



41^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 12 mars 2015

Les nouveaux outils de diagnostic et de pronostic de la myopathie atypique

Par

J.A. Habyarimana¹, F. Boemer², H. Amory³, E. Baise⁴, J. Carlier⁵, P. de Tullio⁶, C. Douny⁷, G. Gault⁸, P. Gustin¹, T. Franck⁹, M. Frederich¹⁰, C. Marcillaud-Pitel¹¹, E. Richard¹², F. Patarin³, M. Weber¹, D.-M. Votion³

¹ Pharmacologie, Pharmacothérapie et Toxicologie, FARAHA, FMV-ULg, Belgique

² Laboratoire de Biochimie génétique, CHU, ULg, Belgique

³ Pôle équin, Faculté de Médecine vétérinaire, FARAHA, FMV-ULg, Belgique

⁴ Département des Maladies infectieuses et parasitaires, FARAHA, FMV-ULg, Belgique

⁵ Latlumtox, Ediss, Université de Lyon, France

⁶ CIRM, Chimie Pharmaceutique, CHU, ULg, Belgique

⁷ Département des Sciences des Denrées Alimentaires, FARAHA, FMV-ULg, Belgique

⁸ Usc 1233 Ediss, VETAGROSUP, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, France

⁹ Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement (CORD), FARAHA, FMV-ULg, Belgique

¹⁰ CIRM, Pharmacognosie, CHU, ULg, Belgique

¹¹ Réseau d'Épidémiologie et de Surveillance en Pathologie Équine (RESPE), Caen, France

¹² Labéo Frank Duncombe, Caen, France

Résumé

Chez les équidés, l'ingestion des fruits (*i.e.* samares) de l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) perturbe le métabolisme énergétique de la cellule musculaire et induit la myopathie atypique (MA). Ces fruits contiennent de l'hypoglycine A dont le métabolite conduit à des désordres biochimiques caractérisés par un profil sanguin modifié en acylcarnitines (AC).

Les objectifs des recherches menées étaient de valider une technique de dosage de l'hypoglycine A dans des extraits végétaux et dans le sang. En outre, le profil sanguin en AC de cas de MA (n=18 dont 5 survivants) et de chevaux souffrant épisodiquement de myopathie d'exercice (n=5) a été établi selon une technique de laboratoire de routine validée antérieurement et pour laquelle des valeurs de référence avaient été obtenues à partir de prélèvements sanguins effectués sur chevaux sains (n=35).

Cette étude a permis de confirmer la présence d'hypoglycine A dans les samares de l'érable sycomore et de montrer que cette molécule était présente dans les plantules printaniers ainsi que dans le sang des chevaux souffrant de MA et pas chez les autres. En outre, l'étude du profil des AC démontre son potentiel diagnostique et pronostique pour les cas de MA.

Mots clés : myopathie atypique, prairie, Acer, toxine, hypoglycine A

Summary

In equines, ingestion of hypoglycin A, a toxin produced in the seeds (samaras) of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) tree alters the energetic metabolism of muscle cells and results in atypical myopathy (AM). This alteration leads to a characteristic biochemical profile of acylcarnitines (AC) that enables to confirm the diagnosis of AM.

This study aims at validating a methodology for the dosage of hypoglycin A in vegetal extracts but also in blood. In addition, the biochemical profile in AC has been determined in AM cases (5 survivors and 13 deceased) and in 5 horses suffering from exercise-induced myopathy. The AC profiles of these horses have been compared to the one of healthy horses (n = 35).

This study showed that hypoglycin A was present in seeds and spring seedlings of sycamore and also in blood of AM cases horses. In addition, the establishment of AC profile contributes to the diagnostic and helps to assess the prognosis of AM cases.

Key-words: atypical myopathy, pasture, Acer, toxin, hypoglycin A



Introduction

La cause de la myopathie atypique des équidés (MA), à savoir, l'ingestion d'hypoglycine A contenue dans les fruits (*i.e.* samares) de l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus* ; Fowden et Pratt, 1973), a récemment été identifiée (Votion *et al.*, 2014). Une fois ingérée, l'hypoglycine A est métabolisée en un composé toxique qui perturbe le métabolisme énergétique. Ces perturbations conduisent à des désordres biochimiques caractéristiques (Westermann *et al.*, 2008) qui contribuent à confirmer le diagnostic de MA par dosage sanguin des acylcarnitines (AC).

