

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	15
I. EVALUATION DE LA CONCENTRATION/DILUTION DE L'URINE.	
INTERET DANS L'EXPRESSION DE LA PROTEINURIE EN MEDECINE CANINE.....	17
1) Modes d'expression de la concentration/dilution de l'urine.....	17
a. Osmolalité.....	17
i. Définitions.....	17
ii. Activité osmotique de l'urine.....	17
iii. Avantages et inconvénients de la mesure de l'osmolalité urinaire pour l'évaluation de la concentration urinaire.....	18
b. Densité urinaire.....	19
c. Relations entre densité et osmolalité urinaires.....	19
2) La protéinurie en médecine canine.....	20
a. Mécanismes de l'excrétion physiologique des protéines urinaires.....	21
i. Structure du filtre glomérulaire.....	21
ii. Mécanismes de filtration sélective par le glomérule.....	22
iii. Mécanismes à l'origine de la composition protéique de l'urine définitive.....	23
b. Mécanismes de l'excrétion pathologique des protéines urinaires.....	24
3) L'expression de l'élimination des protéines.....	24
a. La méthode de référence : collecte sur 24 heures.....	24
i. Technique.....	24
ii. Valeurs obtenues.....	25
iii. Avantages.....	27
iv. Inconvénients.....	27
b. Une durée de collecte plus courte.....	27
c. Ratio protéinurie/osmolalité.....	28
d. Correction de la protéinurie par la densité urinaire.....	28

e. Ratio protéinurie/créatininurie (noté U-protéine/créatinine).....	29
i. Origines de la créatinine et élimination urinaire.....	29
ii. Détermination et pertinence de l'utilisation du rapport U-protéine/créatinine.....	30
 II. MATERIEL ET METHODES.....	33
1) Recueil des échantillons.....	33
a. Animaux inclus dans l'étude.....	33
b. Méthodes de recueil des urines.....	33
c. Traitement et conservation des échantillons.....	34
2) Observations, préparation du spécimen et analyses préliminaires.....	34
3) Procédure générale.....	34
4) Techniques analytiques.....	34
a. Mesure de la densité.....	34
i. Calibration.....	35
ii. Vérification des performances.....	35
iii. Analyses.....	35
b. Mesure de l'osmolarité.....	35
i. Calibration.....	36
ii. Vérification des performances.....	36
iii. Analyses.....	36
c. Mesure de la créatininurie	36
i. Calibration.....	36
ii. Vérification des performances.....	37
iii. Analyses.....	37
d. Mesure de la protéinurie.....	37
i. Composition des réactifs.....	37
ii. Conservation des réactifs.....	38
iii. Vérification des performances.....	38
iv. Analyses.....	38
 III. RESULTATS.....	41
1) Contrôles qualité.....	41

2) Les méthodes d'évaluation de la concentration/dilution de l'urine.....	46
a. Mesure de l'osmolarité, de la densité et de la créatininurie.....	46
b. Comparaisons de ces techniques d'évaluation de la concentration/dilution urinaire.....	48
i. Comparaison des mesures de densité et de l'osmolarité.....	48
ii. Comparaison de l'évaluation de la concentration urinaire par créatininurie et par osmométrie ou densité urinaire.....	48
3) Comment évaluer une protéinurie ?.....	51
a. Les ratios.....	51
i. Le ratio U-protéine/créatinine (RPCU).....	51
ii. Le rapport U-Protéines/(Densité- 1) (RPDU).....	53
iii. Evaluation du RPDU normal.....	55
IV. DISCUSSION.....	56
1) Validité de l'étude.....	56
2) Comparaison des méthodes d'évaluation de la concentration urinaire.....	57
3) Utilisation des ratios pour évaluer une protéinurie.....	59
CONCLUSION.....	61
BIBLIOGRAPHIE.....	63

TABLES DES ILLUSTRATIONS

<u>Figure 1</u> : Schéma de l'ultrastructure du « filtre glomérulaire » et de ses principales caractéristiques de filtration.....	22
<u>Figure 2</u> : Structure du filtre glomérulaire en microscopie électronique (rat).....	22
<u>Figure 3</u> : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de l'osmolarité urinaire sur l'échantillon Level 1.....	42
<u>Figure 4</u> : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de l'osmolarité urinaire sur l'échantillon Level 2.....	42
<u>Figure 5</u> : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la densité de l'échantillon Level 1.....	43
<u>Figure 6</u> : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la densité de l'échantillon Level 2.....	43
<u>Figure 7</u> : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la créatininurie de l'échantillon Level 1.....	44
<u>Figure 8</u> : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la créatininurie de l'échantillon Level 2.....	44
<u>Figure 9</u> : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la concentration de protéines dans l'urine.....	45
<u>Figure 10</u> : Répartition des 170 échantillons testés en fonction de l'osmolarité urinaire (U-osmolarité) mesurée.....	46
<u>Figure 11</u> : Répartition des 170 échantillons testés en fonction de la densité urinaire (U-densité) mesurée.....	47
<u>Figure 12</u> : Répartition des 170 échantillons testés en fonction de la créatinine urinaire (U-créatinine) mesurée.....	47
<u>Figure 13</u> : Nuage de points représentant l'agrément de la mesure de la densité urinaire (U-densité-1) et de la mesure de l'osmolarité (U-osmolarité (mOsm/kg)) dans 170 spécimens d'urine de chien.....	48
<u>Figure 14</u> : Nuage de points représentant l'agrément de la mesure de la créatinine urinaire et de la mesure de l'osmolarité dans 170 spécimens d'urine de chien.....	49
<u>Figure 15</u> : Nuage de points représentant l'agrément de la mesure de la créatinine urinaire et de la densité urinaire ((U-Densité-1)*1000) sur 170 spécimens d'urine de chien..	49

<u>Figure 16</u> : Répartition des 170 échantillons testés en fonction du RPCU calculée.....	52
<u>Figure 17</u> : Nuage de points représentant la relation entre les rapports Protéines/(Densité urinaire-1) et Protéines/(Osmolarité Urinaire/1000) dans 169 urines de chiens....	53
<u>Figure 18</u> : Nuage de points représentant la relation entre RPCU et le rapport Protéines/(Osmolarité Urinaire/1000) dans 169 urines de chien.....	54
<u>Figure 19</u> : Distribution des valeurs de Ln RPDU dans 137 urines de chien ayant des RPCU \leq 0,5.....	54
<u>Tableau 1</u> : Excrétion protéique urinaire en 24 heures chez des chiens cliniquement sains...	26
<u>Tableau 2</u> : Limites recommandées par les fabricants des solutions de contrôle.....	40
<u>Tableau 3</u> : Performances des techniques.....	40
<u>Tableau 4</u> : Ensemble des valeurs obtenues lors des mesures réalisées sur les échantillons de contrôle.....	41
<u>Tableau 5</u> : Variations des mesures de l'osmolarité, de la densité-1 et de la créatininurie en fonction de la classe d'osmolarité.....	51

INTRODUCTION

En clinique vétérinaire ou humaine, l'évaluation de la concentration ou de la dilution urinaire est importante pour plusieurs raisons : au plan médical, la concentration de l'urine est un critère important dans l'évaluation de la fonction rénale car elle rend compte de l'aptitude du rein à concentrer ou à diluer l'urine selon les besoins de l'animal ; au plan analytique, elle est essentielle pour l'interprétation des concentrations urinaires de différents analytes urinaires car une polyurie a tendance à réduire leur concentration (Osborne et al., 1995; Watson, 1998). C'est la raison pour laquelle il est préférable de se référer à l'excrétion totale de l'analyte pendant 24 heures. Mais en pratique la collecte des urines de 24 heures est très difficile et les variations de concentration/dilution de l'urine au cours du temps sont telles que pour interpréter la concentration d'un analyte, la concentration d'une urine ponctuelle doit être corrigée. L'osmolarité urinaire est le critère de référence de la concentration/dilution de l'urine (Bovee, 1969), mais n'est pas mesurée en routine.

C'est la créatinine qui est classiquement utilisée comme facteur de correction de la concentration/dilution de l'urine. L'utilisation du rapport U-Analyte/Créatinine se fonde sur l'excrétion supposée quasi constante de la créatinine et donc sur la relation de sa concentration avec l'osmolarité urinaire. Mais la mesure de la créatininurie n'est pas facile en routine et elle fait l'objet de nombreuses variations en fonction des techniques de mesure, de la masse musculaire, de l'exercice physique, de la consommation protéique ou encore de la proximité de la mesure avec un repas (Barsanti et al., 1979; Center et al., 1985; Greenberg et al., 1952; McCaw et al., 1985; Summerill, 1974; Trumel et al., 2004; Uechi et al., 1994), qui sont donc susceptibles d'affecter le rapport U-Analyte/Créatinine.

Il nous a donc semblé utile d'étudier la relation entre U-créatinine et U-osmolarité chez le chien, et également U-Densité, cette dernière étant proportionnelle à U-osmolarité (Bovee, 1969; Dossin et al., 2003; Genetzky et al., 1987; Hendriks et al., 1978), puis à envisager les éventuels effets du facteur de correction utilisé sur l'expression de l'excrétion urinaire des protéines dans les urines ponctuelles de chien.

Après une synthèse de la littérature portant sur l'évaluation de la concentration/dilution de l'urine et de son intérêt dans l'expression de la protéinurie en médecine canine, nous

reportons le protocole expérimental et les résultats obtenus sont discutés dans une dernière partie.

I. EVALUATION DE LA CONCENTRATION/DILUTION DE L'URINE. INTERET DANS L'EXPRESSION DE LA PROTEINURIE EN MEDECINE CANINE

1) Modes d'expression de la concentration/dilution de l'urine

a. Osmolalité

i. Définitions.

L'osmole (Osm) est l'unité de mesure des concentrations de solutés dans une solution, en terme de quantité de particules et non de masse. Une osmole représentant une quantité importante de soluté, la milliosmole (mOsm) est l'unité la plus utilisée en biologie médicale.

L'osmolarité représente la concentration en particules ayant une activité osmotique par volume de solution. Elle s'exprime en milliosmole par litre (mOsm/L) (Bovee, 1969).

L'osmolalité exprime la concentration en particules par rapport à la masse de solvant. Elle est exprimée en milliosmole par kilogramme (mOsm/kg) (Bovee, 1969). En pratique, dans les solutions diluées que sont l'urine et le plasma, osmolalité et osmolarité sont pratiquement égales, et en biologie médicale les deux termes peuvent être utilisés indifféremment car leurs valeurs diffèrent de moins de 1% (Osborne et al., 1995).

L'osmolalité et l'osmolarité sont indépendantes de la taille, de la forme, de la masse moléculaire ou de la charge des particules en solution. Elles ne dépendent que du nombre de ces particules en solution (Bovee, 1969).

ii. Activité osmotique de l'urine

L'activité osmotique des solutions d'un organisme est surtout due aux ions. Les autres particules ont une activité osmotique faible du fait de leur forte masse moléculaire (c'est le cas des protéines) ou de leur faible concentration (c'est le cas du glucose par exemple).

L'activité osmotique de l'urine est majoritairement due au sodium, aux chlorures et à l'urée. Les cellules et les cylindres ne contribuent pas significativement à l'activité osmotique (Osborne et al., 1995). L'urée contribue notablement à l'activité osmotique urinaire bien qu'elle ne soit pas un ion. En effet, elle est produite de façon importante par l'organisme mais elle est éliminée rapidement et efficacement par les reins et se retrouve donc en grande quantité dans les urines. Mais la quantité d'urée présente dans l'urine dépend de l'alimentation de l'individu et de la proximité du dernier repas. Chez l'homme, dont la consommation normale de protéines est inférieure à la consommation protéique d'un chien, la concentration urinaire d'urée varie de 165 à 420 mmol/L (Newman et al., 1999) alors qu'elle est comprise entre 710 et 850 mmol/L chez un chien à jeun (O'Connor et al., 1976; Summerill, 1974). Cela explique largement que l'osmolarité urinaire soit supérieure chez le chien que chez l'homme. Après un repas carné, l'élimination urinaire d'urée augmente de 200 %, avec un pic 4 à 6 heures après le repas. Cette hausse de l'élimination urinaire de l'urée est précédée d'une hausse de l'urémie allant de 30 à 50 % selon les auteurs (Anderson et al., 1969; Finco et al., 1976; O'Connor et al., 1976).

iii. Avantages et inconvénients de la mesure de l'osmolalité urinaire pour l'évaluation de la concentration urinaire.

Les principales raisons expliquant que l'osmolalité soit reconnue comme le marqueur de choix pour évaluer la concentration d'une urine sont rappelées ci-dessous :

- Les mesures effectuées avec un osmomètre sont très précises (Bovee, 1969; Crandell et al., 1973; Osborne et al., 1995; Watson, 1998).
- L'osmolalité ne varie pas ou peu avec la présence de certaines particules, contrairement à la densité urinaire qui augmente lors de protéinurie. Ainsi, l'osmolalité est-elle plus appropriée que la densité urinaire pour évaluer les capacités de concentration urinaire chez les individus atteints de protéinurie (Green, 1978).
- L'osmolalité est un critère capable de détecter plus précisément l'aptitude du rein à concentrer. En effet, lors d'insuffisance rénale avancée on observe parfois une densité urinaire très basse et qui reste constante ; ce phénomène n'a pas été mis en évidence avec l'osmolalité (Bovee, 1969).
- L'osmométrie permet d'évaluer le rapport osmolalité urinaire sur osmolalité plasmatoire qui indique la capacité du rein à produire une urine plus concentrée que le plasma. Ce rapport est

utilisé pour explorer les troubles polyuriques (causés par exemple par une insuffisance rénale ou un diabète insipide) (Bovee, 1969; Green, 1978; Hardy et al., 1979).

Enfin, l'organisme régule ses équilibres hydro-électriques en respectant les lois de l'osmolalité. Ainsi, toute variation de l'osmolalité plasmatique est directement répercutee, par la libération d'ADH, sur l'activité osmotique urinaire.

Le principal inconvénient de l'osmométrie est que la technique de mesure nécessite un matériel coûteux.

b. Densité urinaire

La densité urinaire (relative) correspond au rapport du poids d'un volume donné d'urine sur le poids du même volume d'eau pure à une même température. Cette valeur n'a pas d'unité (Watson, 1998). Ainsi, la densité représente-t-elle la quantité de matière diluée dans l'urine.

La densité urinaire augmente avec la concentration des solutés mais varie avec le type de soluté présent. Par exemple, une augmentation de densité de 0,001 peut être expliquée par un ajout de 1,47g de NaCl ou 2,7g de glucose à 1L d'urine (Watson, 1998). Mais la présence de particules telles qu'un produit de contraste radio-opaque utilisé à visée diagnostique fait aussi varier la densité urinaire (Feeney et al., 1980).

La densité urinaire varie aussi en fonction de la taille ou de la masse moléculaire des solutés et de la température (Osborne et al., 1995; Thornton et al., 1976).

Les principaux avantages de la mesure de la densité urinaire sont sa simplicité, son accessibilité, son faible coût et surtout la bonne estimation qu'elle permet de faire de la concentration urinaire (cf. paragraphe suivant).

c. Relations entre densité et osmolalité urinaires

Plusieurs études chez le veau (Thornton et al., 1976), le chat (Lees et al., 1979) et le chien (Bovee, 1969; Dossin et al., 2003; Genetzky et al., 1987; Hendriks et al., 1978) ont montré

une très étroite relation entre la densité urinaire (U-Densité) et l'osmolalité (U-Osmolalité). Plusieurs équations ont été proposées, par exemple :

- Hendriks et al. (Hendriks et al., 1978) ont mis en évidence une forte corrélation ($r=0.99$) chez 56 chiens (valeurs mesurées entre 1.002 et 1.050) avec l'équation suivante :

$$U\text{-Osmolalité (mOsm/kg)} = 3,60 \times 10^4 \times (U\text{-densité} - 1)$$

- Dossin et al. (Dossin et al., 2003) ont comparé l'osmométrie avec trois méthodes de mesure de la densité urinaire (la réfractométrie, les bandelettes urinaires et la pesée), sur 182 urines de chiens. Ils ont obtenu une relation quasi linéaire entre la densité urinaire obtenue par réfractométrie et l'osmolalité, très voisine de celle calculée par Hendriks :

$$U\text{-osmolalité (mOsm/kg)} = 36646(34318/38974) \times (U\text{-densité} - 1) + 25(-39/88)$$

Dans cette dernière étude, il a aussi été déterminé qu'il y a une corrélation plus forte entre l'osmolalité et la densité urinaire mesurée par réfractométrie ($r = 0,92$) qu'entre l'osmolalité et la densité urinaire mesurée par pesée ($r = 0,82$) ou par l'utilisation de bandelettes urinaires ($r = 0,27$).

