

1.3 Composition de l'urine de 24 heures

1.3.1 Composition normale de l'urine

Le système urinaire est destiné à éliminer les déchets organiques sous forme liquide.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'urine est tout d'abord un ultrat-filtrat du plasma dépourvu de la plupart des protéines. Puis, cet ultrat-filtrat est « vidé » de son glucose, des protéines et acides aminés, des vitamines, de l'acide ascorbique, de l'acétoacétate, de l'hydrobutyrate, de l'acide urique, des ions sodium, potassium, calcium, phosphates, bicarbonates, et sulfates. L'urine primitive est ensuite « chargée » avec des ions hydrogènes, d'ammoniac, d'acide urique et de potassium. C'est cette urine définitive, d'osmolarité élevée (3 000mOsm/L) qui est éliminée via le bas appareil urinaire.

L'urine éliminée de l'organisme contient donc des substances organiques et inorganiques solubles en nombre et en quantité variables retirées du sang par les reins pour maintenir l'homéostasie.

Enfin, il existe donc une composition urinaire à laquelle on doit s'attendre lorsqu'on examine au hasard des échantillons urinaires normaux recueillis par prélèvement ou miction spontanée (Osborne et Stevens, 1999 ; Chew et Dibartola, 1986).

1.3.1.1 Le volume d'urine

Il a été établi qu'un chien adulte normal placé dans un environnement normal produit environ 20 à 40 ml d'urine par kilogramme de poids vif et par 24 heures. Alors qu'un chat adulte normal produit en moyenne 28 ml d'urine par kilogramme de poids vif et par jour.

Il a été estimé que le volume urinaire normal quotidien d'un chaton est compris entre 5 à 60 ml par kilogramme de poids vif (Osborne et Stevens, 1999).

Comparativement, les chiots et chatons nouveaux nés ont une capacité limitée à concentrer ou à diluer leur urine en réponse à une modification du volume liquidien extracellulaire (Roche, 2003). Les chiots ont un volume urinaire sur 24 heures supérieur à ceux des chiens âgés (Roche, 2003). Le volume urinaire journalier est donc connu aujourd'hui.

L'urine est composée à 95% d'eau. Suite à l'excrétion et la sécrétion tubulaire, elle comporte des composés organiques lesquels représentent environ 2% du volume total et des sels minéraux (3% du volume total).

1.3.1.2 Composés organiques de l'urine

a) Produits du catabolisme

L'urine normale ne doit comporter aucune protéine de haut poids moléculaire (albumine, immunoglobuline), ainsi qu'aucune protéine chargée négativement (albumine).

Les protéines de faibles poids moléculaires qui passent le glomérule sanguin sont réabsorbées au niveau des tubules rénaux. Néanmoins, quelques protéines comme les mucoprotéines et les immunoglobulines sécrétantes sont produites par les tubules rénaux et sont, par la suite, sécrétées dans l'urine. Ainsi, chez les animaux sains, une petite quantité de protéines est découverte dans les urines (Monroe et Leib, 1996).

Néanmoins, une petite quantité d'albumine passe également la barrière glomérulaire (Monroe et Leib, 1996). Ces traces de protéines ont été quantifiées. On parle de micro-albuminurie. Chez le chien, la protéinurie observée est dite micro-albuminurie si celle – ci n'excède pas 10 à 20 mg/kg/J (Grauer *et al.*, 1989). Chez le chat, cette valeur ne doit pas excéder 30 mg/kg/J (Monroe *et al.*, 1989). 50% de ces protéines sont des enzymes, des mucoprotéines et des immunoglobulines des tubules (Grauer *et al.*, 1989).

Bien que les protéines de faibles poids moléculaires ne doivent pas être retrouvées dans les urines de 24 heures, celles de poids inférieurs à 70kDa comme les produits du catabolisme cellulaire peuvent être détectées dans ces urines (Littman, 2011).

◆ L'urée

L'urée, par exemple, représente 2% des composés organiques de l'urine de 24 heures. C'est le produit terminal du catabolisme des protéines (Chew et Dibartola, 1986).

◆ La créatinine

La créatinine, produit terminal du catabolisme de la créatine musculaire regroupe 0,1% des composés organiques (Chew et Dibartola, 1986).

◆ Acides organiques

On compte également l'acide urique (0,03%), produit terminal du catabolisme des acides nucléiques, ADN et ARN, et l'acide hippurique (Chew et Dibartola, 1986).

◆ Autres substances organiques

Des éventuels toxiques à élimination rénale ou des médicaments, le plus souvent sous forme de catabolites inactifs peuvent être présents. Par ailleurs, l'urine contient également des substances qui inhibent la formation de cristaux (ex : mucoprotéine de Tamm-Horsfall), l'agrégation de cristaux (ex : la néphrocalcine) et les infections urinaires bactériennes (ex : immunoglobuline A). Cependant, leur quantité est non définie à l'heure actuelle (Osborne et Stevens, 1999).

b) Composition de l'urine en minéraux

Les composés organiques de l'urine rassemblent également les minéraux excrétés et sécrétés par les tubules urinaires (*cf.* Tableau 2). Chez les animaux sains, l'urine de 24 heures contient du potassium (0 à 3,1 mEq/kg/J), du chlore (0 à 3,4 mEq/kg/J), des ions sulfates (0,18%), du sodium (0,1% soit 0 à 3,7 mEq/kg/J), des ions phosphates (0 à 60 mEq/kg/J), carbonates, du calcium (0,015% soit 0 à 1,4 mEq/kg/J) et du magnésium (Chew et Dibartola, 1986).

Les nitrates sont également des constituants normaux de l'urine. Ils proviennent de l'alimentation. Normalement, les nitrites, la forme réduite des nitrates ne se retrouvent pas dans l'urine.

Tableau 2 : Composition de l'urine en électrolytes (D'après Chew et Dibartola, 1986).

	Sodium	Potassium	Chlorure	Calcium	Phosphate
mEq/kg/J ou mg/kg/J (Ca, P)	0-3.7	0-3.1	0-3.4	0-1.4	0-60
Fraction d'excrétion (%)	0-0,7%	0-20%	0-0,8%	0-0,4%	3-39%

c) Glucose

L'urine définitive ne doit pas contenir de glucose. Nous avons vu que celui-ci était entièrement réabsorbé dans le TCP (Osborne et Stevens, 1999 ; Monroe et Leib, 1996).

d) Corps cétoniques

Les corps cétoniques doivent être absents de l'urine finale. Ces produits de l'oxydation des acides gras (β -hydroxybutyrate, acétoacétate et acétone) sont réabsorbés dans le TCP (Osborne et Stevens, 1999 ; Monroe et Leib, 1996).

On connaît donc, aujourd'hui les éléments que l'on peut retrouver dans l'urine d'un individu sain. Cependant, définir une composition normale et précise de l'urine reste problématique.

1.3.2 Les variations possibles de la composition de l'urine

Nous avons vu précédemment par quels mécanismes l'urine était fabriquée par le rein. Chacun des mécanismes expliqués révèlent les possibilités de variations de l'urine de 24 heures.

1.3.2.1 Le volume urinaire

Le volume urinaire formé est influencée par de nombreux facteurs parmi lesquels l'espèce, l'âge et le poids vif.

Par exemple, lors de la croissance de l'individu, le volume urinaire peut changer de jour en jour pendant l'acquisition de la fonction de concentration de l'urine (Roche, 2003).

Le volume urinaire dépend de la capacité du rein à réabsorber l'eau et donc de la réabsorption de sodium. Cette dernière est fonction de la quantité de sodium dans le sang (Osborne et Finco, 1995).

Le volume urinaire est donc directement lié aux métabolites et ingrédients alimentaires (eau, minéraux et autres nutriments). On peut donc fortement supposer que le volume urinaire variera avec l'heure de la prise alimentaire.

En effet, on a vu précédemment, qu'un régime riche en protéine augmentait l'excrétion urinaire de l'urée et que cette molécule est essentielle pour créer la pression osmotique interstitielle à l'origine de la réabsorption d'eau. Les chiens nourris avec un régime riche en protéine pourront donc avoir un volume urinaire un peu plus faible (Osborne *et al.*, 1976). Chez le chien, le volume urinaire est aussi plus faible après repas.

Par ailleurs, l'absorption d'eau ainsi que les pertes hydriques d'origine non rénale influenceront directement le volume urinaire. La température et l'humidité modifieront la prise de boisson de l'animal, donc sa volémie et par conséquent sa diurèse.

Le volume urinaire de 24 heures peut donc être différent d'un jour sur l'autre et surtout au cours des 24 heures de la journée. Mais quand est – il des concentrations des substances dissoutes dans l'urine ?

1.3.2.2 La composition de l'urine

La composition de l'urine peut varier avec le rythme journalier de l'individu (Osborne *et al.*, 1976).

L'exercice physique, par exemple, augmente la production de créatinine par le muscle et donc son excrétion urinaire (Chew et Dibartola, 1986).

