



44^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 15 mars 2018

Émergence de la toxicité printanière et influence des conditions météorologiques sur les risques de myopathie atypique

J.A. Habyarimana¹, P. Gustin¹, M.-L. Scippo², L. Martinelle³, C. Douny², C. Marcillaud-Pitel⁴, E. Richard⁵, D.-M. Votion⁶

¹Département des Sciences fonctionnelles, FARA, FMV-ULg, Belgique

²Département des Sciences des Denrées Alimentaires, FARA, FMV-ULg, Belgique

³Station Expérimentale (CARE - FePex), FARA, FMV-ULg, Belgique

⁴Réseau d'Épidémiologie et de Surveillance en Pathologie Équine (RESPE), Caen, France

⁵Normandie Université, UNICAEN, Labéo Frank Duncombe, Caen, France

⁶Pôle équin, Faculté de Médecine vétérinaire, FARA, FMV-ULg, Belgique

Résumé

La myopathie atypique (MA) équine en Europe résulte de l'ingestion d'hypoglycine A (HGA) contenue dans les samares et les plantules de l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*). Le taux d'HGA a été déterminé dans des samares tombées au sol et des plantules d'érables sycomores récoltées tous les 15 jours au cours du printemps 2016. Ponctuellement, d'autres échantillons environnementaux ont été également prélevés : fleurs, plants âgés, foin produit sur une de ces prairies.

À partir des concentrations maximales d'HGA mesurées dans les échantillons d'érable sycomore et en extrapolant la dose toxique pour un cheval à partir des données basées sur des animaux de laboratoire, il peut être estimé qu'à certaines périodes, moins de 20 g de samares ou moins de 50 plantules sont suffisants pour atteindre la dose maximale tolérée pour un cheval. En outre, cette dose hypothétique peut être atteinte avec 150 g de fleurs et 2 L d'eau de pluie qui a ruisselé sur les plantules. Le foin produit sur une des prairies contenait de l'HGA en une concentration dépendant du nombre de plantules séchées et incluses dans celui-ci.

Mots clés : myopathie atypique équine, érable sycomore, hypoglycine A

Summary

Atypical myopathy (AM) equine in Europe results from the ingestion of hypoglycin A (HGA) contained in samaras and seedlings of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*). The concentration of HGA was determined in samaras fallen on the ground and in seedlings of sycamore maple harvested every 15 days, in spring 2016. Other samples have been also collected: flowers, sycamore saplings and hay.

Based on the maximum concentrations of HGA measured in the sycamore samples and extrapolating the toxic dose to a horse from the literature data (dose based on laboratory animals), it can be estimated that at certain times less than 20 g samaras or less than 50 seedlings are enough to reach the maximum tolerated dose for a horse. In addition, this hypothetical toxic dose can be reached with 150 g of inflorescences and 2 L of rainwater that has dripped onto seedlings. The hay produced on one of the grasslands contained HGA in a concentration depending on the number of seedlings dried and included in it.

Key-words: Equine atypical myopathy, sycamore maple, hypoglycin A



Introduction

La myopathie atypique équine (MA) en Europe résulte de l'ingestion d'hypoglycine A (HGA) contenue dans les samares et les plantules de l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) (Unger *et al.*, 2014 ; Baise *et al.*, 2015 ; Bochnia *et al.*, 2015 ; Westermann *et al.*, 2016). La maladie est saisonnière avec des séries cliniques se déclarant à l'automne lorsque les samares tombent au sol et au printemps, probablement à la suite de leur germination (van Galen *et al.*, 2012). Le premier objectif de cette étude était de mesurer la concentration d'HGA dans les samares d'érables sycomores tombées au sol puis dans les plantules dès leur formation et ce, tout au long du printemps. L'objectif ultérieur était d'examiner d'autres sources possibles d'intoxication par l'HGA.