Les études (Dossin et al., 2003; van Vonderen et al., 1995) ayant comparé les valeurs de densité urinaire obtenues par l'utilisation de bandelettes urinaires et par osmométrie ont démontré que ces bandelettes réactives donnent une mauvaise estimation de la densité urinaire.

2) La protéinurie en médecine canine

Les protéines sont des constituants normaux des urines des carnivores domestiques mais elles sont normalement indétectables par les méthodes analytiques de routine, excepté dans les urines concentrées. On ne parle donc de protéinurie que lorsque des protéines sont détectées dans les urines par les méthodes de routine. Chez le chien, les pertes protéiques urinaires « normales » en 24 heures sont très variables selon les méthodes et les études : inférieures à 38mg/24h (Barsanti et al., 1979), 13,9mg/kg/24h (DiBartola et al., 1980), ou encore inférieures à 10 mg/kg/24h (Biewenga et al., 1982), ce qui correspond à des concentrations atteignant 0.3 à 0.5 g/L.

La principale structure rénale impliquée dans l'excrétion sélective des protéines est le glomérule. Toute altération de celui-ci ou des structures rénales de filtration peut être à l'origine d'une excrétion protéique qualitativement ou quantitativement anormale.

Les bases biologiques de l'excrétion des protéines seront décrites ici brièvement, en se fondant sur quelques revues de synthèse (Braun et al., 1996; DiBartola et al., 1980; Grauer, 1985; Pages et al., 1990).

a. Mécanismes de l'excrétion physiologique des protéines urinaires

i. Structure du filtre glomérulaire

Le filtre glomérulaire (Figures 1 et 2) est fondé sur les caractéristiques du diaphragme des fentes de filtration entre les pédicelles des podocytes. Pour passer du plasma à l'urine primitive les protéines doivent franchir trois couches :

- du côté vasculaire : les cellules de l'endothélium des capillaires glomérulaires qui sont fenêtrées de pores (de 50 à 100 nm de diamètre) et partiellement couvertes par un glycocalyx, donc chargées négativement.
- le feuillet pariétal de la capsule glomérulaire : une membrane basale, composée de trois couches : la lamina rara interna, la lamina densa et la lamina rara externa. Cette basale est épaisse de 110 à 190 nm et est fortement électronégative (collagène, sulfates de glycosaminoglycans,...)
- le feuillet viscéral de la capsule glomérulaire : une couche discontinue de podocytes desquels se détachent des expansions cytoplasmiques (les pédicelles, ou pieds des podocytes) ; celles-ci s'appliquent, en s'intriquant les unes avec les autres, sur la face externe de la basale des capillaires.

Les fentes de filtration situées entre les pédicelles des podocytes sont couvertes par un glycocalyx et des protéines synthétisées uniquement par les podocytes, qui forment un diaphragme entre deux podocytes voisins. Ce diaphragme est formé d'un arrangement de protéines disposées à la manière d'une fermeture éclair laissant des pores dont la taille détermine les caractéristiques de filtration du glomérule rénal.

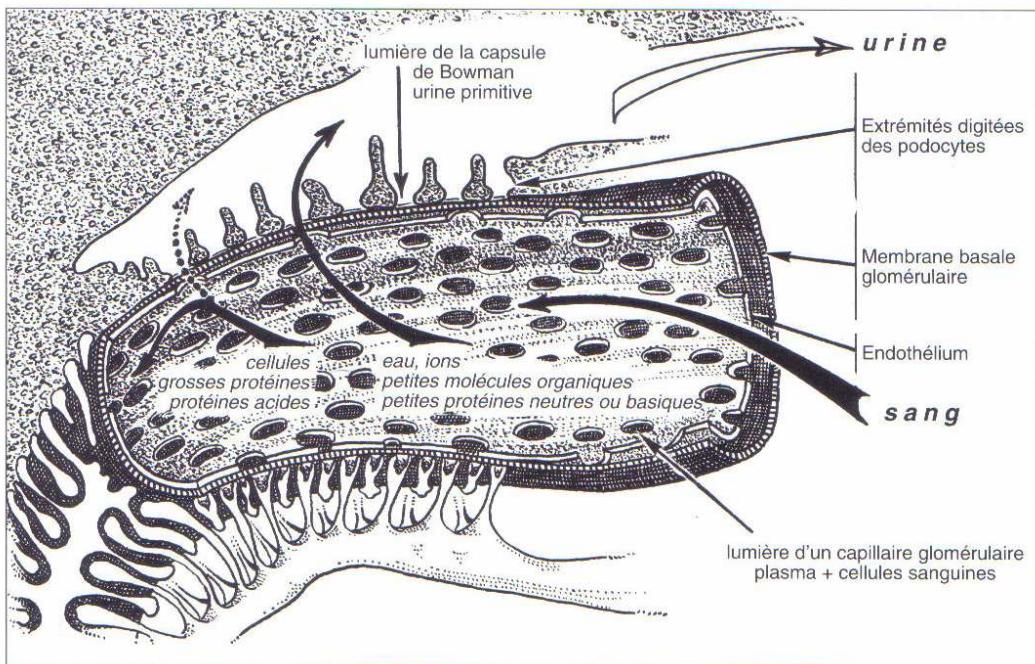


Figure 1 : Schéma de l'ultrastructure du « filtre glomérulaire » et de ses principales caractéristiques de filtration (Braun et al., 1996). Publiée avec l'aimable autorisation de l'éditeur.



Figure 2 : Structure du filtre glomérulaire en microscopie électronique (rat)

1 : podocyte ; 2 : pédicelle qui s'entrelace avec les pédicelles des podocytes voisins ; 3 : Fente de filtration qui relie les pédicelles voisins, avec le diaphragme qui forme la dernière barrière entre le sang et l'urine. (www.biology.buffalo.edu/.../tsui/ct_1.jpg)

ii. Mécanismes de filtration sélective par le glomérule

Plusieurs facteurs peuvent expliquer qu'une protéine puisse franchir ou non le filtre glomérulaire :

- la masse moléculaire : elle semble être l'un des plus importants facteurs limitant le passage du filtre glomérulaire. Une molécule de masse relative (Mr) supérieure à 70 000 n'est pas filtrée. L'albumine, de Mr 68 000, n'est que faiblement filtrée en raison de son électronégativité et est partiellement réabsorbée dans le tubule proximal, elle ne se retrouve donc qu'à l'état de traces dans l'urine chez un sujet en bonne santé. Pour ces raisons, elle est considérée comme jouant le rôle de « protéine seuil » de la capacité de filtration rénale. Par ailleurs, des molécules de taille inférieure au seuil de filtration peuvent ne pas être filtrées par le glomérule si elles sont transportées par des protéines de plus grosse taille. (Exemple : l'hémoglobine liée à l'haptoglobine).

- les interactions électrostatiques : les différentes couches du filtre étant fortement électronégatives, elles repoussent les protéines qui sont majoritairement des anions au pH du sang (voisin de 7,4) et facilitent la filtration des polycations.

- les facteurs hémodynamiques : la vitesse et la pression sanguines dans les artéries glomérulaires influent aussi sur l'excrétion rénale normale des protéines, qui est augmentée lors d'hypertension.

Ainsi, étant donnés les mécanismes de filtration sélective du glomérule, l'urine primitive renferme toutes les protéines plasmatiques de $\text{Mr} < 70000$, à l'exception de celles qui ont un pI bas et qui donc, comme l'albumine, portent de fortes charges négatives à pH 7,4.

iii. Mécanismes à l'origine de la composition protéique de l'urine définitive

Les protéines filtrées ne se retrouvent pas toutes dans l'urine définitive. En biologie humaine (Le Bricon, 2001), il a été montré que les facteurs de variations de la composition protéique de l'urine définitive sont :

- les cellules épithéliales du tubule proximal réabsorbent certaines protéines par endocytose, les catabolisent et les produits de dégradation sont reversés dans la circulation générale.
- la branche ascendante de l'anse de Henlé, le tubule contourné distal ou le tube collecteur sécrètent certaines protéines, par exemple, chez l'homme, les protéines de Tamm Horsfall, l'urokinase, les IgA sécrétaires. Chez le chien, il a été montré, à partir de culture de cellules rénales que celles-ci sont capables de sécréter l'urokinase (Canipari et al., 1992; Lewis, 1979; Vigorito et al., 1965). D'autre part, une analyse immunohistochimique de reins a noté que la distribution de cette protéine est identique à celle connue chez l'homme (Bailey et al., 2006).

Les protéines de Tamm Horsfall sont essentiellement sécrétées par la branche ascendante de l'anse de Henlé et le tube contourné distal (Raila et al., 2003; Raila et al., 2003; Schweigert et al., 2002). En ce qui concerne la sécrétion rénale d'IgA sécrétoires aucune donnée spécifique au chien n'a été trouvée.

b. Mécanismes de l'excrétion pathologique des protéines urinaires

Un document de consensus de l'American College of Veterinary Internal Medicine - ACVIM (Lees et al., 2005) propose une classification des protéinuries en trois catégories, en fonction de leur cause :

- « - pré-rénale : due à une composition anormale des protéines plasmatiques qui traversent le filtre glomérulaire qui a conservé une sélectivité de filtration normale.
- rénale : due à un dysfonctionnement organique, d'origine fonctionnelle ou lésionnelle, qui laisse passer les protéines plasmatiques normales dans l'urine définitive
- post-rénale : due à l'entrée de protéines dans l'urine après qu'elle soit passée dans le bassinet. Ces protéines peuvent provenir ou non du tractus urinaire. »

3) L'expression de l'élimination des protéines

a. La méthode de référence : collecte sur 24 heures

i. Technique

Cette technique est décrite par de nombreux auteurs qui se fondent toujours sur le même principe décrit ci-dessous (DiBartola et al., 1980).

Une analyse urinaire quantitative nécessite la récolte de toute l'urine produite en un temps donné. Une collecte d'urine sur 24 heures minimise la variabilité des résultats obtenus lors de des périodes de collecte plus courtes.

Au début de la collecte, la vessie de l'animal est vidée par cystocentèse, sondage ou miction et une échographie confirme que la vessie est bien vide. Puis, l'animal est placé dans une cage à métabolisme qui permet la récolte de toute l'urine émise pendant les 24 prochaines heures. Au bout de cette période, la vessie est à nouveau vidée et l'urine recueillie est ajoutée à l'urine récupérée dans la cage à métabolisme pendant les heures précédentes.

Le volume d'urine ainsi obtenue en 24 heures est mesuré, homogénéisé et divisé en aliquotes sur lesquelles sont réalisées les analyses. La quantité totale de protéines urinaires éliminées en 24 heures est obtenue en multipliant le volume urinaire produit en 24 heures par la concentration en protéines de l'aliquote analysée.

ii. Valeurs obtenues

Selon la méthode utilisée pour doser les protéines urinaires, les auteurs ou l'âge du chien la quantité de protéines excrétées en 24 heures est très variable (Tableau 1).

Tableau 1 : Excrétion protéique urinaire en 24 heures chez des chiens cliniquement sains.

Méthode analytique	Auteurs	Caractéristiques des chiens étudiés	Protéinurie (mg/kg/24h) : moyenne (\pm SD)
Bleu de Coomassie	Barsanti et al. (Barsanti et al., 1979)	- 5 femelles et 5 mâles (beagles) - Age : un an - Poids : 10 kg	7,0 (\pm 4,9)
Bleu de Coomassie	McCaw et al. (McCaw et al., 1985)	- 7 mâles et 7 femelles - Age : de 0,5 à 10 ans - Poids : de 14,5 à 37,5 kg.	7,6 (\pm 5,47)
Bleu de Coomassie	Grauer et al. (Grauer et al., 1985)	- 8 mâles et 8 femelles (beagles) - Age : de 9 à 11 mois - Poids : entre 5,9 et 15,5 kg	2,3 (\pm 1,0)
Bleu de Coomassie	Laroute et al. (Laroute et al., 2005)	- 10 beagles femelles - Age : de 6 à 9 ans - Poids : 13,6 +/- 2,5 kg	48 (\pm 68,4)
Bleu de Coomassie	Laroute et al. (Laroute et al., 2005)	- 10 beagles mâles - Age : de 65 à 68 jours - Poids : 3,0 +/- 0,63 kg	6 (\pm 1,9)
Bleu de Coomassie	Lane et al. (Lane et al., 2000)	- 3 mâles et 3 femelles (beagles) - Age : de 9 semaines au début de l'étude et de 27 semaines à la fin	5 (\pm 2,2)
Ponceau S	Barsanti et al. (Barsanti et al., 1979)	- 5 femelles et 5 mâles (beagles) - Age : 1 an - Poids : 10 kg	3,8 (\pm 4,1)
Ponceau S	Biewenga et al. (Biewenga et al., 1982)	- 23 femelles et 6 mâles - Age : de 6 à 120 mois - Poids : de 8,4 à 34,4 kg	6,6
Ponceau S	White et al. (White et al., 1984)	- 3 mâles et 5 femelles - Age : de 6 mois à 4 ans - Poids : de 20,9 à 29 kg	4,8
Turbidimétrie	Center et al. (Center et al., 1985)	- 16 femelles, 3 mâles	2,5
Electrophorèse	DiBartola et al. (DiBartola et al., 1980)	- 11 femelles et 6 mâles - Age : adulte - Poids : de 7,6 à 45 kg (moyenne de 22 +/- 12 kg)	13,9 (\pm 7,71)

iii. Avantages

Les principaux avantages de la détermination de la protéinurie par collecte d'urine sur 24 heures sont résumés ci-dessous.

- Cette méthode est reconnue comme la méthode « standard », la plus fiable pour quantifier et qualifier la protéinurie (Finco, 1995 ; Wilson et al., 1993).
- D'autres données, telle que la clairance de la créatinine endogène, peuvent être obtenues si la créatininémie est mesurée simultanément (Finco, 1995).
- La mesure d'autres variables telles que l'osmolarité, la densité ou la quantité d'ions éliminés en 24 heures permet d'avoir des valeurs plus représentatives de la réalité que des valeurs obtenues à partir de mictions ponctuelles.

iv. Inconvénients

Les principaux inconvénients de cette méthode résumés par Finco (Finco, 1995) :

- Comme indiqué dans un paragraphe précédent les valeurs physiologiques sont très variables selon les études (Tableau 1).
- La cage à métabolisme est coûteuse.
- Les animaux sont stressés.
- Une collecte d'urine sur 24 heures demande beaucoup de temps et de personnel.
- Si l'urine est collectée par sondage, il y a un risque pour l'animal de contracter une infection urinaire.

b. Une durée de collecte plus courte

Certains auteurs ont proposé de collecter les urines sur des périodes plus courtes. Le résultat de la mesure de la concentration en créatinine urinaire de cet échantillon (en mg/mL) est multiplié par le débit urinaire (en mL/min) pour donner un résultat d'excrétion protéique en mg/min. Il suffit ensuite de multiplier ce résultat en mg/min par 1440 pour estimer l'excrétion protéique en 24h (Epstein et al., 1979). Dans leur étude, Epstein et al. (Epstein et al., 1979) ont ainsi trouvé une excrétion protéique d'environ 38,4 mg/kg/24h chez vingt-six chiens pesant en moyenne 13,5 kg et au repos. Mais, ils ont aussi montré une grande variation de

l'excrétion protéique (allant de 0,07 à 1,71 mg/min) selon que le chien avait fait de l'exercice ou non.

Dans une revue de biochimie humaine, Price et al. (Price et al., 2005) proposent aussi de remplacer la collecte d'urine sur 24 heures par une durée de collecte plus courte. Mais cette proposition n'a pas été retenue car des études montrent des variations d'excrétion protéique quotidienne allant de 100 à 500 %.

