

ifce

institut français
du **cheval**
et de l'**équitation**



43^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 16 mars 2017

Point sur les travaux de recherche sur la myopathie atypique et leurs impacts sur la filière : quoi de neuf ?

C. Marcillaud-Pitel¹, E. Baise², F. Boemer³, J.A. Habyarimana⁴, P. Gustin⁴, C. Cello³, C. Douny⁵, E. Richard⁶, M.-P. Toquet⁶, J. Detilleux², H. Amory⁷, M. Weber⁴, A. Aurore⁸, D.-M. Votion⁷

¹ Réseau d'Épidémiologie et de Surveillance en Pathologie Équine (RESPE), Caen, France

² Département des animaux de production, FARA, FMV-ULg, Belgique

³ Laboratoire de Biochimie génétique, CHU, ULg, Belgique

⁴ Pharmacologie, Pharmacothérapie et Toxicologie, FARA, FMV-ULg, Belgique

⁵ Département des Sciences des Denrées Alimentaires, FARA, FMV-ULg, Belgique

⁶ Normandie Université, UNICAEN, Labéo Frank Duncombe, Caen, France

⁷ Pôle équin, Faculté de Médecine vétérinaire, FARA, FMV-ULg, Belgique

⁸ AgroSup Dijon, France

Résumé

En 2014, il était montré qu'un métabolite toxique, l'acide méthylcyclopropylacétique, était présent dans le sang des équidés souffrant de myopathie atypique. Cette molécule toxique résulte de la métabolisation de l'hypoglycine A, un acide aminé contenu dans les fruits (*i.e.* samaras) de l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*). À partir de cette observation, différentes recherches ont été menées dont les objectifs principaux visaient à (1) identifier les causes environnementales responsables de l'émergence de la maladie ; (2) améliorer la gestion des cas par un meilleur diagnostic et une évaluation plus juste du pronostic et (3), mieux comprendre le processus pathologique afin d'identifier des substances potentiellement thérapeutiques. Cet article de synthèse décrit les recherches menées depuis la découverte de la cause de la myopathie atypique et les applications pratiques issues des résultats de ces recherches.

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

Summary

In 2014, a toxic metabolite, methylenecyclopropyl acetic acid, was found in equine blood suffering from atypical myopathy. This toxic molecule results from the metabolism of hypoglycine A, an amino acid contained in the fruits (*i.e.* samaras) of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*). From there, the researches performed aimed at (1) identifying the environmental causes responsible for the emergence of the disease ; (2) improving case management through improved diagnosis and a better assessment of the vital prognosis, and (3) better understanding the pathological process in order to identify potentially therapeutic substances. This article describes the researches carried out since the discovery of the cause and the practical applications resulting from their results.

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



Introduction

En 2014, il était montré qu'un métabolite toxique, l'acide méthylcyclopropylacétique (MCPA), était présent dans le sang des équidés souffrant de myopathie atypique (MA) (Votion *et al.*, 2014). Cette molécule toxique résulte de la métabolisation de l'hypoglycine A, un acide aminé contenu dans les fruits (*i.e.* samares) de l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) (Fowden et Pratt, 1973; Unger *et al.*, 2014; Westermann *et al.*, 2016). Selon une étude publiée en 1973 (Fowden et Pratt, 1973), toutes les espèces d'érables ne sont pas toxiques. Dans nos régions (France, Belgique et pays limitrophes), les deux espèces toxiques sont l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) et l'érable négundo (*Acer negundo*). Toujours selon cette ancienne étude, l'érable champêtre (*Acer campestris*) et l'érable plane (*Acer platanoides*) ne sont pas toxiques. La toxicité des différentes espèces d'érables est à réévaluer puisque la maladie est émergente et la toxicité des érables pourrait résulter de facteurs exogènes nouvellement rencontrés (exemple : une infection de la plante). En outre, différentes questions émanent du terrain : « L'eau de boisson contaminée par des samares est-elle toxique ? » ; « Le foin produit sur une prairie contenant des plantules d'érables est-il toxique ? » ; « Le frêne qui possède des samares est-il toxique ? » ; etc.

La découverte de la cause de la MA induite par un arbre commun a déclenché un vent de panique chez les propriétaires de chevaux car actuellement, la seule mesure préventive absolue qui peut être conseillée, c'est le retrait de la pâture des équidés, du début de l'automne à la fin du printemps, si des samares risquent d'être présentes sur la prairie. Cette technique de prévention a des conséquences financières tellement importantes qu'elle s'avère souvent inapplicable pour de nombreux propriétaires de chevaux, et en particulier pour les éleveurs. Dans certaines régions envahies par les érables, la faisabilité de poursuivre une activité d'élevage est de plus en plus fréquemment remise en question. Afin de prévenir plus efficacement la maladie, il est utile de connaître avec précision les sources d'intoxication potentielles. D'autre part, la maladie présentant un caractère saisonnier, il est important de définir les facteurs favorisant la toxicité des érables.