1 Matériel et méthodes

Les échantillons (samares tombées au sol et plantules d'érables sycomores) ont été recueillis sur trois pâtures dont deux ont été le siège de cas de MA. Les échantillons ont été collectés à des intervalles de 2 semaines au cours du printemps 2016 (du 01/03 au 15/06). À titre de témoins négatifs, des samares d'érables planes (*Acer platanoides*) et d'érables champêtres (*Acer campestre*) ont été recueillies aux mêmes moments. Des études précédentes avaient montré l'innocuité de ces érables (Fowden et Pratt, 1973 ; Westermann *et al.*, 2016).

Au cours d'une collecte effectuée le lendemain d'une nuit pluvieuse, des fleurs d'érables sycomores étaient tombées au sol ; des inflorescences de ces érables ont été collectées sur les arbres afin d'évaluer le potentiel toxique de celles-ci. De même, l'eau ruisselant sur des plantules a été collectée pour déterminer, le cas échéant, le taux d'HGA. Fin juin, du foin produit à partir d'une de ces prairies a été prélevé. Enfin, des plantules d'au moins un an d'âge ont été récoltées afin de déterminer si les plants plus âgés avaient perdu leur toxicité.

1.1 Dosage de l'hypoglycine A dans les échantillons végétaux

L'HGA a été dosée dans les échantillons végétaux par chromatographie sur couche mince de haute performance par une technique validée (Habyarimana *et al.*, 2017). 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 4500 *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 tube Falcon contenant les 12,5 ml de surnageant transféré 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 d'HGA dans les échantillons végétaux a été réalisée par chromatographie en couche mince haute performance (HPTLC) avec un appareil CAMAG (CAMAG, Muttenz, Suisse). L'HGA 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 déposées sur des plaques de silice HPTLC 60 Å F254 (Merck) de taille 20 × 10 ou 10 × 10 cm grâce à un applicateur CAMAG Linomat V. La composition de la solution d'éluion était la suivante : méthanol, 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 du méthanol suivie d'une incubation de 5 minutes à 110°C. La détermination et la quantification de l'HGA 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). Les limites de détection et de quantification de la méthode ont été déterminées et sont de 6 mg HGA/kg et 12 mg HGA/kg de poids frais, respectivement.

1.2 Dosage de l'hypoglycine A dans l'eau

L'eau ayant ruisselé sur les samares collectées début avril a été récupérée et analysée directement par HTPLC. La limite de détection de l'HGA dans l'eau par la méthode utilisée est de 3 mg/L.

2 Résultats

L'HGA a été détectée dans tous les échantillons issus des érables sycomores (samares, plantules, fleurs (Figure I), plants âgés ; Tableau 1) à l'exception des samares d'une prairie prélevées le 01/03. Les samares prélevées ultérieurement dans cette prairie (et qui avaient commencé à germer) contenaient de l'HGA. Le suivi du taux de toxicité des samares et plantules d'érables sycomores au cours du temps montre que le taux d'HGA (par g de matière fraîche) augmente avec la germination de la graine (Figure II), atteint un maximum puis diminue avec la croissance de la plantule. Il est à noter que de l'HGA était encore détectée dans les plants d'érables de l'année antérieure. Les samares des autres espèces d'érables collectées ne contenaient pas de toxine. L'eau de pluie en contact avec les plantules contenait de l'HGA. Le foin produit sur une de ces prairies contenait de l'HGA en une concentration dépendant du nombre de plantules séchées et incluses dans celui-ci (Figure III).

Figure I : Inflorescences d'un érable sycomore (mai 2016)
Figure I: Inflorescences of sycamore maple (May 2016)



Commentaire : Un seul arbre mature peut avoir plus de 800 inflorescences et chaque inflorescence peut donner jusqu'à 30 fruits. Ainsi, un tel arbre peut produire plus de 24 000 graines (Pasta *et al.*, 2017).

Comment: A single mature tree may have more than 800 inflorescences and each inflorescence may result in up to 30 fruits. Thus, such a tree may produce more than 24,000 seeds (Pasta et al., 2016).