L'urine prélevée au lever et donc à jeun est plus concentrée. Ensuite, comme la consommation d'eau est plus importante pendant la journée, l'urine risque d'être moins concentrée. Une densité urinaire représentative des urines émises par le patient se mesure donc sur les urines de la journée (Osborne et Stevens, 1999).

Dans les échantillons du matin, une glycosurie hyperglycémique risque d'être moins notable que dans les échantillons prélevés 3 à 4 heures après le repas. Une recherche de glycosurie sur un seul échantillon recueilli tôt dans la journée peut engendrer des faux négatifs (Osborne et Stevens, 1999).

Mais, la véritable cause de variation de la composition urinaire sur 24 heures est la suivante.

On sait aujourd'hui que la formation de l'urine est sous la dépendance de nombreuses hormones. L'aldostérone va permettre la réabsorption du sodium et l'hormone anti-diurétique celle de l'eau. Par conséquent, si l'activité de ces hormones varie au cours de la journée, la composition de l'urine peut alors varier au cours des 24 heures.

1.4 Le nycthémère et variation de la composition urinaire

1.4.1 Variations des concentrations hormonales au cours du cycle journalier

De nombreuses études se sont intéressées aux variations des concentrations plasmatiques hormonales durant le cycle nycthéral.

Comme nous, les carnivores domestiques se réveillent le matin, et s'endorment le soir. Vers 4h du matin, leur organisme présente un pic de production de mélatonine (Leger, 2005). Vers 5h, l'angiotensine II et l'aldostérone sont également produites en grande quantité (Rittig *et al.*, 2006). De nombreux auteurs se sont intéressés aux fluctuations de l'excrétion urinaire du cortisol durant la journée.

1.4.1.1 Variations du cortisol urinaire au cours de la journée

a) Origine du Cortisol de l'organisme

Le cortisol est le glucocorticoïde synthétisé par la zone fasciculée et réticulée de la surrénale. Il est secrété dans la circulation sanguine en réponse à l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), elle-même sous contrôle de l'hormone hypothalamique, la corticolibérine (CRH).

b) Augmentation du cortisol urinaire la nuit

En humaine, une étude sur 23 patients de nature stressé à comparer les concentrations salivaires et urinaires en cortisol la nuit comme le jour.

Les individus de nature stressés furent choisis après évaluation de leur trouble d'anxiété par un psychologue. Les patients ont du recueillir les urines émises entre 22h et 8h ainsi que celle du matin. Ils devaient également récupérer un échantillon de salive toutes les 2 heures entre 8 heures et 22 heures. Cela pendant 3 jours consécutifs. Une corrélation entre les concentrations de cortisol libre dans la salive et dans le plasma avait été prouvée ultérieurement (Wedekind *et al.*, 2000).

Les résultats de cette étude révèlent dans un premier temps des concentrations urinaires et salivaires beaucoup plus importante et cela de manière significative chez les individus

stressés. Dans un second temps, cette expérience a permis de mettre en évidence que les concentrations urinaires en cortisol étaient significativement plus élevées la nuit chez les individus présentant des troubles de l'anxiété comme chez les individus « normaux » (Bandelow *et al.*, 2000). On sait aujourd'hui que l'axe corticotrope est stimulé par l'activité physique et le stress. Ce mécanisme permet de justifier les variations importantes de concentration en cortisol entre les individus au cours de la journée. La nuit, l'excrétion urinaire de cortisol est beaucoup moins variable d'un individu à l'autre mais elle reste toujours nettement supérieure aux valeurs de concentration en journée (Bandelow *et al.*, 2000).

Néanmoins, certaines études rapportent que les concentrations en cortisol ne varient pas durant le cycle circadien chez l'homme, excepté chez les individus fatigués (Jerjes *et al.*, 2005). Chez l'animal, de nombreuses études concluent également à l'absence de variation des concentrations en cortisol sur 24 heures (Gordon et Lavie, 1985).

L'étude du cortisol reste très délicate, étant donné les nombreux facteurs qui influencent sa sécrétion.

1.4.1.2 Augmentation de la sécrétion d'aldostérone et d'angiotensine II durant la nuit

a) Chez l'homme

◆ Déroulement de l'étude

Une étude de 2006 en médecine humaine, a étudié la composition urinaire chez des enfants atteints d'énurésie et chez des enfants ne présentant pas ce trouble.

Le but de cette étude étant de montrer les variations circadiennes sur l'excrétion urinaire.

L'urine des patients fut recueillie par 5 prélèvements journaliers. Puis, l'urine de la nuit fut recueillie à l'aide d'un système de collecte urinaire après sondage urinaire laissé à demeure la nuit. Une fois les urines recueillies, le volume urinaire de 24 heures fut calculé, ainsi que l'osmolarité urinaire, les fractions d'excrétion en sodium et potassium, les concentrations plasmatiques en aldostérone, angiotensine II, sodium, potassium et créatinine (Rittig *et al.*, 2006).

◆ Résultats

Les résultats de cette étude révèlent que les enfants atteints d'énurésie, produisent un volume urinaire sur 24 heures beaucoup plus important, avec des concentrations urinaires en électrolytes la nuit supérieure aux valeurs connues. Ces individus souffrent donc d'un défaut de réabsorption de Na⁺ la nuit.

Chez les individus « sains », les concentrations plasmatiques en angiotensine II et aldostérone présentent un pic de concentration pendant la nuit (à 5h). C'est le rythme circadien hormonal de l'aldostérone. Mais, ce pic de concentration est absent chez les individus souffrant d'énurésie. Enfin, l'étude montre une corrélation entre la concentration nocturne et plasmatique de l'angiotensine II et l'osmolarité urinaire nocturne (Rittig *et al.*, 2006).

Par conséquent, on peut comprendre que, chez l'homme, pendant la nuit, il existe un pic de concentration plasmatique en angiotensine II à l'origine d'un pic de concentration plasmatique d'aldostérone au alentour de 5 h du matin. Ce pic d'aldostérone entraîne une réabsorption de sodium au niveau du TCD et donc d'eau. L'urine produite la nuit est donc plus concentrée grâce à cette réabsorption d'eau. Les enfants souffrant d'énurésie ont donc un trouble du cycle circadien de l'angiotensine II et de l'aldostérone à l'origine d'une polyurie et natriurèse (Rittig *et al.*, 2006).

On peut alors conclure que, chez l'homme, l'aldostérone et l'angiotensine ont des concentrations sanguines qui varient selon le nyctémère.

b) Chez le chien

Chez le chien, une récente étude a également mis en évidence cette différence d'osmolarité entre l'urine de la journée et celle de la nuit.

Le volume urinaire fut mesuré sur 24 heures chez des chiens sains. L'excrétion urinaire en sodium et potassium fut également évaluée (Gordon et Lavie, 1983).

Les résultats de cette étude ont montré que le pic d'excrétion urinaire en Na⁺ avait lieu la journée alors que celui du potassium apparaissait la nuit. Par ailleurs, la réponse aux diurétiques donnés après ingestion de fluides était beaucoup plus importante et rapide pendant la journée. En effet, le jour, les concentrations plasmatiques en ADH, aldostérone et angiotensine II étaient clairement plus faibles. Tous les chiens de l'étude présentaient

d'ailleurs une diminution de la concentration plasmatique en ADH au matin associée à une augmentation du volume urinaire dans la matinée et à une diminution de l'osmolarité des mêmes prélèvements (Gordon et Lavie, 1983).

Chez les carnivores domestiques la diurèse est donc augmentée le jour avec une urine d'osmolarité faible avec une forte excrétion de sodium. La nuit, la diurèse est beaucoup plus faible, l'urine est d'osmolarité élevée avec une forte concentration en potassium. Ces modifications urinaires sont en parfaite corrélation avec les concentrations plasmatiques des hormones responsables de la diurèse (ADH, aldostérone).

On peut conclure de ces études, que la composition urinaire est différente la nuit de la journée. Le volume urinaire est moindre et les concentrations urinaires en électrolytes (Na et K) varie d'un élément à un autre. Ces concentrations urinaires variables sont directement dues au rythme circadien des hormones.

Les carnivores domestiques sont donc réglés « comme des horloges ». Et pour cause, 10 à 15 % de leurs gènes sont contrôlés par une horloge biologique d'une période d'environ 24 heures (horloge circadienne), dont la partie centrale se trouve dans le cerveau, au niveau de l'hypothalamus (Lacoche et Delaunay, 2003).

1.4.2 Rythme circadien et horloge biologique

1.4.2.1 Définitions

a) Les rythmes circadiens

C'est en 1729, que le mathématicien et astronome français Jean-Jacques Dortous de Mairan décrits des rythmes circadiens. De période proche d'un jour, du latin *circa* qui signifie environ et du mot latin *diem*, qui signifie jour, ces cycles sont présents dans la plupart des organismes vivants.

Un des rythmes circadiens qui marque le plus la vie quotidienne des êtres humains est, bien sûr, le rythme veille-sommeil. Un autre rythme facile à mettre en évidence, est celui de la température corporelle. Ce cycle passe par un maximum en fin de journée, et un minimum en milieu de nuit (Leger, 2005).