Lorsque la prévention mise en œuvre n'a pas suffi et qu'un cas se déclare, il est essentiel d'établir un diagnostic et un pronostic vital afin de gérer le cas de manière appropriée. Plus de 75% des chevaux atteints meurent dans les 72 heures après avoir présenté les signes cliniques résultant de la destruction massive de différents groupes musculaires dont les muscles posturaux, respiratoires et le muscle cardiaque (Cassart *et al.*, 2007). Le caractère inopiné de la survenue de la MA induit des conditions de gestion clinique extrêmement difficiles de ces cas nécessitant des soins intensifs : souvent, le cheval est trouvé couché au pré et présente des difficultés voire une incapacité à se lever. Or, la majeure partie des cas se déclare à l'automne quand les conditions climatiques sont défavorables (*i.e.* premières gelées, pluies, tempêtes). Les soins intensifs sont onéreux mais une étude rétrospective indique que traiter un cheval augmente ses chances de survie tandis que l'existence de séquelles n'est pas démontrée (van Galen *et al.*, 2012b). Actuellement, le traitement de la MA est essentiellement symptomatique (van Galen et Votion, 2013a, b) et il n'existe pas d'antidote à cette maladie dont l'efficacité aurait été prouvée scientifiquement chez le cheval.

Différentes recherches ont été menées depuis la découverte de la cause dont les objectifs principaux visaient à (1) identifier les causes environnementales responsables de l'émergence de la maladie (Action 1) ; (2) améliorer la gestion des cas par un meilleur diagnostic et une évaluation plus juste du pronostic (Action 2) et (3), mieux comprendre le processus pathologique afin d'identifier des substances potentiellement thérapeutiques (Action 3). Cet article décrit ces différentes recherches et leurs impacts sur la filière.

1 Matériel et méthodes

Pour réaliser les objectifs des actions précitées, il a été nécessaire de valider différentes méthodologies de dosage brièvement présentées ci-après. Pour l'action 1, des échantillons végétaux ont été prélevés sur des prairies qui ont été le siège de cas de MA et sur des prairies témoins. Les chevaux hospitalisés à la Faculté de Médecine vétérinaire de Liège et de Gand (Belgique) ainsi que des échantillons de sang fournis par des vétérinaires praticiens (France et Belgique) constituent le matériel animal des études des actions 2 et 3.



1.1. Sources d'intoxication – Action 1

Pour mieux définir les sources d'intoxication potentielles, une méthode de dosage de l'hypoglycine A a été validée pour les besoins de cette action (Habyarimana *et al.*, *soumis*). En résumé, chaque échantillon (samares entières, plantules d'érables ou autres types d'échantillons végétaux) a été pesé avec précision, broyé mécaniquement et mélangé avec une solution de méthanol pure (5 g d'échantillon avec 25 ml de méthanol) dans un tube Falcon de 50 ml. Le mélange a été maintenu sur agitateur pendant 24h (à température ambiante). Ensuite, le tube Falcon a été centrifugé 15 minutes à 4100 RPM (soit 3026 *g*) et 12,5 ml du surnageant obtenu ont été transférés dans un nouveau tube Falcon de 50 ml. Le tube Falcon contenant les débris végétaux a été placé dans une étuve (à 70°C pendant 72 heures) afin de déterminer la masse de résidu sec. Le nouveau tube Falcon a été mis à évaporer (via un bain-Marie limité à 37°C et ventilé) jusqu'à disparition du surnageant. L'extrait a été récupéré avec 3 ml d'eau Millipore (avec 3 périodes de 5 secondes d'agitation au Vortex). Les extraits ainsi préparés ont été soit analysés immédiatement, soit congelés à -80°C en attendant leur analyse. La quantification de l'hypoglycine A dans les échantillons végétaux a été réalisée par chromatographie en couche mince haute performance (HPTLC) avec un appareil CAMAG (CAMAG, Muttenz, Suisse). L'hypoglycine A utilisée dans la préparation des courbes d'étalonnage a été obtenue auprès de Toronto Research Chemicals, Inc., Ontario, Canada. Une solution étalon et les échantillons ont été déposés sur des plaques de silice HPTLC 60 Å F254 (Merckx) de taille 20 x 10 ou 10 x 10 cm grâce à un applicateur CAMAG Linomat V. La composition de la **solution d'éluion** était la suivante: isobutanol, acide acétique, eau Millipore 70/20/10 (v/v/v). La révélation a été effectuée par application (3 pulvérisations successives dans 3 directions différentes) d'une solution de ninhydrine à 0,2% p/v dans de l'éthanol suivie d'une incubation de 5 minutes à 110°C. La détermination et la quantification **de l'hypoglycine A** ont été effectuées sur un scanner TLC CAMAG 3 à 490 nm en mode absorbance contrôlée avec le logiciel WinCATS 4.3 (CAMAG, Muttenz, Suisse).