Depuis la découverte de la cause de la MA, la question de la nocivité de fruits d'autres arbres communément présents sur les pâtures en Europe (Patarin *et al.*, 2014) ou des feuilles des érables reste posée, et les conditions de toxicité des samares restent à définir (influence des conditions climatiques, du degré de maturité des fruits, etc.). D'autres questions émises par divers acteurs du secteur équin concernent la saisonnalité (pourquoi des cas ré-émergent-ils au printemps ?), la toxicité éventuelle du foin ou de l'ensilage produit à partir d'une prairie où des cas ont été confirmés, la quantité de samares devant être ingérée pour induire la MA, etc. Pour répondre à ces interrogations dont les réponses auront des implications pratiques pour les éleveurs, il est nécessaire de disposer d'une technique de dosage de l'hypoglycine A dans des échantillons végétaux. Le dosage de l'hypoglycine A dans le sang permettrait quant à lui, non seulement de confirmer chez les chevaux malades que ceux-ci ont ingéré la toxine, mais également d'étudier la relation entre toxicité environnementale et déclenchement des séries cliniques de MA.

Les objectifs des recherches menées étaient de valider une technique de dosage de l'hypoglycine A dans des extraits végétaux et dans le sang afin de les appliquer ultérieurement aux différents échantillons végétaux et sanguins collectés sur des cas de MA au cours de l'automne 2013 et du printemps 2014. En outre, l'hypothèse était émise que le profil des AC, outre son apport diagnostique, contribuerait à évaluer le pronostic vital des cas de MA.

1. Matériel et méthodes

1.1. Sélection des échantillons

1.1.1. Echantillons végétaux

Pour la validation technique du dosage de l'hypoglycine A dans des échantillons végétaux, des samares d'érables sycomores ont été collectées sur des prairies de cas de MA confirmés (notamment sur base du profil des AC) à l'automne 2013 et 2014. Ensuite, des analyses ont été réalisées sur des plantules collectées sur des prairies de cas de MA confirmés au printemps 2014. Lorsque cela a été nécessaire, les échantillons ont été conservés à -20°C en vue de l'analyse.

1.1.2. Echantillons sanguins

Les groupes de chevaux utilisés dans cette étude sont repris dans le Tableau 1 et sont détaillés ci-après.

- *Objectif 1 – Validation des techniques de dosage*

Pour les validations techniques du dosage de l'hypoglycine A effectué sur des échantillons sanguins, ceux-ci ont été récoltés *via* le Réseau d'Epidémiologie et de Surveillance en Pathologie Equine (RESPE) pour les cas Français et *via* l'Atypical Myopathy Alert Group (AMAG) pour les échantillons prélevés sur des cas belges. Au total, les échantillons de 25 cas confirmés de MA ont été sélectionnés dans notre sérothèque. Certains chevaux avaient été prélevés plusieurs fois au cours de leur maladie et c'est au total 55 échantillons sanguins qui ont été analysés pour valider la technique de dosage. Le sang de 8 chevaux sains a été prélevé à titre de contrôle négatif.

Les valeurs de référence pour le profil biochimique des AC ont été établies à partir de prélèvements sanguins effectués sur chevaux sains de différentes races et d'âges variés (n=35 ; *données non publiées*).

- *Objectif 2 – Etude clinique*

Pour tester l'utilité des dosages validés, le taux d'hypoglycine A et le profil des AC a été déterminé dans le sang des cas de MA hospitalisés à la Faculté de Médecine vétérinaire de Liège à l'automne 2013 (n=18 dont 5 survivants) et dans le sang de chevaux souffrant de myopathie d'exercice (*i.e.* chevaux myopathes ; n=5).