Depuis les années 1950, on sait que ces rythmes reflètent l'existence d'une horloge biologique interne.

b) L'horloge biologique interne

De nombreux organismes possèdent une horloge biologique interne. Des cyanobactéries, à l'homme en passant par les plantes, les champignons et les animaux, tous ont une horloge biologique centrale qui est à l'origine des rythmes biologiques de l'organisme (Touitou, 2001).

Le second rôle de cette horloge biologique est de constituer un mécanisme d'adaptation anticipative par rapport aux changements journaliers de l'environnement (Teboul *et al.*, 2006). Par exemple, lors d'un décalage horaire important au cours d'un voyage intercontinentale, on observe une adaptation progressive mais complète de l'horloge biologique, en quelques jours seulement (Honma et Kawamoto, 2003).

1.4.2.2 Composition et structure de l'horloge biologique interne

L'horloge biologique interne est située au niveau du noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus. Le noyau suprachiasmatique (NSC) qui chevauche le point de croisement des nerfs visuels (N.II) gauche et droit ou chiasma optique, est formé d'un ensemble de neurones (10 000 chez l'homme) (Weaver, 1998).

L'ablation de ce noyau rend les animaux (rats ou hamsters) arythmiques, tant dans leur comportement (alternance veille-sommeil) que dans la production de différentes hormones (mélatonine, cortisol) ou même dans le maintien de leur température corporelle (Weaver, 1998). En leur greffant un nouveau NSC, prélevés sur des embryons de la même espèce, on peut restaurer la plupart de ces rythmes (Weaver, 1998).

Chaque cellule de ce noyau est capable de battre le rythme du temps indépendamment de ses voisines (Leger, 2005). Mais comment ces neurones régulent les rythmes de l'organisme ?

1.4.2.3 Fonctionnement de l'horloge biologique interne

Les NSC utilisent des signaux variés pour imposer leur rythmicité aux différents processus physiologiques qu'ils contrôlent. L'identification de ces signaux constitue un domaine de recherche très actif. Certains sont probablement des « facteurs humoraux », libérés localement et qui diffusent ensuite jusqu'à leurs cibles à travers l'organisme. En effet, des NSC greffés de manière à leur interdire toute connexion nerveuse avec le cerveau du

receveur, tout en laissant diffuser les petites molécules qu'ils produisent, restaurent un rythme de comportement (alternance veille-sommeil) normal aux animaux receveurs.

Pour réguler les rythmes biologiques de l'organisme, il existe 2 modes de fonctionnement du NSC.

a) Rythmes spontanés

Certains rythmes biologiques ont lieu dans l'obscurité et après retrait du NSC. C'est le libre cours ou « free run » lequel révèle la période spontanée (Touitou, 2001). On considère donc, que ces rythmes sont à composante endogène très forte et donc moins sensibles aux influences extérieures. C'est le cas de la température (*cf.* Figure 27) et du cortisol (Gosselin *et al.*, 1990).

Figure 27 : Variation de la température au cours du cycle circadien (Goldbeter, 2010).



b) Rythmes à régulation extérieur

D'autres rythmes sont beaucoup plus sensibles aux modifications de l'environnement extérieur : les rythmes veille-sommeil, celui de la température cutanée et de l'hormone de croissance (Touitou, 2001).

Si l'expression circadienne se fait de manière autonome et spontanée pour certains rythmes, certains facteurs environnementaux semblent avoir une influence considérable. C'est le cas de la lumière. En effet, au moment de la nuit, l'horloge donne le signal du repos alors que le jour est traditionnellement une période plus active (Honma et

Kawamoto, 2003). Avant que l'horloge biologique centrale n'active d'autre cycle biologique de l'organisme, celle-ci est donc régulée par la lumière.

1.4.2.4 Stimulation et régulation de l'horloge biologique

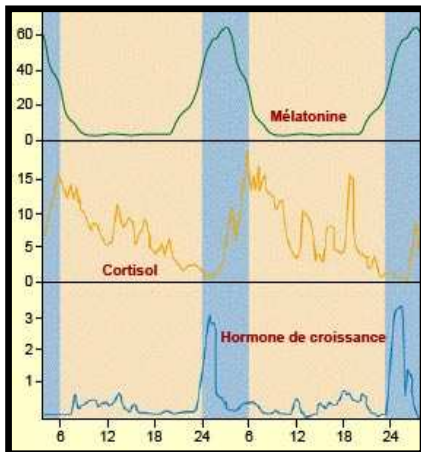
Afin de connaître le fonctionnement de l'horloge biologique, les chercheurs ont multiplié les expériences d'isolement de sujets dans des laboratoires ou dans des grottes (sans influence de la lumière, du bruit, de la température, ou du rythme social).

A partir de ces études, il a été montré que, chez l'homme, 2 facteurs contribuaient à synchroniser fortement l'horloge biologique sur le rythme de 24 heures.

-Le premier facteur est le rythme social : l'horloge interne est influencée par l'activité physique et intellectuelle. Si l'activité est concentrée sur la journée, le sommeil se déclenchera naturellement le soir. Si elle est retardée, le sommeil sera aussi retardé. On peut supposer que ce rythme social existe chez les carnivores domestiques.

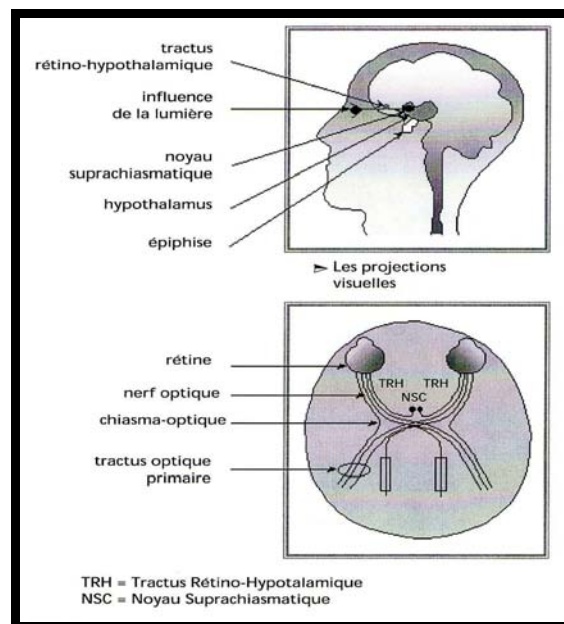
-Le second facteur, le plus puissant, est la lumière. La lumière atteint la rétine. Au sein de la rétine, des cellules appelées les mélanopsines sont constituées d'axones très longs qui, dans le nerf visuel finissent par atteindre le noyau supra chiasmatique. Les neurotransmetteurs des cellules mélanopsines (glutamate et le neuropeptide PACAP) active la transcription des gènes *Per* dans les cellules du NSC. Après cette étape, le message nerveux longe le tractus rétino-hypothalamique et se rend à l'hypothalamus. Il atteint ainsi l'épiphyse ou glande pinéale. Le neurotransmetteur libéré au niveau de la glande pinéale est la noradrénaline. Cette hormone se fixe sur ces récepteurs spécifiques à la surface des cellules de la glande pinéale. La noradrénaline est responsable d'une cascade de signaux à l'intérieur de ces cellules et aboutit, in fine, à y moduler la production de mélatonine. Cette modulation dépend d'une part, des indicateurs de l'horloge centrale (la production n'a lieu que pendant la nuit) et d'autre part des conditions d'éclairement. Lorsque le jour parait, la mélatonine n'est plus secrétée et l'éveil à lieu (*cf.* Figure 28). Dans le cas contraire, sa sécrétion donne le signal du sommeil à l'organisme. La mélatonine est l'hormone de la nuit (Leger, 2005).

Figure 28 : Variation des hormones au cours de la journée (Goldbeter, 2010).



La lumière est donc responsable de la régulation du cycle veille-sommeil et de la production de mélatonine (cf. Figure 29). On comprend donc pourquoi les concentrations de cette hormone varient au cours du nyctémère.

Figure 29 : L'horloge biologique et les effets de la lumière (Leger, 2005).



Nous avons également perçu que la lumière entraînait l'activation de gène dans les noyaux supra chiasmatiques. Il s'agit des gènes Per dits « gènes horloges » (Honma et Kawamoto, 2003). Les interactions entre ces gènes et leurs produits génèrent une boucle d'autorégulation transcriptionnelle et traductionnelle auto-entretenu et agissant sur d'autres gènes : les gènes contrôlés par l'horloge. Ce sont ces derniers qui contrôlent la

physiologie des organismes. Alors que les gènes horloges ont été très étudiés, le nombre, la nature et la fonction des gènes contrôlés par l'horloge restent en comparaison très peu documentés (Lacoche et Delaunay, 2003).

En revanche, leur importance physiologique est suggérée par l'identification des perturbations de la phase du cycle veille-sommeil (Teboul *et al.*, 2007).

