



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

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

This is an author-deposited version published in : [http://oatao.univ-toulouse.fr/
Eprints ID : 17876](http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints ID : 17876)

To cite this version :

Ancel, Camille. *Détermination des intervalles de référence de la densité urinaire et du rapport protéines / créatinine urinaire chez les vaches adultes*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2016, 74 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

DÉTERMINATION DES INTERVALLES DE RÉFÉRENCE DE LA DENSITÉ URINAIRE ET DU RAPPORT PROTÉINES / CRÉATININE URINAIRE CHEZ LES VACHES ADULTES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

par

ANCEL Camille

Née, le 23 mai 1990 à Le Mans (72)

Directeur de thèse : M. François SCHELCHER

JURY

PRESIDENT :
Mme COURTADE-SAÏDI

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
M. François SCHELCHER
Mme. Catherine TRUMEL

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.

Mise à jour : 06/09/2016

DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p>Responsable : M. SANS</p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>EPIDEMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>MALADIES REGLEMENTEES-ZOONOSES- MEDECINE PREVENTIVE DES CARNIVORES DOMESTIQUES-DROIT VETERINAIRE :</u> M. PICAUVET Dominique, PR</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MCC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIERE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, MC M. MEYER Gilles, PR</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMELIORATION GENETIQUE ECONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p>Responsable : Mme GAYRARD</p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, MC Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. MILON Alain, PR M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, MC Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p><u>BIostatISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THERAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p>Responsable : Mme CADIERGUES</p> <p><u>ANESTHESIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MEDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MEDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES EQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme PRADIER Sophie, MC Mme LALLEMAND Elodie, AERC</p>

REMERCIEMENTS

A notre président du jury,

Madame le Professeure Monique COURTADE-SAÏDI,

Professeure des Universités,

Praticien hospitalier,

Service d'Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie,

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

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur François SCHELCHER,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour,

Qui nous a fait l'honneur et le plaisir d'accepter la direction de cette thèse,

Sincères remerciements.

Madame le Professeure Catherine TRUMEL

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie médicale des Equidés et Carnivores,

Pour votre collaboration et votre expertise à toutes les étapes de ce projet,

Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Nicolas HERMAN

Résident à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie des Ruminants,

Qui est à l'initiative de ce projet. Pour ta disponibilité et ton soutien tout au long de ce travail.

Pour le gîte et le couvert dans le Cantal. Je pourrais t'écrire toute une page de remerciements mais tu ne me laisserais jamais oublier ça !

Merci pour tout !

Aux personnes impliquées dans la réalisation de cette thèse,

Monsieur le Professeur Jean-Pierre BRAUN,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Physique et chimie biologiques et médicales,

Pour votre aide précieuse dans la réalisation et l'interprétation des statistiques de cette étude,

Remerciements chaleureux.

Mademoiselle le Docteur Pauline RAGOT,

Praticienne vétérinaire,

Pour les journées de prélèvements auxquelles tu as pris part,

Un grand MERCI !

Monsieur le Docteur Eugène HERMAN,

Praticien vétérinaire,

Pour votre accueil et votre aide sur le terrain,

Merci beaucoup.

A Marion,

Pour ton aide sur le terrain et ton accueil dans le Cantal,

Merci mille fois.

Aux techniciennes du Laboratoire de l'ENVT,

Pour la réalisation efficace des RPCU, malgré tout le travail de début d'année scolaire,

Sincères remerciements.

A tous les éleveurs qui nous ont accueillis,

Pour votre patience et votre aide, cette étude n'aurait pu être réalisée sans votre contribution,

Mille mercis !

A tout le service de Pathologie du Bétail de l'ENVT,

Pour votre aide au cours de cette étude et pour cette année d'internat entreprise à vos côtés,

Merci à tous.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX	11
INTRODUCTION.....	13
1. Matériel et méthodes.....	21
1.1. Sélection des sujets de la population de référence	21
1.1.1. Critères de partition	21
1.1.2. Critères d'exclusion.....	22
1.1.3. Critères d'inclusion	23
1.2. Caractéristiques pré-analytiques et prélèvement des spécimens	24
1.2.1. Collecte des urines.....	24
1.2.2. Conditionnement pré-analytique des spécimens	25
1.2.3. Conditions de conservation et d'acheminement des prélèvements	25
1.3. Analyse des spécimens.....	26
1.3.1. Analyses au chevet du patient	26
1.3.2. Analyses au laboratoire	28
1.4. Analyse statistique des données.....	29
2. Résultats	31
2.1. Caractéristiques de la population de référence.....	31
2.2. Intervalles de référence	33
2.2.1. Intervalle de référence de la densité urinaire.....	33
2.2.2. Intervalle de référence du RPCU.....	35
2.3. Influence des critères de partition sur les intervalles de référence	37
2.3.1. Influence du type de production sur le RPCU.....	37
2.3.2. Influence du stade physiologique sur le RPCU.....	39
3. Discussion.....	41
3.1. Validité du protocole expérimental.....	41

3.1.1.	Sélection des sujets de l'échantillon de référence	41
3.1.2.	Facteurs de variations pré-analytiques	42
3.1.2.1.	Facteurs liés au prélèvement	42
3.1.2.2.	Facteurs liés à la conservation du prélèvement	44
3.1.3.	Méthodes de détermination des intervalles de référence.....	45
3.2.	Influence des critères de partition sur l'intervalle de référence du RPCU	46
3.2.1.	Influence du type de production sur le RPCU.....	46
3.2.2.	Influence du stade de gestation sur le RPCU	47
3.2.3.	Influence de la ration alimentaire sur le RPCU.....	48
3.2.4.	Influence du poids sur le RPCU	48
CONCLUSION	51
BIBLIOGRAPHIE	53
ANNEXES	57
	Annexe 1 : Questionnaire troupeau	57
	Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement.....	58
	Annexe 3 : Consentement éclairé de l'éleveur	60
	Annexe 4 : Fiche de résultats de l'analyse d'urine	61
	Annexe 5 : Protocole expérimental.....	62
	Annexe 6 : Valeurs de référence de la densité urinaire et du RPCU	71

LISTE DES ABREVIATIONS

ANOVA : Analysis of Variance

ASVCP : American Society for Veterinary Clinical Pathology

CLSI : Clinical Laboratory and Standards Institute

IFCC : International Federation of Clinical Chemistry

RPCU : rapport protéines sur créatinine urinaires

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Distribution des âges des 115 vaches de la population de référence.....	32
Figure 2 : Distribution des valeurs de densité urinaire	34
Figure 3: Diagramme quantile-quantile de comparaison de la distribution observée de la densité avec une loi normale.....	34
Figure 4 : Représentation graphique des limites de l'intervalle de référence et des intervalles de confiance de la densité urinaire.....	35
Figure 5 : Distribution des valeurs de RPCU.....	36
Figure 6 : Diagramme quantile-quantile de comparaison de la distribution observée du RPCU avec une loi normale.....	36
Figure 7 : Représentation graphique des limites de l'intervalle de référence et des intervalles de confiance du RPCU.....	37
Figure 8 : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus pour l'ensemble des vaches, les laitières et les allaitantes	38
Figure 9 : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus pour l'ensemble des vaches et les sous-groupes de stade physiologique 1, 2 ou 3	39

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères d'exclusion portant sur l'analyse préliminaire des urines	23
Tableau 2 : Critères de sélection des animaux dans l'étude	24
Tableau 3 : Facteurs pré-analytiques de l'étude.....	26
Tableau 4 : Causes d'exclusion de la population de référence	31
Tableau 5 : Caractéristiques de la population étudiée : races	32
Tableau 6 : Caractéristiques de la population étudiée : stade physiologique.....	33
Tableau 7 : Caractéristiques de la population étudiée : alimentation.....	33
Tableau 8 : Résultats de l'analyse statistique des valeurs de référence pour la densité urinaire.....	35
Tableau 9 : Résultats de l'analyse statistique des valeurs de référence pour le RPCU	37
Tableau 10 : Données utilisées pour le test de Harris et Boyd concernant le type de production	38
Tableau 11 : Données utilisées pour les tests de Harris et Boyd concernant le stade physiologique	40

INTRODUCTION

Le prélèvement d'urine est un acte simple et non invasif. Il n'est pas systématiquement réalisé sur le terrain mais devrait faire partie intégrante de l'examen clinique d'un bovin (Bouisset, 2003). La symptomatologie assez fruste des troubles rénaux chez les bovins souligne l'importance des analyses de biologie médicale (Schelcher et al., 1995). Actuellement, l'exploration urinaire de routine rassemble, d'une part, des analyses au chevet de l'animal : examen macroscopique de l'urine et bandelette urinaire ; et exceptionnellement, des analyses du laboratoire : densité urinaire, biochimie et cytologie urinaire. Néanmoins, ces examens paracliniques nécessitent l'existence de valeurs de référence, permettant d'identifier des résultats anormaux.

Physiologiquement, l'urine des bovins est jaune et limpide, avec une « odeur légèrement aromatique » (Gründer, 1979). Les modifications de son aspect macroscopique peuvent être évocatrices de certaines anomalies rénales (Schelcher et al., 1999).

La couleur jaune des urines est plus ou moins marquée selon leur concentration/dilution. Une coloration anormale peut également être notée : les urines sont rouges à brunâtres lors d'hémoglobinurie (hémolyse intravasculaire), de myoglobininurie (lyse musculaire) ou d'hématurie (pyélonéphrites, cystite ou urolithiase).

La transparence de l'urine peut aussi être altérée. La turbidité est notamment augmentée lors de pyurie, c'est un signe d'appel de pyélonéphrite (Schelcher et al., 1995).

Les paramètres évalués par la bandelette urinaire

Les bandelettes urinaires sont employées en routine, en médecine vétérinaire. Il s'agit d'une méthode de détection semi-quantitative de substances, habituellement présentes en très faible quantité, dans les urines. Les bandelettes utilisées sont celles étalonnées pour la médecine humaine. Quatre marques sont disponibles en pratique vétérinaire courante : Kitvia[®], Siemens[®], Combur[®] et Kruuse[®] (cf catalogue Centravet).

Une étude visait à comparer les résultats de 4 bandelettes urinaires (Combur 10 Test[®], Combi-Screen 11SYS[®], Multistix 10 SG[®] et URS-10[®]) sur un même échantillon d'urine (Moyen et al., 2008). Au cours de cette recherche, les urines de 53 chiens, 11 chats, 9 chevaux et 12 bovins ont été testées.

La conclusion tirée était que les bandelettes de différentes marques donnaient des résultats analogues, hormis sur les plages de densité et de pH. Les auteurs soulignaient que les principales sources d'erreurs découlaient des conditions de conservation et d'utilisation des bandelettes.

Une autre étude a été réalisée sur 100 bovins malades (hôpital de Giessen, Germany) visant à déterminer la fiabilité de la bandelette, par rapport à la méthode de mesure de référence, pour chaque variable évaluée (Defontis et al., 2013). La sensibilité et la spécificité des bandelettes ont été calculées pour certains analytes. La lecture des bandelettes a été réalisée par deux observateurs différents tout au long de l'étude. L'analyse statistique a été réalisée avec une méthode non paramétrique de corrélation des rangs, permettant de tester l'existence d'une relation entre deux variables. Les résultats ont été exprimés avec le coefficient de corrélation des rangs de Spearman (r_s). Cette étude a été réalisée sur 2 bandelettes urinaires différentes (Aution sticks[®] 10PA et Aution sticks[®] 10EA) qui donnaient des résultats similaires. Les conclusions de cette recherche seront citées, pour chaque plage de la bandelette, présentée ci-après.

❖ Protéines

L'urine des bovins contient physiologiquement moins de 10 mg/L de protéines (Gründer, 1979). Sur les bandelettes urinaires, l'indicateur coloré le plus utilisé est le bleu de tétrabromophénol, il permet une détection à partir de 50 mg/L d'albumine (Pagès et Trouillet, 1990). La bandelette urinaire ne détecte donc pas les valeurs de protéinurie physiologique.

Cependant, on peut observer une réaction faussement positive lorsque les urines sont alcalines (pH>8), ceci est souvent le cas dans l'espèce bovine (Guatteo, 2007). Les désinfectants tels que la chlorhexidine sont également sources de faux positifs (Pagès et Trouillet, 1990).

Par ailleurs, la réaction de la bandelette est plus sensible pour détecter l'albumine que les globulines. Ainsi, on peut obtenir un faux négatif si la protéinurie se compose uniquement de protéines de faible poids moléculaire (Pagès et Trouillet, 1990).

La bandelette urinaire a été comparée au dosage quantitatif (colorimétrie au rouge de pyrogallol) pour la détection des protéines (Defontis et al., 2013). Les deux méthodes ont une faible corrélation ($r_s = 0,20$). En excluant les urines alcalines de l'échantillon, la corrélation entre les résultats de la bandelette et la méthode de référence était plus élevée.

Les bandelettes ont une bonne spécificité de détection des protéines (Sp = 92,6%). En revanche, leur sensibilité est faible (Se = 52% pour Aution Sticks[®] 10PA et Se = 57,5% pour Aution Sticks[®] 10EA) (Defontis et al., 2013). Ainsi, la bandelette urinaire donne de nombreux résultats faussement négatifs. Elle ne permet pas une détection précoce de la protéinurie.

Les principales affections rénales des bovins (pyélonéphrite, glomérulonéphrite, amyloïdose, nécrose

tubulaire aigüe) sont à l'origine d'une protéinurie (Smith, 2009a). La détection précoce et l'évaluation qualitative et quantitative des protéines de l'urine est donc un outil diagnostique important.

❖ Sang

La plage « sang » détecte une activité peroxydasique. Elle permet ainsi la mise en évidence d'hémoglobinurie, d'hématurie ou de myoglobulinurie (Schelcher et al., 1999).

De faux positifs peuvent survenir lors de présence d'un nombre important de leucocytes dans les urines ou lors de contamination par des oxydants. Une réaction faussement négative est possible si les urines sont très concentrées ou dans le cas d'une protéinurie élevée (Bouisset, 2003).

L'examen microscopique du culot urinaire permet de visualiser directement les hématies et d'estimer approximativement leur quantité. Cette méthode directe est plus fiable que la bandelette pour détecter une hématurie.

La comparaison des deux méthodes a été effectuée (Defontis et al., 2013) et leur corrélation est faible ($r_s = 0,53$ pour Aution sticks[®] 10PA et $r_s = 0,49$ pour Aution sticks[®] 10EA). La détection d'une hématurie à la bandelette nécessite donc une confirmation par examen microscopique du culot urinaire.

Une hématurie peut avoir une cause d'origine rénale (pyélonéphrite, choc endotoxinique), vésicale (hématurie essentielle, cystite, calcul) ou urétrale (calcul, traumatisme) (Schelcher et al., 1999).

Une hémoglobinurie est présente en cas d'hémolyse intravasculaire. Elle peut être causée par une piroplasmose, une leptospirose ou une intoxication (Smith, 2009a).

Enfin, une myoglobulinurie témoigne d'une forte lyse musculaire (Camart-Perié et Perié, 2007).

❖ Leucocytes

La bandelette détecte une réaction enzymatique avec les estérases des polynucléaires neutrophiles (Bouisset, 2003). La sensibilité et la spécificité de la bandelette urinaire pour la plage « leucocytes » ont été définies en médecine canine ($Sp = 93,2\%$ et $Se = 46\%$) par une étude menée sur 229 chiens malades au Colorado State University Veterinary Teaching Hospital (Vail et al., 1986).

La cytologie du culot urinaire permet la visualisation microscopique des globules blancs présents dans l'urine prélevée, ainsi qu'une estimation approximative de leur quantité. Cette méthode est, par conséquent, plus fiable pour mettre en évidence une pyurie.

La comparaison entre la détection des leucocytes par la bandelette urinaire et par cytologie a été réalisée (Defontis et al., 2013) : la corrélation entre ces deux méthodes est faible ($r_s = 0,29$). Ce résultat doit cependant être interprété avec précaution, en raison du faible nombre de bovins avec une pyurie inclus dans l'étude ($n = 6$).