Tableau 1 : Groupes de chevaux utilisés dans l'étude
Table 1: Categories of horses used

	Chevaux souffrant de myopathie atypique	Chevaux contrôles (valeurs de référence)	Myopathie d'exercice
Dosage sanguin de l'hypoglycine A	n = 25* (validation de la technique)	n = 8	n = 5
Dosage des acylcarnitines	n = 18 dont 5 survivants	n = 35 (validation de la technique)	n = 5

Légende : (*) : certains chevaux ont été prélevés plusieurs fois ; au total, 55 échantillons étaient disponibles à partir de ces 25 chevaux

1.2 Dosage de l'hypoglycine A dans les échantillons végétaux

Le dosage de l'hypoglycine A dans les échantillons végétaux par chromatographie sur couche mince de haute performance (HTPLC) a nécessité de standardiser les différentes étapes de préparation des échantillons (comptage, pesée, réduction mécanique, extraction liquide-liquide...) et de trouver les conditions optimales pour la séparation de la molécule ciblée (*i.e.* l'hypoglycine A) à partir de l'extrait. La détermination et la quantification ont été effectuées à l'aide d'une station de travail HTPLC (CAMAG Scanner 3) en mode d'absorbance à 490 nm.

1.3 Dosage de l'hypoglycine A dans le sang

Le dosage de l'hypoglycine A dans le sang a été effectué par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les détails de la validation technique sont disponibles ailleurs (Carlier *et al.*, 2015). D'autre part, afin de permettre cette analyse dans un laboratoire de routine, une autre méthode basée sur un kit d'analyse des acides aminés dans des fluides physiologiques (aTRAQ® kit) a été validée à partir des 55 échantillons sanguins précités (Boemer *et al.*, *soumis pour publication*). Suite à cette validation, l'hypoglycine A a été dosée dans le sang des cas de MA hospitalisés à la Faculté de Médecine vétérinaire de Liège à l'automne 2013, dans le sang des chevaux contrôles et dans le sang de chevaux souffrant de myopathie d'exercice (*cf.* Tableau 1).

1.4 Détermination du profil sanguin des acylcarnitines

Le profil sanguin en AC des chevaux de cette étude a été établi selon une technique de laboratoire de routine. Pour les chevaux souffrant de MA, la prise de sang a été réalisée dès réception du cas à la clinique et avant l'administration de tout traitement (néanmoins, certains chevaux avaient reçu des traitements prodigués par un praticien, sur le terrain). Pour les chevaux souffrant de myopathie d'exercice, la prise de sang a été effectuée au repos.

Afin de définir le potentiel pronostique du profil sanguin en AC, un indice de survie a été obtenu grâce à une modélisation par régression linéaire. La valeur Y issu de cette modélisation correspond à une probabilité entre 0 (= décès) et 1 (=survie).

1.5 Analyses statistiques

Les différents paramètres ont été comparés avec un Test de t pour données non appariées. Les différences ont été considérées comme significative quand $P < 0,05$.

2. Résultats

2.1. Dosage de l'hypoglycine A dans les échantillons végétaux

Les conditions analytiques ont été définies avec pour objectif la mise en place d'une méthode d'analyse fiable et reproductible. Les détails de la procédure sont disponibles en tout (Habyarimana *et al.*, *soumis pour publication*) ou en partie (Habyarimana *et al.*, 2014) dans d'autres écrits. En conclusion, la méthode HTPLC a été retenue et le dosage de l'hypoglycine A dans une première série d'échantillons végétaux a permis de montrer que celle-ci était présente dans les samares de l'érable sycomore mais également dans les jeunes pousses d'érables (Figure I) testées.



Figure I : plantules de l'érable sycomore
Figure I: seedlings of sycamore maple tree

Photographie: Votion D.-M.

2.2. Dosage de l'hypoglycine A dans le sang

Par LC-MS/MS et à l'aide du kit aTRAQ®, l'hypoglycine A a été détectée et dosée dans le sang des cas de MA (pas de différence significative entre les survivants et les décédés), mais elle n'a pas été détectée dans celui des cas contrôles ; ni dans le sang des chevaux souffrant de myopathie d'exercice (Tableau 2).