L'hypoglycine A a été recherchée dans des samares mais également dans des plantules d'érables. Ces échantillons ont été récoltés à différentes dates au cours de **l'automne 2015 (samares) et du printemps 2016 (samares et plantules)**. Ainsi, l'influence de la germination des samares a été déterminée par la récolte d'échantillons effectuée à partir du 1^{er} mars 2016.

- La **toxicité de l'érable négundo (*Acer negundo*)** a été également évaluée. Cet arbre est **occasionnellement présent dans le nord de l'Europe (espèce essentiellement ornementale, souvent en arbre isolé)** ; il est responsable des cas de MA aux États-Unis (Valberg *et al.*, 2013). Enfin, la toxine a été recherchée dans diverses sources potentielles : **fleurs d'érable sycomore**, eau de pluie ayant perlé sur des samares et des plantules, samares de frêne, etc.

1.2. Outils diagnostiques et pronostiques – Action 2

Pour améliorer le diagnostic de la MA, la technique de dosage de l'hypoglycine A, dans le sang, par chromatographie liquide ultra-haute performance (UHPLC; Ultimate® 3000; Thermo Scientific, Courtabœuf, France) couplée à la spectrométrie de masse en tandem à haute résolution (HRMS/MS; Q Exactive, Thermo Scientific, Courtabœuf, France) a été validée ; les détails de cette validation technique sont disponibles (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 ; Sciex, Framingham, MA, USA) a été validée à partir de 55 échantillons sanguins prélevés sur des cas de MA et 8 échantillons de cas contrôles (Boemer *et al.*, 2015).

Le taux d'hypoglycine A sanguin a été ensuite déterminé chez 51 chevaux souffrant de MA dont 11 ont survécu. Des critères pronostiques ont été recherchés chez ces chevaux dans les signes cliniques, les paramètres sanguins de biochimie classique (activité des enzymes musculaires, ions, diverses protéines d'intérêt etc.) et le profil des acylcarnitines (ces intermédiaires du métabolisme lipidique s'accumulent chez les chevaux souffrant de MA suite à l'inhibition de l'oxydation des acides gras causée par le MCPA) déterminé par un système de chromatographie en phase liquide triple quadripôle (LC/MS/MS ; TQ5500 mass spectrometer ; Sciex, Framingham, MA, USA). La régression par les moindres carrés partiels, suivie de régression logistique, a été utilisée **pour estimer la probabilité de survie à partir du dosage des acylcarnitines.**



1.3. Processus pathologique – Action 3

La toxine responsable de la MA est connue pour interférer avec le métabolisme des acides gras (Ikeda et Tanaka, 1990). Les muscles ciblés par cette toxine sont ceux riches en fibres de type lent contenant de nombreuses mitochondries. La respiration mitochondriale musculaire a été investiguée par respirométrie à haute résolution (RHR) appliquée à des échantillons de muscles prélevés sur 15 chevaux souffrant de MA. **Cette technique offre l'opportunité d'étudier la fonction mitochondriale à partir d'une faible quantité de tissu prélevée par microbiopsie (*i.e.* < 2 mg ; (Votion *et al.*, 2012)) en mesurant la consommation d'oxygène d'un échantillon. Cette mesure de la consommation d'oxygène correspond à la capacité mitochondriale à assurer la production d'énergie, la respiration étant initiée par l'ajout, dans le système de RHR, de substrats énergétiques.** Les données obtenues ont été soumises à une analyse de variance à l'aide du logiciel SAS (Statistical Analysis Systems Software, 2001) pour déterminer l'effet de groupe. La limite de signification statistique a été définie pour $P \leq 0,05$.

Jusqu'à présent, les protocoles de RHR n'utilisaient pas les acides gras comme substrats pour initier la respiration mitochondriale. De nouveaux protocoles ont été testés en utilisant des acides gras à courte (C2 ; acétylcarnitine), moyenne (C8 ; octanoylcarnitine) et longue (C16 ; palmitoylcarnitine) chaînes sur un modèle de culture de cellules musculaires équinées développé par des collaborateurs de cette étude (Ceusters *et al.*, 2012). D'autres protocoles testant spécifiquement les différents complexes mitochondriaux ont également été mis au point. Ainsi, 8 protocoles différents ont été testés en vue de valider de nouveaux modèles pour étudier la fonction mitochondriale musculaire sur culture cellulaire ou microbiopsie chez le cheval. Des tests préliminaires ont été effectués pour vérifier si ces modèles pouvaient être utilisés pour mesurer l'action de l'hypoglycine A et/ ou du MCPA sur la respiration mitochondriale.