La première étude décrivant l'expression des gènes horloge chez l'humain a été effectuée par Bjarnason et al à partir de biopsie de peau et de muqueuse orale prélevées toutes les 4 heures pendant 24 heures chez 8 sujets sains. Leur étude réalisée par RT-PCR a mis en évidence une expression rythmique des gènes PER1 et BMAL1 avec un pic d'expression respectivement le matin et le soir.

En 2002, Takata *et al.*, ont comparé l'expression du gène PER2 à 9h du matin et du soir. Leurs résultats décrivent une importante hétérogénéité d'expression parmi les sujets étudiés avec globalement une expression plus élevée le matin que le soir.

L'oscillateur du NSC est synchronisé par la lumière et coordonnerait en aval les oscillateurs périphériques via des voies neurohormonales encore très mal définies.

Néanmoins, les oscillateurs périphériques sont aussi synchronisés directement par certaines hormones (glucocorticoïdes) et l'alimentation (Teboul *et al.*, 2007).

On sait donc aujourd'hui que l'horloge biologique est activée par la lumière. Que cette activation consiste à la transcription puis traduction de gène dans les cellules du NSC mais aussi dans les organes périphériques. C'est de cette manière que certaines hormones sont synthétisées à une certaine heure de la journée (rythme circadien de l'hormone).

Mais, à l'heure actuelle, aucune étude ne décrit précisément les voies d'activation des autres gènes.

Néanmoins, on sait aujourd'hui que la protéine clock des gènes de l'horloge possède une activité enzymatique capable de modifier le degré de « compaction » de l'ADN au sein de la cellule. Autrement dit, en remodelant les chromosomes, Clock rend les gènes plus ou moins accessibles, ce qui influence leur expression. C'est par ce mécanisme que l'horloge biologique agit sur l'horloge cellulaire et donc sur les rythmes de l'organisme (Leger, 2005).

1.4.3 Variation hormonale et rythme circadien

L'horloge centrale coordonne l'activité de nombreuses horloges situées dans différents tissus périphériques. Elle gouverne l'organisation des rythmes circadiens du sommeil et de

la vigilance comme vu précédemment, mais aussi de très nombreux rythmes biologiques (l'hormone de croissance, le cortisol, la mélatonine) (Leger, 2005).

Voilà pourquoi l'activité de la plupart des grands systèmes physiologiques de l'organisme fluctue selon le moment de la journée. C'est le cas par exemple de la température du corps, du niveau des hormones, de la production d'urine, de la circulation sanguine et du métabolisme. Les fluctuations passent habituellement par un maximum et un minimum qui coïncident avec une période particulière de la journée. La température corporelle est, par exemple, toujours la plus basse durant la nuit (*cf.* Figure 27).

1.4.3.1 Généralités

Quatre paramètres fondamentaux caractérisent le rythme biologique d'une variable définie (*cf.* Figure 30) :

-La période (T), espace de temps séparant deux évènements spécifiés de la variation dans le temps. Par exemple, le pic ou le creux de la variation considérée. Selon la période on définit les rythmes circadiens ($T = 24 \pm 4$ h), les rythmes ultradiens ($T < 20$ h), et infradiens ($T > 28$ h).

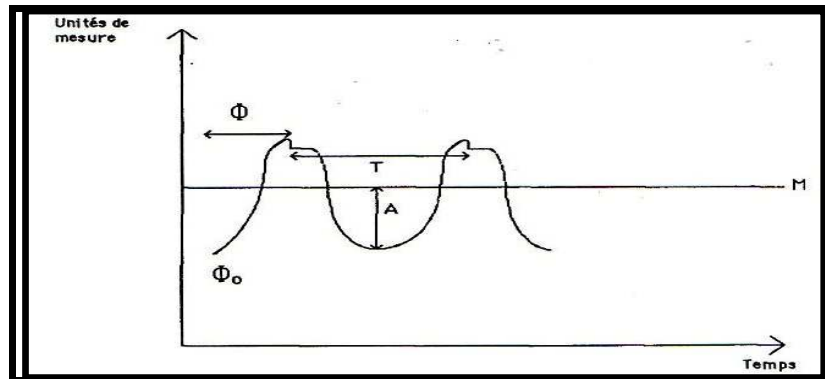
-L'acrophase (ϕ), localisation dans le temps du maximum de la variation. Elle représente l'angle entre l'emplacement du sommet de la variation pour une période donnée et une phase de référence ϕ_0 . Egalement dénommé pic, l'acrophase peut être donnée en heures dans le cas d'un rythme circadien, avec par exemple, une phase de référence choisie à minuit.

-L'amplitude (A), moitié de la variation totale entre le pic et le creux pour une période donnée.

-Le mésor (M), niveau ajusté du rythme pour une période donnée. C'est la moyenne arithmétique des mesures si celles-ci sont équidistantes.

Cependant, ces définitions données stricto sensu appellent un double commentaire. Une variable déterminée peut présenter à la fois des composantes ultradiennes, circadiennes et infradiennes. C'est notamment le cas du cortisol plasmatique que nous détaillerons ultérieurement (Gosselin *et al.*, 1990).

Figure 30 : Les 4 paramètres d'un rythme biologique. Période (T), Acrophase (ϕ), Amplitude (A) et Mésor (M) (Gosselin *et al.*, 1990).



1.4.3.2 Etudes spécifiques

Les concentrations plasmatiques hormonales varient selon la journée. Ceci est dû au rythme biologique dirigé par l'horloge centrale du NSC. En revanche, cette horloge hypothalamique est directement influencée par la lumière laquelle est à l'origine du cycle sommeil-éveil.

Certains chercheurs ont d'ailleurs classé les hormones en 3 catégories selon lesquelles les concentrations hormonales sont fortement, moyennement ou faiblement influencées par le sommeil (Gronfier et Brandenberger, 1998).

Les hormones dont les concentrations plasmatiques sont faiblement influencées par le sommeil sont l'ACTH, le cortisol et la mélatonine. Celles dont la concentration plasmatique est fortement influencée par le sommeil sont la prolactine et la TSH (Thyroxine Stimulating Hormone). Enfin, l'hormone de croissance (GH) est partiellement contrôlée par le rythme sommeil-éveil. Nous nous intéresserons tout particulièrement au rythme hormonal de la mélatonine et du cortisol.

a) Rythme de la mélatonine

Les rythmes des concentrations sanguines d'hormones sont la résultante de nombreux facteurs : rythme de la synthèse, de la libération, du passage sanguin, et du catabolisme de ces hormones. A cela s'ajoute parfois les rythmes de l'activation (testostérone et dihydrotestostérone), du stockage (ADH), et de liaison aux protéines plasmatiques (cortisol et CBG).

Ces considérations multiples conduisent à de nécessaires études chronobiologiques, dans le but de rechercher les rythmes des différentes variables biologiques considérées.

Comme vu précédemment, la mélatonine est indécélable dans le sang pendant la journée. Elle commence à être sécrétée en milieu de soirée quand la lumière diminue. Avant, elle ne peut pas être retrouvée dans les urines (Leger, 2005).

b) Rythme circadien du cortisol

Le cortisol, hormone de stress et de l'adaptation, représente le modèle chronobiologique le plus étudié. Pour lui, de nombreux rythmes ont été mis en évidence.

◆ Rythme circadien

La concentration sanguine du cortisol est plus élevée le matin entre 6h et 8h (*cf.* Figure 31). En outre, les profils sont très reproductibles chez un même sujet et d'un sujet à un autre. C'est une variable très robuste de la synchronisation, un rythme « marqueur » au même titre que la température (Touitou, 2001).

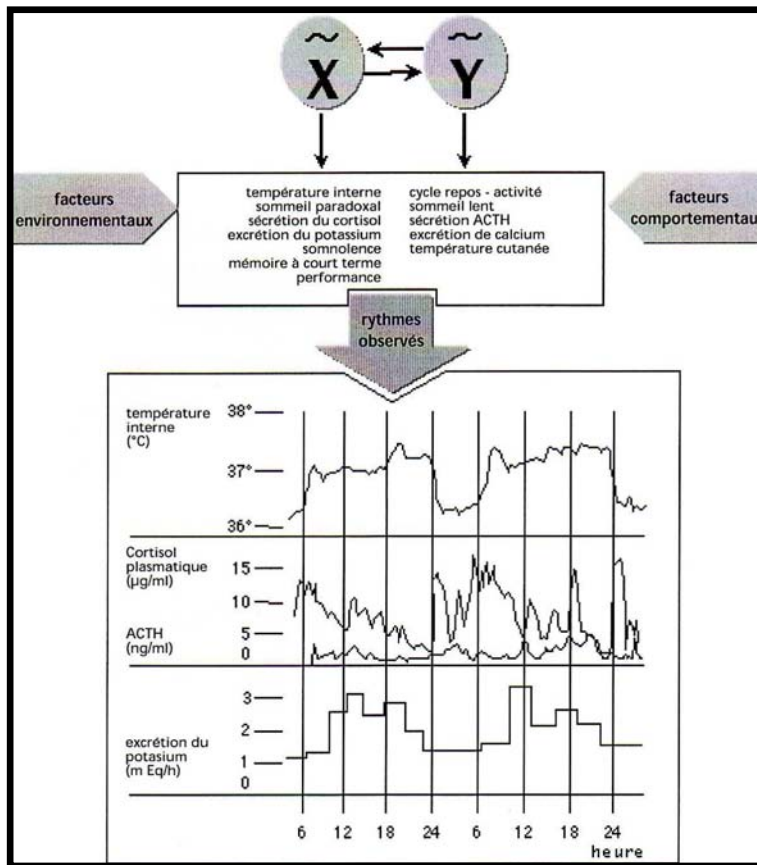
◆ Rythme ultradien

Le cortisol à une sécrétion pulsatile, reflet de la sécrétion épisodique de la corticosurrénale. Gallagher et al ont conclu qu'il existait, chez l'homme, 7 à 13 épisodes sécrétoires par jour, sommation de plusieurs rythmes ultradiens et repartis en quatre phases comme suit : 6h de sécrétion basse (avant le coucher), 3h de sécrétion accrue (de la 3^{ième} à 5^{ième} heures de sommeil), 4 h de sécrétion élevée (de la 6^{ième} à la 8^{ième} heure de sommeil et à la 1^{ière} heure de réveil), et 11h de sécrétion intermittente pendant l'activité.