Face aux difficultés pratiques de la collecte d'urine sur 24 heures et de la variabilité de l'excrétion protéique au cours de la journée, des méthodes plus simples d'évaluer l'excrétion protéique totale ont été imaginées. Le but de ces méthodes est de gommer l'effet de la concentration/dilution de l'urine lors de l'interprétation d'une protéinurie et donc d'avoir une estimation de l'élimination protéique urinaire totale en 24 heures. Ces techniques d'estimation sont fondées sur la création de ratios, dont les principes sont décrits dans les paragraphes suivants.

c. Ratio protéinurie/osmolalité

L'osmolalité est la méthode la plus appropriée pour évaluer la concentration urinaire (cf. paragraphes précédents). Ainsi, le ratio protéine (en mg/L) / Osmolalité (mOsm/kg) pourrait être le plus adapté pour corriger les effets de l'état d'hydratation de l'animal lors d'une mesure de protéinurie sur un prélèvement d'urine ponctuel.

En biologie humaine, Wilson, et al. (Wilson et al., 1993) ont établi plusieurs formules de régression linéaire montrant que le ratio U-protéine/osmolalité est fortement corrélé à la protéinurie en 24 heures. Ils ont aussi proposé qu'une valeur du ratio inférieure ou égale à 0,12 soit considérée comme normale, car c'est la valeur limite pour laquelle la spécificité et la sensibilité sont les meilleures (respectivement 93 % et 96 %).

Bien que la mesure de l'osmolarité soit très simple, elle est très peu réalisée en pratique, probablement en raison du coût d'acquisition du matériel qui semble hors de proportion avec l'intérêt du résultat obtenu.

d. Correction de la protéinurie par la densité urinaire

Les deux principaux intérêts de comparer la protéinurie à la densité urinaire sont :

- en clinique, la densité urinaire est une méthode plus simple d'obtenir une évaluation de la concentration/dilution de l'urine que l'osmolalité, et la corrélation entre la densité et l'osmolarité est très forte (Bovee, 1969; Dossin et al., 2003; Genetzky et al., 1987; Hendriks et al., 1978; Lees et al., 1979; Thornton et al., 1976).

- il a été montré, chez l'homme, que la densité urinaire est moins variable sur 24 heures (CV de 34,9 %) que le volume urinaire émis (CV de 77,1 %) ou que l'excrétion en créatinine en 24 heures (CV de 94 %) (Newman et al., 2000). Mais, cette même étude a montré que le volume d'urine émise en 24 heures est plus fortement corrélé à la créatininurie qu'à la densité urinaire.

e. Ratio protéinurie/créatininurie (noté U-protéine/créatinine)

i. Origines de la créatinine et élimination urinaire

L'apport alimentaire de la créatinine est très faible chez le chien. En effet, dans l'alimentation industrielle animale les concentrations en créatine et en créatinine sont faibles, de l'ordre de 0,5 à 2,0 µmol/g (Harris et al., 1997). La créatinine résulte essentiellement d'une dégradation de la créatine et de la créatine phosphate musculaires, qui est spontanée, irréversible, non-enzymatique et a lieu dans les cellules musculaires. La conversion de la créatine en créatinine a lieu à un rythme constant et consomme quotidiennement environ 2% de la créatine totale de l'organisme (Braun et al., 2003 ; Finco, 1995).

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

- La créatinine est filtrée librement par le glomérule, sa concentration dans le filtrat glomérulaire est donc égale à sa concentration plasmatique (Finco, 1995; Shannon et al., 1932).
- Chez le chien, les tubules proximaux sécrètent de la créatinine mais en quantité considérée comme négligeable (O'Connell et al., 1962; Shannon et al., 1932 ; Swanson et al., 1962; Watson et al., 2002).
- La synthèse de créatinine est indépendante du sexe et ne dépend que de la masse musculaire (McCaw et al., 1985; Uechi et al., 1994). C'est pourquoi l'apport de créatinine au plasma est constant, donc que la créatininémie est approximativement stable (excepté en phase post-

prandiale). Par conséquent, la quantité éliminée par voie urinaire serait pratiquement constante dans le temps ; ce qui est cependant discutable (cf. infra, (Uechi et al., 1994)).

On estime donc que la créatininurie est une fonction inverse de la concentration urinaire. On se fonde sur cette hypothèse pour corriger l'effet de la concentration/dilution de l'urine sur la concentration urinaire d'un analyte en rapportant cette concentration à la concentration urinaire en créatinine (ratio U-Analyte/U-Créatinine) (Grauer et al., 1985).

ii. Détermination et pertinence de l'utilisation du ratio U-protéine/créatinine (RPCU)

Plusieurs études chez le chien ont montré que le ratio U-protéine/créatinine établi à partir d'un prélèvement unique d'urine permet une estimation de l'excrétion protéique urinaire en 24 heures.

Chez le chien en bonne santé de nombreux auteurs (Barsanti et al., 1979 ; Grauer et al., 1985 ; McCaw et al., 1985 ; White et al., 1984) ont démontré la forte corrélation entre le RPCU et la quantité de protéines éliminées en 24. Dans la plupart des études, le coefficient de corrélation a été supérieur à 0,95 : White et al. (White et al., 1984) ; Grauer et al. (Grauer et al., 1985) ; McCaw et al. (McCaw et al., 1985).

A partir de ces études, il a été décidé qu'un ratio inférieur à 0,5 est « normal » ; un ratio compris entre 0,5 et 1 est douteux et un ratio supérieur à 1 est anormal (Lulich et al., 1990).

Ce ratio est couramment utilisé pour évaluer l'excrétion protéique urinaire mais de nombreuses variations de l'excrétion urinaire en créatinine ou en protéines ont été rapportées.

L'excrétion totale de créatinine urinaire varie beaucoup selon les études : de 170 à 425 µmol/kg/jour (Barsanti et al., 1979; Center et al., 1985; Greenberg et al., 1952; Uechi et al., 1994). Ces variations pourraient s'expliquer par la composition protéique des aliments consommés, par les techniques de mesure utilisées (Trumel et al., 2004) ou par des variations inter-individuelles comme mises en évidence, chez l'homme, par Vestergaard et al. (Vestergaard et al., 1958) lors d'une étude sur dix-huit sujets. Les variations de la concentration urinaire en créatinine sont encore plus grandes (de 4,7 à 42,0 mmol/L) à cause

de la concentration/dilution de l'urine (Barsanti et al., 1979; Center et al., 1985; McCaw et al., 1985).

D'après Uechi (Uechi et al., 1994), la concentration en créatinine urinaire chez le chien augmente d'environ 20 à 25% après la prise alimentaire. D'après Summerill (Summerill, 1974), chez le chien, la clairance urinaire de la créatinine augmente d'environ 40 %, 2 à 4 heures après le repas.

Il a été démontré, chez le mouton une variation de la clairance rénale de créatinine en fonction de la saison (Nawaz et al., 1984). De telles variations saisonnières n'ont pas été rapportées chez le chien.

Certaines études rapportent que chez les mâles l'excrétion protéique urinaire et la créatininurie normales sont supérieures aux protéinurie et créatininurie des femelles (Grauer et al., 1985; Wilson et al., 1993), ce qui pourrait avoir une influence sur les valeurs « normales » du RPCU.

La protéinurie et la créatininurie varient de façon linéaire en fonction du poids de l'animal, l'effet de ce paramètre devrait donc s'annuler lors du calcul de RPCU (DiBartola et al., 1980; Grauer et al., 1985).

Les humains pratiquant une activité physique importante ont une excréition urinaire en créatinine supérieure à celle des personnes n'ayant pas d'activité physique (Newman et al., 2000; Xin et al., 2004). Il a aussi été établi chez le chien que l'excrétion protéique urinaire augmente après l'exercice physique (Epstein et al., 1979). Seule une étude, chez le chien, n'a pas mis en évidence de variation du RPCU en fonction de l'exercice physique (McCaw et al., 1985). Cette même étude n'a pas établi d'influence de l'heure de collecte sur le RPCU.

Chez le chiot (de 2 mois), il semblerait que l'excrétion protéique urinaire quotidienne soit inférieure à l'excrétion protéique en 24 heures d'un adulte mais la variation inter-individuelle est moins importante chez le chiot (24%) que chez l'adulte (35%) (Laroute et al., 2005). Une étude portant sur des chiots de 9 à 27 semaines a montré une baisse progressive de la clairance de la créatinine et de la protéinurie avec l'âge, les plus fortes valeurs étant observées à l'âge de 9 semaines (Lane et al., 2000).

Chez les chiens ayant une protéinurie pathologique d'origine rénale (Center et al., 1985; McCaw et al., 1985), la relation entre l'excrétion protéique en 24 heures et le rapport U-protéines/créatinine est étroite mais la dispersion est plus importante que chez les animaux sains.

Chez les chiens souffrant d'une inflammation ou d'une infection du tractus urinaire, ou si le prélèvement urinaire est très contaminé par du sang, le ratio U-protéine/créatinine ne peut pas être utilisé pour diagnostiquer une protéinurie rénale (Bagley et al., 1991).

II. MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude prospective qui s'est déroulée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) entre Décembre 2006 et Mars 2007.

Le but de cette étude a été de comparer les résultats de l'évaluation de la concentration/dilution de l'urine de chien mesurée par l'osmométrie à l'estimation de la obtenue par la mesure de la densité urinaire ou la créatininurie.

Cette étude a visé à établir, prioritairement d'éventuelles relations entre :

- densité urinaire et créatininurie
- rapport U-(Protéines/Créatinine) et rapport U-(Protéines/Densité)

1) Recueil des échantillons

a. Animaux inclus dans l'étude

Les animaux inclus dans cette étude étaient les chiens présents sur les sites de l'ENVT entre Décembre 2006 et Mars 2007. Ces animaux, en bonne santé ou non, étaient présentés aux cliniques de l'ENVT pour une consultation, une hospitalisation ou appartenaient aux élèves de l'ENVT. Il n'a pas été tenu compte du sexe, de la race ou de l'état de santé de l'animal, seul a été renseigné l'âge en mois du chien.

b. Méthodes de recueil des urines

Les urines ont été recueillies par différentes méthodes selon les chiens. La majorité des prélèvements a été faite par miction spontanée, à l'aide d'une barquette en plastique et de la collaboration de l'animal. Pour les animaux dont la démarche diagnostique nécessitait une cystocentèse échoguidée, ce mode de prélèvement a été utilisé.

Le seul critère d'inclusion du prélèvement urinaire a été son volume, qui devait être au moins égal à 3 mL. Certains chiens ont été inclus plusieurs fois dans l'étude mais les prélèvements étaient séparés d'au moins 24 heures. Les prélèvements ont été identifiés, la date et l'heure du prélèvement ont été notées.

c. Traitement et conservation des échantillons

Tout spécimen sélectionné a été conditionné dans un tube à hémolyse en polypropylène avec un bouchon et enregistré dans le cahier de laboratoire dans l'ordre d'arrivée ; ce numéro (sous la forme UPC1, UPC2, UPC3,...) a été porté sur le tube avec un marqueur ineffaçable et a servi d'identifiant pour toute l'étude.

2) Observations, préparation du spécimen et analyses préliminaires

L'urine a été centrifugée (Universal 16A, Hettich, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) à 2 500 g pendant 5 min ; le surnageant a été placé dans un nouveau tube portant le numéro du spécimen ; le culot a été jeté.

La couleur et la transparence de l'urine ont été notées et une analyse par bandelette a été effectuée avec lecture automatique (Clinitek 500 Urine Chemistry Analyser ; Bayer, USA) dont le résultat imprimé a été identifié et collé dans le cahier de laboratoire.

Le spécimen a été conservé au réfrigérateur, au maximum quarante-huit heures, jusqu'à analyse.

3) Procédure générale

Pour chaque spécimen, les déterminations suivantes ont été effectuées :

- mesure de la densité avec un réfractomètre
- mesure de l'osmolarité urinaire avec un osmomètre à point de congélation
- mesure de la créatininurie avec l'automate Vitros 250
- mesure de la protéinurie avec une technique manuelle au rouge de pyrogallol

4) Techniques analytiques

a. Mesure de la densité

Le réfractomètre utilisé dans cette étude est un réfractomètre clinique SPR T2, Atago CO., Centravet, Pludno (Tokyo, Japon).

i. Calibration

Au début de chaque série de mesures, le calibrage du réfractomètre a été effectué avec de l'eau distillée de densité égale à 1,000 et corrigé si nécessaire avec la vis située à l'avant de l'oculaire.

ii. Vérification des performances

Avant chaque série de mesures la densité des deux solutions de contrôle Liquicheck (Liquicheck Urinanalysis Control 1 et Control 2, Bio-Rad laboratories, Irvine, CA, United States, Lot 61241) a été mesurée deux fois. Les résultats de ces mesures ont été notés sur la feuille de contrôle du jour. S'ils étaient dans les limites recommandées par le fabricant (Tableau 2) les mesures sur les urines étudiées pouvaient commencer, sinon l'appareil était contrôlé.

iii. Analyses

Avant chaque mesure, le réfractomètre a été nettoyé avec de l'eau distillée et séché avec un papier absorbant.

Toutes les mesures ont été réalisées à la température du laboratoire, environ 20°C.

Une goutte d'environ 50 µL a été déposée au milieu du prisme du réfractomètre et la densité a été lue sur l'échelle SG. Chaque mesure a été réalisée deux fois. Les résultats ont été notés dans le cahier de laboratoire.

b. Mesure de l'osmolarité

L'osmomètre utilisé dans cette étude est un osmomètre à abaissement du point de congélation Autocal 13 Hermann Roebling Messtechnick (Berlin, Allemagne).

i. Calibration

Au début de chaque série de mesures, le calibrage du point zéro de l'osmomètre a été effectué avec de l'eau distillée et le calibrage du point 300 mOsm/kg a été réalisé avec la solution standard Roebling (Solution Standard for Osmometer – 300 mOsmol/kg H₂O, Katteweg 32, D-14129 Berlin, lot n° 2212C42)

ii. Vérification des performances

Avant chaque série de mesures l'osmolarité des deux solutions de contrôle Liquicheck (solutions Liquicheck Urinanalysis control 1 et control 2, Bio-Rad laboratories, Irvine, CA, United States, Lot 61241) a été mesurée deux fois. Les quatre résultats de ces mesures ont été notés sur la feuille de contrôle du jour. S'ils étaient dans les limites recommandées par le fabricant (Tableau 2) les mesures sur les urines étudiées ont commencé.

iii. Analyses

Avant de procéder à la série de mesures, l'osmomètre était mis à « chauffer » 30 minutes.

Toutes les mesures ont été réalisées à la température du laboratoire, environ 20°C.

Les mesures ont été faites comme recommandé par le fabricant sur 100 µL d'urine dans un tube Eppendorf. Chaque mesure a été répétée deux fois. Les résultats ont été notés dans le cahier de laboratoire.

c. Mesure de la créatininurie

L'analyseur utilisé dans cette étude est un analyseur Vitros 250, Ortho-clinical Diagnostics (Bucks, Royaume-Uni).

i. Calibration

Le calibrage de l'analyseur a été réalisé, comme recommandé par le fabricant, avec le coffret de solutions Calibrator (Vitros Products Chemistry, Ortho-Clinical Diagnostics, Bucks, Royaume-Uni, Référence 188 2208) et vérifié à l'aide de deux solutions de contrôle (solution

I : Vitros Products Chemistry, orth-clinical Diagnosis, Bucks, Royaume-Uni, Référence 823 1474 et solution II : Vitros products Chemistry, orth-clinical Diagnosis, Bucks, Royaume-Uni, Référence 806 7324) sur lesquelles la créatininurie a été mesurée deux fois.

ii. Vérification des performances

Avant chaque série de mesures, la créatiniurie des deux solutions de contrôle Liquicheck (solutions Liquicheck Urinanalysis control 1 et control 2, Bio-Rad laboratories, Irvine, CA, United States, Lot 61241) a été mesurée deux fois. Les résultats de ces mesures ont été notés sur la feuille de contrôle du jour. Il n'y a pas de valeurs limites pour la créatininurie.

iii. Analyses

Toutes les mesures ont été réalisées à la température du laboratoire, environ 20°C.