2 Résultats

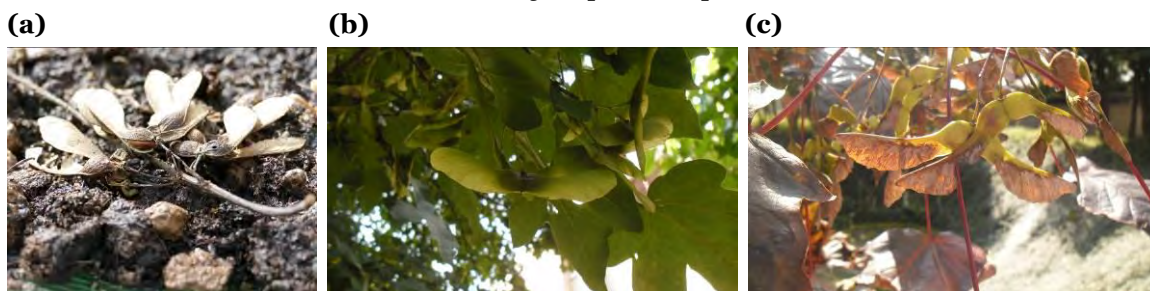
2.1. Sources d'intoxication – Action 1

2.1.1 Samares d'érables communs

Les analyses confirment les résultats récemment publiés par Westermann *et al.* (2016) à savoir, l'inocuité de l'érable champêtre (*Acer campestre*), de l'érable plane (*Acer platanoides*) tandis que les samares et les plantules de l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) sont toxiques (Figure 1).

Figure 1 – Samares d'érables (a) sycomore, (b) champêtre et (c) plane collectées en mai 2016

Figure 1 – Samaras of (a) sycamore maple tree (*Acer pseudoplatanus*), field maple (*Acer campestre*) and Norway maple (*Acer platanoides*)

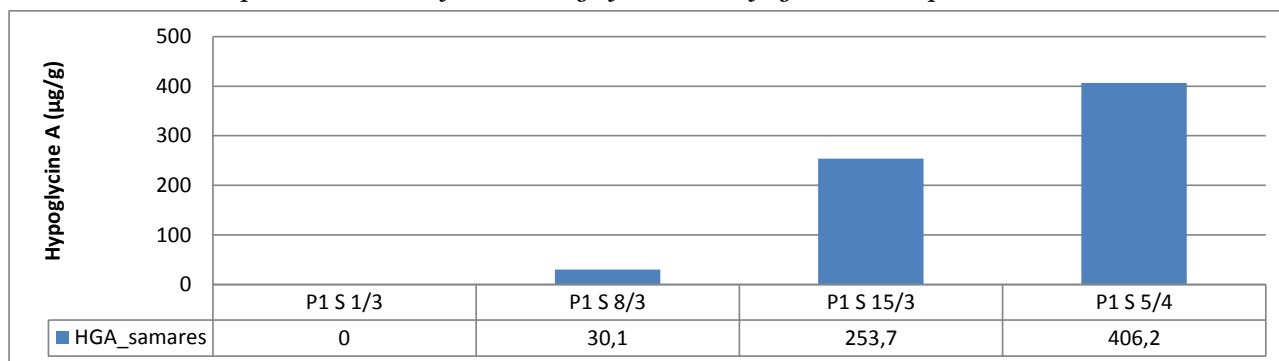


2.1.2 Samares d'érables sycomores en germination

Le résultat des dosages indique que les samares commencent à produire de l'hypoglycine A lors de leur germination (Graphique 1) au début du printemps.



Graphique 1 : Évolution de la toxicité des samares de l'érable sycomore au cours du temps
 Graph 1: Evolution of the toxicity of samaras of sycamore maples over time



Légende : P1 = Prairie où deux cas de myopathie atypique ont été confirmés par le passé ; S = samares d'érables sycomores ; 1/3 = 1^{er} mars 2016 ; 8/3= 8 mars 2016 ; 15/03 = 15 mars 2016 ; 05/04 = 5 avril 2016. Au-delà du 5 avril 2016 seules des plantules étaient retrouvées sur la pâture, les samares ayant germé.

2.1.3 Suivi des samares et plantules d'érables sycomores au cours du printemps

Les études réalisées montrent que la source de la toxine au printemps sont les plantules issues des samares germées. **Ces résultats sont l'objet d'une publication de l'équipe** (Baise *et al.*, 2015). Le suivi des samares et plantules d'érables sycomores au cours du temps (Figure II) montre **un taux significatif d'hypoglycine A dans la plantule qui décroît au cours du temps** (Graphique 2). Cette étude a été menée sur trois pâtures dont deux ont été le siège de cas de MA. **De l'hypoglycine A était présente dans les plants d'érable de l'année précédente.** Néanmoins, la tige étant lignifiée, ces plants plus âgés sont probablement moins appétents.