Une pyurie est majoritairement causée par une pyélonéphrite et, de façon moins fréquente, par une

cystite (Schelcher et al., 1999).

❖ Glucose

Selon les bandelettes, le seuil de détection de la glycosurie est différent. Il s'étend de 0,5 g/L pour les bandelettes Combur 10 Test[®] et Combi-Screen 11SYS[®] à 1g/L pour la bandelette Multistix 10 SG[®] (Moyen et al., 2008).

La mise en évidence du glucose est basée sur une réaction d'oxydation. Ainsi, la présence d'oxydants engendre de faux positifs tandis que celle de réducteurs (corps cétoniques en quantité importante, vitamines B ou C, bactéries) génère de faux négatifs (Schelcher et al., 1999).

Pour être interprétable, la glycosurie doit être comparée à la glycémie (Bouisset, 2003). En effet, on peut observer une glycosurie lors d'hyperglycémie marquée car la capacité de réabsorption tubulaire est dépassée. Elle est généralement associée à un traitement antérieur (perfusion de soluté glucosé hypertonique, corticoïdes) ou à un stress important (Schelcher et al., 1999).

La glycosurie peut également être le marqueur d'un dysfonctionnement tubulaire. Dans ce cas, la glycémie de l'animal est normale (Camart-Perié et Perié, 2007).

La détection de la glycosurie par la bandelette a été comparée au dosage quantitatif du glucose par la glucose oxydase (Defontis et al., 2013). La corrélation entre ces deux méthodes était bonne ($r_s = 0,82$ pour Aution sticks[®] 10PA et $r_s = 0,80$ pour Aution sticks[®] 10EA). La spécificité et la sensibilité de la bandelette urinaire pour le glucose sont excellentes ($Sp = 93\%$ et $Se = 93,1\%$). Ainsi, la bandelette semble fiable pour la détection du glucose.

❖ Corps cétoniques

Trois corps cétoniques peuvent être présents dans les urines : l'acétone, l'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate. La plage « corps cétoniques » de la bandelette urinaire est basée sur la réaction du nitroprussiate de sodium qui ne détecte que l'acétoacétate et, dans une moindre mesure, l'acétone (Adler et al., 1956). Leur concentration physiologique dans les urines des bovins est inférieure à 15mg/dL. Cependant, la bandelette urinaire les détecte à partir de 10 mg/dL. Ainsi, la bandelette donnera des résultats faussement positifs entre 10 et 15 mg/dL (Gründer, 1979). De faux négatifs peuvent, quant à eux, être constatés en cas de multiplication bactérienne (Bouisset, 2003).

La bandelette a une bonne spécificité : 99 % (Carrier et al., 2004 ; Krogh et al., 2011). Sa sensibilité est plus faible et varie selon les études : 49% (Carrier et al., 2004) et 78 % (Krogh et al., 2011).

La plage « corps cétoniques » est très utile pour la détection d'une cétose (primaire ou secondaire) mais ne présente pas d'intérêt dans l'exploration de la fonction rénale des bovins (Schelcher et al., 1999).

❖ Pigments biliaires (bilirubine et urobilinogène)

Ils sont interprétables en cas de forte positivité à la bandelette urinaire et signalent alors une atteinte hépatique importante. Dans ce cas, d'autres examens complémentaires doivent être entrepris (Radigue, 2003).

Tout comme les corps cétoniques, ces plages sont utiles dans le diagnostic de maladies hépatiques mais elles n'ont pas d'intérêt dans la détection des pathologies rénales des bovins (Schelcher et al., 1999).

❖ pH

L'échelle colorimétrique de la bandelette ne permet pas une mesure précise du pH (gradation à l'unité près). Les bandelettes pH Merck® reposent également sur une échelle colorimétrique mais la gradation est plus précise (gradation à 0,3 près). La seule méthode de mesure exacte du pH est le pH-mètre, lorsqu'il est correctement étalonné.

L'estimation du pH par la bandelette urinaire a été comparée à celle réalisée avec un pH-mètre (Defontis et al., 2013). La corrélation des résultats était excellente ($r_s = 0,91$) en ramenant le pH du pH-mètre à l'unité la plus proche.

Le pH urinaire des bovins dépend principalement de l'excrétion de potassium, majoritairement apporté par le fourrage chez les ruminants. Il reflète donc, en grande partie, la proportion alimentaire de fourrages et de concentrés.

L'intervalle de référence concernant le pH urinaire des bovins est plus ou moins large selon les sources : entre 7 et 9 (Smith, 2009b)

Un pH acide (5 - 6,5) est associé à une anorexie prolongée, une cétose ou une acidose ruminale (Radigue, 2003). Par conséquent, en elle-même, la mesure du pH urinaire est négligeable dans l'exploration des pathologies rénales des bovins (Schelcher et al., 1999). Cependant, elle doit être prise en compte dans l'interprétation de la protéinurie détectée sur la bandelette urinaire.

❖ Densité

La mesure de la densité urinaire peut également participer à l'établissement du diagnostic d'une atteinte rénale. Elle dépend du bilan hydrique de l'animal, de l'aptitude du rein à concentrer l'urine et, de manière plus anecdotique, de l'élimination urinaire de certaines molécules telles que les protéines (Schelcher et al., 1999).

Comme pour le pH, la bandelette urinaire donne un résultat imprécis pour la densité. De plus, la corrélation entre le résultat donné par la bandelette et celui lu sur le réfractomètre (Defontis et al., 2013) est médiocre ($r_s=0,36$).

La densité est rarement évaluée en routine. Elle doit être mesurée à l'aide d'un réfractomètre. L'intervalle de référence cité pour la densité urinaire varie selon les sources : comprise entre 1,020 et 1,040 (Guatteo, 2007), entre 1,030 et 1,045 (Reece, 2009) et entre 1,020 et 1,050 (Smith, 2009b). Dans ces trois ouvrages, le protocole expérimental ayant permis d'aboutir à ces intervalles de référence n'est pas décrit. Par conséquent, il est difficile de statuer sur la fiabilité des valeurs citées.

Ainsi, la bandelette urinaire est une méthode de détection dont la fiabilité est très variable selon les analytes considérés. L'aspect macroscopique de l'urine est un paramètre à ne pas négliger. La bandelette urinaire doit servir d'indicateur permettant d'orienter vers des examens de laboratoire.

Evaluation de la protéinurie

❖ Evaluation semi-quantitative

La réaction de Heller est une méthode semi-quantitative de détection de la protéinurie, réalisable directement au cabinet vétérinaire, permettant de confirmer une protéinurie. C'est un test à l'acide nitrique, fondé sur la dénaturation des protéines en milieu acide. Une réaction positive est caractérisée par la formation d'un anneau blanchâtre et floconneux au niveau de l'interface entre l'urine et l'acide (Bouisset, 2003). Son épaisseur est globalement proportionnelle à la quantité de protéines précipitées (Guatteo, 2007). Les seuils de détection de la réaction de Heller sont de 50 à 100 mg/L chez le chien (Grauer et al., 1985). Ils n'ont, à notre connaissance, pas fait l'objet d'étude chez les bovins. Cette méthode est considérée comme plus fiable que la bandelette urinaire pour détecter une protéinurie. Cependant ces techniques sont, par nature, moins précises que les méthodes de dosage quantitatives.

❖ Evaluation quantitative

D'après la littérature, la méthode la plus fiable pour évaluer la protéinurie est le suivi de l'excrétion protéique pendant 24 heures (Osborne et Finco, 1995). En effet, la valeur varie selon la concentration/dilution des urines au cours de la journée. Chez les bovins, la récolte d'urine sur 24h est difficile dans les conditions d'élevage (Chizzotti et al., 2008). On va donc lui préférer un prélèvement urinaire ponctuel. La concentration mesurée sur cet échantillon doit alors être corrigée, selon la dilution de l'urine, afin d'obtenir une approximation de la protéinurie totale en 24 heures (Osborne et Finco, 1995). Ces techniques d'estimation sont fondées sur le calcul de ratios.

En médecine humaine, la créatininurie est utilisée comme facteur de correction de la concentration/dilution de l'urine. En médecine vétérinaire canine, de nombreux auteurs ont également démontré la forte corrélation entre le rapport protéines sur créatinine urinaire (RPCU) et la quantité

de protéines urinaires émises sur 24 heures (Barsanti et Finco, 1979 ; Grauer et al., 1985 ; McCaw et al., 1985). Ceci a conduit à la détermination d'intervalles de référence de la protéinurie chez le chien. A notre connaissance, aucun intervalle de référence n'a été établi, chez les bovins, ni pour la protéinurie, ni pour la créatininurie.

Cependant, l'excrétion de créatinine a précédemment été utilisée, comme facteur de correction de la concentration/dilution de l'urine des bovins, pour estimer l'excrétion urinaire des dérivés de purine. Les auteurs ont démontré que le calcul de la quantité de dérivés de purine divisé par la quantité de créatinine sur un échantillonnage ponctuel d'urine, donne une estimation très proche de la mesure réalisée pendant 24 heures (Chizzotti et al., 2008 ; Oliveira et al., 2001 ; Silva et al., 2001 ; Valadares et al., 1999).

La valeur moyenne de l'excrétion de créatinine urinaire mesurée pendant 24 heures, chez des vaches en bonne santé, est systématiquement exprimée selon le poids de l'animal. Elle diffère légèrement selon les études :

- 0,256 mmol/kg de poids vif, chez 24 Prim'Holstein en lactation (Valadares et al., 1999)
- 0,207 mmol/kg de poids vif, en moyenne, chez 16 Prim'Holstein (Oliveira et al., 2001).
- 0,209 mmol/kg de poids vif, sur 15 vaches croisées : Prim'Holstein x Gir (Silva et al., 2001)
- 0,212 mmol/kg de poids vif, chez 15 Prim'Holstein en lactation (Chizzotti et al., 2008)

Ainsi, un intervalle de référence du RPCU pourrait être évalué dans l'espèce bovine et permettre une évaluation quantitative de la protéinurie, plus précise que toutes les méthodes actuellement disponibles. De plus, cette évaluation quantitative peut aider à localiser la structure rénale atteinte. En effet, une atteinte glomérulaire provoque une protéinurie massive tandis qu'une atteinte tubulo-interstitielle engendre une protéinurie plus modérée (Smith, 2009a).

❖ **Evaluation qualitative**

La détermination de la nature des protéines urinaires permet d'avoir des informations, plus fines que celles fournies par une évaluation quantitative, sur la localisation de l'atteinte rénale. L'électrophorèse est une méthode d'évaluation qualitative des protéines urinaires, basée sur la différence de migration des protéines en fonction de leur poids moléculaire.

Une atteinte glomérulaire est caractérisée par une perte d'albumine et de protéines de haut poids moléculaire (>69kDa). Tandis qu'une atteinte tubulaire se traduit par une perte de protéines de faible poids moléculaire (<69kDa) (Reece, 2009).

Etablissement d'un intervalle de référence en médecine vétérinaire

L'établissement d'un intervalle de référence est basé sur des recommandations internationales émanant de l'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) en 1970 puis adoptées et révisées par le Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI, 2008). Un intervalle de référence est généralement défini comme l'intervalle contenant 95% des valeurs obtenues pour la population de référence. Par conséquent, les limites de cet intervalle correspondent aux quantiles 0,025 et 0,975 de la distribution des valeurs de référence (Friedrichs et al., 2012 ; Geffré et al., 2009).

Il existe plusieurs procédés pour établir un intervalle de référence (Friedrichs et al., 2012 ; Geffré et al., 2009). En l'absence de données préalables, un intervalle de référence *de novo* sera déterminé. La démarche préconisée pour définir cet intervalle de référence est décrite par l'IFCC et le CLSI dans la recommandation C28-A3 (CLSI, 2008) et adaptée à la médecine vétérinaire par l'American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) (Friedrichs et al., 2012).

L'étape initiale et primordiale est le recrutement rigoureux d'un échantillon de référence, composé d'animaux sains, représentatif de la population étudiée. Les critères d'inclusion et d'exclusion des animaux doivent être clairement définis et décrits (Friedrichs et al., 2012). Un minimum de 120 individus de référence est recommandé, lors de l'utilisation d'une méthode non paramétrique de détermination de l'intervalle de référence, avec un intervalle de confiance de 90% (Friedrichs et al., 2012 ; Geffré et al., 2009).

Il est conseillé de standardiser le mieux possible les procédures de prélèvement, de stockage et d'analyse des spécimens afin de limiter les facteurs de variations pré-analytique et analytique. Enfin, une bonne traçabilité des spécimens doit être assurée par une identification rigoureuse de l'ensemble des prélèvements (Friedrichs et al., 2012).

L'objectif de notre étude est d'établir les intervalles de références de la densité urinaire et du RPCU en nous basant sur les recommandations de l'IFCC et de l'ASVCP (Friedrichs et al., 2012).

1. MATERIEL ET METHODES

Le protocole expérimental élaboré pour cette étude et détaillé ci-après, respecte les recommandations du CLSI (CLSI, 2008) et de l'ASVCP (Friedrichs et al., 2012). Il a été validé par un comité d'éthique sous le numéro SSA-2015-002.

Cette étude expérimentale prospective a été menée dans 32 élevages entre décembre 2015 et juin 2016.

1.1. Sélection des sujets de la population de référence

La détermination d'un intervalle de référence s'appuie sur le choix d'un échantillon de référence. Celui-ci doit être composé d'individus sains et représentatifs de la population étudiée.

Nous avons choisi de prélever au maximum 5 animaux par élevage afin de limiter un biais d'échantillonnage par un « effet élevage » : parenté, alimentation, conduite du troupeau...

1.1.1. Critères de partition

❖ Répartition géographique

Les sujets sains constituant la population de référence ont été sélectionnés, au hasard, au sein des 32 élevages répartis dans l'Ouest de la France (Haute Garonne, Aveyron, Gers, Cantal, Deux Sèvres). Ces élevages, sans trouble sanitaire majeur, ont été recrutés selon les conseils du vétérinaire traitant. Pour des raisons pratiques, chaque journée de prélèvement, soit 3 à 4 élevages, se concentrait dans une zone géographique limitée à environ 30 km autour d'un cabinet vétérinaire.

❖ Age et sexe

Il a été décidé de ne mener cette étude que sur des vaches adultes. Les génisses, les veaux et les mâles ont été exclus en raison de la difficulté voire de l'impossibilité de sondage urinaire.

Aucun autre critère d'âge n'a été pris en compte dans la sélection des vaches adultes prélevées.

❖ Poids

Le poids a été estimé en mesurant le périmètre thoracique, en arrière de l'épaule, de chaque animal prélevé. Il a été évalué afin de réaliser des sous-groupes et d'étudier son influence éventuelle sur les valeurs de référence du RPCU.

❖ **Type de production et races**

La proportion des races prélevées dans l'échantillon a été établie de manière à être aussi représentative que possible de la prévalence de la race au sein du cheptel bovin français (d'après les chiffres de l'institut de l'élevage (Groupe Economie du Bétail (GEB) 2015) ; septembre 2015).

❖ **Stade physiologique**

Le stade physiologique de l'animal a également été pris en compte dans le choix des sujets prélevés.

Il a été défini de la manière suivante :

- Vaches en premier trimestre post-partum (0 à 3 mois après le vêlage) : groupe 1
- Vaches en production (3 à 9 mois post-vêlage) : groupe 2
- Vaches en dernier trimestre de gestation (0 à 3 mois avant le terme prévu) : groupe 3

L'objectif était d'obtenir, en proportions équivalentes, des prélèvements de ces trois stades physiologiques.

❖ **Alimentation**

L'objectif était de prélever en proportions équivalentes les vaches dont la ration était à base de foin ou d'herbe et celles dont la ration était à base d'ensilage de maïs.

1.1.2. Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion de l'animal dans l'étude ont été définis comme suit :

- Animal ayant reçu un traitement (hormis antiparasitaire) durant le mois précédant le prélèvement.
- Animal avec un historique d'affection diverse (boiterie, mammite, métrite...) durant le mois précédant le prélèvement.
- Animal déclaré malade sur la base des réponses de l'éleveur au questionnaire et/ou de l'examen clinique

- Animal présentant une modification des urines : aspect macroscopique, bandelette urinaire anormale, cytologie modifiée. Les seuils retenus, pour chaque paramètre évalué, ont été synthétisés ci-après [**Tableau 1**].