◆ Rythme annuel

Le cortisol présente un pic de sécrétion en mars et mai (Gosselin *et al.*, 1990).

Figure 31 : Facteurs environnementaux et comportementaux sur les cycles biologiques (Leger, 2005).



Les concentrations plasmatiques hormonales varient avec le nyctémère. Les concentrations urinaires en composés organiques et inorganiques seraient donc également variables au cours de la journée. Il serait donc important de prendre en compte ce principe dès la réalisation d'une analyse urinaire.

II / Intérêt de l'analyse urinaire en routine

2.1 Indication de l'analyse urinaire en routine

En routine, l'examen urinaire permet de rechercher le diagnostic de diverses maladies, de dépister une maladie asymptomatique chez un patient, de surveiller l'évolution biologique d'une maladie et enfin, de surveiller l'efficacité et l'innocuité d'un traitement (Osborne et Stevens, 1999).

L'analyse d'urine doit être effectuée dans la demi-heure suivant le prélèvement. En effet, l'urine se conserve très mal à température ambiante et à la lumière, et ce d'autant plus si elle est alcaline. Le pH augmente par évaporation du CO₂ : l'urine s'alcalinise. Les cellules souffrent de ces modifications de pH et d'osmolarité et deviennent difficilement identifiables. Certains cristaux, ainsi que les cylindres tendent à se dissoudre, tandis que d'autres substances tendent à se cristalliser (Osborne et Stevens, 1999).

L'examen de la fonction urinaire comporte plusieurs étapes.

2.2 Les différentes étapes de l'analyse urinaire

L'analyse urinaire va être déclinée en différentes étapes :

- l'examen physique des urines
- l'examen chimique des urines
- l'examen cytologique des urines
- l'examen de la cristallurie

2.3 Évaluation de la capacité rénale à concentrer les urines : mesure de la densité urinaire

2.3.1 Définition et mesure de la densité urinaire

2.3.1.1 Définition de la densité urinaire

La densité urinaire reflète la masse totale de toutes les substances dissoutes par unité de volume de solution. La densité urinaire est donc le rapport du poids de l'urine sur le poids d'un volume égal d'eau distillée. Les 2 doivent être mesurés à la même température. L'urine est plus dense que l'eau parce qu'elle est composée d'eau et de diverses substances dissoutes de densité différente. Par conséquent, sa densité est toujours supérieure à 1. Sa mesure est réalisée à l'aide d'un réfractomètre (Osborne et Stevens, 1999).

Les valeurs usuelles de densité urinaire chez les carnivores domestiques sont les suivantes :

Chien : du > 1,040 Chat : du > 1,045 (Monroe *et al.*, 1989)

La mesure de la densité urinaire est affectée par le nombre de particules de substances dissoutes présentes. Malheureusement, elle est aussi modifiée par le poids moléculaire de chaque substance dissoute présente. De ce fait, il n'y a qu'une relation approximative entre la densité et la concentration totale des substances dissoutes. Par exemple, si on observe une densité de 1,048 chez trois chiens différents alors que l'osmolarité urinaire de ces mêmes chiens est différentes (1 734, 1 820 et 1 978 mOsm/L), l'explication est très claire. Chaque type de substance dissoute a ses propres effets caractéristiques sur la densité urinaire. Des échantillons urinaires ayant un nombre identique de molécules dissoutes par unité de volume peuvent avoir des densités différentes s'il y a différents mélanges de substances. Par exemple, un même nombre de molécules d'urée, de chlorure, de sodium, d'albumine, de globine, de fibrinogène et de glucose ont un effet quantitatif différent sur la densité (Osborne et Stevens, 1999).

La mesure de la densité urinaire s'effectue à l'aide d'un réfractomètre. En effet, il n'existe aucune concordance entre les résultats donnés par lecture de la bandelette urinaire et le réfractomètre. (Bauer, Rettig et Moritz, 2008)

2.3.1.2 Le réfractomètre et mesure de la densité urinaire

a) Mécanisme physique

Les solutions aqueuses comme l'urine contiennent des substances qui absorbent différentes longueurs d'onde lumineuses. Cela peut être mesuré en déterminant l'indice de réfraction de la lumière. Cet indice est défini comme le rapport de la vitesse de la lumière à travers 2 milieux différents.

En ce qui concerne l'urine, l'indice de réfraction est le rapport entre la réfraction de la lumière dans l'air et la réfraction de la lumière dans l'urine. Lorsque la concentration en substances dissoutes augmente dans l'urine, la vitesse de la lumière passant de l'air dans l'urine diminue et le rayon lumineux est réfracté (Osborne et Stevens, 1999).

b) Le réfractomètre

Les composants de base du réfractomètre clinique sont le prisme, un compensateur liquide, et une chambre qui recouvre et attire une longueur d'onde lumineuse spécifique dans une échelle calibrée.

La mesure de l'indice de réfraction de l'urine est modifiée par la concentration urinaire de toutes les substances dissoutes (ionique ou non). De plus, la température affecte la densité de l'urine. De ce fait, les réfractomètres sont calibrés à une température de référence. Certains réfractomètres ont même un adaptateur intégré pour des températures allant de 15 à 37°C.

Dans l'absolu, les réfractomètres devraient être calibrés pour l'espèce à étudier en utilisant des échantillons urinaires de densité connue. De ce fait, l'urine des chiens et des chats nécessite des échelles différentes (Osborne et Stevens, 1999).

2.3.2 Indication de la mesure de la densité urinaire

L'une des principales fonctions du rein des carnivores domestiques est d'excréter les substances dissoutes indésirables, les déchets du métabolisme dans un volume d'eau qui n'est pas nécessaire pour le maintien de l'homéostasie.

Comme nous l'avons vu dans la partie I/ 1), l'élimination des substances dissoutes indésirables et de l'eau est le résultat d'une régulation précise de la filtration glomérulaire, de la réabsorption tubulaire et de la sécrétion tubulaire.

La mesure de l'osmolarité urinaire, soit directement par osmométrie, soit indirectement par évaluation de la densité urinaire représente la principale méthode utilisée pour évaluer la capacité de réponse du rein à concentrer ou à diluer l'urine selon les besoins.

De ce fait, l'évaluation de l'osmolarité urinaire constitue un indice de la réabsorption tubulaire (Osborne et Stevens, 1999).

Une autre indication majeure de l'évaluation en routine de la densité urinaire est de permettre l'interprétation des résultats des examens constituant l'analyse urinaire complète. L'interprétation de ces résultats dépend de la connaissance de la densité (ou osmolarité) car cette donnée fournit des informations sur le rapport entre les substances dissoutes et le solvant (eau). Les analyses urinaires de routine sont typiquement effectuées sur des échantillons relativement faibles d'urine sans tenir compte du taux de formation de l'urine ni du volume urinaire total. L'interprétation des résultats s'avère impossible dans ces échantillons si on ne connaît pas la densité.

Prenons l'exemple de la protéinurie. Une protéinurie de 2+ avec une densité de 1,010 reflète-elle une perte protéique égale ou supérieure à celle d'une protéinurie de 2+ avec une

densité de 1,050 ? La réponse est évidente, l'échantillon de faible densité détient plus de protéines. Ce même concept est applicable à l'interprétation des résultats positifs à la glycosurie, cétonurie, bilirubinurie, hématurie et à la présence des constituants du sédiment urinaire (Osborne et Stevens, 1999).

Enfin, la dernière indication de l'évaluation de la densité urinaire est qu'elle permet de surveiller l'équilibre hydrique des patients, en particulier lors de traitement par perfusion (Osborne et Stevens, 1999).

2.3.3 Interprétation des valeurs de densité urinaire

2.3.3.1 Terminologie

La racine du mot grec « sthen » se retrouve dans le mot anglais « strength » (force). Hypersthénurie, isosthénurie et hyposthénurie sont des termes qui décrivent la concentration (ou force) des substances dissoutes dans l'urine par comparaison à celle du filtrat glomérulaire.