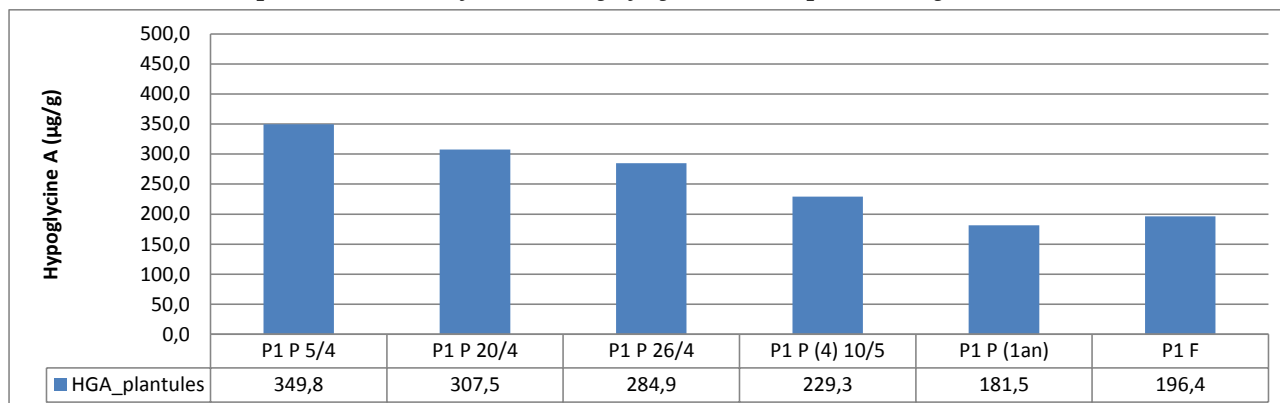
Figure II – Plantules d'érable sycomore collectées au cours de leur croissance (de début avril à fin mai 2016)
 Figure II - Sycamore maple seedlings collected during their growth (early April to the end of May 2016)



Commentaires : Les plantules ont été prélevées à une dizaine de jours d'intervalle (de gauche à droite : samare en germe, émergence de la plantule, stade 2 feuilles, stade 4 feuilles débutant, stade 4 feuilles et plantule de l'année précédente, *i.e.* la tige est lignifiée).



Graphique 2 : Évolution de la toxicité des plantules de l'érable sycomore au cours du temps
 Graph 2: Evolution of the toxicity of sycamore maple seedlings over time



Légende : P1 = Prairie où deux cas de myopathie atypique ont été confirmés par le passé ; P = plantules ; le 05/04 = 5 avril, 20/04 = 20 avril ; le 26/04 = 26 avril ; le 10/05 = 10 mai. A la date du 10 mai, des plantules de 1 an (P1 P -1 an) et des fleurs (P1 F) ont également été collectées.

2.1.4 Erables négundo

Nous avons observé que les érables négundos dans le nord de la France et en Belgique étaient généralement stériles. En effet, cette **espèce d'érable est dioïque, c'est à dire qu'il y a des pieds mâles et des pieds femelles** et si un arbre est isolé (ce qui est fréquemment le cas dans le nord de la France et en Belgique où ils sont utilisés essentiellement dans des jardins privés ou dans des parcs pour leur caractère ornemental), il n'y aura pas de fécondation. Si **l'arbre est un pied mâle, il n'y aura pas de samare et si c'est un pied femelle, il y aura peu de chance qu'il soit fécondé** car il faut un individu mâle à proximité. Chaque fois que nous avons trouvé un érable négundo portant des samares (en Belgique), celles-ci ne contenaient pas de graine. Les analyses confirment l'absence d'hypoglycine A dans les samares vides de l'érable negundo.

2.1.5 Diverses sources

Par temps de pluie, l'eau en surface des plantules a été récoltée. Cette eau en contact avec les plantules contenait de l'hypoglycine A. **Cette observation contribue probablement à expliquer l'importance du facteur « humidité » dans les facteurs de risques associés à la MA ainsi que l'effet protecteur lié au fait de donner l'eau de boisson via le réseau de distribution plutôt que via une source, un ruisseau, etc (Votion *et al.*, 2009).** Au cours de la période de récolte des plantules d'érables sycomores, les arbres étaient en fleurs et, suite à nos observations de terrain, nous avons émis l'hypothèse que les fleurs pouvaient contenir de l'hypoglycine A. Dans ce cas, celles-ci pourraient constituer une source de contamination du milieu sur lequel elles tombent en masse lors de pluies sévères et/ou de vents violents. Les résultats des analyses indiquent que les inflorescences de l'érable contiennent de l'hypoglycine A mais pas celles de l'érable plane ou de l'érable champêtre. Les samares du frêne commun (*Fraxinus exclesior*), un arbre fréquemment rencontré dans les pâtures des chevaux ne contenaient pas d'hypoglycine A.

2.2. Outils diagnostiques et pronostiques – Action 2

De tous les paramètres liés à l'anamnèse, seul l'âge du cheval différait significativement entre les survivants et les décédés (9±2 *vs.* 5±1 ans, respectivement). Aucun signe clinique ne permettait de prédire la survie et en ce qui concerne les paramètres de biochimie classique, seul le taux de calcium total dans le sang contribuait au pronostic (le taux était légèrement inférieur chez les décédés). **Il n'y avait pas de différence significative entre survivants et décédés pour le taux sanguin d'hypoglycine A.**

Toutes les acylcarnitines mesurées chez les chevaux souffrant de MA, qu'ils soient survivants ou décédés, étaient en dehors des valeurs de référence. **Il n'y avait pas de différence significative, entre les survivants et les décédés, pour le taux sanguin de 11 acylcarnitines et de la carnitine libre.** Parmi les 10 acylcarnitines différant significativement entre ces deux groupes, celles dont les concentrations permettaient le meilleur pronostic de survie étaient l'acétylcarnitine (C2), la décadienoylcarnitine (C10:2) et la stéarylcarnitine (C18) pour respectivement, les acylcarnitines à courtes, moyennes et longues chaînes (Boemer *et al.*, soumis).