Tableau 1 : Critères d'exclusion portant sur l'analyse préliminaire des urines

Analyse au chevet du patient	Critères d'exclusion
Aspect macroscopique	Urine trouble
Bandelette urinaire	Plage « corps cétoniques » positive
Cytologie urinaire	Présence de bactéries Moyenne des leucocytes sur 10 champs supérieure à 5 Moyenne des hématies sur 10 champs supérieure à 8

1.1.3. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion de l'animal dans l'étude ont été définis comme suit :

- Vache adulte de pure race ayant déjà eu au moins un veau.
- Pour chaque race, un nombre de vaches proportionnel à la prévalence de cette race au sein du cheptel bovin français.
- Vache ayant été jugée en bonne santé. D'une part, d'après les réponses fournies par l'éleveur à un questionnaire (Annexe 1). D'autre part, grâce à un examen clinique réalisé le jour du prélèvement de l'animal (Annexe 2).
- Un maximum de 5 animaux par élevage.

Un nombre de 150 prélèvements a été initialement prévu dans l'objectif de recueillir un minimum de 120 résultats exploitables, après élimination des spécimens ne correspondant pas aux critères de sélection dans l'étude. Cette limite de 120 spécimens permet de prétendre à des intervalles de confiance à 90% des limites des intervalles de référence (Friedrichs et al., 2012).

Les animaux rassemblant les critères choisis [**Tableau 2**] ont été inclus uniquement après une information complète du propriétaire, associée à la signature du « Formulaire de consentement éclairé » (Annexe 3).

Tableau 2 : Critères de sélection des animaux dans l'étude

Critères de sélection	Catégories	Protocole expérimental
Biologique	Age	Animal ayant déjà vêlé au moins 1 fois (> 2ans)
	Sexe	Femelles uniquement
	Race	Proportionnelle à la prévalence de chaque race dans le cheptel français
	Stade physiologique	3 stades : - 1er trimestre post-partum (0 à 3 mois post-vêlage) - en production (3 à 9 mois post-vêlage) - dernier trimestre de gestation (0 à 3 mois avant terme)
	Alimentation	Avec ou sans ensilage de maïs
Clinique	Antécédents cliniques	Absence de signe clinique dans le mois précédent le prélèvement
	Traitements médicaux	Absence de traitement (hormis antiparasitaire) dans le mois précédent le prélèvement
	Etat de "bonne santé"	Anamnèse avec l'éleveur ; examen clinique le jour du prélèvement
	Examens complémentaires	Analyse d'urine préliminaire : 1 opérateur (Pre Cathy Trumel)
Géographique	Localisation	Ouest de la France : plaine (élevages avec fort potentiel de lactation) et moyenne montagne (élevage avec potentiel de lactation plus faible)
	Elevage	5 animaux maximum prélevés par élevage

1.2. Caractéristiques pré-analytiques et prélèvement des spécimens

1.2.1. Collecte des urines

Les urines ont été recueillies par sondage urinaire ou miction spontanée, après un nettoyage à l'eau de la vulve et un essuyage minutieux. Le sondage a été effectué avec une sonde urinaire métallique courbe stérilisée, réutilisable, de 5 mm de diamètre et 540 mm de long.

La désinfection des sondes urinaires a été réalisée avec de la Chlorhexidine diluée à 5% (HYDEACHLOREX[®], LPG, Dinan, France) pour un temps de contact minimal d'une heure. Cette opération a été effectuée en maintenant les sondes dans un gant de fouille rempli de solution de Chlorhexidine. Après chaque journée de prélèvement, les sondes étaient désinfectées selon ce protocole, puis stérilisées à 200°C pendant 2 heures.

Une quantité d'urine de 8 mL à 20 mL a été récoltée pour chaque animal à l'aide d'une seringue stérile de 20 mL (seringue Omnifix[®], Luer Solo, Melsungen, Germany). Chaque vache a été prélevée une seule fois.

1.2.2. Conditionnement pré-analytique des spécimens

La seringue d'urine recueillie pour chaque vache a été répartie dans 4 tubes Eppendorf (tube 1,5mL, Safe-Lock Eppendorf[®], Hamburg, Germany).

Les 4 spécimens récupérés ont été centrifugés, à température ambiante, dans la centrifugeuse EBA 3S (Andreas Hettich GmbH and Co., Tuttlingen, Allemagne) à 1500 tours/min pendant 5 minutes. Cette étape permettait d'obtenir la séparation du surnageant et du sédiment.

L'extraction du surnageant a été effectuée avec précaution afin d'éviter une remise en suspension prématurée du sédiment. Environ 1,35 ml de surnageant a été extrait de chaque tube Eppendorf à l'aide de pipettes. Le surnageant des 3 spécimens destinés à des analyses ultérieures a été réparti dans 3 nouveaux tubes Eppendorf.

Dans le dernier tube Eppendorf, le surnageant a également été extrait. Puis la remise en suspension du sédiment a été réalisée par une alternance de pressions-dépressions lentes de la pipette plongée dans l'urine résiduelle. Le surnageant et la suspension du sédiment de ce tube ont immédiatement été utilisés pour l'analyse préliminaire de l'urine (dite « analyse au chevet du patient »).

Les spécimens avec un aspect macroscopique anormal ont été éliminés avant toute analyse.

1.2.3. Conditions de conservation et d'acheminement des prélèvements

❖ Entre l'élevage et le lieu d'analyse préliminaire des urines (cabinet vétérinaire)

Chaque seringue de prélèvement a été identifiée, à l'aide d'un marqueur indélébile, avec le numéro d'étude imputé à l'animal (le codage des échantillons utilisés pour l'étude, est détaillé dans le protocole expérimental – Annexe 5).

Elle a ensuite été stockée dans une glacière, à +4°C, jusqu'au lieu d'analyse. Le délai maximal toléré entre le prélèvement et le début de l'analyse était de 2 heures.

❖ Entre le lieu d'analyse préliminaire et le laboratoire

Les 3 tubes Eppendorf conservés par animal ont été gardés à +4°C pendant le transport jusqu'au lieu de stockage (12 heures maximum).

Enfin, ils ont été stockés à -80°C, à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse jusqu'à leur analyse au laboratoire.

En résumé, l'ensemble des facteurs pré-analytiques de notre recherche sont synthétisés dans le tableau ci-après [**Tableau 3**].

Tableau 3 : Facteurs pré-analytiques de l'étude

Facteurs pré-analytiques	Catégories	Protocole expérimental
Période de collecte	Période de l'année	Janvier à juillet 2016
	Moment de la journée	Indifférent
Préparation du patient	Contention	Cornadis ou travail ; assurée par l'éleveur
	Nettoyage	Eau claire et essuyage minutieux de la vulve
Préparation du matériel	Désinfection	Chlorhexidine 5% (temps de contact > 1 heure)
	Stérilisation	Four 200°C : pendant 2 heures
Collecte de l'échantillon	Manipulateur	Dr Nicolas Herman, Camille Ancel
	Système de collecte	Sondage urinaire ou miction spontanée
Gestion de l'échantillon	Transport	< 2 heure entre l'élevage et le lieu de centrifugation
	Température	4°C dans une glacière
	Manipulateur	Opérateur unique (Pre Cathy Trumel)
	Centrifugation	Centrifugeuse EBA 3S ; 1900 tours/min pendant 5 minutes
Stabilité du spécimen	Transport	< 48 heures entre la centrifugation et le lieu de conservation
	Stockage avant conservation	4°C dans un frigo et/ou une glacière
	Conservation	Congélateur à l'ENVT ; -80°C

1.3. Analyse des spécimens

1.3.1. Analyses au chevet du patient

Toutes ces analyses ont été effectuées, à température ambiante, par un unique opérateur (Professeure Cathy Trumel) tout au long de l'étude. Les urines macroscopiquement troubles ont immédiatement été exclues de l'échantillon de référence, sans aucune analyse.

L'ensemble des résultats a été reporté sur la feuille de résultats d'analyse d'urine (Annexe 4).

❖ Densité urinaire

La densité urinaire a été mesurée avec un réfractomètre optique Atago T2-NE (Atago Co. Ltd, Tokyo, Japan) en plaçant une goutte de surnageant sur l'appareil. Entre chaque spécimen, le réfractomètre optique était rincé avec de l'eau distillée et essuyé avec précaution.

Avant chaque série de mesures, le réfractomètre était calibré avec une goutte d'eau distillée de densité égale à 1,000. Toutes les mesures ont été effectuées à température ambiante (environ 20°C).

❖ Bandelettes urinaires

Une analyse chimique du surnageant a été réalisée à l'aide de bandelettes réactives. Les bandelettes suivantes ont été utilisées pour chaque spécimen :

- Bandelette UriVet-100[®] (2 boîtes, n°lot : URS5020076, Kitvia, Labarthe-Inard, France)
- Bandelette Combur 10 Test[®] strips (n° lot 1 : 12539104, n° lot 2 : 20526701, Cobas, Rotkreuz, Suisse)

Deux autres de marques de bandelettes réactives ont été utilisées uniquement sur une partie des spécimens :

- Bandelette Multistix[®] 8 SG (2 boîtes, n° lot : 504084, Siemens, Tarrytown, USA) : sur les spécimens 11 à 128
- Bandelette AUTION MICRO[®] PU-4010 (n° lot 10PA5F08, Arkray, Koji, Japan) : sur les spécimens 72 à 128

L'ordre, dans lequel les bandelettes étaient testées, a été défini au hasard, préalablement à l'analyse de chaque spécimen.

Les animaux dont les urines donnaient un résultat positif aux corps cétoniques (à partir de 1+ soit 0,15g/L de corps cétoniques) ont été exclus de l'échantillon de référence.

❖ Cytologie urinaire

Une analyse cytologique du sédiment a été réalisée en déposant une goutte (environ 6 µL) du spécimen sur une lame à bords coupés et à plage dépolie (Thermo scientific lame porte-objet, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany), recouverte d'une lamelle 22 x 22 mm (Menzel-Gläser,

Braunschweig, Germany). Elle a été analysée avec un microscope Nikon Eclipse E200 aux objectifs 10x et 40x.

Une première analyse semi-quantitative du spécimen a été faite au faible grossissement (10x). La surface de la lamelle a été observée dans son intégralité, en faisant varier la vis micrométrique afin d'effectuer un premier tri entre les éléments d'intérêt (cellules, cristaux, cylindres) et les artéfacts de préparation (bulles, débris de verre, fibres ou poils).

L'analyse quantitative a été effectuée au fort grossissement (40x). Dix champs distincts ont été sélectionnés en prenant soin d'éviter leur chevauchement, afin de ne pas compter plusieurs fois le même élément. Sur chacun des champs, les éléments d'intérêt ont été dénombrés individuellement et relevés dans un tableau (Annexe 5 – Résultats de l'analyse d'urine). En fin d'examen, une moyenne sur les dix champs pour chaque élément d'intérêt, a constitué la donnée brute exploitée par la suite. Une hématurie a été définie par une moyenne supérieure à 8 hématies par champs. Une pyurie a été définie par une moyenne supérieure à 5 leucocytes par champs. Les sujets ayant une hématurie, une pyurie ou une bactériurie ont été éliminés de l'échantillon de référence.

1.3.2. Analyses au laboratoire

Les analyses ont été réalisées au laboratoire central de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Le RPCU a été calculé à partir des concentrations mesurées de créatinine et de protéines sur chaque spécimen par un analyseur (Thermo Fisher Scientific, Indiko, Vantaa, Finland) avec des réactifs spécifiques (Creatinine (Enzymatic) et U-CSF Prot, Thermo Scientific, Vantaa, Finland).

La créatinine a été dosée par une méthode dite enzymatique. C'est-à-dire qu'un chromogène est formé par une cascade de réactions enzymatiques. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration en créatinine du spécimen.

Les protéines, quant à elles, ont été dosées par une méthode colorimétrique avec du rouge de Pyrogallol. L'absorption mesurée, à 600 nm, est proportionnelle à la concentration protéique du spécimen.

Avant chaque série de mesures, un contrôle de l'analyseur est réalisé, avec 2 réactifs, selon le protocole de routine du laboratoire.

De plus, un calibrage de l'appareil est effectué toutes les 2 semaines.

L'ensemble des réactifs utilisés est stocké selon les instructions de conservation du fabricant.

1.4. Analyse statistique des données

L'ensemble des résultats expérimentaux a été organisé dans un tableur Excel.

Les courbes de distribution des valeurs de référence obtenues, pour le RPCU et la densité, ont été examinées visuellement afin de détecter des mesures anormales. Les résultats ont également été soumis au test de Tukey permettant de détecter les valeurs aberrantes des extrémités. Celles-ci ont été écartées des analyses statistiques.

La normalité des distributions des valeurs non transformées ou après transformation a été testée par le test de normalité d'Anderson-Darling. Les intervalles de référence sont établis sur des données non transformées.

Les intervalles de référence et les intervalles de confiance à 90% des limites des intervalles de référence ont été déterminés par une méthode statistique non paramétrique, conformément aux recommandations de l'IFCC-CLSI (CLSI, 2008) et de l'ASVCP (Friedrichs et al., 2012).

Le partitionnement des valeurs de référence selon le type de production de l'animal, l'alimentation et le stade physiologique a été testé par analyse de variance (ANOVA) multifactorielle. Lors de différence significative, la nécessité de réaliser de nouveaux intervalles de référence pour chaque groupe de partition a été évaluée à l'aide du test Z d'Harris et Boyd (Harris et Boyd, 1990). Pour qu'il soit applicable, les auteurs recommandent de travailler avec des données suivant une loi normale. Une transformation de Box Cox sera appliquée, dans notre cas, afin d'avoir une répartition normale d'après le test d'Anderson-Darling ($p > 0,05$). Le test Z d'Harris et Boyd est basé sur la moyenne, l'écart-type et le nombre d'animaux de chacun des échantillons. Il fonctionne mieux lorsque le nombre d'individus et les écart-types sont identiques dans les 2 sous-groupes (Harris et Boyd, 1990). Cependant, des intervalles de référence des sous-groupes ne pourront être établis en raison du faible nombre de spécimens par sous-groupe.

Les calculs ont été réalisés avec le tableur Excel et le logiciel d'analyse statistique Reference Value Advisor[®], adapté à la détermination des intervalles de référence (Geffré et al., 2011). Les analyses de variances (ANOVA) ont été effectués à l'aide du logiciel Systat[®].

2. RESULTATS

Les résultats individuels anormaux obtenus dans l'élevage ont été communiqués à l'éleveur dans les plus brefs délais après l'analyse.

2.1. Caractéristiques de la population de référence

Au total, 156 vaches signalées saines par l'éleveur et présentant un examen clinique normal ont été prélevées. La proportion de chaque race était aussi représentative que possible des races bovines en France (Groupe Economie du Bétail, 2015). Après élimination des animaux prélevés ne remplissant pas l'ensemble des critères d'inclusion et d'exclusion, l'échantillon de référence se composait de 115 vaches.

Les animaux exclus de l'étude après le prélèvement urinaire ont été déterminés sur la base de l'analyse d'urine préliminaire. L'ensemble des anomalies urinaires des vaches prélevées et éliminées de la population de référence ont été recensées [**Tableau 4**]. Les deux principales anomalies détectées chez ces vaches cliniquement saines étaient une acétonurie (25 cas ; 15 laitières, 10 allaitantes) et une hématurie (15 cas). Trois animaux (n°53, 132 et 139) présentaient à la fois une acétonurie et une hématurie. Un animal (n°109) avait une bactériurie et une hématurie.