Tableau 2 : Concentration sérique (moyenne \pm SD; $\mu\text{mol/L}$) en hypoglycine A dans les différents groupes de chevaux testés

Table 2: Serum concentration (mean \pm SD; $\mu\text{mol/L}$) of hypoglycine A in the different types of horses' category

	Hypoglycin A $\mu\text{mol/L}$
Validation technique	
Echantillons de sang de chevaux souffrant de myopathie atypique (n = 55)	2,9 \pm 2
Chevaux contrôles (n = 8)	N.D.
Etude clinique	
Chevaux avec myopathie atypique : décédés (n = 13)	4,7 \pm 2,0
Chevaux avec myopathie atypique : survivants (n = 5)	4,6 \pm 1,5
Chevaux myopathes (n = 5)	N.D.

Légende : N.D. = non détecté

2.3. Détermination du profil sanguin des acylcarnitines

Le profil biochimique (basé sur 34 paramètres du métabolisme énergétique dont les AC) confirmait le diagnostic de MA avec un nombre de paramètres en dehors des normes de 23 ± 8 chez les survivants *vs.* 31 ± 2 chez les décédés. Chez les contrôles, les divers paramètres biochimiques mesurés étaient dans les normes (Tableau 3). En outre, certaines AC (*e.g.* C18:2-OH-Carnitine) étaient hors normes chez les décédés mais pas chez les survivants. Parmi les AC significativement augmentées par rapport aux valeurs de référence, celles-ci l'étaient jusqu'à 7× plus chez les décédés *vs.* les survivants. Le Tableau 3 reprend 1 exemple parmi les AC à chaînes courtes, moyennes et longues.



Tableau 3 : Dosage sérique des acylcarnitines (moyenne \pm SD; $\mu\text{mol/L}$) dans les différents groupes de chevaux testés

Table 3: Serum concentration of acylcarnitines (mean \pm SD; $\mu\text{mol/L}$) of hypoglycine A in the different types of horses' category

Etude clinique	Acylcarnitines : Nombre de paramètres hors normes	Prédiction de survie	C4-carnitine	C8DC-carnitine	C10:2-carnitine	C18:2-OH-Carnitine
Chevaux contrôles : Sains : (n = 35)	0	0,89 \pm 0,14	0,40 \pm 0,42	0,02 \pm 0,02	0,03 \pm 0,02	0,02 \pm 0,02
Chevaux myopathes : (n = 5)	7 \pm 6,5***	0,86 \pm 0,12	0,67 \pm 0,31***	0,07 \pm 0,10**	0,26 \pm 0,54**	0,02 \pm 0,02
Myopathie atypique : décédés (n = 13)	30,6 \pm 2,1***,††	0,12 \pm 0,18***,††	24,58 \pm 17,54***,††	0,08 \pm 0,04***	1,67 \pm 1,04***	0,08 \pm 0,06***,‡
Myopathie atypique : survivants (n = 5)	23,4 \pm 7,8***,††,‡	0,70 \pm 0,35***	15,21 \pm 13,30***,‡	0,04 \pm 0,02**	0,67 \pm 0,52***	0,01 \pm 0,02†

Légende :

C4-carnitine, butyryl-/isobutyrylcarnitine; C8DC-carnitine, suberylcarnitine; C10:2-carnitine, decadienoylcarnitine ; C18:2-OH-Carnitine = hydroxy octadecadienylcarnitine.

Comparaison avec les chevaux contrôles : différence significative avec * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$;

Comparaison entre cas de myopathie atypique, survivants *vs.* décédés : différence significative avec † $P < 0,05$; †† $P < 0,01$; ††† $P < 0,001$;

Comparaison entre cas de myopathie atypique *vs.* chevaux myopathes : différence significative * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

3. Discussion

3.1. Dosage de l'hypoglycine A dans les échantillons végétaux

Les analyses des échantillons végétaux conservés confirment la présence d'hypoglycine A dans les samares de l'érable sycomore en automne ainsi que dans les plantules au printemps ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle les cas de MA du printemps résulteraient de l'ingestion de ces plantules. Aussi, l'absence de cas au printemps suivant un automne sans cas et inversement, trouve ici son explication (van Galen *et al.*, 2012a).