2.3. Processus pathologique – Action 3

La mesure de la consommation en oxygène par RHR effectuée sur des échantillons de muscles prélevés sur des chevaux souffrant de MA montre que la capacité respiratoire mitochondriale est sévèrement déprimée



(de près de 50%) chez ces chevaux en comparaison des mesures effectuées avec 10 chevaux contrôles (Lemieux *et al.*, 2016).

Les nouveaux protocoles ont été utilisés pour étudier l'effet du MCPA mais également de l'hypoglycine A sur les cultures de cellules musculaires. Le MCPA inhibe sévèrement la respiration mitochondriale initiée par l'ajout d'acides gras tandis que l'hypoglycine A n'induit pas de changement significatif (Tableau 1).

Tableau 1 : Effet de l'hypoglycine A et du MCPA sur la respiration mitochondriale de cellules musculaires équinnes

Table 1: Effect of hypoglycin A and MCPA on mitochondrial respiration of equine muscle cells in culture

	Hypoglycin A	MCPA
C2	No change	- 42%
C8	No change	- 31%
C16	No change	- 33%

Légende : l'ajout d'hypoglycine A n'a pas d'effet sur la respiration mitochondriale. À l'inverse, après l'ajout de MCPA, la respiration mitochondriale initiée par les substrats C2 (acétylcarnitine), C8 (octanoylcarnitine) ou C16 (palmitoylcarnitine) chute significativement.

3 Discussion

3.1. Sources d'intoxication – Action 1

Les études relatives aux sources d'intoxication ont permis de confirmer l'hypothèse selon laquelle la toxicité printanière résultait de la germination des samares sortant de leur stade de dormance. En culture contrôlée, les températures optimales de germination des samares d'érables sycomores sont situées entre 1 et 3°C (Suszka *et al.*, 1994). Dans la problématique de la MA, les samares (*i.e.* « les semis ») sont au sol depuis l'automne. Lors du suivi de la toxicité des samares en germination, la toxicité (*i.e.* l'apparition d'hypoglycine A) a débuté le 8/03 pour culminer le 5/04 et ce, dans les 3 prairies suivies.

Actuellement, afin d'aider les propriétaires de chevaux à mieux gérer la mise en pâture de leurs équidés, un système d'alerte a été mis en place. Les alertes sont lancées lorsque plusieurs cas de MA sont déclarés en quelques jours. Ces déclarations s'effectuent en ligne par les vétérinaires sentinelles du Réseau d'Epidémiologie et de Surveillance en Pathologie Equine (RESPE) pour les cas français via le site www.respe.net et par les propriétaires et/ ou les vétérinaires pour les autres pays via le site <http://www.myopathie-atypique.be> du « Groupe d'Alerte de la Myopathie Atypique ». Quand l'alerte, basée sur le système actuel est lancée, les chevaux pâturant dans des conditions favorables à la maladie sont déjà soumis au risque. Afin de prévenir les cas de MA au printemps, il serait opportun de remplacer le système d'alerte actuel par un système basé sur des indicateurs de la toxicité environnementale. La recherche à mener vise à développer une échelle de risque dont le calcul inclura l'enregistrement des degrés-jours cumulés, un outil développé à l'intention du secteur agricole pour l'aider à mieux gérer les impacts des facteurs climatiques dans leur pratique professionnelle. L'indice de risque sera aussi calculé en tenant compte de ces degrés-jours cumulés (influençant la teneur en hypoglycine A) ainsi que des conditions météorologiques connues pour déclencher les séries cliniques dans les échantillons végétaux.

Au cours des prochains printemps et automnes, le suivi de la teneur en hypoglycine A des samares (collectées sur les arbres et au sol dès le 1^{er} septembre) et des samares en germination jusqu'au stade « plantules » avancé (dès le 1^{er} mars) servira également à déterminer la fin du risque lié à la saison et contribuera à identifier les paramètres (notamment climatiques : gel, humidité, pluie, niveau de croissance...) qui influencent la disparition de la toxine.

La présence d'hypoglycine A trouvée dans l'eau en contact avec les plantules pourrait contribuer à une exposition prolongée avec la toxine qui semble nécessaire pour déclencher la MA. En effet, dans l'étude épidémiologique incluant près de 400 cas, tous les chevaux ayant souffert de cette maladie passaient plus de 6 heures par jour en pâture (van Galen *et al.*, 2012a). En outre, les chevaux pâturant plus de 6 heures sont plus susceptibles de manger de l'herbe recouverte de la rosée matinale qui peut contenir de l'hypoglycine A par diffusion hors des plantules. Les fleurs des érables tombées suite à des pluies intenses constituent aussi une source supplémentaire de contamination.