Tableau 4 : Causes d'exclusion de la population de référence

Causes d'exclusion	Aspect macroscopique	Bandelette urinaire	Cytologie	
	Urine trouble	Acétonurie	Bactériurie	Hématurie
Nombre d'animaux exclus	1	25	4	15
Pourcentage (calculé sur l'ensemble des animaux prélevés)	1%	16%	3%	10%

Les races des vaches prélevées ont été déterminées pour correspondre à leur prévalence dans le cheptel bovin français (Groupe Economie du Bétail, 2015). Cependant, après l'élimination des 41 sujets présentant des anomalies de l'urine, la distribution des races incluses a légèrement varié [**Tableau 5**]. Les principales races allaitantes étaient des Blondes d'Aquitaine (21 vaches) et des Charolaises (17 vaches). Les Limousines étaient sous-représentées par rapport à la prévalence de la race en France. Parmi les vaches laitières, la principale est la Prim'Holstein (43 vaches).

Tableau 5 : Caractéristiques de la population étudiée : races

Race	Nombre de prélèvements retenus	Pourcentage dans l'échantillon	Objectif du protocole
Prim'Holstein	43	37,4%	32%
Blonde d'Aquitaine	21	18,3%	6%
Charolaise	17	14,8%	19%
Limousine	11	9,6%	14%
Montbéliarde	9	7,8%	8%
Salers	4	3,5%	3%
Normande	4	3,5%	5%
Aubrac	2	1,7%	2%
Autre type racial (Brune des Alpes dans l'étude)	4	3,5%	4%

Les âges s'étalaient de 2,5 ans à 17 ans. Leur répartition est décrite ci-dessous [Figure 1]. L'âge ne constituait pas un critère de sélection dans notre étude.

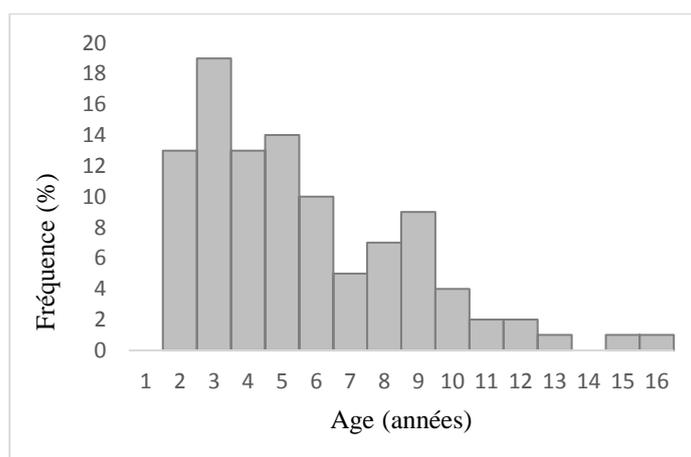


Figure 1 : Distribution des âges des 115 vaches de la population de référence

Les animaux prélevés étaient également classés selon leur stade physiologique. La population de référence contient, en accord avec l'objectif du protocole expérimental, un nombre similaire d'animaux dans les 3 catégories définies par rapport au stade de gestation [Tableau 6].

Tableau 6 : Caractéristiques de la population étudiée : stade physiologique

Stade physiologique	Nombre de prélèvements retenus	Pourcentage dans l'échantillon	Objectif du protocole
Vaches en 1er trimestre post-partum	36	31%	33,3%
Vaches en production (3 à 9 mois post-vêlage)	40	35%	33,3%
Vaches en dernier trimestre de gestation	39	34%	33,3%

Enfin, la ration alimentaire des vaches incluses dans l'étude était scindée en deux groupes : celle à base d'ensilage de maïs et celles n'en contenant pas. L'objectif de prélever ces deux groupes en parts égales est rempli [Tableau 7].

Tableau 7 : Caractéristiques de la population étudiée : alimentation

Type de ration	Nombre de prélèvements retenus	Pourcentage dans l'échantillon	Objectif de l'étude
Avec ensilage de maïs	56	49%	50%
Sans ensilage de maïs	59	51%	50%

2.2. Intervalles de référence

Les résultats bruts obtenus pour la densité et le RPCU sont donnés en Annexe 6.

2.2.1. Intervalle de référence de la densité urinaire

L'ensemble des valeurs de densité urinaire obtenues pour les 115 individus de l'échantillon de référence est représenté graphiquement [Figure 2].

Les résultats de 3 vaches (numéros d'étude 2, 5 et 129, ayant respectivement la densité urinaire 1,048, 1,05 et 1,047) symbolisés par des croix, semblaient très éloignés des résultats obtenus pour le reste de la cohorte [Figure 2]. Ils ont également été identifiés comme aberrants par le test de Tukey, et, par conséquent, ont été éliminés des valeurs de référence utilisées pour établir l'intervalle de référence.

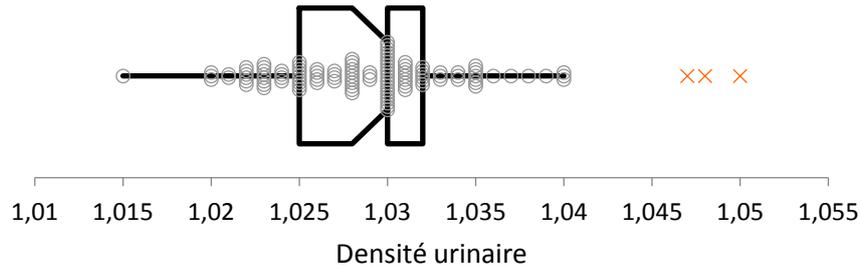


Figure 2 : *Distribution des valeurs de densité urinaire*

En appliquant la même méthode aux valeurs restantes, une valeur aberrante supplémentaire a été mise en évidence (numéro d'étude 154, ayant pour densité urinaire 1,015).

Ces 4 valeurs ont été retirées de l'échantillon de référence. Le test de Tukey a été appliqué aux valeurs restantes et aucune autre valeur aberrante n'a été détectée. L'effectif final est ainsi composé de 111 vaches, pour la détermination des limites de référence de la densité urinaire.

La distribution des 111 valeurs sous la forme d'un diagramme quantile-quantile permet une appréciation visuelle de la distribution des valeurs [Figure 3]. La distribution ne suit pas une loi normale d'après le test d'Anderson-Darling ($p < 0,05$).

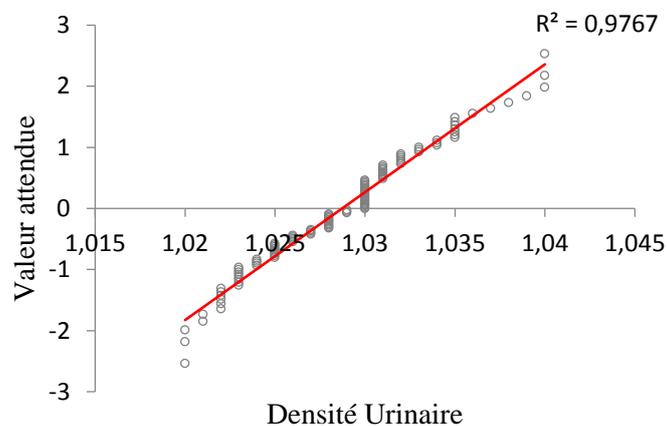


Figure 3: *Diagramme quantile-quantile de comparaison de la distribution observée de la densité avec une loi normale*

Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de référence de la densité urinaire sont respectivement 1,020 et 1,040. Pour ces deux limites, les intervalles de confiance à 90% sont 1,020 – 1,022 et 1,037 – 1,040 [Tableau 8].

Tableau 8 : Résultats de l'analyse statistique des valeurs de référence pour la densité urinaire

<u>Description de l'échantillon de référence</u>		<u>Description de l'intervalle de référence</u>	
n	111	Limite basse IR	1,020
Moyenne	1,029	Limite haute IR	1,040
Médiane	1,030	Intervalle de confiance à 90 % de	
Ecart-type	0,0047	la limite basse	1,020 - 1,022
Minimum	1,020	Intervalle de confiance à 90 % de	
Maximum	1,040	la limite haute	1,037 - 1,040

L'intervalle de référence et les intervalles de confiance sont représentés graphiquement, ainsi qu'un histogramme de distribution des valeurs de densité urinaire [Figure 4].

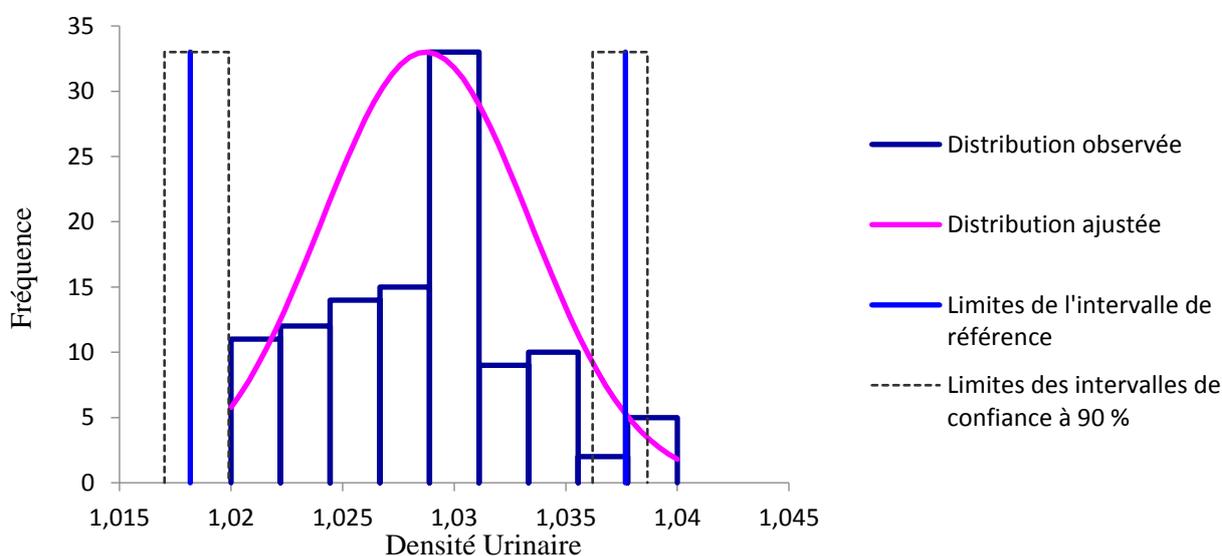


Figure 4 : Représentation graphique des limites de l'intervalle de référence et des intervalles de confiance de la densité urinaire

2.2.2. Intervalle de référence du RPCU

La protéinurie et la créatininurie ont été dosées au laboratoire, permettant de calculer le RPCU de 114 vaches (le spécimen de la vache n°11 n'était pas dosable).

Les résultats de 4 spécimens pour le RPCU (vaches n°64, 78, 94 et 146, ayant respectivement un RPCU égal à 0,28, 0,31 et 2 fois 0,25) se révélaient graphiquement éloignés des résultats des autres spécimens [Figure 5]. Ces valeurs ont été identifiées comme aberrantes par le test de Tukey. Par conséquent, elles ont été retirées de l'échantillon de référence.

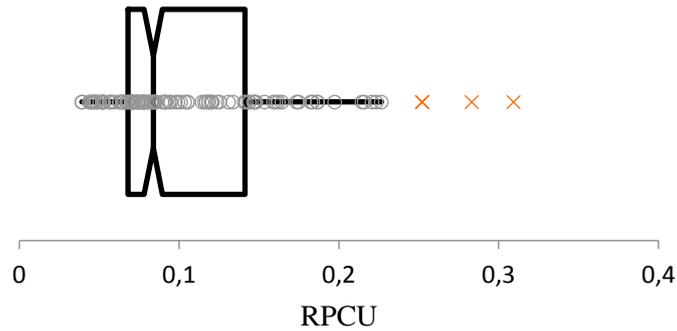


Figure 5 : Distribution des valeurs de RPCU

L'intervalle de référence a été établi en utilisant 110 valeurs de référence, après élimination des valeurs aberrantes.

La distribution des 110 valeurs sous la forme d'un diagramme quantile-quantile permet l'appréciation visuelle de la distribution des valeurs [Figure 6]. La distribution ne suit pas une loi normale d'après le test d'Anderson-Darling ($p < 0,05$).

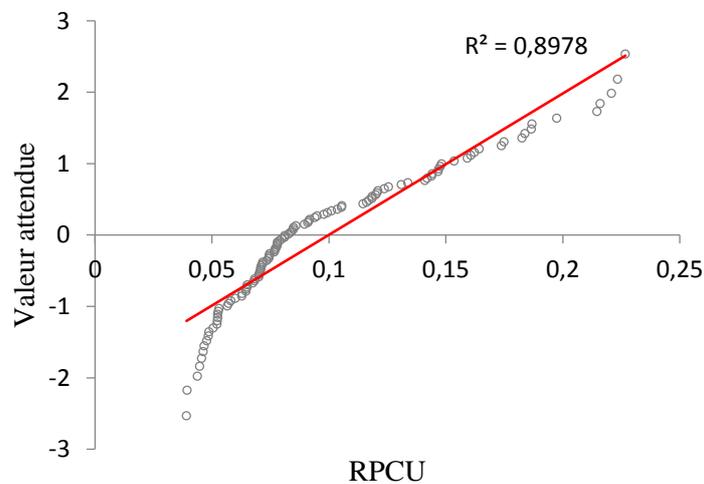


Figure 6 : Diagramme quantile-quantile de comparaison de la distribution observée du RPCU avec une loi normale

Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de référence du RPCU sont respectivement 0,043 et 0,22. Pour ces deux limites, les intervalles de confiance à 90% sont 0,039 – 0,046 et 0,20 – 0,23 [Tableau 9].

Tableau 9 : Résultats de l'analyse statistique des valeurs de référence pour le RPCU

Description de l'échantillon de référence		Description de l'intervalle de référence	
n	110	Limite basse IR	0,043
Moyenne	0,100	Limite haute IR	0,22
Médiane	0,0819	Intervalle de confiance à 90 % de la limite basse	0,039 - 0,046
Ecart-type	0,0474	Intervalle de confiance à 90 % de la limite haute	0,20 - 0,23
Minimum	0,039		
Maximum	0,227		

L'intervalle de référence et les intervalles de confiance sont représentés graphiquement, ainsi qu'un histogramme de distribution des valeurs de référence du RPCU [Figure 7].

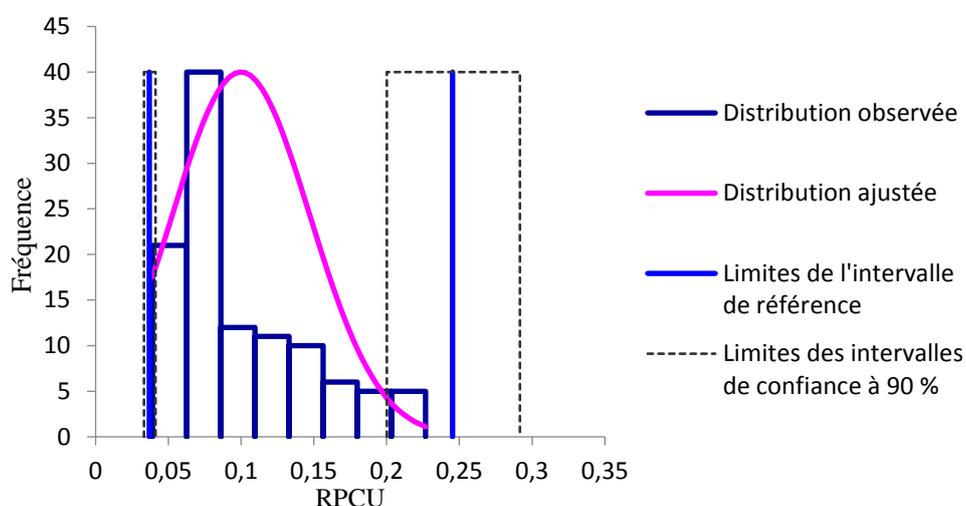


Figure 7 : Représentation graphique des limites de l'intervalle de référence et des intervalles de confiance du RPCU

2.3. Influence des critères de partition sur les intervalles de référence

Nous aborderons, dans cette partie, uniquement les critères de partition pour lesquels un effet significatif a été mis en évidence. Les comparaisons des sous-groupes sont réalisées par une analyse de variance (ANOVA) multifactorielle.