Les urines ont été diluées manuellement au 1/41 en versant 20 µL d'urine dans 800 µL d'eau distillée puis en homogénéisant au vortex. Les deux pipettes utilisées pour cette dilution ont été préalablement vérifiées et n'ont servi qu'à cette manipulation pendant toute la durée de l'étude. Chaque mesure a été réalisée deux fois. La photocopie de la feuille de résultats de l'analyseur a été conservée et les résultats ont été notés dans le cahier de laboratoire.

d. Mesure de la protéinurie

i. Composition des réactifs

Le dosage des protéines au rouge de pyrogallol a été effectué au moyen d'un coffret de réactifs disponible dans le commerce (Coffret Protéines Urinaires, SOBIODA, Montbannot, France, Référence 1200.020). Ce coffret comprend :

- 200 mL de réactif au rouge de pyrogallol tamponné à pH 2,5 contenant 15 mmol de rouge de pyrogallol et 10 mmol de molybdate de sodium,
- 5 mL d'urine de contrôle (URITROL) contenant de l'albumine et des globulines humaines dans de l'urine lyophilisée humaine,

- 3 mL de calibrant (URICAL) constitué d'urine liquide humaine stabilisé (issue d'un pool de donneurs malades ayant une concentration endogène en protéines de 1g/L) et d'un conservateur : l'azide de sodium.

ii. Conservation des réactifs

Le réactif contenant le rouge de pyrogallol a été conservé à température ambiante jusqu'à la date de péremption indiquée par le fabricant.

Après reconstitution avec 5 mL d'eau distillée, l'urine de contrôle a été répartie en aliquotes de 100 µL congelées à – 20°C au maximum deux mois, selon les recommandations du fabricant. Le calibrant (URICAL Coffret Protéines Urinaires, SODIBA, France, Référence 1200.020) a été conservé à 4°C au maximum un mois, selon les recommandations du fabricant.

iii. Vérification des performances

- Avant chaque série de mesures la protéinurie de la solution de contrôle Uritrol a été mesurée deux fois. Les résultats de ces mesures ont été notés sur la feuille de contrôle du jour. S'ils étaient dans les limites recommandées par le fabricant (Tableau 2) les mesures sur les urines étudiées ont pu commencer.
- La protéinurie des deux solutions de contrôle Liquicheck (solutions Liquicheck Urinanalysis control 1 et control 2, Bio-Rad laboratories, Irvine, CA, United States, Lot 61241) a été mesurée deux fois et les résultats ont été notés sur la feuille de contrôle du jour. Il n'y a pas de valeurs limites pour la protéinurie de ces solutions.

iv. Analyses

Dans des cuves jetables contenant 750 µL de réactif, ont été rajoutés, après la mise à la température ambiante et homogénéisation :

- 10 µL d'eau distillée pour constituer le « blanc »
- ou 10 µL de calibrant pour constituer l' « échalon »
- ou 10 µL d'urine de contrôle pour constituer le « contrôle positif »
- ou 10 µL de l'urine à tester (spécimen).

Après homogénéisation par retournement et incubation de 10 minutes à température ambiante, l'absorbance (notée A) a été mesurée au moyen d'un spectrophotomètre (S500, Secomam, Sarcelles, France). La concentration en protéines de l'échantillon a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Protéinurie (g/L)} = (\text{A spécimen} - \text{A blanc}) / (\text{A étalon} - \text{A blanc})$$

Si la concentration en protéines urinaires était supérieure à 1,5 g/L (limite de linéarité annoncée par le fabricant ; Tableau 3) l'urine était diluée au ½ et les mesures refaites. Le facteur de dilution a été pris en compte dans le résultat final. La protéinurie de chaque spécimen a été mesurée deux fois, voire trois si l'écart entre les deux valeurs obtenues était trop important (Tableau 3). Les résultats ont été notés dans le cahier de laboratoire.

Tableau 2 : Limites recommandées par les fabricants des solutions de contrôle

Liquicheck	Level 1	Level 2
Densité (réfractomètre)	1,009 – 1,014	1,018 – 1,027
Osmolarité en mOsm/kg (osmomètre)	333 - 499	620 - 930
Uritrol Protéines urinaires en g/L (spectrophotomètre)	0,30 – 0,42	

Tableau 3 : Performances des techniques.

* : D'après la fabricant ; ** : Calculé d'après les données du fabricant ; *** : D'après (Leroy, 2006-TOU 3, 4116.) ; **** : Décidé arbitrairement.

Analyte	Limite de quantification	Limite de linéarité	CV inter-séries	Différence analytique
Créatinine (Vitros)	4 µmol/L après dilution*	1459 µmol/L après dilution*	2,9 %*	8,0 %**
Protéines (Spectrophotomètre)	0,060 g/L*	1,5 g/L*	3,0 % à 0,37 g/L***	8,3 %**
Osmolarité (Osmomètre)	0 mOsm/kg*	2500 mOsm/kg*	0,25 % à viscosité basse*	0,7 %**
Densité (Réfractomètre)				0,002****

III. RESULTATS

1) Contrôles qualité

La comparaison des résultats nécessite de s'assurer de la reproductibilité de ceux-ci, ce qui a pu être fait en analysant systématiquement des urines de contrôle, en l'occurrence humaines car des urines de contrôle animales ne sont pas commercialisées. Toutes les analyses ont systématiquement été doublées sur deux échantillons de contrôle, l'un fortement concentré (Level 2), l'autre dilué (Level 1) ; en outre, la protéinurie a été mesurée en double sur l'échantillon de contrôle Uritrol. Au total 18 contrôles ont été effectués. Toutes les mesures obtenues lors de ces contrôles sont résumées dans le Tableau n°4.

Tableau 4 : Ensemble des valeurs obtenues lors des mesures réalisées sur les échantillons de contrôle.

Echantillon	Osmolarité (mOsm/kg)		Densité		Créatininurie (µmol/L)		Protéinurie (g/L)		
	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Level 1	Level 2	Uritrol	Level 1	Level 2
Valeurs acceptables	333 à 499	620 à 930	1,009 à 1,014	1,018 à 1,027	-	-	0,30 à 0,42	-	-
Moyenne	421	782	1,0119	1,0222	6877	19116	0,348	0,060	2,412
SD	4,58	9,98	0,0003	0,0004	192,14	433,25	0,035	0,019	0,130
CV (%)	1,06	1,26	0,03	0,04	2,79	2,27	10	31,297	5,395
Minimum	415	767	1,011	1,022	6634	18241	0,289	0,010	2,129
Maximum	429	801	1,012	1,023	7359	19667	0,443	0,089	2,645
Ecart max. entre duplicates	4	7	0,001	0	283	502	0,052	0,66	0,176

Les mesures d'osmolarité des échantillons de contrôle étaient comprises respectivement entre 415 et 429 mOsm/kg pour Level 1 et entre 767 et 801 mOsm/kg pour Level 2 (Figures 3 et 4).

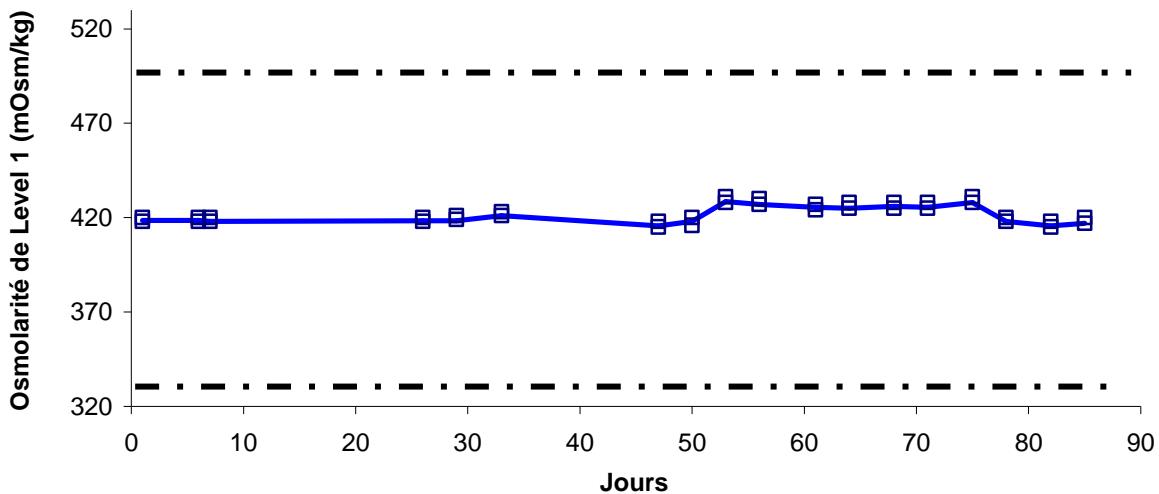


Figure 3 : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de l'osmolarité urinaire sur l'échantillon Level 1. Toutes les mesures ont été effectuées deux fois ; la courbe est celle de la moyenne des résultats. Les lignes pointillées représentent les limites d'acceptabilité données par le fabricant.

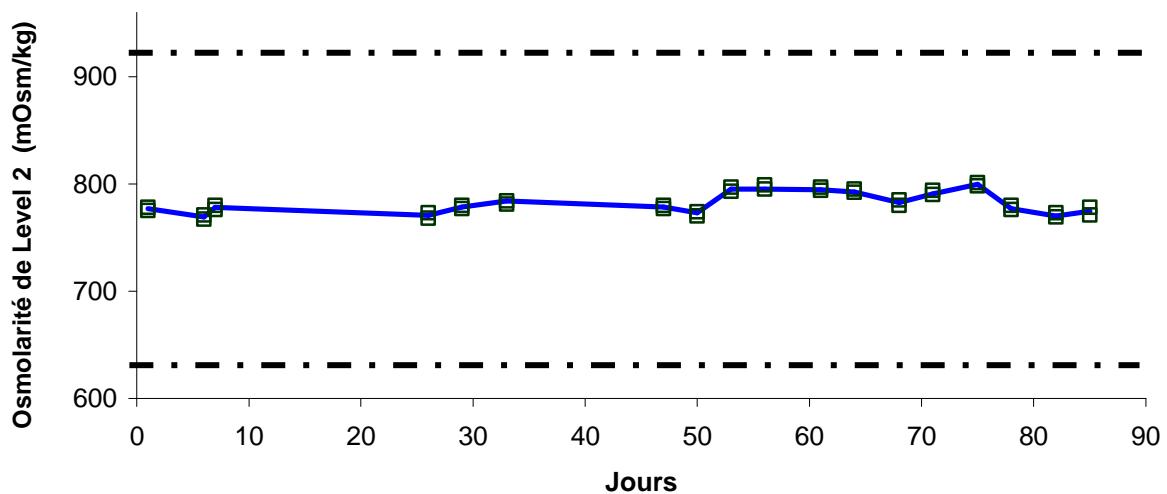


Figure 4 : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de l'osmolarité urinaire sur l'échantillon Level 2. Toutes les mesures ont été effectuées deux fois ; la courbe est celle de la moyenne des résultats. Les lignes pointillées représentent les limites d'acceptabilité données par le fabricant.

Les mesures de densité des échantillons de contrôle étaient comprises respectivement entre 1,011 et 1,012 pour Level 1 et entre 1,022 et 1,023 pour Level 2 (Figures 5 et 6).

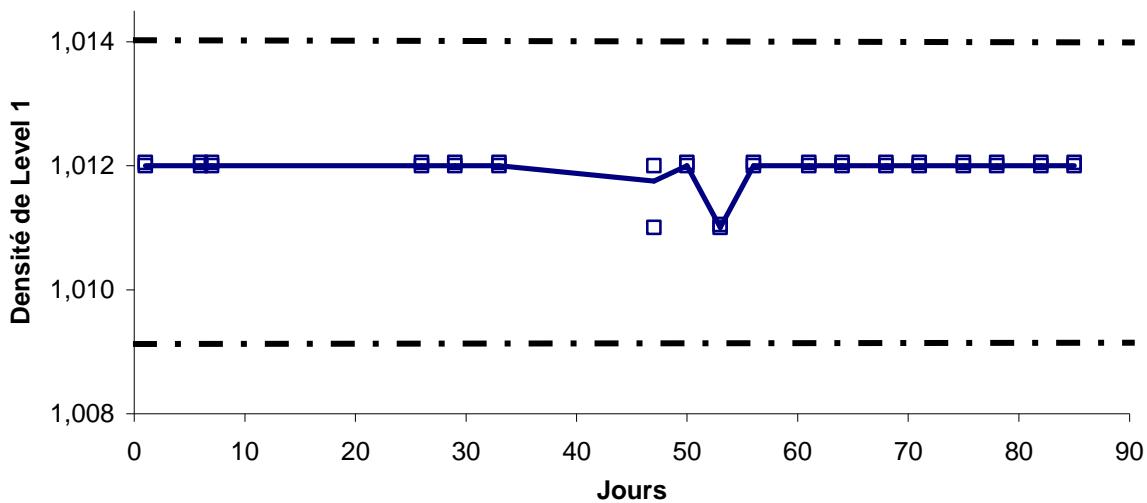


Figure 5 : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la densité de l'échantillon Level 1. Toutes les mesures ont été effectuées deux fois ; la courbe est celle de la moyenne des résultats. Les lignes pointillées représentent les limites d'acceptabilité données par le fabricant.

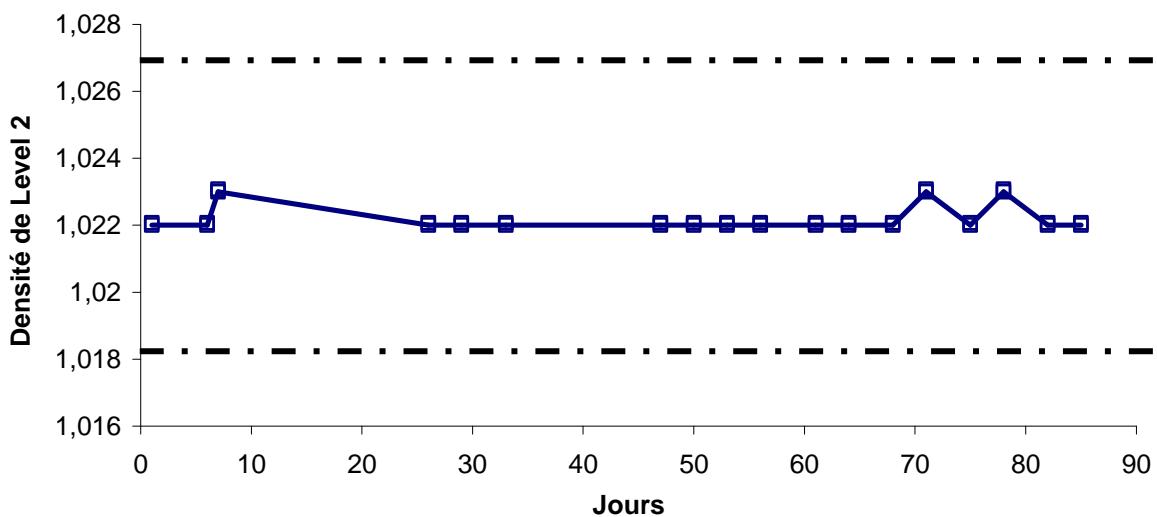


Figure 6 : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la densité de l'échantillon Level 2. Toutes les mesures ont été effectuées deux fois ; la courbe est celle de la moyenne des résultats. Les lignes pointillées représentent les limites d'acceptabilité données par le fabricant.

Les mesures de la créatininurie des échantillons de contrôle étaient comprises respectivement entre 6 634 et 7 359 µmol/L pour Level 1 et entre 18 241 et 19 667 µmol/L pour Level 2 (Figures 7 et 8).