Figure II : Déroulement des deux cotylédons émergeant de l'enveloppe rompue de la samare
Figure II: Unrolling of two cotyledons from the ruptured pericarp



Figure III : Foin (a) et plantule séchée (b) extraite du foin
Figure III: Hay (a) and dried seedling (b) taken out from hay

(a)



(b)





Tableau 1 : Toxicité des échantillons d'érables sycomores récoltés au cours du printemps 2016
 Table 1: Toxicity of sycamore maple samples harvested during spring 2016

	HGA	Date	Quantité toxique
- samares en germination (valeur maximale mesurée)	P1 : 406±1 mg/kg	05/04/2016	64 g
	P2: 1180±84 mg/kg	01/03/2016	22 g
	P3: 1450±12 mg/kg	15/03/2016	17 g
- eau en contact	P2: 12,9±1,0 mg/L	05/04/2016	2 L
- fleurs	P1, P2 & P3: 174±26 mg/kg	11/05/2016	150 inflorescences

Légende : HGA = taux d'hypoglycine A en mg par gramme de matière fraîche (moyenne de 3 mesures ± l'écart-type) ; P1, P2 & P3 : prairies 1, 2 et 3 ; la date correspond à la date d'échantillonnage.

Legend: HGA = rate of hypoglycin A in mg per gram of fresh material (mean ± SD of 3 measurements); P1, P2 & P3: meadows 1, 2 and 3; the date corresponds to the sampling date.

3 Conclusions

À partir des concentrations maximales d'HGA mesurées dans les échantillons d'érables sycomores et en extrapolant la dose toxique pour un cheval à partir des données de littérature basées sur des animaux de laboratoire, il peut être estimé qu'à certaines périodes, moins de 20 g de samares ou moins de 50 plantules sont suffisantes pour atteindre la dose maximale tolérée pour un cheval. Lors de fortes précipitations, les fleurs et l'eau de ruissellement sont des sources de contamination supplémentaires.

Remerciements

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.

Références

- Baise, E., Habyarimana, J.A., Amory, H., Boemer, F., Douny, C., Gustin, P., Marcillaud Pitel, C., Patarin, F., Weber, M., Votion, D.M. 2015. Samaras and seedlings of *Acer pseudoplatanus* are potential sources of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy without necessarily inducing clinical signs. *Equine Vet J*.
- Bochnia, M., Ziegler, J., Sander, J., Uhlig, A., Schaefer, S., Vollstedt, S., Glatter, M., Abel, S., Recknagel, S., Schusser, G. F., Wensch-Dorendorf, M., Zeyner, A. 2015. Hypoglycin A Content in Blood and Urine Discriminates Horses with Atypical Myopathy from Clinically Normal Horses Grazing on the Same Pasture. *PLoS One* 10, e0136785
- Fowden, L., Pratt, H.M. 1973. Cyclopropylamino acids of the genus *Acer*: distribution and biosynthesis. *Phytochemistry* 12, 1677-1681.
- Habyarimana, J. B. A., Baise, E., Douny, C., Weber, M., Boemer, F., De Tullio, P., Franck, T., Marcillaud-Pitel, C., Frederich, M., Mouithys-Mickalad, A., Richard, E., Scippo, M.-L., Votion, D., Gustin, P. 2017. Development of an HPTLC method for determination of hypoglycin A in aqueous extracts of seedlings and samaras of *Acer* species. *bioRxiv*
- Pasta, S., De Rigo, D., Caudullo, G. 2016. *Acer pseudoplatanus* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. In *European atlas of forest tree species*. Eds J. San-Miguel-Ayanz, D. De Rigo, G. Caudullo, T. Houston Durrant, A. Mauri. Luxembourg, Publication Office of the European Union. pp 56-58
- 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. *J Vet Intern Med* 28, 1289-1293.
- van Galen, G., Marcillaud Pitel, C., Saegerman, C., Patarin, F., Amory, H., Baily, J.D., Cassart, D., Gerber, V., Hahn, C., Harris, P., *et al.* 2012. European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006-2009): Spatiotemporal distribution, history and clinical features. *Equine Vet J* 44, 614-620.
- 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. *J Vet Intern Med* 30, 880-884.