2.3.1. Influence du type de production sur le RPCU

La distribution des valeurs de RPCU pour les vaches allaitantes et les vaches laitières est représentée graphiquement [Figure 8], permettant de visualiser les résultats obtenus dans ces deux sous-groupes. Le RPCU des vaches allaitantes semble avoir une tendance à être plus faible que celui des vaches laitières.

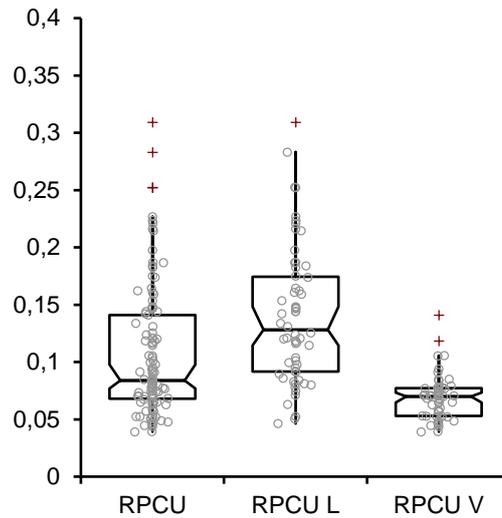


Figure 8 : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus pour l'ensemble des vaches, les laitières et les allaitantes

La comparaison des séries de données du RPCU des vaches laitières et des vaches allaitantes est statistiquement différente ($p < 0,005$).

Le test d'Harris et Boyd est appliqué pour décider si le type de production de l'animal (lait ou viande) nécessite des intervalles de référence distincts.

Tableau 10 : Données utilisées pour le test de Harris et Boyd concernant le type de production

	Laitières	Allaitantes
Nombre d'animaux	60	54
Moyenne	-1,6	-1,7
Ecart-type	0,3	0,2
Z	2,11	
Z*	2,07	

Une partition du RPCU selon le type de production est envisageable d'après le test de Harris et Boyd, car $Z > Z^*$ [Tableau 10].

Le type de production semble, par conséquent, avoir un effet non négligeable sur le RPCU des vaches.

2.3.2. Influence du stade physiologique sur le RPCU

3 stades physiologiques avaient été définis lors de l'élaboration du protocole expérimental :

- Vaches en premier trimestre post-partum (0 à 3 mois après le vêlage) : sous-groupe 1
- Vaches en production (3 à 9 mois post-vêlage) : sous-groupe 2
- Vaches en dernier trimestre de gestation (0 à 3 mois avant le terme prévu) : sous-groupe 3

La répartition des valeurs de RPCU pour ces 3 groupes de partition est représentée graphiquement [Figure 9]. Le RPCU des vaches en dernier trimestre de gestation semble plus faible que pour les autres.

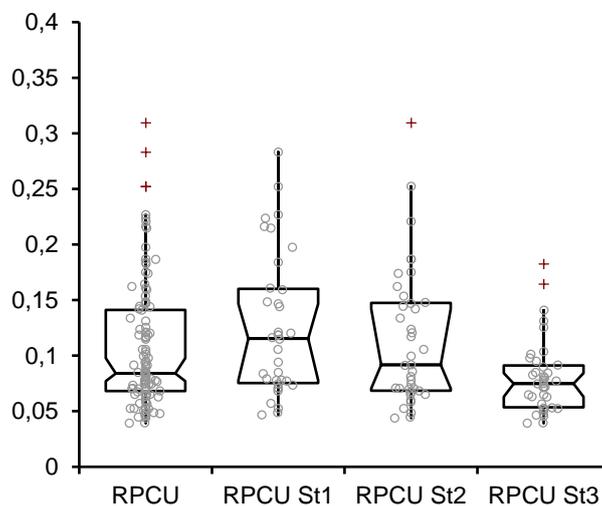


Figure 9 : Box plot représentant la distribution des RPCU obtenus pour l'ensemble des vaches et les sous-groupes de stade physiologique 1, 2 ou 3

L'analyse des séries de données du RPCU, est statistiquement différente entre le stade 1 et le stade 3 ainsi qu'entre le stade 2 et le stade 3 ($p < 0,05$).

Le test de Harris et Boyd est appliqué entre le stade 3 (vaches en fin de gestation) et les stades 1 et 2.

Tableau 11 : Données utilisées pour les tests de Harris et Boyd concernant le stade physiologique

	Stade 1 (début gestation)	Stade 3 (fin gestation)
Nombre d'animaux	36	39
Moyenne	-1,8	-4,9
Ecart-type	0,4	1,1
Z	16,46	
Z*	1,68	

	Stade 2 (milieu gestation)	Stade 3 (fin gestation)
Nombre d'animaux	39	39
Moyenne	-3,3	-4,9
Ecart-type	0,9	1,1
Z	7,03	
Z*	1,71	

Dans les 2 cas, on obtient le résultat $Z > Z^*$ [Tableau 11]. Il semble justifiable de réaliser un intervalle de référence du RPCU spécifique des vaches en fin de gestation (< 3 mois avant la mise bas).

3. DISCUSSION

3.1. Validité du protocole expérimental

Le but de cette étude était d'obtenir des intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des vaches adultes en France. Le protocole a été établi afin de respecter les recommandations internationales pour l'établissement d'intervalle de référence (CLSI, 2008 ; Friedrichs et al., 2012).

3.1.1. Sélection des sujets de l'échantillon de référence

La sélection des sujets constituant l'échantillon de référence est l'étape cruciale dans l'établissement d'un intervalle de référence (Friedrichs et al., 2012 ; Geffré et al., 2009). Cet échantillon doit être composé d'individus sains, représentatifs de la population de référence (Siest et Vernet-Nyssen, 1979), c'est-à-dire représentatifs du cheptel bovin français dans notre étude.

Une des difficultés, particulièrement en médecine vétérinaire, consiste à sélectionner des animaux sains. En l'absence de définition objective de l'état de « bonne santé » d'un animal, les critères d'inclusion et d'exclusion doivent être strictement circonscrits (Siest et Vernet-Nyssen, 1979). Dans notre protocole, l'inclusion des animaux dans l'échantillon de référence a été réalisée en deux temps. L'étape « *a priori* » se composait d'un questionnaire adressé à l'éleveur sur l'historique des maladies et des traitements de l'animal ainsi que d'un examen clinique complet, réalisé le jour du prélèvement. L'étape « *a posteriori* » consistait à réaliser l'analyse d'urine préliminaire (aspect macroscopique, densité, bandelette urinaire et cytologie) puis à éliminer les spécimens présentant une anomalie. Aucun autre examen complémentaire n'a été réalisé. Ces conditions sont celles du vétérinaire praticien, sur le terrain, qui oriente les examens complémentaires en fonction de la clinique de l'animal.

Dans la littérature, les protocoles expérimentaux construits pour établir des valeurs de référence dans l'espèce bovine ne s'appuient pas non plus sur des examens complémentaires. Ils définissent majoritairement une vache saine par l'absence de signe clinique le jour du prélèvement (Doornenbal et al., 1988 ; Kulberg et al., 2004). Dans certains cas, une anamnèse peut compléter l'examen clinique de l'animal (Kim et al., 2016 ; Lumsden et al., 1980).

L'objectif d'un nombre de prélèvements défini pour chaque race de vache a servi de base pour le choix des élevages recrutés dans cette étude. Un maximum de 5 animaux par exploitation a été prélevé. Cette limite a été fixée arbitrairement pour éviter un biais de sélection dû à « l'effet élevage »

(parenté des animaux, conduite de troupeau) sur nos résultats. Cependant, notre échantillon de référence comporte 2 biais de sélection mineurs.

Le premier biais concerne le territoire géographique de collecte. Pour des raisons pratiques de groupement des prélèvements sur la journée, ils ont été réalisés uniquement dans l'Ouest de la France et non sur l'ensemble du territoire.

Le second biais concerne la représentativité des races dans l'échantillon. Seules des races pures ont été sélectionnées dans le protocole expérimental. Les croisements de race, représentant 8 % du cheptel français (Groupe Economie du Bétail, 2015) n'ont pas été échantillonnés. Ce choix a été effectué car les prévalences des différents types de croisements ne sont pas rapportées, à notre connaissance, dans la littérature. Par ailleurs, une partie des races du cheptel bovin français, classées dans les « autres races » (Groupe Economie du Bétail, 2015) et représentant 4% de ce cheptel, n'ont pas été prélevées pour cette étude. En effet, pour des raisons pratiques, il était impossible de recruter l'ensemble des races existantes dans l'échantillon. Parmi ces races minoritaires, seules des Brunnes des Alpes ont été incluses dans l'étude.

Malgré ces 2 biais, les vaches prélevées sont représentatives des principales races présentes dans le cheptel bovin français, c'est-à-dire de la population étudiée.

3.1.2. Facteurs de variations pré-analytiques

Le contrôle des facteurs pré-analytiques est essentiel pour minimiser leur effet éventuel sur les résultats obtenus (Friedrichs et al., 2012). De plus, leur description précise dans le protocole expérimental permet aux cliniciens de reproduire au mieux ces conditions, afin d'utiliser les intervalles de référence déterminés dans l'étude.

3.1.2.1. Facteurs liés au prélèvement

❖ Moment de prélèvement

La densité urinaire dépend du moment de prélèvement et particulièrement de la quantité d'eau ingérée par l'animal. Dans des conditions de terrain, il est impossible de contrôler ces facteurs. Les premières urines du matin seront théoriquement moins diluées par une prise de boisson. Cependant, notre protocole expérimental visant à définir un intervalle de référence de la densité urinaire utilisable en pratique vétérinaire courante, la collecte des urines à tout moment de la journée semblait plus indiquée.

L'influence du moment de collecte sur les valeurs de référence du RPCU a été estimée mineure lors de l'élaboration de notre protocole expérimental. Par conséquent, et pour des raisons pratiques liées au groupement des journées de prélèvements dans les élevages, le recueil des urines a été effectué à n'importe quelle heure de la journée. De plus, ce choix est similaire à la situation rencontrée en pratique vétérinaire courante.

Dans la littérature, la variation de l'excrétion des protéines urinaires par les vaches ou du RPCU, selon le moment de la journée, n'a pas été étudié.

Plusieurs études, portant sur la variation de la créatininurie au cours de la journée, concluent que la période de récolte du spécimen urinaire n'aura pas d'impact majeur sur la concentration en créatinine de l'urine. Cependant, le faible nombre d'animaux a également pu concourir à l'absence de différence statistique observée dans les études.

Une recherche menée sur 4 taurillons dont les urines étaient prélevées à 9h30, 11h30 et 14h30 a montré une variation mineure de la créatininurie (< 5%) entre la collecte du matin et celle de l'après-midi (Cetinkaya et al., 2006).

Dans une étude réalisée sur 15 vaches en lactation, des périodes de collecte de 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h et 24h ont été définies à différents moments de la journée (Chizzotti et al., 2008). La créatininurie ne présente pas de différence significative quel que soit le moment auquel elle a été mesurée et le délai pendant lequel les urines ont été récoltées.

Enfin, une recherche effectuée sur 24 veaux mâles castrés, avec des prélèvements effectués sur 3 périodes (8h – 9h30, 14h – 15h30, 20h – 21h30), ne conclut pas à une différence significative de la créatininurie au cours de la journée (Nsahlai et al., 2000).

En conclusion, le RPCU est une estimation de la protéinurie sur un échantillonnage ponctuel de l'urine. De ce fait, il présentera nécessairement des variations biologiques journalières dont il est impossible de s'affranchir, par rapport à la méthode de référence : la collecte des urines sur 24 heures. C'est également cette caractéristique qui rend le RPCU davantage applicable en pratique qu'un prélèvement d'urine sur 24 heures.

❖ **Méthode de prélèvement**

Le prélèvement d'urine chez les bovins peut se faire par sondage ou lors de miction spontanée (Carrère et Marhuenda, 2006). Ces deux méthodes sont admises dans notre protocole expérimental.

La miction spontanée des vaches ne peut être déclenchée de manière systématique, ce qui est

problématique en terme de temps. Ce prélèvement présente également l'inconvénient de mettre en contact l'urine émise avec l'appareil génital externe et la peau ; ce qui occasionne la présence de débris cellulaires et de bactéries dans l'urine récoltée (Carrër et Marhuenda, 2006).

Le sondage par cathétérisme urétral permet de limiter les contaminations lorsqu'il est correctement exécuté. Cependant, la stérilité de l'échantillon recueilli est illusoire en raison de la contamination urétrale par des bactéries commensales (Carrër et Marhuenda, 2006). Le sondage urinaire nécessite une bonne technicité afin d'éviter la création de lésions de l'urothélium urétral et vésical. Cette méthode peut ainsi présenter l'inconvénient de modifier la composition urinaire à cause de microtraumatismes induits par le cathétérisme. La concentration urinaire en sang et en protéines pourrait augmenter légèrement de manière artéfactuelle (Smith, 2009b).

Il n'existe, à notre connaissance, aucune étude concernant l'impact de la méthode de prélèvement sur la densité urinaire et le RPCU chez les bovins.

Pour notre recherche, le sondage urétral était privilégié pour des contraintes de temps. Mais il a été décidé d'admettre les 2 méthodes de prélèvement, uniquement lorsque le nettoyage minutieux de la vulve avait été réalisé au préalable. En effet, les artefacts liés au prélèvement tels que la présence d'hématies, de débris cellulaires et de bactéries étaient mis en évidence lors de l'analyse cytologique. Pour chacun d'eux, des critères d'exclusion étaient mis en place et susceptibles d'entraîner l'élimination du spécimen de l'étude.

Il aurait été intéressant de pouvoir vérifier notre hypothèse concernant la faible influence de la méthode de prélèvement sur nos résultats. Cependant, le nombre de vaches prélevées par miction spontanée était largement minoritaire et ne permettait pas de réaliser une partition des résultats de densité urinaire et de RPCU selon la méthode de prélèvement.

3.1.2.2. Facteurs liés à la conservation du prélèvement

La standardisation de notre protocole d'acheminement et de conservation, comprenait une réfrigération immédiate après le prélèvement et une centrifugation au maximum 2 heures après. Il est usuellement recommandé de réaliser une centrifugation dans un délai maximal de 1 heure après la récolte d'urine (Bouisset, 2003). En pratique, ce délai n'était pas applicable pour la réalisation de notre étude ; une tolérance de 2 heures a donc été arbitrairement choisie et scrupuleusement respectée afin de limiter au maximum la transformation des paramètres physico-chimiques de l'urine après prélèvement.

Après centrifugation, le surnageant de chaque spécimen était maintenu à +4°C jusqu'au lieu de stockage, où il était congelé à -80°C pendant plusieurs mois.

Le problème de conservation du prélèvement sur le long terme ne se pose pas pour la densité urinaire qui a été mesurée immédiatement après centrifugation.

Aucune étude n'a été réalisée, sur les urines des bovins, concernant l'influence de la méthode de conservation des spécimens sur la mesure du RPCU. En médecine vétérinaire canine, une telle recherche a été menée sur 50 spécimens (Rossi et al., 2012).

La conservation, à température ambiante, pendant 2 à 4 heures, ne modifie pas de manière significative le RPCU mesuré sur le surnageant des urines de chiens. En revanche, les auteurs mettent en évidence une augmentation du RPCU après 12 heures de conservation du surnageant, à température ambiante et à +4°C. Enfin, à -20°C, les concentrations en protéines et créatinine urinaires et par conséquent le RPCU, changent peu (Rossi et al., 2012). La congélation à -80°C n'a pas été évaluée par cette étude.

La conservation du prélèvement avant analyse n'est pas la méthode optimale. Néanmoins la congélation à -80°C permet de conserver le spécimen plus longtemps en minorant l'impact du stockage sur le RPCU.