L'hypersthénurie décrit une urine de forte densité et de forte osmolarité par comparaison au filtrat glomérulaire.

L'hyposthénurie traduit la formation d'une urine diluée ayant une densité et une osmolarité significativement plus basse que celle du plasma et du filtrat glomérulaire.

L'isosthénurie représente la production d'une urine de densité et d'osmolarité identiques à celles du plasma et du filtrat glomérulaire.

La perte totale de la capacité à concentrer ou diluer le filtrat glomérulaire en fonction des besoins de l'organisme est parfois appelée densité « fixe ».

Suivant l'espèce, il existe des variations significatives des capacités de concentration maximale et fonctionnellement adéquate de l'urine (Osborne et Stevens, 1999).

2.3.3.2 Dilution et concentration urinaire

a) Concentration urinaire

La capacité du patient à excréter des urines ayant une densité significativement supérieure à celle du filtrat glomérulaire ($d = 1,008$ à $1,012$) dépend du système de production et de

libération de l'hormone antidiurétique, d'une population suffisante de néphrons pour engendrer et maintenir une forte concentration de substances dissoutes dans la médulla rénale, et d'une population suffisante de tubules fonctionnels pour répondre à l'hormone antidiurétique.

Les données obtenues chez des chiens partiellement néphrectomisés ayant un reste de rein laissent supposer qu'il suffit qu'un tiers des néphrons des 2 reins soit fonctionnel pour concentrer l'urine à 1,025 ou plus.

Bien que l'on puisse s'attendre à certaines variations de la densité urinaire chez les patients canins ayant une néphropathie naturelle, on constate qu'en général les chiens, ayant au moins un tiers des néphrons fonctionnels, ont un fonctionnement rénal adéquat qui évite l'apparition des signes cliniques de l'insuffisance rénale primitive (Osborne et Stevens, 1999).

b) Dilution urinaire

Etant donné qu'il faut un travail métabolique pour diluer le filtrat glomérulaire en retirant les substances dissoutes présentes dans un excès d'eau, une densité urinaire significativement inférieure à 1,008 indique qu'il existe suffisamment de néphrons fonctionnels pour diluer l'urine et éviter les signes cliniques associés à l'insuffisance rénale primitive. La dilution de l'urine est une réponse compensatrice appropriée et attendue à une hydratation excessive. Cependant la formation d'une urine diluée chez un patient en équilibre hydrique négatif est anormale.

Bien que le nombre minimal de néphrons nécessaire pour diluer l'urine du chien ou du chat, afin que sa densité soit inférieure ou égale à 1,005, n'a apparemment pas été déterminé, on suppose qu'il est similaire à celui nécessaire pour concentrer l'urine. Néanmoins, la capacité normale de dilution peut être apparemment maintenue avec moins de néphrons fonctionnels que ceux nécessaires pour le maintien de la capacité normale de concentration (Osborne et Stevens, 1999).

2.3.3.3 Les valeurs de densité urinaire chez les chiots et chatons

Il faut une prudence particulière pour interpréter la signification de la densité urinaire et de l'osmolarité chez les animaux immatures. En effet, leurs valeurs sont différentes de celles de l'adulte (Roche, 2003).

Les valeurs de densité urinaire chez le chiot et le chaton seront plus faibles car la capacité du rein à concentrer ces urines n'est pas atteinte (Osborne et Stevens, 1999).

La densité urinaire du chiot atteint sa valeur définitive à partir de 4 semaines d'âge. Jusqu'à 3 semaines, la densité urinaire du chiot peut évoluer de 1,003 à 1,055 (Faulks et Lane, 2003). Une récente étude s'est intéressé à réaliser des analyses urinaires de routine chez des chiots de 0 à 24 semaines d'âge. Les chiots étaient déclaré « sains » après examen clinique. Les urines étaient recueillies après miction spontanée par une seringue stérile dans les cages. Les urines étaient ensuite stockées dans un récipient de polypropylène au réfrigérateur pendant 4 heures. Pour augmenter la taille de l'échantillon, plusieurs recueils furent réalisés (2 à 3 par chien). Les expérimentateurs réalisèrent ensuite une bandelette urinaire, une analyse du sédiment urinaire et une mesure de densité urinaire. Les résultats ont montré que la densité urinaire d'un chiot de plus de 4 semaines était proche de celles des adultes. Cependant aucune étude ne compare réellement la densité urinaire des chiots de plus de 4 semaines à celle des adultes. L'étude fut menée sur un nombre conséquent d'individus (n = 118). Les chiots sont nourris au lait. Mais, on ne connaît pas ni l'activité des individus, la prise de boisson et les heures de recueil des urines. Or, la densité urinaire varie avec ces différents facteurs (Faulks et Lane, 2003).

2.3.3.4 Diminution de la densité urinaire

Pour interpréter des valeurs anormales de densité urinaire, il est important de prendre en compte l'état d'hydratation de l'animal, son régime alimentaire, de la mise sous perfusion ou non du patient et de l'azotémie.

En effet, il est important de distinguer une diminution de densité urinaire associée à une azotémie d'une diminution d'osmolarité urinaire seule.

a) Diminution de la densité urinaire et augmentation de l'azotémie

La perte totale de la capacité à concentrer les urines n'est souvent pas brutale mais se développe graduellement.

C'est pourquoi une densité urinaire comprise entre 1,007 et 1,029 chez le chien contre 1,007 et 1,039 chez le chat et associée à une azotémie suggère fortement une insuffisance rénale primitive, même si parfois un hypocorticisme peut engendrer les mêmes résultats. De la même manière, si ces valeurs de densité urinaires sont détectées chez des animaux

déshydratés mais non azotémiques, il faut suspecter une insuffisance rénale primitive ou une autre pathologie diminuant la capacité de concentration des urines.

b) Diminution de la densité urinaire sans augmentation de l'azotémie

Si des patients non azotémiques présentent une baisse de la capacité à concentrer leur urine, il faudra rechercher les causes d'une polyurie pathologique. La détermination de la densité urinaire ou de l'osmolarité urinaire pourra permettre de savoir si la polyurie est une diurèse acqueuse (1,001 +/- 1,006) ou une diurèse osmotique (+/- 1,008 ou plus).

Si on suspecte chez un patient non déshydraté et non azotémique une polyurie pathologique et que sa densité urinaire n'indique pas que les reins peuvent concentrer l'urine, il faudra effectuer d'autres tests « par provocation » avant d'établir des conclusions sur la capacité des reins à concentrer les urines (Osborne et Stevens, 1999).

Par exemple, lorsque l'on réalise un test de restriction hydrique chez un patient non azotémique et non déshydraté pendant un laps de temps approprié, on s'attend à ce que l'hormone antidiurétique soit libérée par l'hypophyse postérieure comme réponse compensatrice au déficit hydrique.

2.3.3.5 Augmentation de la densité urinaire

Une densité urinaire élevée peut être révélateur d'une déshydratation, de pertes sanguines internes ou externes, d'une diminution du débit cardiaque lors d'insuffisance cardiaque ou encore d'un état de choc (Osborne et Stevens, 1999).

Pour s'aider dans le diagnostic étiologique d'une diminution de capacité à concentrer les urines, il est important de réaliser un examen biochimique (détection de glycosurie, etc.), et physique des urines.

2.4 L'examen physique des urines

Les analyses physiques pouvant être réalisées sont l'étude de la couleur, de la turbidité et de son odeur.

2.4.1 La couleur de l'urine

2.4.1.1 Indication et méthode d'examen

La modification de la couleur de l'urine de l'animal est souvent un motif de consultation chez le vétérinaire.

Cependant, l'examen de la couleur urinaire en soi est d'un intérêt diagnostique limité. Comme il s'agit d'un examen facile et non coûteux, la détermination de la couleur de l'urine est incluse dans les analyses urinaires complètes de routine (Osborne et Stevens, 1999).

Il est important d'examiner la couleur de l'urine sous une bonne lumière. Pour ce faire, il est recommandé d'utiliser un volume standard d'urine placé dans un récipient standard transparent, en plastique ou en verre. Ensuite, on regarde la couleur de l'urine sur un fond blanc. La couleur de l'urine doit être jaune claire, jaune ou ambrée (Osborne et Stevens, 1999).

2.4.1.2 Interprétation

La couleur de l'urine est un composite de toutes les substances colorées qu'elle contient. L'intensité de la couleur urinaire peut être modifiée par différents procédés.

Plus la quantité de substances colorées dans l'urine est importante, plus l'intensité de la couleur de l'urine sera forte. De la même manière, le pH urinaire et la structure biochimique des substances présentes dans l'urine influenceront l'intensité de la couleur de l'urine.

Par ailleurs, étant donné que l'intensité de la couleur dépend de la quantité d'eau dans laquelle les pigments sont excrétés, la signification de la couleur doit être interprétée à la lumière de la densité urinaire. Au final, la couleur de l'urine peut être modifiée par la concentration et la dilution urinaires, diverses maladies, certains agents pharmacologiques et certaines substances ingérées.