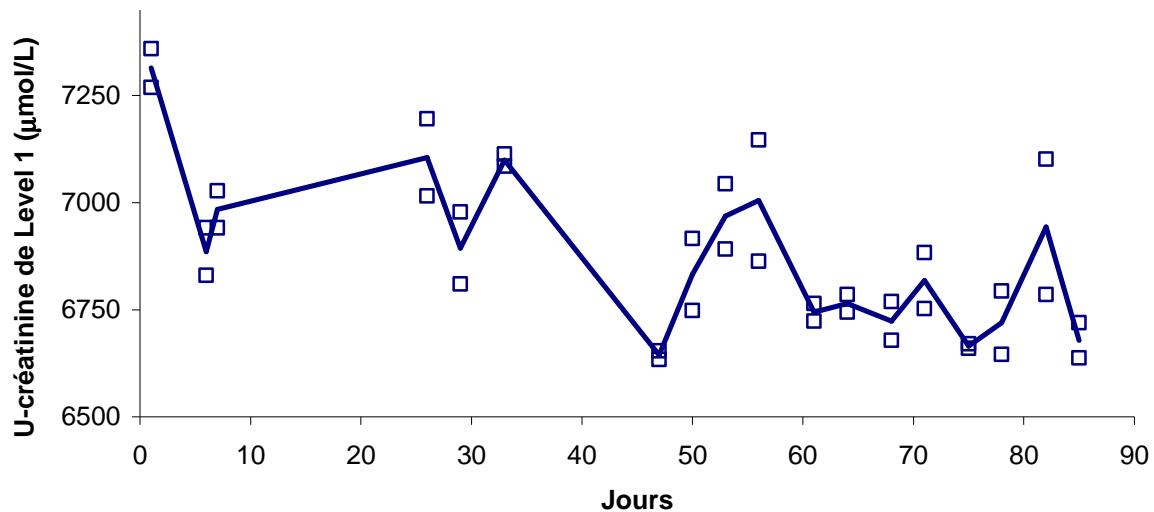


Figure 7 : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la créatininurie de l'échantillon Level 1. Toutes les mesures ont été effectuées deux fois ; la courbe est celle de la moyenne des résultats. Il n'y avait pas de valeur d'acceptabilité pour cette mesure

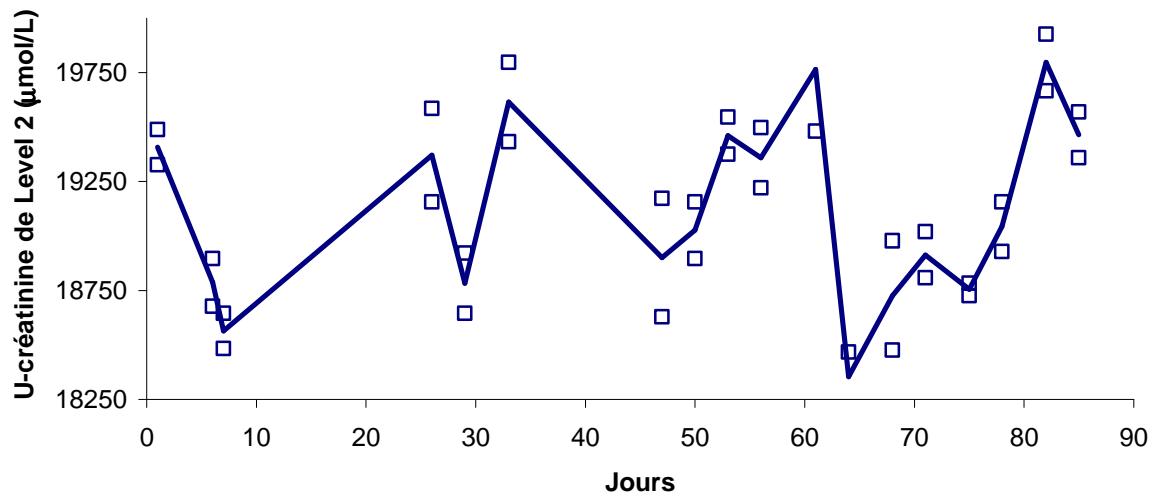


Figure 8 : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la créatininurie de l'échantillon Level 2. Toutes les mesures ont été effectuées deux fois ; la courbe est celle de la moyenne des résultats.

Les concentrations moyennes en protéines des échantillons de contrôles étaient comprises entre 0,289 et 0,443 g/L, avec une moyenne de 0,348 g/L (Figure 9).

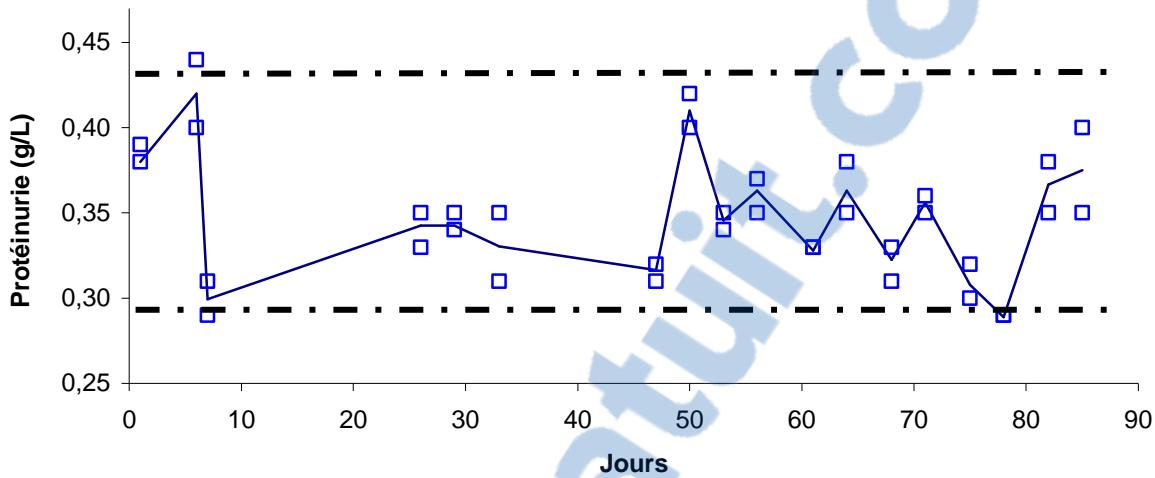


Figure 9 : Diagramme de contrôle de qualité de la mesure de la concentration de protéines dans l'urine. Toutes les mesures ont été effectuées deux fois ; la courbe est celle de la moyenne des résultats. Les lignes pointillées représentent les limites d'acceptabilité données par le fabricant.

L'ensemble des graphiques montre que toutes les valeurs mesurées lors de ces contrôles étaient comprises dans les intervalles d'acceptabilités indiquées par le fabricant.

En outre, l'examen de la répétabilité à partir des duplicates des 170 échantillons d'urine analysés a montré des coefficients de variation bas :

- 0,40 % pour l'osmolarité. L'imprécision intra-séries a été légèrement inférieure pour des osmolarités basses (0,27% lorsque l'osmolarité est inférieure à 1000 mOsm/kg) ou fortes (0,24% lorsque l'osmolarité est supérieure à 2000 mOsm/kg) ;
- inférieur à 0,1% pour la densité ;
- 1,2% pour la créatininurie ;
- 10,6% pour la protéinurie. L'imprécision intra-séries a été légèrement inférieure pour les protéinuries faibles (6,6% lorsque la concentration était <0,5 g/L) que pour les protéinuries fortes (7,6% lorsque la concentration était > 0,5 g/L).

2) Les méthodes d'évaluation de la concentration/dilution de l'urine

Cent soixante dix urines de chien ont été analysées en double. Dans cette partie, les résultats sont ceux de la moyenne de ces valeurs.

a. Mesure de l'osmolarité, de la densité et de la créatininurie

L'osmométrie moyenne mesurée a varié de 94 à 2 603 mOs/kg, et 79,3 % des valeurs étaient comprises entre 500 et 2000 mOsm/kg (Figure 10). La moyenne globale des mesures d'osmolarité a été de 1 196 mOsm/kg.

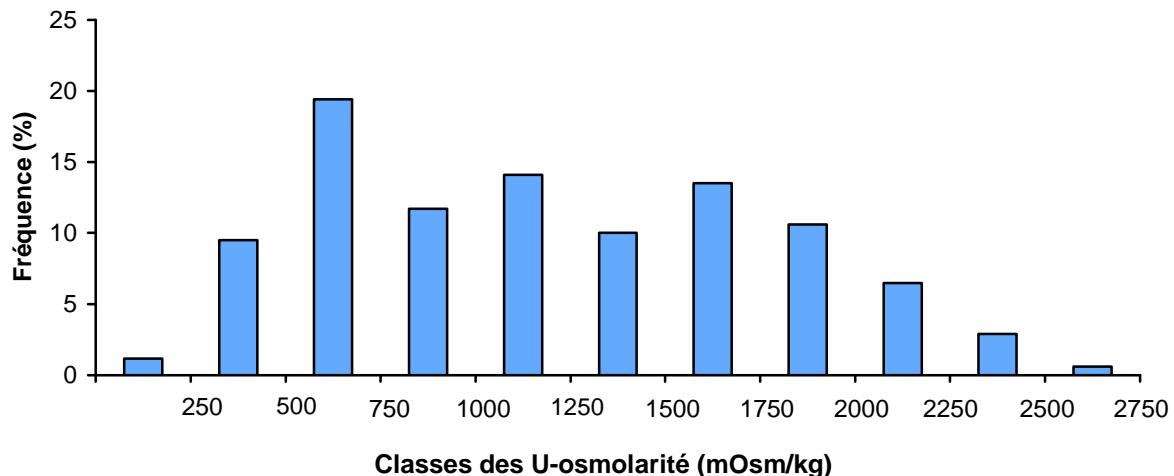


Figure 10 : Répartition des 170 échantillons testés en fonction de l'osmolarité urinaire (U-osmolarité) mesurée.

Les valeurs de densité moyenne mesurées ont varié de 1,002 à 1,066, et 45 % des valeurs étaient comprises entre 1,020 et 1,040 (Figure 11). La moyenne globale des densités a été de 1,031.

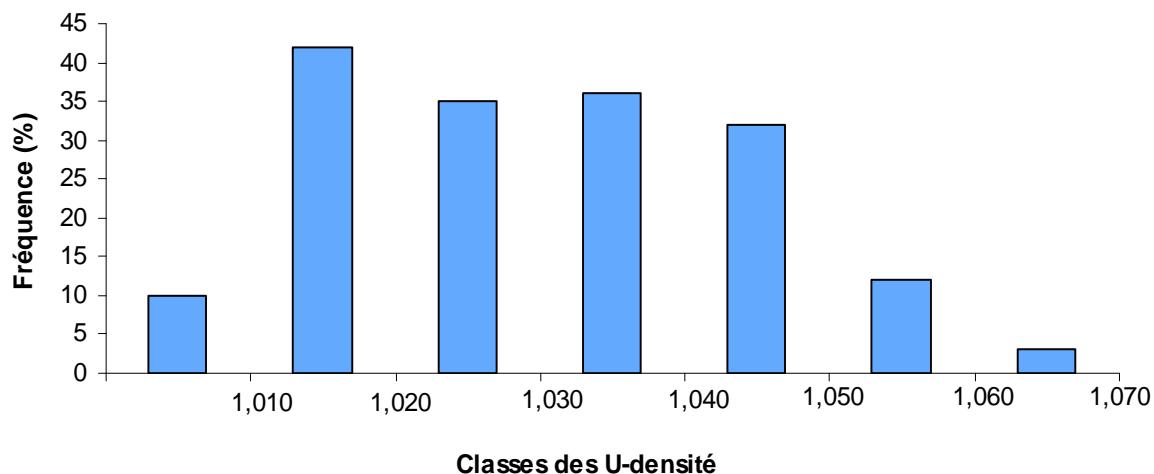


Figure 11 : Répartition des 170 échantillons testés en fonction de la densité urinaire (U-densité) mesurée

La créatininurie moyenne mesurée a varié de 1 037 à 38 693 µmol/L, et 95 % des valeurs étaient comprises entre 12 760 et 15 482 µmol/L (Figure 12). La moyenne globale des mesures de créatininurie a été de 14 121 µmol/L.

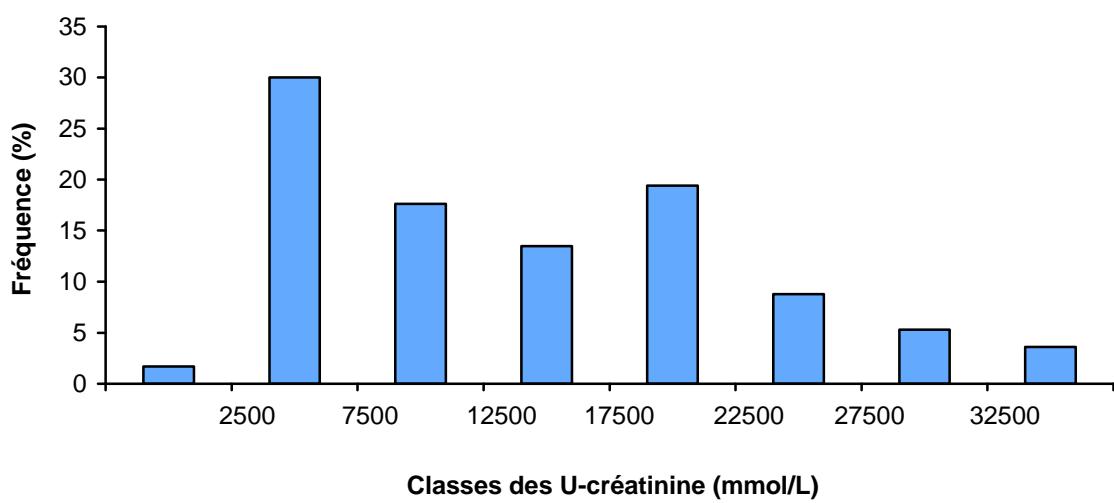


Figure 12 : Répartition des 170 échantillons testés en fonction de la créatininurie (U-créatinine) mesurée

b. Comparaisons de ces techniques d'évaluation de la concentration/dilution urinaire

i. Comparaison des mesures de densité et de l'osmolarité

Les résultats de cette comparaison sont représentés dans la figure n°13, on peut observer que l'agrément entre les deux techniques est très bon avec un coefficient de corrélation de 0,94. Le calcul de régression pour évaluer l'osmolarité en fonction de la densité mesurée donne l'équation suivante :

$$U\text{-Osmolarité(mOsm/kg)} = 38891 [37377; 40404] * ((U\text{-Densité-1}) * 1000) - 10,6 [-62,4; 41,2]$$

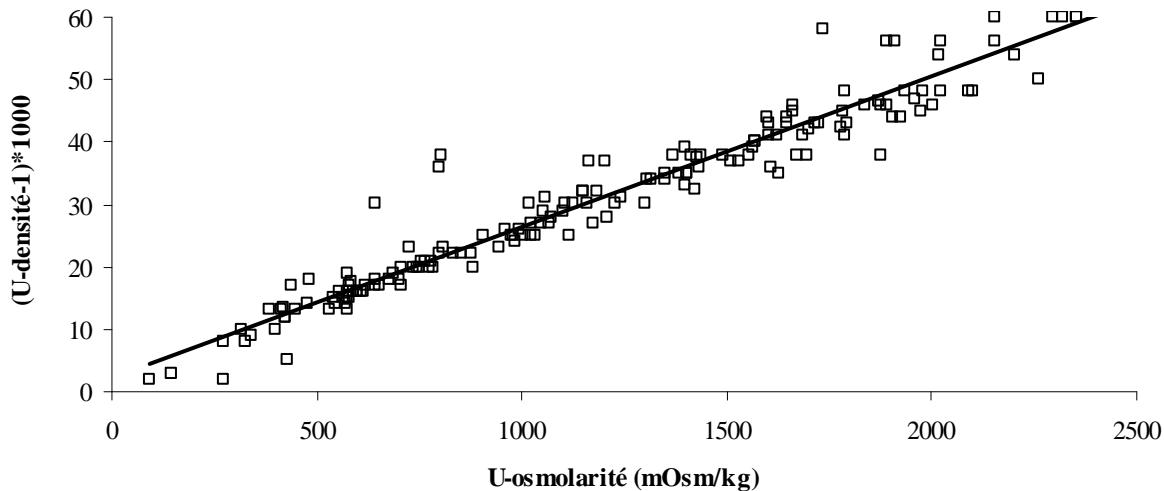


Figure. 13 : Nuage de points représentant l'agrément de la mesure de la densité urinaire ((U-densité-1)*1000) et de la mesure de l'osmolarité (U-osmolarité (mOsm/kg)) sur 170 spécimens d'urine de chien.