3.1.3. Méthodes de détermination des intervalles de référence

Les intervalles de référence ont été établis avec une méthode non paramétrique, suivant les recommandations de l'IFCC-CLSI (CLSI, 2008) et de l'ASVCP (Friedrichs et al., 2012). Un nombre de 120 individus est recommandé pour l'application de cette méthode avec des intervalles de confiance à 90 % des limites de référence. Nos intervalles de référence du RPCU et de la densité urinaire ont été déterminés respectivement avec 110 et 111 spécimens, soit un nombre satisfaisant bien que légèrement inférieur à la recommandation. En diminuant l'effectif, on augmente l'imprécision de définition des limites de l'intervalle de référence. Malgré la collecte de 156 spécimens, un nombre trop élevé de vaches a été éliminé lors de l'analyse d'urine préliminaire ce qui n'a pas permis de conserver 120 individus de référence. Un nombre plus élevé de spécimens aurait dû être planifiée dans notre protocole expérimental, en prévision de l'élimination d'une partie des échantillons récoltés.

L'intervalle de référence de la densité urinaire des bovins dans notre étude est 1,020 – 1,040. Il

correspond à l'un des intervalles de référence cité en introduction (Guatteo, 2007). Les protocoles expérimentaux des intervalles de référence cités dans la littérature ne sont pas connus. Par conséquent, il est impossible d'émettre des hypothèses concernant leur inadéquation partielle avec les valeurs que nous avons obtenues.

Cette étude est la première à définir un intervalle de référence du RPCU des bovins. Le RPCU normal d'une vache adulte saine est inférieur à 0,23.

3.2. Influence des critères de partition sur l'intervalle de référence du RPCU

Notre protocole expérimental prévoyait l'étude de 4 critères de partition sur la mesure du RPCU : le type de production, le stade de gestation, le poids et l'alimentation. Les sous-groupes formés rassemblaient entre 35 et 60 individus de référence. Un minimum de 40 individus de référence par sous-groupe est recommandé pour la réalisation d'une partition (Friedrichs et al., 2012).

L'utilisation de critères de partition permet de réduire la variabilité interindividuelle au sein de l'échantillon de référence qui sera, de ce fait, scindé en sous-groupes plus homogènes (Friedrichs et al., 2012). Aucun consensus ne définit clairement dans quel cas une partition s'avère nécessaire (Geffré et al., 2009). Cependant, elle semble indiquée s'il existe une variation clinique documentée entre les deux sous-groupes (Henny, 2011) ou lorsque les limites de référence établies sont utilisées comme limite critique de décision (Friedrichs et al., 2012).

Le test de Harris et Boyd est une méthode statistique permettant d'évaluer le caractère nécessaire d'une partition de l'échantillon de référence pour affiner l'intervalle de référence obtenu (Geffré et al., 2009). Nos effectifs étant insuffisants, nous avons choisi d'explorer la nécessité d'une partition sans réaliser de nouveaux intervalles de référence pour ces sous-groupes, la méthode non paramétrique n'étant pas applicable.

3.2.1. Influence du type de production sur le RPCU

Une différence significative du RPCU des vaches laitières et des vaches allaitantes a été mise en évidence par notre analyse statistique.

Le test de Harris et Boyd donne des valeurs similaires pour Z et Z^* , avec Z légèrement supérieur. Ce résultat laisse supposer que des intervalles de référence du RPCU, spécifiques de ces deux sous-groupes, pourraient être établis.

Néanmoins, Z^* a été calculé avec l'équation initiale établie par Harris et Boyd soit $Z^* = 3 \times \sqrt{\frac{n}{120}}$; n représentant le nombre d'individus de référence contenus dans les deux sous-groupes (Harris et Boyd, 1990). Les auteurs ont jugé ce critère trop permissif dans une publication ultérieure et ont modifié le facteur 3 par un facteur 5 soit $Z^* = 5 \times \sqrt{\frac{n}{120}}$ (Harris et Boyd, 1995). Cependant, cette modification n'a pas été prise en compte dans les recommandations du CLSI, sur lesquelles se base l'ensemble de notre protocole expérimental.

Aucune étude n'avait été réalisée auparavant sur la différence quantitative d'excrétion urinaire de protéines ou de créatinine entre les vaches laitières et les vaches allaitantes, ce qui ne permet pas d'orienter notre décision.

En définitive, l'intervalle de référence établi dans notre étude est utilisable pour les vaches laitières comme pour les allaitantes. D'après la répartition de nos valeurs de référence du RPCU, une valeur proche de la limite haute de référence chez une vache allaitante sera plus douteuse que chez une vache laitière quant à une éventuelle pathologie. Mais la nécessité et éventuellement la réalisation d'intervalles de référence distincts pour les laitières et les allaitantes, devraient être évaluées avec un nombre d'individus de référence plus important dans chaque sous-groupe.

3.2.2. Influence du stade de gestation sur le RPCU

Le RPCU des individus de référence à moins de 3 mois du terme de gestation est significativement plus faible que celui des autres individus de référence dans notre étude. Le test de Harris et Boyd a été réalisé pour comparer le sous-groupe des vaches à moins de 3 mois du terme (groupe 3) avec :

- celui des vaches ayant vêlé depuis moins de 3 mois (groupe 1)
- celui des vaches ayant vêlé 3 à 9 mois auparavant (groupe 2)

Pour ces 2 comparaisons, le test donnait $Z > Z^*$, suggérant la nécessité d'une partition des vaches : celles à moins de 3 mois du terme et les autres.

Cette partition fait apparaître une différence significative des valeurs de référence du RPCU. Ceci permet de limiter le nombre de sous-groupes concernant le stade de gestation et, par conséquent, le nombre d'animaux à prélever.

L'influence de la gestation sur l'excrétion journalière de créatinine urinaire a été étudiée sur 5 vaches

gravides (stade de gestation non précisé) et 8 vaches non gravides (Whittet et al., 2004). Aucune relation n'avait été mise en évidence ($p > 0,05$).

En revanche, il n'existe pas d'étude concernant l'influence de la gestation sur la protéinurie ou le RPCU.

3.2.3. Influence de la ration alimentaire sur le RPCU

Nous n'avons retrouvé aucune différence significative du RPCU ($p = 0,31$), selon le fourrage dominant de la ration alimentaire des individus de référence de l'étude.

L'influence de la ration alimentaire sur l'excrétion de créatinine urinaire a été étudiée dans différentes recherches qui ont conclu à un effet faible voire non significatif.

Une ration d'engraissement (90% de concentrés et 10% de fourrage) a été comparée à une ration d'entretien (foin et drèches de distillerie) sur 31 vaches et génisses (Whittet et al., 2004). Une différence significative ($p < 0,05$) mais faible a été mise en évidence entre les deux rations. La créatininurie était légèrement plus élevée pour la ration d'entretien (moyenne de 28 mg/kg de poids vif) que pour la ration d'engraissement (moyenne de 26 mg/kg de poids vif).

Des rations à base des mêmes composants dans des pourcentages différents ont également été testées quant à leur influence sur la créatininurie (Valadares et al., 1999). Les 4 rations testées étaient :

- 20% de concentrés et 80% d'ensilage de luzerne
- 35% de concentrés et 65% d'ensilage de luzerne
- 50% de concentrés et d'ensilage de luzerne
- 65% de concentrés et 35% d'ensilage de luzerne

24 vaches laitières multipares ont été réparties en 6 carrés latins sur une période de 21 jours. Aucune influence significative des rations n'a été constatée sur l'excrétion urinaire journalière de créatinine (moyenne de 29 mg/kg de poids vif).

L'influence de la ration alimentaire sur la protéinurie et le RPCU des vaches adultes n'a pas été étudiée dans la littérature, ce qui ne nous permet pas de confronter nos résultats à des données préexistantes.

3.2.4. Influence du poids sur le RPCU

L'influence du poids sur le RPCU des vaches n'a pas pu être testée dans notre recherche.

Le poids des vaches avait été évalué à l'aide d'un ruban mesurant le périmètre thoracique en arrière

de l'épaule. Cette estimation du poids des animaux est reproductible entre deux manipulateurs distincts (coefficient de corrélation $r = 0,99$), d'après une étude menée sur 26 génisses Prim'Holstein dont le périmètre thoracique était mesuré en aveugle par des opérateurs différents (Heinrichs et al., 2007). Cette méthode donne une bonne estimation du poids, pour les races dans lesquelles l'équation reliant le périmètre thoracique au poids vif est établie.

Dans notre recherche, les résultats de poids vif obtenus avec les mesures de périmètre thoracique étaient surévalués. De plus, les équations pour lier le poids et le périmètre thoracique ne sont pas définies pour toutes les races de vaches. Il était impossible de réaliser une partition des résultats de RPCU avec les valeurs approximatives voire erronées du poids vif que nous avons obtenu.

Il aurait été plus judicieux d'évaluer le poids des animaux visuellement, afin de les classer dans des catégories, avec une évaluation de l'éleveur et une évaluation d'un des opérateurs de l'étude, indépendantes l'une de l'autre.

Dans notre protocole expérimental, nous n'avons fixé aucune contrainte de poids quant au recrutement des animaux.

Aucune étude ne porte sur l'influence de la masse musculaire des bovins sur la valeur du RPCU. En revanche, d'après la littérature, l'excrétion de créatinine urinaire est corrélée à la masse musculaire et, par conséquent, au poids de l'animal (Cetinkaya et al., 2006 ; Chizzotti et al., 2008 ; Vagnoni et al., 1997).

Le coefficient de corrélation est $r = 0,96$ entre le poids vif et l'excrétion de créatinine urinaire, pour 22 génisses Prim'Holstein de renouvellement, pesant entre 107 et 545 kg (Chizzotti et al., 2008).

La créatininurie est utilisée comme facteur de correction de la concentration urinaire pour estimer l'excrétion des dérivés de purine à partir d'un prélèvement d'urine ponctuel (Cetinkaya et al., 2006). Ces auteurs prennent en compte l'influence du poids sur la quantité de créatinine urinaire émise, en multipliant le rapport dérivé de purine / créatinine par le poids vif de l'animal à la puissance 0,75 (PDC index = PDC ratio $\times W^{0,75}$).

En médecine vétérinaire canine, certains auteurs estiment qu'il existe une corrélation entre la masse corporelle de l'animal et la quantité de protéines émises dans les urines. Par conséquent, l'effet du poids en tant que facteur de variation s'annulerait lors du calcul du RPCU (DiBartola et al., 1980). Le consensus de l'American College of Veterinary Internal Medicine définit des valeurs normales, douteuses et pathologiques du RPCU chez les chiens et les chats, sans prendre en compte le poids de l'animal (Lees et al., 2005). Ce sont ces valeurs qui servent d'orientation pour la prise en charge clinique de l'animal. Ainsi, chez les carnivores domestiques, le poids ne semble pas être un critère de

partition suffisant pour établir un intervalle de référence du RPCU spécifique de la classe de poids.
Chez les vaches adultes, l'influence du poids sur la valeur du RPCU devrait être étudiée.

CONCLUSION

Cette étude, menée sur 156 vaches de pure race représentatives du cheptel bovin français, a permis de déterminer deux nouveaux intervalles de référence. Les valeurs limites de l'intervalle de référence de la densité urinaire (intervalles de confiance à 90%) sont 1,020 (1,020 – 1,022) et 1,040 (1,037 – 1,040). Celles du RPCU sont 0,043 (0,039 – 0,046) et 0,22 (0,20 – 0,23). Ainsi, le RPCU d'une vache adulte sera considéré normal s'il est inférieur à 0,23. Il est semblable au RPCU normal du chien (<0,2).

L'intervalle de référence de la densité urinaire a été obtenu avec un réfractomètre. Il est utilisable directement en pratique vétérinaire courante.

L'intervalle de référence du RPCU, quant à lui, a été déterminé au laboratoire central de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse avec l'analyseur Indiko (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland). En l'absence de méthode standardisée pour doser les protéines et la créatinine urinaire, les techniques utilisées sont variables selon les laboratoires. Une étude permettant le transfert des valeurs obtenues par notre recherche à d'autres analyseurs est recommandée (Friedrichs et al., 2012) avant leur utilisation dans un autre laboratoire. Cette procédure est moins chronophage et coûteuse que la détermination d'un intervalle de référence *de novo*.

Notre recherche est la première à établir un intervalle de référence du RPCU chez les bovins. Le type de production des vaches ainsi que le stade de gestation semblent influencer de manière significative le RPCU obtenu. Il serait dorénavant intéressant de déterminer des intervalles de référence distincts pour ces sous-groupes. En revanche, le fourrage dominant de la ration alimentaire n'a donné aucune variation significative du RPCU des individus de référence.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER J, ROBERTS S, STEEL R (1956). The relation between reactions to the Ross test on milk and urine and the degree of ketonemia in dairy cows. *The Cornell veterinarian*, **47**(1), 101-111.
- BARSANTI J, FINCO D (1979). Protein concentration in urine of normal dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **40**, 1583-1588.
- BOUISSET S (2003). Examens d'urine au chevet du bovin. *Le Point Vétérinaire*, **34** (numéro spécial - Examens paracliniques chez les bovins), 16-17.
- CAMART-PERIE A, PERIE P (2007). Affections urinaires des bovins adultes. *Le Point vétérinaire*, **38** (278), 31-37.
- CARRÈR H, MARHUENDA C (2006). Prélèvement d'urine chez les bovins. *Le Point Vétérinaire*, **265**, 54-55.
- CARRIER J, STEWART S, GODDEN S, FETROW J, RAPNICKI P (2004). Evaluation and use of three cowside tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. *Journal of dairy science*. **87**(11), 3725–3735.
- CETINKAYAN, YAMAN S, BABER N (2006). The use of purine derivatives/creatinine ratio in spot urine samples as an index of microbial protein supply in Yerli Kara crossbred cattle. *Livestock Science*, **100**(2), 91–98.
- CHIZZOTTI M, VALADARES S, VALADARES R, CHIZZOTTI F, TEDESCHI L (2008). Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. *Livestock Science*, **113** (2), 218-225.
- CLSI (2008). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory ; approved guideline. Third edition. Wayne, PA.
- DEFONTIS M, BAUER N, FAILING K, MORITZ A (2013). Automated and visual analysis of commercial urinary dipsticks in dogs, cats and cattle. *Research in Veterinary Science*, **94**(3), 440-445.
- DIBARTOLA SP, CHEW DJ, JACOBS G (1980). Quantitative urinalysis including 24-hour protein excretion in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **16**, 537-546.
- DOORNENBAL H, TONG AK, MURRAY NL (1988). Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **52**(1), 99-105.
- FRIEDRICHS K, HARR K, FREEMAN K, SZLADOVITS B, WALTON R, BARNHART K, BLANCO-CHAVEZ J (2012). ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, **41**(4), 441-453.
- GEFFRÉ A, CONCORDET D, BRAUN J-P, TRUMEL C (2011). Reference Value Advisor : a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Veterinary Clinical Pathology*, **40**(1), 107-112.
- GEFFRÉ A, FRIEDRICHS K, HARR K, CONCORDET D, TRUMEL C, BRAUN J-P (2009).

Reference values : a review. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, **38**(3), 288-298.

GRAUER GF, THOMAS CB, EICKER SW (1985). Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample. *American Journal of Veterinary Research*, **46**(10), 2116-2119

GROUPE ECONOMIE DU BÉTAIL (GEB) (2015). Chiffres clés 2015 : productions bovines lait et viande. *Institut de l'élevage (Idele)*.

GRÜNDER (1979). Appareil urinaire. In : ROSENBERGER, *Examen clinique des bovins*. Maison Alfort (France) : Editions le Point Vétérinaire, 305-322.

GUATTEO R (2007). Prélèvement d'urine. In : *Prélèvements chez les bovins : Guide illustré des procédures et gestes techniques en pratique courante*. Maison Alfort (France) : Editions le Point Vétérinaire, 95-105.

HARRIS EK, BOYD JC (1990). On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clinical Chemistry*, **36**(2), 265–270.

HARRIS EK, BOYD JC (1995). *Statistical bases of reference values in laboratory medicine*. New York, Basel, Hong Kong : Marcel Dekker.

HEINRICHS AJ, ERB HN, ROGERS GW, COOPER JB, JONES CM (2007). Variability in Holstein heifer heart-girth measurements and comparison of prediction equations for live weight. *Preventive Veterinary Medicine*, **78**, 333-338.

HENNY J (2011). Etablissement et validation des intervalles de référence au laboratoire de biologie médicale. *Annales de Biologie Clinique*, **69**(2), 229-237.