En revanche, la plupart des aliments et des médicaments perdent leur couleur au cours de leur digestion et de leur métabolisme. Ils n'ont donc aucun effet notable sur la coloration de l'urine (Osborne et Stevens, 1999).

a) Couleur normale de l'urine

L'urine normale est typiquement transparente, jaune claire, jaune ou ambrée.

L'intensité du jaune de l'urine normale varie avec le degré de dilution ou de concentration de l'urine.

La couleur jaune est due principalement à l'excrétion rénale de l'urochrome plasmatique. Ce dernier provient de l'oxydation d'un urochromogène incolore. Il est jaune, liposoluble, et contient du soufre. Comme l'excrétion urinaire quotidienne de l'urochrome est relativement constante, la couleur urinaire fournit un indice brut du degré de concentration et de dilution urinaire (Chew et Dibartola, 1986).

Les urines très concentrées seront ambres, alors que les urines diluées seront incolores ou jaunes claires. La quantité d'urochrome peut également augmenter dans les urines maintenues à température ambiante. Une quantité d'urochrome supérieur peut être excrété lors de fièvre ou de jeun.

Enfin, l'urobiline, un produit de dégradation orange-brun de l'urobilinogène incolore, peut aussi contribuer à la couleur jaune de l'urine (Osborne et Stevens, 1999).

b) Couleur anormale de l'urine

La détection d'une couleur anormale de l'urine doit engendrer des questions sur le régime alimentaire, l'administration de médicament et l'environnement.

Bien qu'elles indiquent une anomalie, elles ne fournissent aucune information spécifique sur la localisation de la cause. L'étiologie d'une coloration anormale doit être confirmée par des examens de laboratoire appropriés et par l'examen du sédiment urinaire.

En ce qui concerne l'hématurie, la couleur de l'urine peut varier du rouge au noir selon la quantité de sang dans l'urine, le degré d'acidité de l'urine, et l'intervalle de temps pendant lequel le sang est en contact avec l'urine.

En effet, comme les hématies se désintègrent, elles libèrent l'hémoglobine qui, lorsqu'elle s'oxyde en méthémoglobine, devient brune à noire. L'hémoglobinurie résultant d'une hémoglobinémie peut aussi colorer l'urine fraîchement prélevée en brun ou noir si l'hémoglobine a été oxydée en méthémoglobine.

Par ailleurs, la myoglobinurie peut aussi rendre l'urine brune (Chew et Dibartola, 1986).

La bilirubine, elle peut provoquer une coloration jaune plus foncée que la normale. Il en est de même pour ses produits de dégradation. En revanche, une urine verte peut être associée à l'oxydation d'une grande quantité de bilirubine en biliverdine.

L'inconvénient de ces pigmentations de l'urine est que la couleur peut interférer avec les résultats des tests colorimétriques.

Enfin, lors des examens physiques de l'urine, il est très important de faire la différence entre la couleur de l'urine et sa transparence (Osborne et Stevens, 1999).

2.5 L'examen chimique des urines

Les analyses chimiques réalisables sont l'étude des protéines, du pH, des nitrites, des leucocytes, du glucose, des corps cétoniques, des érythrocytes, de l'hémoglobine de la bilirubine et de la myoglobine de l'urine recueillie.

La protéinurie peut être détectée de différente façon, alors que le reste de l'examen chimique des urines s'effectuera par bandelette urinaire.

2.5.1 Les protéines

L'examen de l'urine pour rechercher les protéines fait partie des analyses urinaires de routine, car lorsque les résultats sont interpréter en association avec les autres résultats cliniques et de laboratoire, ils facilitent souvent la détection, la localisation et même parfois l'identification spécifique des affections sous-jacente.

2.5.1.1 Définitions

La protéinurie se définit comme la détection de protéines dans l'urine. Les protéines urinaires sont composées d'une quantité variable de protéines plasmatiques, de protéines issues du tractus urinaire selon la méthode de prélèvement, et de protéines issues de l'appareil génital.

Chez des individus sains, la protéinurie peut variée de 0 à 50 mg/dl (Chew et Dibartola, 1986). Mais, la protéinurie est un terme normalement utilisé pour impliquer la présence d'une quantité anormale de protéine dans l'urine (> 20 mg/kg/J) (Osborne et Stevens., 1995).

Le terme de « protéinurie » est préférable à celui d'« albuminurie » car, malgré que l'albumine représente 90% des protéines plasmatiques, il a été trouvé plus de 40 protéines dans les urines normales qui peuvent également être présentes lors d'affections liées à une albuminurie.

a) La protéinurie de Bence Jones

La protéinurie de Bence Jones se définit par la présence de ces petites protéines (22 000 à 44 000 D) qui portent le nom du médecin anglais (Henry Bence Jones) qui les a découvertes. Ces protéines ont la capacité de précipiter lorsque l'urine est chauffée progressivement de 45 à 70 °C. Puis, elles ont tendance à se dissoudre à nouveau lorsque l'urine approche du point d'ébullition. Les protéines de Bence Jones sont des chaînes légères d'immunoglobuline et peuvent être observées dans les urines de patients souffrant de myélome multiple.

Une protéinurie cliniquement significative implique des examens supplémentaires pour rechercher sa cause et son évolution biologique. Il existe différents types de protéinurie (Osborne et Stevens, 1999).

b) La protéinurie physiologique ou fonctionnelle

Une protéinurie peut se produire lors de stress, d'exercice, de fièvre, d'épilepsie, et d'hyperthermie. Bien que la fonction glomérulaire soit temporairement modifiée, ce processus est rapidement réversible. Son mécanisme exact n'est pas encore bien défini. Mais, il peut être lié aux modifications du flux sanguin glomérulaire ou à celles de la perméabilité des parois capillaires des glomérules. Bien que cette protéinurie physiologique doive être différenciée des autres formes de protéinurie, la protéinurie fonctionnelle n'occasionne pas de signe clinique (Osborne et Stevens, 1999).

c) La protéinurie pré-glomérulaire

La protéinurie pré-glomérulaire fait référence à une protéinurie résultant d'une anomalie d'un appareil autre que l'appareil génito-urinaire. Il peut s'agir d'une protéinurie physiologique ou d'une protéinurie de surcharge.

Cette dernière fut initialement découverte en induisant expérimentalement de fortes concentrations de protéines plasmatiques chez des chiens. Ces protéines étaient administrées par voie parentérale. Lorsque la concentration sérique protéique augmente, une grande quantité d'albumine et d'autres protéines de fort poids moléculaire sont excrétées dans l'urine. La morphologie glomérulaire se modifie de façon réversible lors d'une excrétion protéique anormale. Au-delà des valeurs de 9g/dl de protéinémie, cette hyperprotéinémie entraîne une protéinurie (Osborne et Stevens, 1999).

Les causes d'hyperprotéinémie peuvent être le myélome multiple avec augmentation des protéines de Bence Jones dans le sang, une hypermyoglobinémie lors de traumatisme musculaire ou encore une hyperhémoglobinémie lors d'hémolyse infectieuse ou auto-immune (Chew et Dibartola, 1986).

d) La protéinurie d'origine rénale (glomérulaire ou tubulaire)

◆ La protéinurie glomérulaire

La protéinurie glomérulaire ou sélective peut se produire lors de glomérulopathie légère à modifiée. Les parois des capillaires glomérulaires portant des lésions minimales laissent passer les protéines plasmatiques ayant un poids moléculaire compris entre 60 000 à 80 000 D. Cependant, si les lésions empirent, des protéines de toutes taille et de tout poids moléculaire passeront la barrière hémato-glomérulaire. On parle de protéinurie non sélective (Osborne et Stevens, 1999).

◆ La protéinurie tubulaire

La protéinurie tubulaire se caractérise par l'excrétion de protéines plasmatiques de faible poids moléculaire (1500 à 45 000 D) du fait d'une anomalie de résorption par les tubules proximaux. L'électrophorèse des protéines peut montrer des pics alpha et bêta, qui sont caractéristiques d'une protéinurie tubulaire. Les maladies tubulaires ne provoquent pas d'hypoalbuminémie (Osborne et Stevens, 1999).

Il existe également une perte des protéines par les tubules rénaux lors de protéinémie de surcharge. Ces protéines qui ont traversé facilement la paroi des capillaires glomérulaires, surcharge les mécanismes de résorption tubulaire (Osborne et Stevens, 1999).

e) La protéinurie post-glomérulaire

La protéinurie post-glomérulaire résulte de la perte protéique provenant de la partie du tractus génito-urinaire située en dessous des glomérules. L'exsudation protéique est habituellement le résultat de pathologies inflammatoires, néoplasiques, ischémiques ou traumatiques. Par exemple, c'est le cas d'une cystite, de la prostatite, d'urolithiase ou encore de carcinome transitionnel de la vessie (Chew et Dibartola, 1986).

Quelque soit le type de protéinurie, il est très important dans un premier temps de détecter cette protéinurie.