3.2. Dosage de l'hypoglycine A dans le sang

Il est à noter que l'hypoglycine A n'est pas le composé toxique mais son précurseur. En effet, une fois ingérée, l'hypoglycine A est métabolisée en un composé toxique (*i.e.*, l'acide méthylcyclopropylacétique ; MCPA) et c'est cette molécule qui perturbe le métabolisme énergétique conduisant aux désordres biochimiques observés. En plus du dosage des AC, la présence d'hypoglycine A dans le sang est une confirmation supplémentaire de l'origine des signes de myopathie observés (*i.e.* ingestion de la source de la toxine). Actuellement, la détection de MCPA dans le sang (présent sous forme de MCPA-carnitine) n'est techniquement pas possible car elle requiert la synthèse de MCPA-carnitine *in vitro* à titre de molécule de référence pour établir la méthode de dosage or, les difficultés techniques liées à cette synthèse ne sont pas encore résolues. Aucune différence n'était observée quant aux taux d'hypoglycine A chez les chevaux décédés *vs.* les survivants. Dès lors, si ce dosage contribue au diagnostic, il ne semble avoir aucune valeur pronostique.

3.3. Détermination du profil sanguin des acylcarnitines

Cette étude préliminaire montre que, sur base de la détermination du profil des AC, il est possible de discriminer les chevaux souffrant de myopathie d'exercice de ceux souffrant de MA et ce, à partir d'une prise



de sang prise au repos. D'autre part, un indice de probabilité que le cheval survive peut être calculé à partir du taux des plusieurs AC (non détaillé dans ce travail).

La MA se caractérise par une rhabdomyolyse aiguë avec des signes cliniques résultant de la destruction massive des muscles cibles (muscles de la posture, diaphragme et cœur ; Cassart *et al.*, 2007). Quel que soit le devenir vital du cheval, les signes cliniques sont sévères (Votion *et al.*, 2007 ; Galen *et al.*, 2012a). Antérieurement, il a été montré que l'activité sérique des enzymes musculaires (reflet de cette destruction massive) n'avait aucune valeur pronostique de survie (van Galen *et al.*, 2012b). Dès lors, il est souvent difficile pour le vétérinaire praticien et le clinicien de se prononcer quant à l'utilité de poursuivre un traitement. Pour la première fois, un pronostic vital peut être calculé à partir d'un profil biochimique établi sur une prise de sang prélevée précocement dans le processus pathologique.

Conclusions

Les méthodes de dosages de l'hypoglycine A dans les échantillons végétaux et dans le sang ont été validées. Suite à ces validations, deux observations essentielles sont à mentionner : (1) les plantules des érables sycomores contiennent la toxine (et seraient donc la source de l'émergence des cas au printemps) et (2), l'hypoglycine A est présente dans le sang des cas et dès lors, chez le cheval malade, la transformation de l'hypoglycine A en son métabolite toxique continuerait à intoxiquer le cheval même si celui-ci n'ingère plus de samares ou de plantules d'érable sycomore. En outre, le dosage de l'hypoglycine A dans les échantillons végétaux va permettre de déterminer les causes environnementales de l'émergence de la maladie et de vérifier la toxicité ou l'innocuité des samares des érables ou d'autres arbres de nos régions. Le dosage de l'hypoglycine A dans le sang, en association avec l'étude du profil biochimique, devrait, quant à lui, contribuer à l'amélioration de la gestion des cas grâce à un meilleur diagnostic et une évaluation plus juste du pronostic.

Remerciements

Les vétérinaires sentinelles du RESPE, les membres de l'AMAG, tous les cliniciens des cliniques universitaires et privées ainsi que les vétérinaires praticiens et les propriétaires des chevaux qui nous ont communiqués des cas sont chaleureusement remerciés. Sans leur aide, il n'aurait pas été possible d'effectuer cette étude. Les auteurs de cette étude remercient l'Institut français du cheval et de l'équitation (*ifce*) pour leur soutien financier.