KIM YM, LEE JA, JUNG BG, KIM TH, LEE BJ, SUH GH (2016). Reference ranges of hematology and lymphocyte subsets in healthy Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein dairy cattle. *Animal Science Journal*, **87**(6), 796-801.

KROGH MA, TOFT N, ENEVOLDSEN C (2011). Latent class evaluation of a milk test, a urine test, and the fat-to-protein percentage ratio in milk to diagnose ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **94**(5), 2360-2367.

KULBERG S, BOYSEN P, STORSET AK (2004). Reference values for relative numbers of natural killer cells in cattle blood. *Developmental & Comparative Immunology*, **28**(9), 941-948.

LEES GE, BROWN SA, ELLIOTT J, GRAUER GE, VADEN SL (2005). Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **19**(3), 377–385.

LUMSDEN JH, MULLEN K, ROWE R (1980). Hematology and biochemistry reference values for female Holstein cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, **44**(1), 24.

MCCAW DL, KNAPP DW, HEWETT JE (1985). Effect of collection time and exercise restriction on the prediction of urine protein excretion, using urine protein/creatinine ratio in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **46**(8), 1665-1669.

MOYEN N, CONCORDET D, TRUMEL C, GEFFRE A, BRAUN JP (2008). Comparaison des résultats d'analyses urinaires rapides en fonction du type de bandelette réactive utilisé. *Pratique*

Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie, **43**(1), 15-20.

NSAHLAI IV, OSUJI PO, UMUNNA NN (2000). Effect of form and of quality of feed on the concentrations of purine derivatives in urinary spot samples, daily microbial N supply and predictability of intake. *Animal Feed Science and Technology*, **85**, 223-238.

OLIVEIRA A, VALADARES R, VALADARES F, CAMPOS S, CECON P, RENNÓ L, QUEIROZ A, CHIZZOTTI M (2001). Microbial protein production, purine derivatives and urea excretion estimate in lactating dairy cows fed isoprotein diets with different non protein nitrogen compounds levels. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **30**(5), 1621-1629.

OSBORNE C, FINCO D (1995). Urinary protein loss. In : *Canine and Feline Nephrology and Urology*. Baltimore : Williams & Wilkins, 211-215.

PAGÈS J-P, TROUILLET J-L (1990). Les protéinuries. *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, **25**(6), 585-597.

RADIGUE P-E (2003). Prélèvements et analyses au chevet du bovin malade. *Le Point Vétérinaire*, **34** (n° spécial - Examens paracliniques chez les bovins), 4-9.

REECE W (2009). The urinary system. In : *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. 4th edition. Ames : John Wiley & Sons, p.312-358.

ROSSI G, GIORI L, CAMPAGNOLA S, ZATELLI A, ZINI E, PALTRINIERI S (2012). Evaluation of factors that affect analytic variability of urine protein-to-creatinine ratio determination in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, **73**(6), 779-788.

SCHELCHER F, VALARCHER J-F, CABANIE P, ESPINASSE J (1995). Pyélonéphrites des bovins. *Le Point Vétérinaire*. 27(167), 43-46.

SCHELCHER F, VALARCHER J-F, FOUCRAS G, BOUISSET S (1999). Affections rénales des bovins : sémiologie et diagnostic. *Bulletin des GTV*, **1**, 17-38.

SIEST G, VERNET-NYSSSEN M (1979). Le concept de valeurs de référence en biologie clinique. Commission valeurs de référence. Document A. *Annales de Biologie Clinique*, **37**(2), 119-124.

SILVA R, VALADARES R, VALADARES F, CAMPOS S, CECON P, RENNÓ L, SILVA J (2001). Urea for dairy cows : estimates of urinary volume, microbial production and urea excretion. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **30**(6), 1948-1957.

SMITH B (2009a). Diseases of the Renal System. In : *Large animal internal medicine*. 4th edition. Saint Louis : Elsevier, p.1144-1188.

SMITH B (2009b). Clinical chemistry test : Urinalysis. In : *Large animal internal medicine*. 4th edition. Saint Louis : Elsevier, p. 395-396.

VAGNONI DB, BRODERICK GA, CLAYTON MK, HATFIELD RD (1997). Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science*, **80**(8), 1695-1702.

VAIL D, ALLEN T, WEISER G (1986). Applicability of leukocyte esterase test strip in detection of canine pyuria. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **189**(11), 1451-1453.

VALADARES RF, BRODERICK GA, VALADARES FILHO S, CLAYTON MK (1999). Effect of

replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of dairy science*, **82**(12), 2686–2696.

WHITTET K, KLOPFENSTEIN T, ERICKSON G, LOY T, MCDONALD R (2004). Effect of age, pregnancy, and diet on urinary creatinine excretion in heifers and cows. *Nebraska Beef Cattle Reports*, 100-102.

ANNEXES

	<p align="center">Unité de Pathologie des Ruminants ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : 05.61.19.38.36</p>	<p align="center">Annexe 1 : Questionnaire troupeau</p>
<p align="center">Détermination des intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des vaches adultes</p>		

NUMEROS D'IDENTIFICATION DES VACHES POUR L'ETUDE :

.....

COORDONNEES DE L'ELEVEUR :

Nom :

Adresse :

.....

Coordonnées téléphoniques :

ALTITUDE DE L'ELEVAGE :

COORDONNEES DU VETERINAIRE TRAITANT :

Nom :

Adresse :

.....

Coordonnées téléphoniques :

 	Unité de Pathologie des Ruminants ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : 05.61.19.38.36	Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement
Détermination des intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des vaches adultes		

Anamnèse

N° d'étude	
N° identification	
Race	
Age	
Stade physiologique 1 : mise bas < 3 mois 2 : mise bas : 3-9 mois 3 : tarie	

Alimentation et traitements

Alimentation (fourrage dominant)	
Traitement antiparasitaire (nom déposé et date)	
Confirmation absence de traitement en cours	
Antécédents médicaux	

Examen clinique

Examen cardiaque	<i>FC =</i> <i>Auscultation cardiaque :</i>
Examen respiratoire	<i>FR =</i> <i>Type respiratoire :</i> <i>Auscultation respiratoire :</i>
Contractions ruminales / 5 min	
Température rectale	
Périmètre thoracique	

Caractéristiques du prélèvement :

Date	
Heure	
Volume d'urine récolté	

	Unité de Pathologie des Ruminants ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : 05.61.19.38.36	Annexe 3 : Consentement éclairé de l'éleveur
Détermination des intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des vaches adultes		

Étude effectuée en élevage de décembre 2015 à juin 2016.

Le but de cette étude est d'établir des intervalles de références hématologiques, biochimiques et urinaires chez les vaches adultes saines. Les prélèvements seront réalisés par prise de sang à la veine coccygienne et par sondage urinaire.

Chaque animal sera examiné avant inclusion dans l'étude.

Nous nous engageons à analyser uniquement ces données, dans le but de compléter les informations de l'examen clinique quant à la bonne santé de l'animal.

.....
Je, soussigné(e),

Propriétaire du (des) bovin(s) :

.....

Atteste avoir lu les paragraphes précédents et avoir reçu une copie du protocole expérimental de l'étude.

Atteste avoir été clairement informé du caractère facultatif de cette étude, avoir conscience de ma totale liberté de refuser que mes vaches y participent, et accepte que ma (mes) vache(s) soi(en)t incluse(s) dans l'étude.

À

le

Signature :

 ECOLE NATIONALE VETERINAIRE	Unité de Pathologie des Ruminants ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : 05.61.19.38.36	Annexe 4 : Fiche de résultats de l'analyse d'urine
Détermination des intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des vaches adultes		

N° D'ETUDE DE LA VACHE :

ASPECT MACROSCOPIQUE DES URINES :

DENSITE URINAIRE :

PH (PAPIER MERCK) :

BANDELETTE URINAIRE :

	Leucocyte	Sang	Protéine	pH	Glucose	Corps cétoniques	Urobilinogène	Ni	Bilirubine	Densité
Kitvia										
Siemens										
Combur										
Arkay										

EXAMEN MICROSCOPIQUE DES URINES :

Analyse préliminaire (grossissement 10x) :

.....

Analyse quantitative (grossissement 40x) :

Eléments comptés	Champ 1	Champ 2	Champ 3	Champ 4	Champ 5	Champ 6	Champ 7	Champ 8	Champ 9	Champ 10
Cristaux										
Hématies										
Leucocytes										
Cylindres										
Bactéries										
Cellules épithéliales										

	Unité de Pathologie des Ruminants ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : 05.61.19.38.36	Annexe 5 : Protocole expérimental
Détermination des intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des vaches adultes		

1. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Le prélèvement d'urine est un élément simple et non invasif, rarement effectué en pratique, qui devrait faire partie intégrante de l'examen clinique d'un bovin. Des analyses simples sont réalisables au chevet de l'animal (bandelette urinaire) et/ ou au cabinet vétérinaire (densité urinaire, biochimie urinaire, cytologie).

L'intervalle de référence rapporté pour la densité urinaire varie selon les ouvrages :

- 1,020 – 1,040 (Guatteo, 2007)
- 1,030 – 1,045 (Reece, 2009)
- 1.020 – 1,050 (Smith, 2009b)

Cependant, dans ces trois ouvrages, les densités urinaires citées ne sont pas reliées à un article scientifique de référence permettant de savoir comment elles ont été établies et sur combien d'animaux. Il est donc intéressant de définir la densité urinaire pour les vaches, considérées comme saines, prélevées dans cette étude.

De plus, une analyse d'urine n'est pas complète sans cytologie du culot urinaire afin de repérer des anomalies microscopiques. Une bandelette urinaire est également utilisée dans le cadre d'une analyse d'urine de base. De ce fait, une bandelette, une cytologie du culot urinaire ainsi que la mesure de la densité urinaire constitueront l'analyse préliminaire des urines. Elle sera effectuée pour chaque animal inclus dans l'étude et permettra d'exclure des spécimens considérés comme anormaux des individus de référence.

Enfin, à notre connaissance, aucun intervalle de référence n'a été établi pour la protéinurie et le RPCU chez les bovins. De ce fait, aucune méthode quantitative d'évaluation de la protéinurie n'est disponible chez les bovins. Les seules méthodes actuellement utilisées sont semi-quantitative : la bandelette urinaire et la réaction de Heller.

Cette étude a pour objectif d'établir des intervalles de référence de la densité urinaire et du rapport protéines / créatinine urinaires à partir des recommandations du CLSI (CLSI, 2008) et de l'ASVCP (Friedrichs et al., 2012).

2. PERSONNES IMPLIQUEES

L'étude est effectuée et coordonnée par C. Ancel, sous la responsabilité de N. Herman, F. Schelcher et C. Trumel, avec l'assistance de :

- C. Ancel : préparation du protocole, réalisation des prélèvements urinaires, traitement des données et interprétation des résultats.
- N. Herman : préparation du protocole, recrutement des animaux, réalisation des prélèvements urinaires, traitement des données et interprétation des résultats.
- C. Trumel : préparation du protocole, préparation des prélèvements, analyse préliminaire et au laboratoire des urines, traitement des données et interprétation des résultats.
- F. Schelcher : préparation du protocole, relecture et interprétation des résultats
- J-P Braun : analyse statistique des données

3. PERIODE ET DUREE DE L'ETUDE

Les prélèvements seront réalisés dans les élevages de décembre 2015 à juin 2016.

4. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

4.1. Critères de partition des animaux

Un nombre de 150 prélèvements sera effectué dans l'objectif de recueillir un minimum de 120 résultats exploitables.

Les génisses, les veaux et les mâles sont exclus de notre échantillonnage en raison de la difficulté de sondage urinaire. Seules les vaches adultes sont donc prélevées.

4.1.1. Race

De façon à obtenir un échantillonnage représentatif du cheptel bovin français, le pourcentage de chaque race prélevée dans cette étude est corrélé à l'importance de cette race au sein du cheptel français (Groupe Economie du Bétail, 2015). Soit 150 prélèvements répartis comme suit :

- 50 Prim'Holstein (32% du cheptel français)
- 30 Charolaises (19% du cheptel français)
- 20 Limousines (14% du cheptel français)
- 15 Montbéliardes (8% du cheptel français)
- 10 Blondes d'Aquitaine (6% du cheptel français)
- 10 Normandes (5% du cheptel français)
- 5 Salers (3% du cheptel français)
- 5 Aubrac (2% du cheptel français)
- 5 Brunes des Alpes ou autres (4% du cheptel français constitué d'autres races que celles évoquées précédemment)

4.1.2. Stade physiologique

Le choix des animaux à prélever est également conditionné par leur stade physiologique. On prélèvera en proportions équivalentes :

- Vaches en premier trimestre post-partum (0 à 3 mois après le vêlage) : groupe 1
- Vaches en production (3 à 9 mois post-vêlage) : groupe 2
- Vaches en dernier trimestre de gestation : groupe 3

Le stade physiologique sera confirmé par palpation transrectale ou examen échographique.

4.1.3. Alimentation

Afin d'être en mesure de discuter d'un éventuel rôle de l'alimentation sur la valeur du RPCU, l'objectif sera de prélever en proportions équivalentes des vaches avec :

- Ration avec foin dominant.
- Ration avec ensilage de maïs dominant.

4.1.4. Altitude

Dans un souci de représentativité, l'altitude des élevages sera renseignée.

4.2. Critères d'inclusion de l'animal

- Vache adulte de pure race ayant déjà eu au moins un veau.
- Pour chaque race, un nombre de vaches proportionnel à la prévalence de cette race au sein du cheptel bovin français.
- Vache ayant été jugée en bonne santé. D'une part, d'après les réponses fournies par l'éleveur à un questionnaire (Annexe 1 : Questionnaire troupeau). D'autre part, grâce à un examen clinique réalisé le jour du prélèvement de l'animal (Annexe 2 : Fiche d'accompagnement du prélèvement).
- Un maximum de 5 animaux par élevage.

Les animaux sont inclus uniquement après une information complète du propriétaire, associée à la signature du « Formulaire de consentement éclairé » (Annexe 3).

4.3. Critères d'exclusion de l'animal

4.3.1. Exclusion initiale

- Animal ayant reçu un traitement (hormis antiparasitaire) durant le mois précédant le prélèvement.
- Animal avec un historique d'affection diverse (boiterie, mammite, métrite...) durant le mois précédant le prélèvement.
- Animal déclaré malade sur base de l'examen clinique

4.3.2. Exclusion à l'analyse préliminaire

Animal présentant une modification des urines (aspect macroscopique, densité anormale, bandelette urinaire anormale, cytologie modifiée).

Analyse au chevet du patient	Critères d'exclusion
Aspect macroscopique	Urine trouble
Bandelette urinaire	Plage « corps cétoniques » positive
Cytologie urinaire	Présence de bactéries Moyenne des leucocytes sur 10 champs supérieure à 5 Moyenne des hématies sur 10 champs supérieure à 8

4.4. Identification des animaux

Chaque vache sélectionnée pour l'étude aura une fiche d'accompagnement du prélèvement (Annexe 2). Cette fiche comportera l'identification, la race, l'âge, le poids, le stade physiologique de l'animal, le type d'alimentation, l'altitude de la ferme ainsi que la date, l'heure du prélèvement et le numéro d'identification de l'animal dans l'étude. Les bovins sont identifiés de la façon suivante ; « de 1 à X », et seul leur numéro d'étude sera mentionné sur les résultats d'analyses.

4.5. Déroulement

4.5.1. Examen clinique

Chaque vache est soumise à un examen clinique avant la réalisation des prélèvements afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'anomalie notable de son état général. Les paramètres évalués sont la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, les contractions ruminales auscultées sur 5 minutes et la température rectale (Annexe 2).

4.5.2. Récolte des urines

Les urines sont toutes recueillies par sondage urinaire, par trois manipulateurs (P. Ragot, N. Herman et C. Ancel).

Le prélèvement d'urine chez les bovins peut se faire par sondage ou lors de miction spontanée (Carrër et Marhuenda, 2006).