Aussi, outre l'effet des degrés-jours cumulés sur le métabolisme de la plante (*i.e.* à déterminer dans un nouveau programme de recherche), les prévisions météorologiques contribuent aussi à prévenir la MA et à ce titre, il faut tenir compte des risques liés :

- En automne : aux vents et pluies qui font tomber les samares ;
- au printemps : aux vents et pluies qui font tomber les fleurs, à l'humidité qui favorise la diffusion de l'hypoglycine A dans le milieu et aux plantules en germination.



Il est conseillé de limiter le temps de pâture voire de garder les équidés à l'écurie lorsque ces conditions climatiques sont annoncées.

3.2. Outils diagnostiques et pronostiques – Action 2

La technique de dosage de l'hypoglycine A (dans le sang et les extraits végétaux) a permis de montrer que la MA était présente en Nouvelle-Zélande (McKenzie *et al.*, 2016).

Les résultats de l'étude comparant les survivants de la MA aux non-survivants montrent que le taux d'hypoglycine A sanguin n'a pas de valeur pronostique. Il est à noter que l'hypoglycine A n'est pas le composé toxique mais son précurseur, le MCPA. C'est cette molécule qui perturbe le métabolisme énergétique conduisant aux désordres biochimiques observés. La validation de la technique de dosage du MCPA nécessitait la synthèse du MCPA-carnitine, la forme de détoxification retrouvée dans le sang. Cette synthèse complexe effectuée par Toronto Research Chemicals, Inc., Ontario, Canada, à notre demande, a nécessité plusieurs mois mais est désormais disponible. La technique de dosage est validée mais non publiée ; elle sera appliquée sur les échantillons collectés au cours de l'automne 2016 afin de déterminer l'intérêt de ce dosage pour le pronostic.

Le MCPA interfère avec la β -oxydation des acides gras : le muscle ne peut plus utiliser les lipides et des métabolites intermédiaires, *i.e.* les acylcarnitines, s'accumulent dans le sang. La MA résulte d'une altération du métabolisme énergétique dont l'ampleur est reflétée par le taux des acylcarnitines sanguines. Le dosage des acylcarnitines outre son rôle diagnostique contribue au pronostic de la MA. Il est à noter que la valeur prédictive des acylcarnitines a été démontrée en utilisant la prise de sang la plus précocement réalisée après l'apparition des premiers signes cliniques. Etablir un pronostic est essentiel pour éviter des souffrances inutiles aux animaux condamnés et à l'inverse, pour objectiver la pertinence d'une thérapie de soutien à ceux qui ont une chance de survivre. Les études épidémiologiques ont montré que traiter un animal avec des vitamines et antioxydants augmente ses chances de survie même si 55% des animaux traités décèdent (van Galen *et al.*, 2012b).

3.3. Processus pathologique – Action 3

La MA est une myopathie aiguë des muscles posturaux, respiratoires et du myocarde, muscles riches en mitochondries. Les colorations histochimiques et de rares études sur la fonction mitochondriale suggéraient (avant de connaître la cause) que les mitochondries étaient ciblées par l'agent étiologique. Les études réalisées à partir de microbiopsies prélevées sur des cas cliniques confirment l'implication mitochondriale dans la pathogénie. Aussi, la toxine induit une altération grave du métabolisme énergétique via une dépression sévère de la respiration mitochondriale du muscle ce qui pourrait contribuer au taux élevé de mortalité de la MA.

Grâce à la validation de nouveaux modèles d'évaluation de la fonction mitochondriale par RHR, il est désormais possible d'étudier, *in vitro*, les dysfonctionnements mitochondriaux engendrés par le MCPA mais également d'évaluer la capacité de composés pharmaceutiques à restaurer une fonction mitochondriale normale. Par analogie avec la maladie du vomissement jamaïcain, une maladie humaine résultant également de l'ingestion d'hypoglycine A, plusieurs molécules sont pressenties pour prévenir ou traiter la MA. La recherche à venir testera la capacité de molécules potentiellement « antidotes » à restaurer une fonction mitochondriale efficace.



Conclusion

La découverte de la cause de la MA a dynamisé la recherche et il est essentiel que celle-ci s'attèle à (1) mieux prévenir la MA, (2) étudier le mécanisme physiopathologique et (3), à trouver un traitement. Pour réaliser ces objectifs, il est nécessaire de développer (i) **une échelle d'alerte basée sur les conditions** de toxicité environnementale, (2) déterminer les facteurs favorisant la résistance à la MA **par l'élucidation** des mécanismes intervenant dans la pathogénie et, (3) **d'évaluer la capacité** de composés pharmaceutiques à restaurer une fonction mitochondriale musculaire normale.