Références

- Boemer, F., Deberg, M., Schoos, R., Baise, E., Amory, H., Gault, G., Carlier, J., Gaillard, Y., Marcillaud-Pitel, C., Votion, D. Quantification of hypoglycin a in plasma using a TRAQ® kit. *Submitted for publication*
- Carlier, J., Guitton, J., Moreau, C., Boyer, B., Bévalot, F., Fanton, L., Habyarimana, J., Gault, G., Gaillard, Y., 2015. A validated method for quantifying hypoglycin A in whole blood by UHPLC-HRMS/MS. *Journal of Chromatography B* 978-979, 70-77.
- Cassart, D., Baise, E., Cherel, Y., Delguste, C., Antoine, N., Votion, D., Amory, H., Rollin, F., Linden, A., Coignoul, F., Desmecht, D., 2007. Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy. *Equine Veterinary Journal* 39, 26-32.
- Fowden, L., Pratt, H.M., 1973. Cyclopropylamino acids of the genus *Acer*: distribution and biosynthesis. *Phytochemistry* 12, 1677-1681.
- Habyarimana, J.A. Baise, E., Weber, M., Franck, T., Gault, G., Carlier, J., Votion, D., Gustin, P. Validation of HPTLC method for quantitative determination of Hypoglycin A in methanolic extracts of Maple (*Acer*) samples *In Proceedings: International Symposium for High-Performance Thin-Layer Chromatography*, Lyon, France, Juillet 2014, pp 185.
- Habyarimana, J.A. Douny, C., Baise, E., Weber, M., Franck, T., J., Votion, D., Gustin, P. Validation of HPTLC method for quantitative determination of Hypoglycin A in methanolic extracts of Maple (*Acer*) samples. *Soumis pour publication*.
- Patarin, F., Van Galen, G., Dopagne, C., Rouxhet, S., Pitel, C., Votion, D.-M. Etiologie de la myopathie atypique : conditions de toxicité de l'agent causal – étude préliminaire *In Proceedings: 40^{ème} journée de la Recherche Equine*, Paris, France, mars 2014, pp 101-109 ;



van Galen, G., Marcillaud Pitel, C., Saegerman, C., Patarin, F., Amory, H., Baily, J.D., Cassart, D., Gerber, V., Hahn, C., Harris, P., Keen, J.A., Kirschvink, N., Lefere, L., McGorum, B., Muller, J.M., Picavet, M.T., Piercy, R.J., Roscher, K., Serateyn, D., Unger, L., van der Kolk, J.H., van Loon, G., Verwilghen, D., Westermann, C.M., Votion, D.M., 2012a. European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006-2009): Spatiotemporal distribution, history and clinical features. *Equine Veterinary Journal* 44, 614-620.

van Galen, G., Saegerman, C., Marcillaud Pitel, C., Patarin, F., Amory, H., Baily, J.D., Cassart, D., Gerber, V., Hahn, C., Harris, P., Keen, J.A., Kirschvink, N., Lefere, L., McGorum, B., Muller, J.M., Picavet, M.T., Piercy, R.J., Roscher, K., Serateyn, D., Unger, L., van der Kolk, J.H., van Loon, G., Verwilghen, D., Westermann, C.M., Votion, D.M., 2012b. European outbreaks of atypical myopathy in grazing horses (2006-2009): Determination of indicators for risk and prognostic factors. *Equine Veterinary Journal* 44, 621-625.

Votion, D.M., Linden, A., Saegerman, C., Engels, P., Erpicum, M., Thiry, E., Delguste, C., Rouxhet, S., Demoulin, V., Navet, R., Sluse, F., Serateyn, D., van Galen, G., Amory, H., 2007. History and clinical features of atypical myopathy in horses in Belgium (2000-2005). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 1380-1391.

Votion, D.M., van Galen, G., Sweetman, L., Boemer, F., de Tullio, P., Dopagne, C., Lefere, L., Mouihys-Mickalad, A., Patarin, F., Rouxhet, S., van Loon, G., Serateyn, D., Sponseller, B.T., Valberg, S.J., 2014. Identification of methylenecyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Veterinary Journal* 46, 146-149.

Westermann, C.M., Dorland, L., Votion, D.M., de Sain-van der Velden, M.G., Wijnberg, I.D., Wanders, R.J., Spliet, W.G., Testerink, N., Berger, R., Ruiter, J.P., van der Kolk, J.H., 2008. Acquired multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 10 horses with atypical myopathy. *Neuromuscular Disorders* 18, 355-364.