On peut obtenir la miction spontanée chez la vache en caressant la commissure inférieure de la vulve et la zone périnéale ou en massant la vessie par voie transrectale. Cependant, cette miction ne peut être déclenchée de manière systématique, ce qui est problématique en terme de temps. Ce prélèvement présente également l'inconvénient de mettre en contact l'urine émise avec l'appareil génital externe et la peau ; ce qui occasionne la présence de débris cellulaires et de bactéries dans l'urine récoltée (Carrër et Marhuenda, 2006).

Dans cette étude, les prélèvements urinaires seront majoritairement réalisés par sondage urinaire. Cependant, la miction spontanée est admise si le nettoyage de la vulve a préalablement été réalisé.

Pour réaliser le sondage :

- nettoyage de la vulve à l'eau et essuyage minutieux
- sondage à l'aide d'une sonde métallique courbe stérilisée, réutilisable, de 5 mm de diamètre et 540 mm de long.
- récolte de l'urine à l'aide d'une seringue de 20 mL neuve
- nettoyage de la sonde à l'eau puis désinfection à la Chlorhexidine diluée (5 %, temps de contact 1 heure) entre chaque élevage. Afin de conserver le contact pendant 1 heure, on les garde dans un gant de fouille rempli de Chlorhexidine.

Pour chaque animal, un seul prélèvement de 10 mL au minimum est réalisé à l'aide d'une seringue de 20 mL. Elle est ensuite identifiée avec le numéro d'étude de l'animal (écrit au marqueur noir indélébile) et placée dans une glacière jusqu'au lieu d'analyse d'urine préliminaire.

5. ÉTAPES PRE-ANALYTIQUES

L'analyse au chevet du patient est réalisée dans un délai maximal de deux heures après la collecte.

Chaque spécimen récolté est réparti en 4 volumes de 1,5 mL, placés dans 4 tubes Eppendorf (tube 1,5mL, Safe-Lock Eppendorf[®], Hamburg, Germany). Ils sont, au préalable, identifiés avec le numéro d'étude de l'animal : « U (Urine) X ».

Les 4 tubes Eppendorf d'urine sont placés dans la centrifugeuse EBA 3S (Andreas Hettich GmbH and Co., Tuttlingen, Allemagne) à 1500 tours/minute pendant 5 minutes.

Pour 3 des 4 tubes Eppendorf, le surnageant est réparti dans 3 nouveaux tubes Eppendorf préalablement identifiés « US (Urine surnageant) X ».

Le 4^{ème} tube Eppendorf sert à réaliser les analyses au chevet de l'animal.

Les prélèvements sont conservés à 4°C dans une glacière pendant le transport entre l'élevage et le laboratoire de l'ENVT (lieu d'analyse). Ils sont ensuite congelés à -80°C jusqu'à l'analyse.

6. ÉTAPES ANALYTIQUES AU CHEVET DE L'ANIMAL

Une analyse d'urine complète est réalisée à partir du dernier tube Eppendorf, directement après le prélèvement.

6.1. Densité urinaire

Mesure de la densité urinaire au moyen d'un refractomètre optique Atago T2-NE (Atago Co. Ltd., Tokyo, Japan). La valeur obtenue est consignée dans la fiche analytique (Annexe 4).

6.2. pH urinaire

Une estimation du pH urinaire est effectuée avec la bandelette MColorpHast® pH 6,5 à 10 (Merck, Darmstadt, Germany).

6.3. Bandelettes urinaires

Une analyse chimique est réalisée au moyen de bandelettes urinaires réactives :

- Bandelette UriVet-100® (Kitvia, Labarthe-Inard, France)
- Bandelette Combur 10 Test® strips (Cobas, Rotkreuz, Suisse)
- Bandelette Multistix® 8 SG (Siemens, Tarrytown, USA)
- Bandelette AUTION MICRO® PU-4010 (Arkray, Koji, Japan)

L'ordre dans lequel les bandelettes sont testées est défini au hasard, préalablement à l'analyse de chaque spécimen.

Les valeurs sont reportées dans la fiche analytiques de chaque individu (Annexe 4).

6.4. Cytologie urinaire

Le sédiment urinaire est examiné immédiatement après centrifugation du tube, toujours par le même opérateur (C. Trumel).

Les résultats de l'examen cytologique sont également consignés dans la feuille d'analyse de la vache (Annexe 4)

Une goutte (environ 6 µL) de sédiment urinaire du spécimen est transférée sur une lame à bords coupés et à plage dépolie (Thermo Scientific Menzel-Gläser) et recouverte d'une lamelle 22 x 22 mm (Thermo Scientific Menzel-Gläser).

Le sédiment est observé aux objectifs x10 et x40 avec un microscope Nikon Eclipse E200. L'intensité lumineuse, la fermeture du diaphragme et la descente du condensateur sont réglées à leur maximum.

❖ Analyse préliminaire au faible grossissement

Une première analyse semi-quantitative du spécimen se fait au faible grossissement (10x) dans le but d'apprécier la richesse du prélèvement et la présence éventuelle de cristaux et de cylindres. La surface de la lamelle est observée dans son intégralité en faisant varier la vis micrométrique afin d'effectuer un premier tri entre les éléments d'intérêt (cellules, cristaux, cylindres) et les artéfacts de préparation (bulles, débris de verre, fibres ou poils).

❖ Analyse au fort grossissement

L'analyse quantitative s'effectue à l'aide de l'objectif (40x).

Dix champs distincts sont sélectionnés en prenant soin d'éviter leur chevauchement afin de ne pas compter plusieurs fois le même élément.

Sur chacun des champs, les éléments d'intérêt sont dénombrés individuellement et relevés dans une colonne du tableau (cf. page suivante) qui servira de modèle pour toutes les analyses microscopiques de l'étude. Une moyenne sur les dix champs est effectuée à la fin de l'examen. Cette moyenne constituera la donnée brute exploitée par la suite dans l'élimination des spécimens anormaux.

La nature des cristaux, cylindre ou bactérie sera précisée si nécessaire.

Les données brutes obtenues pour chaque échantillon d'urine seront stockées sur la fiche de résultat individuelle (Annexe 4), au fur et à mesure de leur obtention.

Eléments comptés	Champ 1	Champ 2	Champ 3	Champ 4	Champ 5	Champ 6	Champ 7	Champ 8	Champ 9	Champ10
Cristaux										
Hématies										
Leucocytes										
Cylindres										
Bactéries										

6.5. Contrôle de qualité

Le contrôle de qualité du réfractomètre s'effectue en déposant une goutte d'eau distillée sur la plage dédiée. La densité lue doit être égale à 1,000. Si nécessaire, la valeur est corrigée avec la vis située à

l'avant de l'oculaire.

Les bandelettes urinaires sont conservées selon les instructions des fabricants.

7. ETAPES ANALYTIQUES AU LABORATOIRE

7.1. Détermination des concentrations en protéines et créatinine urinaires

Les analyses sont réalisées au laboratoire central de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Le RPCU sera calculé à partir des concentrations mesurées de créatinine et de protéines sur chaque spécimen par un analyseur (Thermo Fisher Scientific, Indiko, Vantaa, Finland) avec des réactifs spécifiques (Creatinine (Enzymatic) et U-CSF Prot, Thermo Scientific, Vantaa, Finland).

Tous les résultats urinaires sont reportés dans la feuille analytique de chaque animal (Annexe 4).

7.2. Contrôles de qualité

Avant chaque série de mesures, un contrôle de l'analyseur est réalisé, avec 2 réactifs, selon le protocole de routine du laboratoire.

De plus, un calibrage de l'appareil est effectué, toutes les 2 semaines.

8. INTERPRETATION DES RESULTATS SCIENTIFIQUES – STATISTIQUES

Un fichier Excel est réalisé par C. Ancel pour recenser tous les résultats obtenus concernant les analyses urinaires.

Les calculs statistiques sont effectués grâce aux logiciels Excel, Analyse-It et Reference Value Advisor®.

 ECOLE NATIONALE VETERINAIRE	Unité de Pathologie des Ruminants ENVT, 23 Chemin des Capelles, BP 8761431076 Toulouse Cedex 3, France ☎ : 05.61.19.38.36	Annexe 6 : Valeurs de référence de la densité urinaire et du RPCU
Détermination des intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des vaches adultes		

Numéro d'étude du bovin	Créatinine (mg/L)	Protéines (mg/L)	RPCU	Densité urinaire
1	471,8	67	0,1420	1,03
2	1045,2	126	0,1206	1,048
4	964,7	155	0,1607	1,04
5	2963,4	137	0,0462	1,05
6	1295,7	123	0,0949	1,033
7	1009,1	148	0,1467	1,035
8	948	140	0,1477	1,032
9	957,3	138	0,1442	1,03
10	701,1	131	0,1868	1,03
11	ND	ND	ND	1,032
13	2768,1	145	0,0524	1,031
14	2336,4	152	0,0651	1,03
15	2672,3	151	0,0565	1,03
16	954,3	81	0,0849	1,028
18	1371,5	54	0,0394	1,027
19	1137,4	66	0,0580	1,025
20	1038,3	55	0,0530	1,023
21	3328,6	174	0,0523	1,04
25	1951,2	143	0,0733	1,03
26	1500,3	141	0,0940	1,025
27	1212,9	142	0,1171	1,028
28	1489,3	148	0,0994	1,035
30	1059,6	157	0,1482	1,035
31	2022,7	144	0,0712	1,032
35	942,5	150	0,1592	1,033
36	826,9	151	0,1826	1,027
39	1239,8	150	0,1210	1,038
42	1500	124	0,0827	1,03
43	1934,8	144	0,0744	1,028
45	1248,1	167	0,1338	1,03
46	1246,7	107	0,0858	1,035
47	2968,1	155	0,0522	1,032
49	1173,3	139	0,1185	1,024

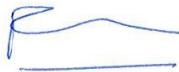
Numéro d'étude du bovin	Créatinine (mg/L)	Protéines (mg/L)	RPCU	Densité urinaire
50	2314,5	158	0,0683	1,034
57	3605,3	141	0,0391	1,03
58	2023,6	157	0,0776	1,03
59	1319,8	90	0,0682	1,02
60	1668,9	117	0,0701	1,022
61	1928,9	135	0,0700	1,023
62	715,6	158	0,2208	1,028
63	535,2	93	0,1738	1,022
64	388,5	110	0,2831	1,022
65	1897,9	148	0,0780	1,032
66	2003,8	160	0,0798	1,031
67	2088,5	155	0,0742	1,03
68	1807,6	135	0,0747	1,025
70	1710,8	143	0,0836	1,03
71	1978,2	154	0,0778	1,031
72	2769,8	146	0,0527	1,031
73	3245	155	0,0478	1,031
74	2428,7	157	0,0646	1,021
75	2101,1	166	0,0790	1,03
77	977,2	128	0,1310	1,02
78	459,1	142	0,3093	1,023
81	703,8	151	0,2145	1,03
82	2126,5	163	0,0767	1,023
83	1746,8	125	0,0716	1,02
84	1483,9	133	0,0896	1,026
85	1418,7	147	0,1036	1,029
86	894,9	106	0,1184	1,03
87	1252,3	115	0,0918	1,037
88	1874,7	152	0,0811	1,04
90	1108,2	139	0,1254	1,026
91	820,2	133	0,1622	1,024
92	944,1	145	0,1536	1,025
93	730,2	120	0,1643	1,021
94	586,4	148	0,2524	1,028
95	793,5	148	0,1865	1,03
97	799,7	147	0,1838	1,03
98	1451,6	142	0,0978	1,034
100	1701	131	0,0770	1,025
101	1193,9	126	0,1055	1,023
102	1049,9	148	0,1410	1,023
103	1610,9	124	0,0770	1,03
105	1115,9	138	0,1237	1,025
106	1370,2	157	0,1146	1,03
107	1207,9	145	0,1200	1,025

Numéro d'étude du bovin	Créatinine (mg/L)	Protéines (mg/L)	RPCU	Densité urinaire
108	2278,2	115	0,0505	1,028
111	1867,8	170	0,0910	1,033
112	2438,5	153	0,0627	1,03
113	2090,2	150	0,0718	1,036
116	1935	144	0,0744	1,027
118	1691,4	119	0,0704	1,031
119	2310,9	163	0,0705	1,035
120	1422,5	150	0,1054	1,028
121	3644,2	163	0,0447	1,039
122	1884,1	147	0,0780	1,029
124	3476,5	162	0,0466	1,032
125	3403,7	149	0,0438	1,031
126	3055,9	149	0,0488	1,035
128	2321,7	150	0,0646	1,028
129	1437,9	167	0,1161	1,047
130	993,6	143	0,1439	1,031
131	604,1	135	0,2235	1,027
133	1302,5	119	0,0914	1,022
134	1618	105	0,0649	1,023
135	2527	115	0,0455	1,03
136	1632,5	79	0,0484	1,022
137	2154,1	123	0,0571	1,029
138	1707,1	121	0,0709	1,028
140	628,2	124	0,1974	1,028
141	634,6	111	0,1749	1,026
142	453,6	98	0,2160	1,024
143	1810	95	0,0525	1,024
145	762,3	112	0,1469	1,028
146	476,2	120	0,2520	1,025
147	471,9	107	0,2267	1,025
148	999,1	101	0,1011	1,026
149	2768	196	0,0708	1,034
150	2298,6	155	0,0674	1,035
151	1262,2	107	0,0848	1,023
153	1934,7	116	0,0600	1,026
154	827,1	67	0,0810	1,015
155	2496,1	157	0,0629	1,031
156	1103,8	93	0,0843	1,022

AGREMENT SCIENTIFIQUE

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

Je soussigné, François SCHELCHER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **ANCEL Camille** intitulée « **Détermination des intervalles de références de la densité urinaire et du rapport protéine/créatinine urinaire chez les vaches.**» et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

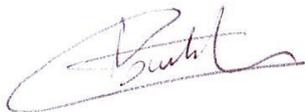


Fait à Toulouse, le 3 novembre 2016
Professeur François SCHELCHER
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



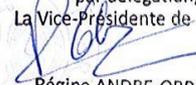

Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN

Vu :
Le Président du jury :
Professeure Monique COURTADE SAÏDI



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier

Monsieur Jean-Pierre VINEL
Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU


Régine ANDRE-OBRECHT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Nom : Ancel

Prénom : Camille

Titre : Détermination des intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des vaches adultes

Résumé : Les intervalles de référence de la densité urinaire et du RPCU des bovins ont été établis en suivant les recommandations internationales (CLSI et ASVCP) avec une méthode statistique non paramétrique.

L'intervalle de référence de la densité urinaire, réalisé sur 111 spécimens sains, est 1,020 – 1,040. Il est directement utilisable en pratique courante avec un réfractomètre.

Notre recherche est la première à déterminer un intervalle de référence du RPCU. Les valeurs limites, obtenues sur 110 spécimens sains, sont 0,043 – 0,22 avec l'analyseur Indiko (Thermo Fischer Scientific). Une étude permettant le transfert de nos valeurs pour un autre analyseur est conseillée avant leur utilisation.

Les vaches allaitantes ont un RPCU plus faible, en moyenne que les vaches laitières. Le stade de gestation influence également de manière significative le RPCU obtenu : les vaches à moins de 3 mois du terme ont un RPCU plus faible que les autres vaches prélevées.

Mots-clés : Analyse d'urine, RPCU, protéinurie, créatininurie, densité urinaire, vache

Title : Reference intervals determination of specific gravity and UPC ratio in adult cows

Summary : The goal of the following study is the determination of reference intervals of specific gravity and UPC ratio accordingly to the international guidelines (CLSI and ASVCP) with a non-parametric method.

The determination of specific gravity reference interval using a refractometer was handled on a range of 111 healthy cow units. Reference interval is 1,020 – 1,040.

We are the first to determine a reference interval of the UPC ratio of adult cows. The urine samples from 110 healthy cows were analyzed using Indiko automate (Thermo Fisher Scientific). Reference interval value is 0,043 – 0,22. A transfer to another automat should be performed before using our reference interval.

Beef cattle units have lower UPC ratio reference values than dairy cows. Moreover, similar trend can be observed during the pregnancy period between short-term bred cows (0-3 months) and usual ones.

Keywords : urine analysis, reference interval, UPC ratio, proteinuria, creatinuria, specific gravity, cows