2.5.1.2 Méthodes de mesure

Il existe, à l'heure actuelle, 3 techniques pour mettre en évidence une protéinurie ; le test colorimétrique par bandelette urinaire, le test de turbidité à l'acide sulfosalicylique et le test de Heller.

a) Test colorimétrique par bandelette urinaire

◆ Principe

Ce test est basé sur la capacité des groupes aminés des protéines à se lier avec certains indicateurs acido-basiques et à altérer leur coloration même lorsque le pH de l'échantillon reste constant du fait de l'emploi d'un tampon contenu dans la plage réactive.

Lorsque certains indicateurs colorés réagissent avec les protéines, ils libèrent les ions hydrogènes et provoquent un changement de coloration. La lésion du colorant dépend de groupes aminés libres de chaque protéine. Par exemple, l'albumine a plus de groupes aminés libres que les globulines, l'hémoglobuline, la protéine Bence Jones ou les mucoprotéines.

Du fait de la capacité réduite de ces colorants à détecter les autres protéines que l'albumine, les résultats de ce test sont dits semi-quantitatifs.

Le bleu de tétrabromophénol est jaune à un pH = 3. A un pH de 4, il est bleu ou vert. Les bandelettes urinaires du commerce sont imprégnées de cet indicateur coloré ainsi que d'un tampon citrate qui maintient le pH à 3. L'addition de protéines en quantité variable va

conduire à une augmentation du changement de couleur passant du jaune au bleu-verdâtre puis au bleu ou du jaune au vert clair même lorsque le pH reste à 3 (Osborne et Stevens, 1999).

◆ Interprétation

Une trace de protéine est un résultat normal. Une trace dans des urines dont la densité est 1,010 signifie que sa quantité de protéine est supérieure à celle des urines dont la densité urinaire est de 1,025. Le taux de protéine dans l'urine doit être inférieur à 0,65g/L (Chew et Dibartola, 1986).

Les résultats de ces tests ne sont pas modifiés par la turbidité urinaire. De plus, les modifications de pH dans les limites physiologiques des urines diluées n'affectent en général pas les résultats des tests.

En revanche, de l'urine diluée fortement basique ou des urines concentrées modérément alcalines peuvent induire des résultats faux-positifs. La capacité tampon de l'urine concentrée, comme on la rencontre souvent chez le chien et le chat, peut dépasser la capacité tampon de la bandelette réactive, même lorsque le pH est extrêmement basique. L'augmentation du pH va entraîner de faux-positifs. Il faut éviter d'acidifier l'urine dans le but d'empêcher des faux-positifs, car cela nécessite une quantité considérable d'acide qui va diluer l'urine ou précipiter les protéines (Osborne et Stevens, 1999).

De plus, comme tous les tests colorimétriques, les résultats faux-positifs peuvent aussi se produire si on laisse les bandelettes dans l'échantillon urinaire pendant assez longtemps pour que les réactifs des tests soient lessivés. De même, lors d'urine colorée par du sang, l'interprétation de la protéinurie peut être faussée. D'autre part, on ne peut pas « quantifier » la trace de protéinurie sur la bandelette (+, ++ ou +++) et d'autre part, on risque d'associer la protéinurie à l'hémoglobinurie alors qu'il peut y avoir une protéinurie d'origine glomérulaire avec une hématurie due à la méthode de prélèvement (Chew et Dibartola, 1986).

Par ailleurs, étant donné que la bandelette urinaire est beaucoup plus sensible à l'albumine qu'aux globulines, il peut se produire des résultats faux négatifs pour ces protéines. Par exemple, les protéines de Bence Jones ne peuvent être détectées que si elles sont présentes en grande quantité.

L'autre inconvénient majeur des bandelettes urinaires est que l'interprétation du degré de protéinurie (1+ à 4+) peut varier d'un individu à l'autre. Cependant, il existe aujourd'hui des lecteurs automatiques de bandelette urinaire qui permettent de s'affranchir de ces variations de mesure. En effet, Bauer, Rettig et Moritz ont prouvé que les résultats donnés par lecture de bandelette urinaire pour la protéinurie concordent avec ceux donnés par l'analyseur. Cependant, les manipulateurs utilisés dans ce travail étaient des lecteurs expérimentés (Bauer *et al.*, 2008).

Il existe d'autres méthodes de mesures, de la protéinurie.

b) Test de turbidimétrie à l'acide sulfosalicylique (ASS) et test de Heller

◆ Principe

● Test à l'ASS

Le test à l'ASS consiste à mélanger des parties égales d'ASS (solution 5%) et d'urine. Cet acide va précipiter les protéines urinaires et entraîner une turbidité de l'échantillon. Mais, toutes les protéines n'ont pas la même capacité à précipiter (Osborne et Stevens, 1999).

● Test de Heller

La technique de Heller, elle, utilise l'acide nitrique. Le principe consiste à déposer 2 à 3 ml d'acide nitrique sur 2 à 3 ml d'urine mise dans un tube à essai. L'urine remonte à la surface car la densité urinaire est inférieure à celle de l'acide nitrique. S'il y a des protéines dans l'urine, elles sont dénaturées et forment un disque blanc à l'interface (Osborne et Stevens, 1999).

◆ Interprétation

Dans le cas du test à l'ASS, pour interpréter la turbidité offerte par la réaction, il faut comparer cette turbidité à celle d'un échantillon de contrôle contenant du surnageant urinaire auquel il a été rajouté de l'eau et non pas l'acide sulfosalicylique. Les résultats de

ce test peuvent être faussés par la présence d'une turbidité urinaire due à des substances non protéiques. D'où l'intérêt de réaliser l'examen physique de l'urine.

De plus, il est très important d'utiliser pour ce test, le surnageant urinaire. En effet, on peut obtenir des résultats faux positifs ou une surestimation des résultats positifs si on n'utilise pas une aliquote d'urine centrifugée.

De la même manière, les produits radio-opaques excrétés dans l'urine peuvent être à l'origine de faux positifs.

Enfin, étant donné que l'évaluation de la turbidité n'est pas standardisée (1+ à 4+), il existe des variations entre individus. Néanmoins, contrairement à la bandelette urinaire, le test à l'ASS va détecter la protéine Bence Jones (Osborne et Stevens, 1999).

2.5.2 Le pH

2.5.2.1 Indication et méthode de mesure du pH

a) Indication

Le pH urinaire peut être utilisé comme indice brut de l'équilibre acido-basique de l'organisme. L'organisme produit en général un excès de métabolites acides. Les poumons régulent l'équilibre acido-basique par la rétention ou l'élimination de dioxyde de carbone, alors que les reins régulent l'équilibre acido-basique principalement en récupérant le bicarbonate du filtrat sanguin et/ou en excréant des protons (H⁺) sous forme d'ions ammoniums et d'ions phosphates.

Chez les chiens et les chats le tampon principal est d'ailleurs le phosphate (Osborne et Stevens, 1999).

Comme dans le cas de la densité urinaire, on ne peut interpréter les valeurs normales et anormales de pH sans avoir des informations supplémentaires. En effet, le pH varie avec l'alimentation et les affections urinaires. Par ailleurs, il existe des variations diurnes significatives du pH urinaire. Ces variations sont dues aux événements associés au repas et à la digestion. L'urine des chiens et des chats a tendance à être moins acide après l'ingestion d'aliment. Ce phénomène est lié à la « marée acide » due à l'augmentation de la sécrétion d'acide chlorhydrique dans l'estomac. Chez l'homme, après plusieurs heures de

sommeil, le pH urinaire est plus acide suite à l'acidose respiratoire associée à la baisse de ventilation au cours du sommeil.

L'intérêt de mesurer le pH urinaire est, d'une part, de faciliter la détermination du type de calculs urinaires présent dans l'urine avant l'analyse minérale. Par exemple, les calculs de phosphate de calcium et de phosphate ammoniaco-magnésien se forment dans l'urine basique.

D'autre part, l'évaluation du pH urinaire est intéressante lors de suspicion d'infection urinaire. Les infections urinaires provoquées par des bactéries productrices d'uréase (Staphylocoques et les Proteus) rendent l'urine basique. Cependant, la plupart des infections urinaires sont retrouvées dans les urines acides. En effet, la grande majorité des bactéries pathogènes ne produisent pas d'uréase.

L'interprétation du sédiment urinaire nécessite également la connaissance du pH urinaire. Les hématies, leucocytes, cylindres et autres structures protéiques ont tendance à se désintégrer en présence d'une urine basique (Osborne et Stevens., 1999).

Il existe donc plusieurs indications à mesurer le pH urinaire. A l'heure actuelle, 2 techniques de mesure du pH urinaire sont décrites ; le pH mètre et la bandelette urinaire.

b) Le pH mètre

Bien que le pH mètre fournisse d'excellent résultat, il n'est pas utilisé en clientèle courante du fait de son coût et de la facilité d'utilisation des bandelettes urinaires.

Au laboratoire, les pH mètres sont habituellement utilisés en association avec la détermination de l'acidité titrable.

◆ L'acidité titrable

● Définition

L'acidité titrable est la mesure simultanée de la concentration en ions ammonium et en bicarbonate.