Selon la classe d'osmolarité dans laquelle se trouve un échantillon urinaire l'osmolarité et la (Densité-1) n'ont pas le même facteur de corrélation :

- lorsqu'une urine présente une osmolarité comprise entre 400 et 600 mOsm/kg, l'osmolarité est mal corrélée à (U-densité-1)*1000 ($R^2 = 0,36$) ;
- à partir de 800 mOsm/kg la corrélation entre osmolarité et (U-Densité-1)*1000 est forte ($R^2 = 0,83$).

ii. Comparaison de l'évaluation de la concentration urinaire par créatininurie et par osmométrie ou densité urinaire.

La comparaison de l'agrément entre la créatininurie et de l'osmolarité et entre la créatininurie et la densité urinaire (Figures 14 et 15) montre des coefficients de corrélation semblables, proches de 0,65. La dispersion des nuages de points est également comparable.

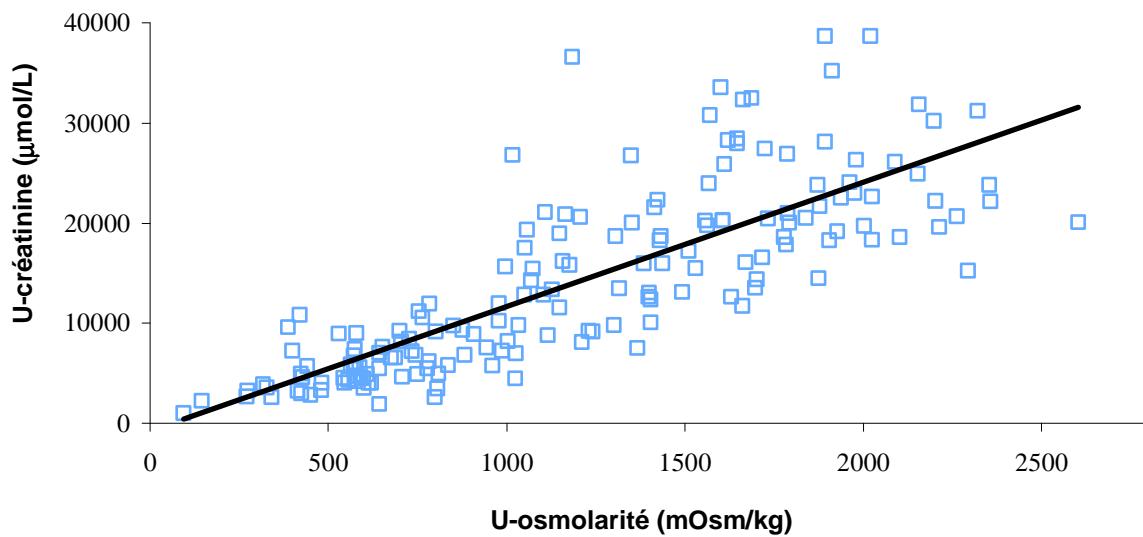


Figure 14 : Nuage de points représentant l'agrément de la mesure de la créatinine urinaire et de la mesure de l'osmolarité sur 170 spécimens d'urine de chien ($R^2 = 0,6471$).

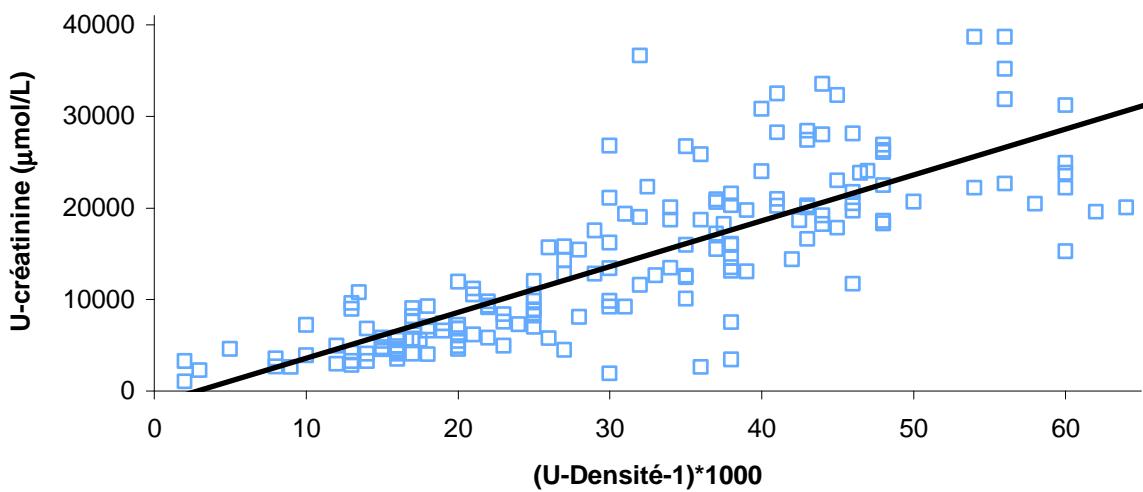


Figure 15 : Nuage de points représentant l'agrément de la mesure de la créatinine urinaire et de la densité urinaire $((U\text{-Densité-1}) \times 1000)$ sur 170 spécimens d'urine de chien ($R^2 = 0,6543$).

Pour évaluer la dispersion des mesures de créatininurie et de densité urinaire ((Densité-1)*1000), ces mesures ont été comparées à des classes d'osmolarité définies arbitrairement de sorte à ce que le maximum soit égal à une fois et demi le minimum (rapport max./min. = 1,5) : ces observations ont été faites pour des osmolarités allant de 400 à 600 mOsm/kg, de 800 à 1200 mOsm/kg et de 1600 à 2400 mOsm/kg (Tableau 5).

Lorsque l'osmolarité urinaire est comprise entre 800 et 1200 mOsm/kg ou entre 1600 et 2400 mOsm/kg, la gamme des densités urinaires est égale à environ 1,2 fois la gamme des osmolarités mesurées ; alors que pour une osmolarité allant de 400 à 600 mOsm/kg la gamme de densités urinaires correspondante est 2,6 fois plus grande que la gamme des osmolarités mesurées. La taille des gammes de densité reste proche de la taille des gammes d'osmolarité, aussi, la substitution de l'osmolarité par la densité dans le calcul du rapport RPOU entraînera une faible erreur.

Lorsque l'osmolarité urinaire est comprise entre 400 et 600 mOsm/kg ou entre 1600 et 2400 mOsm/kg, la gamme des créatininuries mesurées est égale à 2 à 2,6 fois la gamme des osmolarités mesurées ; alors que pour une osmolarité comprise entre 800 et 1200 mOsm/kg la gamme des créatininuries est sept fois plus grande que celle des osmolarités mesurées. Les rapports RPCU seront donc plus dispersés que les rapports RPOU.

On peut aussi noter que, pour des osmolarités incluses entre 400 et 600 mOsm/kg les gammes de densité et de créatininurie sont de taille identique. Aussi, pour cet intervalle d'osmolarité l'utilisation de la créatininurie ou de la densité à la place de l'osmolarité dans le rapport RPOU impliquera une erreur semblable. Mais pour des osmolarités comprises entre 800 et 1200 mOsm/kg ou entre 1600 et 2400 mOsm/kg, les gammes de créatininurie sont 2 à 10 fois plus grandes que les gammes de densités, aussi utiliser le rapport RPCU au lieu du rapport RPOU apporte une erreur beaucoup plus grande que l'utilisation du rapport RPDU au lieu du rapport RPOU.

Tableau 5 : Variations des mesures de l'osmolarité, de la densité-1 et de la créatininurie en fonction de la classe d'osmolarité.

Osmolarité (mOsm/kg)	Osmolarité (mOsm/kg)	(Densité -1) *1000	Créatininurie (μmol/L)
400 à 600	Moyenne	521,1	5354 ,8
	Minimum	399,5	2826,9
	Maximum	599,5	10787,1
	Max./Min.	1,5	3,8
800 à 1200	Moyenne	1012,9	12603,8
	Minimum	801,5	3439,9
	Maximum	1184	36613
	Max./Min.	1,5	10,6
1600 à 2400	Moyenne	1897	23299,1
	Minimum	1600	11721,9
	Maximum	2356	38693,7
	Max./Min.	1,5	3,3

3) Comment évaluer une protéinurie ?

Nous avons décrit dans la première partie de cette étude comment, chez le chien, le ratio U-protéine/créatinine (noté RPCU) établi à partir d'un prélèvement unique d'urine permet d'évaluer l'excrétion protéique urinaire en 24 heures. Le but de ce paragraphe est d'étudier la corrélation entre les ratios U-protéines/densité (RPDU) ou U-protéines/osmolarité (RPOU) et U-protéine/créatinine (RPCU).

a. Les ratios

i. Le ratio U-protéine/créatinine (RPCU)

Dans cette étude, le rapport RPCU a varié de 0,04 à 13,64 (Figure 16) ; avec une moyenne globale de 0,57. Sur ces 170 échantillons 137 valeurs (soit 80,6 %) peuvent être considérées comme normales car inférieures à 0,5 ; 19 (soit 11,2%) valeurs sont considérées comme douteuses car comprises entre 0,5 et 1 et 14 valeurs (soit 8,2%) peuvent être considérées comme pathologiques car supérieures à 1 (Lulich et al., 1990).

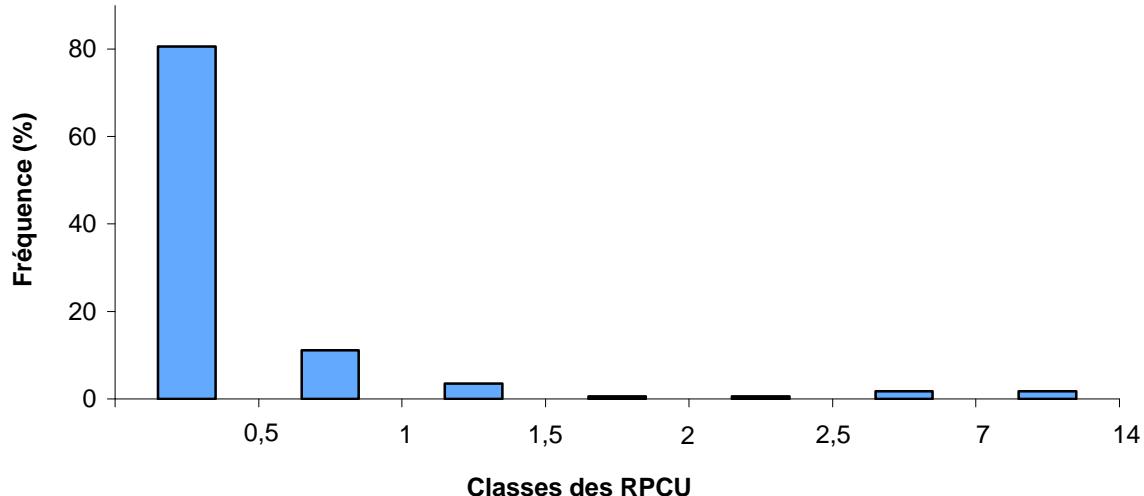


Figure 16 : Répartition des 170 échantillons testés en fonction du RPCU calculé.

En étudiant les échantillons d'urine ayant une densité urinaire de 1,030 ; et en supposant que ces échantillons aient une protéinurie de 1 g/L ; le RPCU varierait de 0,3 à 4,57 ; soit de tout à fait normal à pathologique (DiBartola et al., 1980). La grande dispersion de la créatininurie, notée dans le paragraphe précédent, se répercute sur les valeurs de RPCU qui sont aussi très dispersées à une densité et une protéinurie données.

Quelle que soit la valeur de l'osmolarité le RPCU est relativement bien corrélé à U-protéines (avec $R^2 = 0,74$). Mais cette corrélation est très variable en fonction de la classe d'osmolarité étudiée :

- Pour une osmolarité inférieure à 600 mOsm, U-protéines (g/L) est très fortement corrélée au RPCU avec un coefficient de corrélation de 0,93 et une équation de régression linéaire.
- Pour une osmolarité comprise entre 600 et 1300 mOsm la corrélation entre ces deux variables est bien moins bonne, avec un coefficient de corrélation de 0,63.
- A partir de 1400 mOsm/kg la corrélation entre RPCU et U-protéines est à nouveau forte avec un coefficient de corrélation de 0,91.

ii. Le rapport U-Protéines/((Densité-1)*1000) (RPDU)

Dans l'expression d'une densité urinaire, seule la partie décimale renseigne de manière proportionnelle sur la concentration urinaire, c'est elle qui est par conséquent utilisée ici et les rapports discutés sont des rapports U-Protéines (g/L)/U-((Densité-1)*1000).

Sur l'ensemble des urines, les valeurs de RPDU ont varié entre 0,0013 et 0,78 avec une médiane à 0,0102. Elles ont été très fortement corrélées à celles du rapport U-protéines/Osmolarité (RPOU) ($R^2 = 0,7504$) et du RPCU ($R^2 = 0,7005$).

On peut observer que dans la relation entre RPDU et RPUO, une valeur est grossièrement aberrante (urine n°11, cf annexes) ; si cette valeur est éliminée, la corrélation entre les deux rapports est alors de $R^2 = 0,9846$ (Figure 17) et leur relation est pratiquement linéaire.

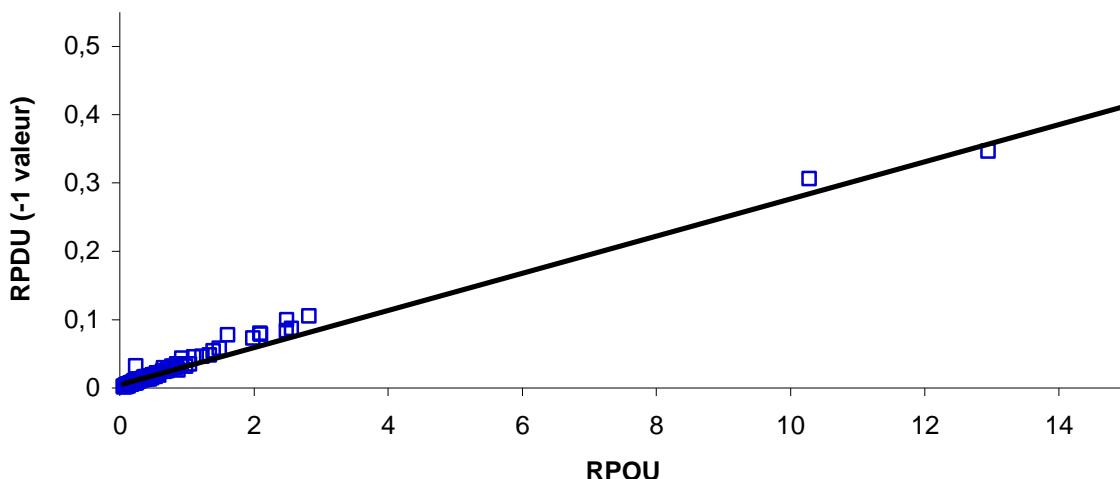


Figure 17 : Nuage de points représentant la relation entre les rapports U-Protéines/((U-Densité urinaire-1)*1000) et U-Protéines/(U-Osmolarité Urinaire/1000) dans 169 urines de chiens. (Une valeur apparemment aberrante a été éliminée).

La relation entre RPCU et RPUO (Figure 18) est légèrement plus forte que celle liant RPDU et RPOU. La relation entre RPCU et RPUO présente également une valeur apparemment aberrante (différente de la précédente ; urine n°48, cf. annexes). Lorsque celle-ci est retirée, la corrélation entre RPCU et RPUO ($R^2 = 0,9444$) est alors presque égale à celle entre RPOU et RPDU.