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 ces études. **Les auteurs de cette étude remercient l'Institut français du cheval et de l'équitation (ifce) pour son soutien financier ainsi que les Fonds spéciaux pour la Recherche de l'Université de Liège. Madame Raja Fares est remerciée pour la relecture attentive de cet écrit.**

Références

- Baise, E., Habyarimana, J.A., Amory, H., Boemer, F., Douny, C., Gustin, P., Marcillaud Pitel, C., Patarin, F., Weber, M., Votion, D.M. 2016. Samaras and seedlings of *Acer pseudoplatanus* are potential sources of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy without necessarily inducing clinical signs. *Equine Veterinary Journal* 48, 414-417.
- Boemer, F., Deberg, M., Schoos, R., Baise, E., Amory, H., Gault, G., Carlier, J., Gaillard, Y., Marcillaud-Pitel, C., Votion, D. 2015. Quantification of hypoglycin A in serum using a TRAQ(R) assay. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 997, 75-80.
- Carlier, J., Guitton, J., Moreau, C., Boyer, B., Bévalot, F., Fanton, L., Habyarimana, J.A., Gault, G., Gaillard, Y. 2015. A validated method for quantifying hypoglycin A in whole blood by UHPLC-HRMS/MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 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.
- Ceusters, J.D., Mouithys-Mickalad, A.A., de la Rebiere de Pouyade, G., Franck, T.J., Votion, D.M., Deby-Dupont, G.P., Serteyn, D.A. 2012. Assessment of reactive oxygen species production in cultured equine skeletal myoblasts in response to conditions of anoxia followed by reoxygenation with or without exposure to peroxidases. *American journal of veterinary research* 73, 426-434.
- Fowden, L., Pratt, H.M. 1973. Cyclopropylamino acids of the genus *Acer*: distribution and biosynthesis. *Phytochemistry* 12, 1677-1681.
- Ikeda, Y., Tanaka, K. 1990. Selective inactivation of various acyl-CoA dehydrogenases by (methylenecyclopropyl) acetyl-CoA. *Biochimica et biophysica acta* 1038, 216-221.
- Lemieux, H., Boemer, F., van Galen, G., Serteyn, D., Amory, H., Baise, E., Cassart, D., van Loon, G., Marcillaud-Pitel, C., Votion, D.M. 2016. Mitochondrial function is altered in horse atypical myopathy. *Mitochondrion* 30, 35-41.
- McKenzie, R.K., Hill, F.I., Habyarimana, J.A., Boemer, F., Votion, D.M. 2016. Detection of hypoglycin A in the seeds of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and box elder (*A. negundo*) in New Zealand; the toxin associated with cases of equine atypical myopathy. *New Zealand veterinary journal* 64, 182-187.
- Suszka, B., Muller, C., Bonnet-Masimbert, M. 1994. Graines des feuillus forestiers: de la récolte au semis. *Techniques et Pratiques*. Versailles, FRA : INRA Editions, 292 p.
- Unger, L., Nicholson, A., Jewitt, E.M., Gerber, V., Hegeman, A., Sweetman, L., Valberg, S. (2014). Hypoglycin a concentrations in seeds of *acer pseudoplatanus* trees growing on atypical myopathy-affected and control pastures. *Journal of veterinary internal medicine* 28, 1289-1293.
- Valberg, S.J., Sponseller, B.T., Hegeman, A.D., Earing, J., Bender, J.B., Martinson, K.L., Patterson, S.E., Sweetman, L. 2013. Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree. *Equine Veterinary Journal* 45, 419-426.



- 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., Serteyn, 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., Serteyn, 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.
- van Galen, G., Votion, D.M. 2013a. Management of cases suffering from atypical myopathy: Interpretations of descriptive, epidemiological and pathophysiological findings. Part 1: First aid, cardiovascular, nutritional and digestive care. *Equine Veterinary Education* 25, 264-270.
- van Galen, G., Votion, D.M. 2013b. Management of cases suffering from atypical myopathy: Interpretations of descriptive, epidemiological and pathophysiological findings. Part 2: Muscular, urinary, respiratory and hepatic care, and inflammatory/infectious status. *Equine Veterinary Education* 25, 264-270.
- Votion, D.M., Gnaiger, E., Lemieux, H., Mouithys-Mickalad, A., Serteyn, D. 2012. Physical fitness and mitochondrial respiratory capacity in horse skeletal muscle. *PLoS One* 7, e34890.
- Votion, D.M., Linden, A., Delguste, C., Amory, H., Thiry, E., Engels, P., van Galen, G., Navet, R., Sluse, F., Serteyn, D., et al. 2009. Atypical myopathy in grazing horses: a first exploratory data analysis. *The Veterinary Journal* 180, 77-87.
- Votion, D.M., van Galen, G., Sweetman, L., Boemer, F., de Tullio, P., Dopagne, C., Lefere, L., Mouithys-Mickalad, A., Patarin, F., Rouxhet, S., van Loon, G., Serteyn, D., Sponseller, B. T. and 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., van Leeuwen, R., van Raamsdonk, L.W., Mol, H.G. 2016. Hypoglycin A Concentrations in Maple Tree Species in the Netherlands and the Occurrence of Atypical Myopathy in Horses. *Journal of veterinary internal medicine* 30, 880-884.