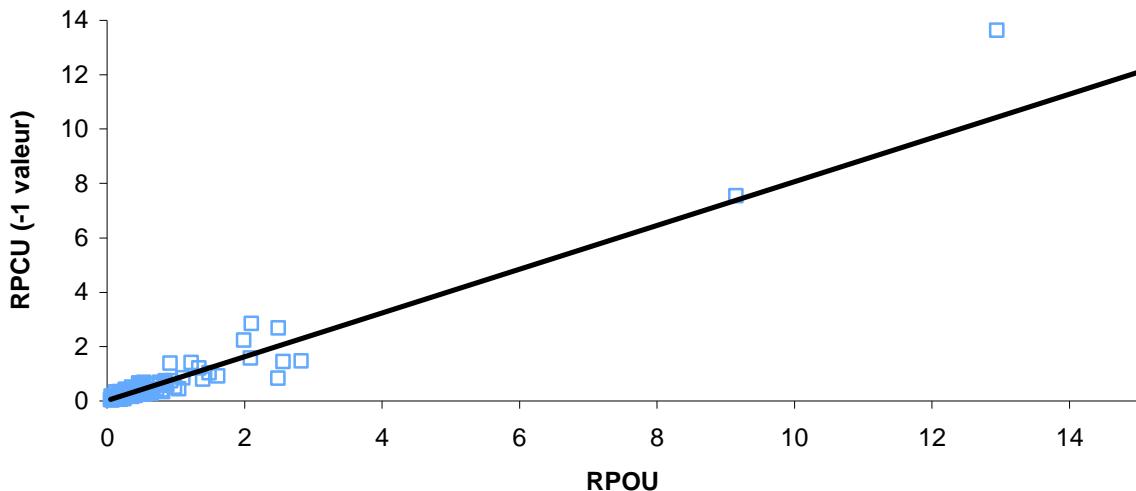


Figure 18 : Nuage de points représentant la relation entre RPCU et le rapport U-Protéines/(Osmolarité Urinaire/1000) dans 169 urines de chien. (Une valeur apparemment aberrante a été éliminée)

Si l'on se fonde sur une limite supérieure du RPCU à 0,5 pour les chiens sains, on peut observer que sur les 137 cas concernés, la distribution du RPDU est log-gaussienne (test de Kolmogorov-Smirnov, $P>0,15$ pour $\ln \text{RPDU}$) (Figure 19)

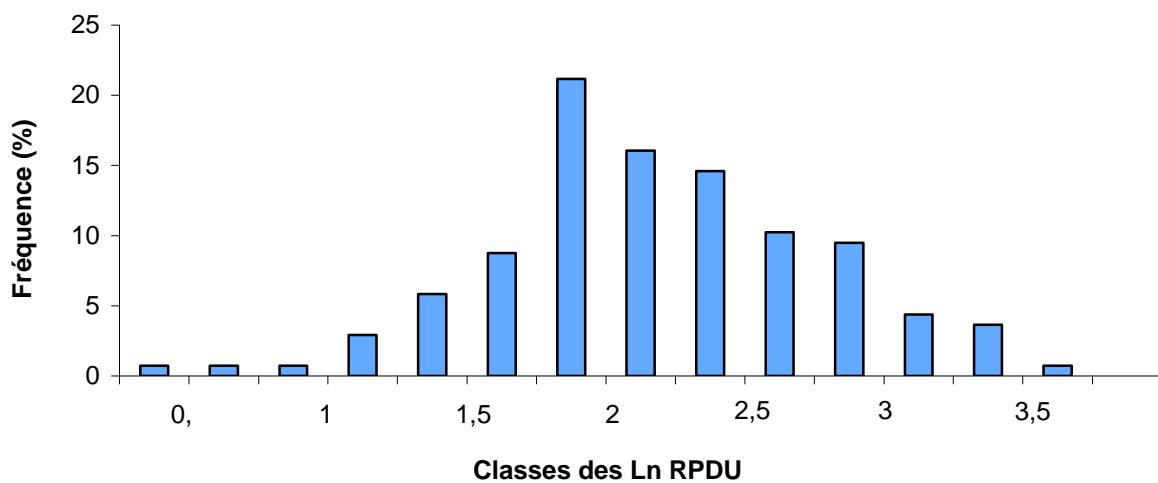


Figure 19 : Distribution des valeurs de $\ln \text{RPDU}$ dans 137 urines de chien ayant des $\text{RPCU} \leq 0,5$. Cette distribution n'est pas statistiquement différente d'une distribution gaussienne.

Les paramètres de la distribution de RPDU (en g/L : [Densité-1]) sont identiques qu'ils soient estimés de manière non paramétrique ou à partir de la distribution de Ln RPDU :

- Moyenne : 10,5
- Médiane : 8,3
- Interquantile 2,5-97,5% : 2,5-30,5

iii. Evaluation du « RPDU normal »

Notre étude ne permet pas d'évaluer les limites physiologiques du rapport RPDU ; nous pouvons seulement observer que, lorsque RPCU est inférieur à 0,5 (valeur physiologique, (Lulich et al., 1990)), RPDU varie de 0,01 à 0,035. Lorsque RPCU est supérieur à 0,5 les valeurs de RPDU varient de 0,015 à 0,783.

IV. DISCUSSION

1) Validité de l'étude

La validité des résultats présentés précédemment repose sur les résultats du contrôle de qualité des méthodes utilisées, ainsi que le nombre de spécimens analysés recouvrant une très large gamme de concentrations.

Lors des contrôles de qualités de dosages de l'osmolarité, de la densité et de la créatininurie avec les solutions de contrôle Level 1 et Level 2, l'exactitude et la précision des techniques ont été très bonnes (Tableau 4). En effet,

- toutes les mesures des contrôles d'exactitude étaient situées dans les intervalles d'acceptabilité indiqués par le fabricant ;
- la répétabilité des dosages a été très bonne ;
- le coefficient de variation interséries a été très faible de 0,03 à 2,8 % selon les analytes.

Lors du contrôle de qualité du dosage des protéines au rouge de pyrogallol (Tableau 4),

- la répétabilité des dosages a été bonne ;
- le coefficient de variation interséries a été assez élevé à 10% ;
- 4 résultats de dosages (Jours 1, 3, 5 et 6) n'étaient pas inclus dans l'intervalle d'acceptabilité indiqué par le fabricant lors de la première mesure. Ces mesures ont été refaites à chaque fois et les analyses du jour n'ont été conduites qu'une fois ces valeurs de contrôle incluses dans l'intervalle d'acceptabilité indiqué par le fabricant.

L'échantillonnage de spécimens urinaires canins a été assez important : 170 urines ont été analysées, recueillies sur des animaux malades ou en bonne santé indépendamment des techniques de collecte. De plus, l'étendue des osmolarités et des protéinuries mesurées a été très large, variant respectivement de 94 à 2 603 mOsm/kg et de 0,039 g/L à 8,03 g/L, couvrant ainsi des valeurs physiologiques et pathologiques. Cela permet d'extrapoler les résultats à l'ensemble des cas que le vétérinaire praticien est susceptible de rencontrer dans sa clientèle.

2) Comparaison des méthodes d'évaluation de la concentration urinaire chez le chien

Notre étude a confirmé des résultats antérieurs montrant une très bonne corrélation entre osmolarité et densité urinaire (Bovee, 1969; Dossin et al., 2003; Genetzky et al., 1987; Hendriks et al., 1978).

Le calcul de régression a montré que la relation entre densité et osmolarité était pratiquement linéaire même si à chaque valeur d'osmolarité correspond une gamme de valeurs de densité. En effet, l'osmolarité ne dépend que de la concentration en particules osmotiquement actives alors que la densité dépend également de leur masse qui peut varier, par exemple, dans le cas de maladie rénale lorsque l'élimination de molécules organiques comme le glucose ou les protéines est augmentée. Le coefficient de proportionnalité évalué dans cette étude est très voisin de ceux qui ont été proposés dans les études précédentes : 36 000 (Dossin et al., 2003; Hendriks et al., 1978).

Dans notre étude, les corrélations entre l'osmolarité, la densité urinaire et la créatininurie ont été très variables selon la classe d'osmolarité de l'échantillon d'urine considéré. Pour des osmolarités comprises entre 400 et 600 mOsm/kg et entre 1600 et 2400 mOsm/kg, la dispersion des valeurs de la créatininurie et de la densité sont semblables (Tableau 5). Pour une osmolarité comprise entre 800 et 1200 mOsm/kg la densité donne une bonne approximation de l'osmolarité (leur dispersion est similaire) alors que la créatininurie est très variable et ne donne pas une bonne approximation de l'osmolarité (Tableau 5). On peut donc s'interroger sur la capacité de la créatininurie à rendre compte de la concentration/dilution de l'urine lors de l'interprétation de la concentration urinaire d'autres analytes lorsque l'urine concernée a une osmolarité comprise entre 800 et 1200 mOsm/kg, c'est-à-dire pour une densité comprise entre 1,022 et 1,032 ; soit pour 20 % des échantillons d'urine de notre étude.

L'osmolarité est la méthode de référence pour évaluer la concentration/dilution d'une urine. Mais c'est la créatinine, dans le rapport RPCU, qui est communément utilisée pour évaluer la concentration urinaire et estimer l'intensité de l'excrétion urinaire protéique (Barsanti et al., 1979 ; Center et al., 1985; Grauer et al., 1985 ; McCaw et al., 1985 ; White et al., 1984). La capacité de la créatininurie à évaluer la concentration/dilution de l'urine est à questionner pour plusieurs raisons.

Dans notre étude, la créatininurie n'a pas été un bon évaluateur de la concentration/dilution de l'urine ; le coefficient de corrélation entre ces deux facteurs étant de 0,65 (figure 14) ; et cela est particulièrement vrai pour des osmolarités comprises entre 800 et 1200 mOsm/kg.

Les analyseurs à la disposition des cliniques vétérinaires sous-estimeraient la créatininurie, et ne seraient donc pas adaptés à une mesure précise de celle-ci, surtout pour des concentrations élevées. Une sous-estimation de la créatininurie est responsable d'une surestimation de RPCU et donc de faux positifs. Cette étude met en évidence la nécessité de contrôles qualité corrects dans les cliniques et d'intervalles de références de la créatininurie et de RPCU appropriés (Trumel et al., 2004).

De plus, certains facteurs de variation interindividuels ont un effet sur la créatininurie ; alors que le sexe n'a pas d'effet sur celle-ci (McCaw et al., 1985; Uechi et al., 1994) :

- Le poids de l'animal : il existe une corrélation positive entre la masse musculaire et la clairance de la créatinine (DiBartola et al., 1980; Grauer et al., 1985).
- L'âge : chez le chiot la clairance décroît de 2 à 7 mois, âge auquel la clairance est similaire à celle des adultes (Lane et al., 2000).

Les facteurs de variation intra-individuels de la créatininurie suivants ont aussi été rapportés :

- La clairance de la créatinine varie en fonction du débit de filtration glomérulaire, donc de l'état d'hydratation de l'animal en diminuant en cas de déshydratation (Tabaru et al., 1993) ; il est donc vraisemblable que la créatininémie varie également.
- Le régime alimentaire : la créatininurie postprandiale est supérieure (d'environ 20%) à la créatininurie hors période de repas (Uechi et al., 1994).
- L'anesthésie : lors d'une anesthésie au thiopental et à l'halothane, la clairance rénale est égale environ au tiers de la clairance rénale de l'animal vigile (Lobetti et al., 2000), ce qui influe probablement sur la créatininémie.
- L'excrétion de créatinine n'est pas constante au cours de la journée. Chez l'homme l'excrétion de créatinine serait moins importante la nuit (Vestergaard et al., 1958).

Le nombre de ces facteurs de variation explique que la créatininurie ait une plus grande variabilité que l'osmolarité et la densité ; d'où l'intérêt d'utiliser l'un de ces deux paramètres comme évaluateur de la concentration/dilution de l'urine.

3) Utilisation du rapport RPDU pour évaluer la concentration/dilution de l'urine

A une osmolarité donnée, les valeurs de créatininurie mesurée sont très dispersées, ce qui pourrait faire douter de l'interprétation de rapports construits à partir de celle-ci tel que le rapport RPCU. Par exemple, à une osmolarité donnée (ici, 1000 ± 100 mOsm/kg), et pour une protéinurie de 1 g/L les valeurs du RPCU varient d'une valeur tout à fait normale (0,3) à clairement pathologique (2,0). Une correction de la protéinurie par la densité aurait des effets moins importants.

Bien que la corrélation entre le RPCU et le RPOU soit forte ($R^2 = 0,94$), la corrélation entre RPDU et RPUO est légèrement meilleure ($R^2 = 0,98$).

En médecine humaine, l'utilisation de la densité urinaire à la place de la créatininurie pour corriger la concentration/dilution de l'urine a déjà été testée. Les auteurs ont déterminé que l'efficacité de RPDU à mettre en évidence une protéinurie est au moins aussi bonne que celle de RPCU mais que le RPDU est plus facile et plus pratique à mesurer (Constantiner et al., 2005; Ikeda et al., 2003; Miller et al., 2004; Newman et al., 2000; Parikh et al., 2002; Verplanke et al., 1992). Un auteur a même construit un programme permettant d'évaluer la protéinurie en 24 heures à partir du résultat de la mesure de la protéinurie par bandelettes et de la mesure de la densité urinaire du même échantillon (Constantiner et al., 2005).

Il a aussi été mis en évidence que pour des protéinuries élevées, RPCU ne permettait pas une bonne évaluation de la protéinurie en 24 heures chez l'homme (Lane et al., 2006).

Beaucoup de ces études ont porté sur la mesure de l'albuminurie, corrigée par la densité urinaire plutôt que par la créatininurie (Moore et al., 1997; Newman et al., 2000; Parikh et al., 2002). Ces études ont mené à un changement des habitudes cliniques en médecine humaine, désormais les valeurs de microalbuminémie sont standardisées pour une densité à 1,010.

Pour l'instant, que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, les cliniciens sont habitués à prendre leur décision en fonction du RPCU, de ses intervalles de référence et de ses limites. Actuellement, les études confirmant la possibilité d'utiliser la densité urinaire pour corriger la concentration/dilution de l'urine lors de la mesure de la protéinurie sur une miction ponctuelle n'ont pas été suivies des faits. Pour permettre ce changement des habitudes, il est nécessaire de construire des intervalles de référence et d'en déduire les conduites cliniques

correspondantes. Bien que la détermination du RPDU soit plus facile, moins onéreuse que celle du RPDU et se fondant sur un paramètre plus fiable que la créatininurie, il est plus prudent d'utiliser une méthode dont les limites et les références sont connues qu'une méthode nouvelle pour laquelle ces paramètres ne sont pas encore établis.

Cette étude n'a pas permis de fixer un seuil de décision du RPDU car il nous est impossible de nous fonder sur les valeurs du RPCU, qui sont imprécises, pour établir de tels seuils. Pour ce faire, il faudrait mener une étude comparative des valeurs de RPDU chez des chiens sains et des chiens ayant des fuites protéiques urinaires d'origine rénale ou non.

CONCLUSION

Cette étude a confirmé que la densité et l'osmolarité urinaires étaient étroitement liées et a établi que la concentration urinaire en créatinine ne donne pas une bonne représentation de l'une ou l'autre de ces variables ($R^2 = 0,65$) et que la dispersion des valeurs de créatininurie est très grande pour une valeur donnée de l'osmolarité ou de la densité.

Il est donc clair que la densité est un meilleur paramètre que la créatinine pour évaluer la concentration/dilution de l'urine. Par ailleurs, sa mesure est plus facile, plus exacte, plus précise et moins coûteuse que celle de la créatinine urinaire.

Cependant, les habitudes des biologistes et des cliniciens humains et vétérinaires les portent à utiliser la créatinine en routine car ils sont habitués à l'utilisation des rapports classiques comme le rapport protéine/créatinine urinaires.

Il est vraisemblable que le rapport U-Protéines/Densité permettrait une meilleure évaluation de l'excrétion protéique que le rapport U-Protéines/Créatinine mais son utilisation nécessite deux pré requis : établir des intervalles de référence et des seuils de décision chez des sujets sains et des chiens ayant une perte protéique urinaire anormale, puis convaincre que la meilleure efficacité diagnostique du rapport U-Protéines/Densité mérite de changer des habitudes.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON, R.S. and EDNEY, A.T.
Protein intake and blood urea in the dog.
Vet Rec, 1969, **84**, 13: 348-9.

BAGLEY, R.S., CENTER, S.A., LEWIS, R.M., et al.
The effect of experimental cystitis and iatrogenic blood contamination on the urine protein/creatinine ratio in the dog.
J Vet Intern Med, 1991, **5**, 2: 66-70.

BAILEY, T.R., PAULSEN, D.B., SEHGAL, I., et al.
Immunohistochemical staining of urokinase plasminogen activator-like and urokinase plasminogen activator receptor-like proteins in the urinary tract of healthy dogs.
Am J Vet Res, 2006, **67**, 9: 1628-34.

BARSANTI, J.A. and FINCO, D.R.
Protein concentration in urine of normal dogs.
Am J Vet Res, 1979, **40**, 11: 1583-8.

BIEWENGA, W.J., GRUYS, E. and HENDRIKS, H.J.
Urinary protein loss in the dog: nephrological study of 29 dogs without signs of renal disease.
Res Vet Sci, 1982, **33**, 3: 366-74.

BOVEE, K.C.
Urine osmolality as a definitive indicator of renal concentrating capacity.
J Am Vet Med Assoc, 1969, **155**, 1: 30-34.

BRAUN, J.P., COTARD, J.P., DELVERDIER, M., et al.
Bases morphologiques et fonctionnelles de l'exploration rénale chez le chien.
Prat. Med et Chir. de l'an. de comp., 1996, supplément au n°4: 9-15.

BRAUN, J.P., LEFEBVRE, H.P. and WATSON, A.D.
Creatinine in the dog: a review.
Vet Clin Pathol, 2003, **32**, 4: 162-79.

CANIPARI, R., ZURZOLO, C., POLISTINA, C., et al.
Polarized secretion of plasminogen activators by epithelial cell monolayers.
Biochim Biophys Acta, 1992, **1175**, 1: 1-6.

CENTER, S.A., WILKINSON, E., SMITH, C.A., et al.
24-Hour urine protein/creatinine ratio in dogs with protein-losing nephropathies.
J Am Vet Med Assoc, 1985, **187**, 8: 820-4.

CONSTANTINER, M., SEHGAL, A.R., HUMBERT, L., et al.
A dipstick protein and specific gravity algorithm accurately predicts pathological proteinuria.
Am J Kidney Dis, 2005, **45**, 5: 833-41.

CRANDELL, W.B. and MACDONALD, A.
Assesment of renal function in surgical patients by urine osmolality concentration tests.
The Am J Surg, 1973, **125**: 508-514.

DIBARTOLA, S.P., CHEW, D.J. and JACOBS, G.
Quantitative urinalysis including 24-hour protein excretion in the dog.
J Am Anim Hosp Assoc, 1980, **16**: 537-546.

DOSSIN, O., GERMAIN, C. and BRAUN, J.P.
Comparison of the techniques of evaluation of urine dilution/concentration in the dog.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 2003, **50**, 6: 322-5.

EPSTEIN, J.B. and ZAMBRASKI, E.J.
Proteinuria in the exercising dog.
Med Sci Sports, 1979, **11**, 4: 348-50.

FEENEY, D.A., OSBORNE, C.A. and JESSEN, C.R.
Effects of radiographic contrast media on results of urinalysis, with emphasis on alteration in specific gravity.
J Am Vet Med Assoc, 1980, **176**, 12: 1378-81.

FINCO, D.R.
Evaluation of renal functions.
In: OSBORNE, C. A. and FINCO, D. R.
Canine and Feline Nephrology and Urology.
Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, 216-29.

FINCO, D.R.
Urinary protein loss.
In: OSBORNE, C. A. and FINCO, D. R.
Canine and Feline Nephrology and Urology.
Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, 211-15.

FINCO, D.R. and DUNCAN, J.R.
Evaluation of blood urea nitrogen and serum creatinine concentrations as indicators of renal dysfunction: a study of 111 cases and a review of related literature.
J Am Vet Med Assoc, 1976, **168**, 7: 593-601.

GENETZKY, R.M., LOPARCO, F.V. and LEDET, A.E.
Clinical pathologic alterations in horses during a water deprivation test.
Am J Vet Res, 1987, **48**, 6: 1007-11.

GRAUER, G.F.
Clinicopathologic evaluation of early renal disease in dogs.
Comp Cont Educ Pract Vet, 1985, **7**, 1: 32-38.

GRAUER, G.F., THOMAS, C.B. and EICKER, S.W.
Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample.
Am J Vet Res, 1985, **46**, 10: 2116-9.

GRAUER, G.F., THOMAS, C.B. and EICKER, S.W.
Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ration from a random, voided sample.
Am J Vet Res, 1985, **46**, 10: 2116-2119.

GREEN, R.A.
Perspectives of clinical osmometry.
Vet Clin North Am, 1978, **8**, 2: 287-99.

GREENBERG, J., SCHWARTZ, I.L., SPINNER, M., et al.
Apparent volume of distribution of p-aminohippurate and creatinine in the dog.
Am J Physiol, 1952, **168**: 86-92.

HARDY, R.M. and OSBORNE, C.A.
Water deprivation test in the dog: maximal normal values.
J Am Vet Med Assoc, 1979, **174**, 5: 479-83.

HARRIS, R.C., LOWE, J.A., WARNES, K., et al.
The concentration of creatine in meat, offal and commercial dog food.
Res Vet Sci, 1997, **62**: 58-62.

HENDRIKS, H.J., DE BRUIJNE, J.J. and VAN DEN BROM, W.E.
The clinical refractometer: a useful tool for the determination of specific gravity and osmolality in canine urine.
Tijdschr Diergeneeskd, 1978, **103**, 20: 1065-8.

IKEDA, M., EZAKI, T., TSUKAHARA, T., et al.
Bias induced by the use of creatinine-corrected values in evaluation of beta2-microglobulin levels.
Toxicol Lett, 2003, **145**, 2: 197-207.

LANE, C., BROWN, M., DUNSMUIR, W., et al.
Can spot urine protein/creatinine ratio replace 24 h urine protein in usual clinical nephrology?
Nephrology (Carlton), 2006, **11**, 3: 245-9.

LANE, I.F., SHAW, D.H., BURTON, S.A., et al.
Quantitative urinalysis in healthy Beagle puppies from 9 to 27 weeks of age.
Am J Vet Res, 2000, **61**, 5: 577-81.

LAROUTE, V., CHETBOUL, V., ROCHE, L., et al.
Quantitative evaluation of renal function in healthy Beagle puppies and mature dogs.
Res Vet Sci, 2005, **79**, 2: 161-7.

LE BRICON, T.

Exploration biologique de la protéinurie au laboratoire d'analyses : aspects quantitatifs.
Ann Biol Clin, 2001, **59**: 701-715.

LEES, G.E., BROWN, S.A., ELLIOTT, J., et al.

Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal).
J Vet Intern Med, 2005, **19**, 3: 377-85.

LEES, G.E., OSBORNE, C.A. and STEVENS, J.B.

Antibacterial properties of urine : Studies of feline urine specific gravity, osmolality, and pH.
J Am Anim Hosp Assoc, 1979, **15**, 135-141.

LEROY, J.

Comparaison des tests de dépistage rapide et de la mesure de la protéinurie chez le chien
Th. : Med.vet.: Toulouse ENVT: 2006-TOU 3, 4116. 73 pages

LEWIS, L.J.

Plasminogen activator (urokinase) from cultured cells.
Thromb Haemost, 1979, **42**, 3: 895-900.

LOBETTI, R. and LAMBRECHTS, N.

Effects of general anesthesia and surgery on renal function in healthy dogs.
Am J Vet Res, 2000, **61**, 2: 121-4.

LULICH, J.P. and OSBORNE, C.A.

Interpretation of urine protein-creatinine ratios in dogs with glomerular and nonglomerular disorders.

Comp Cont Educ Pract Vet, 1990, **12**, 1: 59-73.

MCCAW, D.L., KNAPP, D.W. and HEWETT, J.E.

Effect of collection time and exercise restriction on the prediction of urine protein excretion, using urine protein/creatinine ratio in dogs.

Am J Vet Res, 1985, **46**, 8: 1665-9.

MILLER, R.C., BRINDLE, E., HOLMAN, D.J., et al.

Comparison of specific gravity and creatinine for normalizing urinary reproductive hormone concentrations.

Clin Chem, 2004, **50**, 5: 924-32.

MOORE, R.R., HIRATA-DULAS, C.A. and KASISKE, B.L.

Use of urine specific gravity to improve screening for albuminuria.

Kidney Int, 1997, **52**: 240-243.

NAWAZ, M. and SHAH, B.H.

Renal clearance of endogenous creatinine and urea in sheep during summer and winter.
Res Vet Sci, 1984, **36**, 2: 220-4.

NEWMAN, D.J. and PRICE, C.P.
Renal function and nitrogen metabolites.
In: BURTIS, C. A. and ASHWOOD, E. R.
Tietz Textbook of clinical chemistry. 3rd edition.
Philadelphia: W.B Saunders company, 1999, 1204-1270.

NEWMAN, D.J., PUGIA, M.J., LOTT, J.A., et al.
Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity.
Clin Chim Acta, 2000, **294**: 139-155.

O'CONNELL, J.M.B., ROMEO, J.A. and MUDGE, G.H.
Renal tubular secretion of creatinine in the dog.
Am J Physiol, 1962, **203**, 6: 985-990.

O'CONNOR, W.J. and SUMMERILL, R.A.
The excretion of urea by dogs following a meat meal.
J Physiol, 1976, **256**, 1: 93-102.

OSBORNE, C.A., STEVENS, J.B., LULICH, J.P., et al.
A clinician's analysis of urinalysis.
In: OSBORNE, C. A., FINCO, D.R.
Canine and feline nephrology and urology.
Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, 136-205.

PAGES, J.P. and TROUILLET, J.L.
Les protéinuries.
Prat Med Chir Anim Comp, 1990, **25**, 6: 585-597.

PARIKH, C.R., GYAMLANI, G.G. and CARVOOUNIS, C.P.
Screening for microalbuminuria simplified by urine specific gravity.
Am J Nephrol, 2002, **22**, 4: 315-9.

PRICE, C.P., NEWALL, R.G. and BOYD, J.C.
Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria : a systematic review.
Clin Chem, 2005, **51**, 9: 1577-1586.

RAILA, J., FORTERRE, S. and SCHWEIGERT, F.J.
Levels of retinol and retinyl esters in plasma and urine of dogs with urolithiasis.
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 2003, **50**, 7: 380-2.

RAILA, J., NEUMANN, U. and SCHWEIGERT, F.J.
Immunochemical localization of megalin, retinol-binding protein and Tamm-Horsfall glycoprotein in the kidneys of dogs.
Vet Res Commun, 2003, **27**, 2: 125-35.

SCHWEIGERT, F.J., RAILA, J. and HAEBEL, S.
Vitamin A excreted in the urine of canines is associated with a Tamm-Horsfall like protein.
Vet Res, 2002, **33**, 3: 299-311.

SHANNON, J.A., JOLLIFFE, N. and SMITH, H.W.
The excretion of urine in the dog. VI. The filtration and secretion of exogenous creatinine.
Am J Physiol, 1932, **102**: 534-550.

SUMMERILL, R.A.
Proceedings: The effects of a meat meal on glomerular filtration rate and urea excretion in the conscious dog.
J Physiol, 1974, **238**, 1: 64P.

SWANSON, R. and HAKIM, A.A.
Stop-flow analysis of creatinine excretion in the dog.
Am J Physiol, 1962, **203**, 6: 980-984.

TABARU, H., FINCO, D.R., BROWN, S.A., et al.
Influence of hydration status on renal functions of dogs.
Am J Vet Res, 1993, **54**, 10: 1758-1764.

THORNTON, J.R. and ENGLISH, P.B.
Specific gravity and osmolality as measures of urine concentration in the calf.
Aust Vet J, 1976, **52**: 335-337.

TRUMEL, C., DIQUELOU, A., LEFEBVRE, H., et al.
Inaccuracy of routine creatinine measurement in canine urine.
Vet Clin Pathol, 2004, **33**, 3: 128-32.

UECHI, M., TERUI, H., NAKAYAMA, T., et al.
Circadian variation of urinary enzymes in the dog.
J Vet Med Sci, 1994, **56**, 5: 849-854.

VAN VONDEREN, I.K., KOOISTRA, H.S. and DE BRUIJNE, J.J.
[Evaluation of a test strip for the determination of urine specific gravity in the dog].
Tijdschr Diergeneeskd, 1995, **120**, 13: 400-2.

VERPLANKE, A.J., HERBER, R.F. and BROERSEN, J.P.
A comparison of dilution adjustment methods for urinary enzymes.
Sci Total Environ, 1992, **120**, 1-2: 135-43.

VESTERGAARD, P., LEVERETT, R. and ORANGEBURG, M.S.
Constancy of urinary creatinine excretion.
J Lab Clin Med, 1958, **51**, 2: 211-218.

VIGORITO, T., CELANDER, E., MILLER, A., et al.
In Vivo Distribution of Radioactive Anticanine Urokinase.
J Am Osteopath Assoc, 1965, **64**: 955-6.

WATSON, A.D.
Urine specific gravity in practice.
Aust Vet J, 1998, **76**, 6: 392-8.

WATSON, A.D., LEFEBVRE, H.P., CONCORDET, D., et al.
Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy.
J Vet Intern Med, 2002, **16**, 1: 22-33.

WHITE, J.V., OLIVIER, N.B., REIMANN, K., et al.
Use of protein-to-creatinine ratio in a single urine specimen for quantitative estimation of canine proteinuria.
J Am Vet Med Assoc, 1984, **185**, 8: 882-5.

WILSON, D.M. and ANDERSON, R.L.
Protein-osmolality ratio for the quantitative assessment of proteinuria from a random urinalysis sample.
Am J Clin Pathol, 1993, **100**, 4: 419-424.

XIN, G., WANG, M., JIAO, L., et al.
Protein-to-creatinine ratio in spot urine samples as a predictor of quantitation of proteinuria.
Clin Chem Acta, 2004, **350**: 35-39.

TOULOUSE, 2007
NOM : MOYEN

PRENOM : Natalie

TITRE : COMPARAISON DE LA CONCENTRATION EN CREATININE ET DE LA DENSITE POUR EVALUER LA CONCENTRATION/DILUTION DE L'URINE DU CHIEN

RESUME :

Pour évaluer la concentration/dilution d'une urine ponctuelle et interpréter la concentration urinaire d'un analyte, l'osmolarité est le critère de référence. Mais c'est la créatinine qui est classiquement utilisée alors qu'elle n'est pas bien corrélée à l'osmolarité, contrairement à la densité. Nous avons étudié la relation entre U-osmolarité et U-densité ou U-créatinine chez le chien. La corrélation entre U-densité et U-osmolarité ($R^2 = 0,94$) a été plus forte qu'entre U-créatininurie et U-osmolarité ($R^2 = 0,65$) et la dispersion de la densité par rapport à l'osmolarité a été plus faible que celle de la créatininurie par rapport à l'osmolarité. La corrélation entre les rapports U-Protéines/Densité (RPDU) et U-Protéines/Osmolarité (RPOU) a été plus forte qu'entre U-Protéines/Créatinine et RPOU. Pour évaluer la concentration/dilution de l'urine il serait plus adapté d'utiliser la densité urinaire. Mais pour utiliser ce nouveau rapport en pratique il faudra déterminer des intervalles de référence.

MOTS CLES : Crétatine urinaire, Densité urinaire, Osmolarité, Protéinurie, Chien,

ENGLISH TITLE : INDEX OF CONCENTRATION OR DILUTION OF THE URINE OF DOGS: COMPARISON OF THE URINARY CREATININE AND THE URINARY DENSITY

ABSTRACT :

The interpretation of the concentration of any analyte in a spot urine requires a correction for variations of urine concentration/dilution. Although osmolarity is the gold standard, creatinine is the correcting factor usually used even if its transferability has been reported as low, whereas specific gravity is proportional to osmolarity. This study compared the estimation of canine urine concentration/dilution by creatinine and specific gravity to osmolarity. U-specific gravity was more strongly correlated to U-osmolarity than was U-creatinine. The scatter of urine creatinine concentrations at a given osmolarity was broader than that of U-specific gravity. The ratio U-proteines/specific gravity was more highly correlated to U-Proteines/Osmolarity than U-Proteines/creatinine was to U-Proteines/osmolarity. To interpret urine concentration/dilution the use of specific gravity would be more appropriated than creatinine, but to have the clinicians change there habits decision thresholds have to be determined.

KEY WORDS : Urinary creatinine, Specific gravity, Osmolarity, Proteinuria, Dog