

*J'ai passé ma vie à jouer et à apprendre
et si apprendre est un plaisir,
apprendre toute sa vie est un privilège.
J'ai appris et j'apprends de tout ce que je fais.*

Lee Friedlander

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	acide désoxyribonucléique
AST :	aspartate aminotransférase
ATP :	adénosine triphosphate
ATPase :	adénosine triphosphatase
AZR :	<i>alizarin red</i>
CCCP :	carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone
CK :	créatine kinase
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DS :	déviation standard
EAM :	<i>equine atypical myopathy</i>
EHV :	<i>equine herpes virus</i>
EM :	<i>electron microscopy</i>
EMND :	<i>equine motor neuron disease</i>
Fig :	figure
FL1 :	fluorescence 1
FL2 :	fluorescence 2
FSC :	<i>forward scatter</i>
GBE :	<i>glycogen branching enzyme</i>
GBED :	<i>glycogen branching enzyme deficiency</i>
H&E :	hématoxyline et éosine
JC-1 :	5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazolcarbocyanine iodide
IgA :	immunoglobuline A
IgG :	immunoglobuline G
LDH :	lactate déshydrogénase
MADD :	<i>multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency</i>
NADH :	nicotinamide adénine dinucléotide réduite
NADH CoQ :	NADH coenzyme Q 10 (ubiquinone)
ORO :	<i>oil red O</i>
PAS :	<i>periodic acid Schiff</i>
PBMC :	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS :	<i>phosphate buffered</i>

PSSM : *polysaccharide storage myopathy*
SD : *standard deviation*
SSC : *side scatter*
TEM : *transmission electron microscopy*
US : *United States*
 $\Delta\psi_m$: potentiel de membrane mitochondrial

RESUME

La myopathie atypique équine, sujet central de cette thèse, est, dans un premier temps, replacée dans le contexte général des myopathies équines à travers une revue de littérature utilisant des critères morphologiques comme fil conducteur. Deux études originales sont ensuite exposées.

La première étude est une évaluation anatomo-pathologique, histopathologique et ultrastructurale réalisée à partir de 32 chevaux âgés de 6 mois à 7 ans, morts ou euthanasiés suite à un syndrome ataxique accompagné de myoglobinurie correspondant à une myopathie atypique. L'étude morphologique de la musculature striée a mis en évidence (1) des zones de nécrose au niveau des muscles de posture, des muscles respiratoires et parfois du myocarde, (2) une dégénérescence segmentaire de type Zenker, monophasique et multifocale, affectant préférentiellement les fibres de type I, (3) une activité enzymatique mitochondriale diminuée avec une distribution hétérogène révélée par la coloration NADH tétrazolium réductase, (4) une absence de sels de calcium intracellulaires, (5) une accumulation intracytoplasmique de gouttelettes lipidiques et (6) des modifications ultrastructurales touchant essentiellement les mitochondries. Ces données indiquent que la myopathie atypique équine exhibe la plupart des caractéristiques morphopathologiques des myopathies toxiques au sens le plus large. Pour confirmer l'hypothèse d'une atteinte mitochondriale primaire, une étude fonctionnelle *in vivo* a paru nécessaire.

Le développement et la validation d'une méthode d'analyse quantitative de la fonction mitochondriale à partir d'échantillons sanguins de chevaux ont fait l'objet de la deuxième étude. Le fluorophore lipophile cationique JC-1 a été choisi en raison de sa capacité d'accumulation dans les membranes mitochondriales et de son spectre de fluorescence directement dépendant du potentiel membranaire. Le potentiel de membrane mitochondrial peut donc être optiquement mesuré par le rapport de la fluorescence orange (indiquant la tendance de JC-1 à former des oligomères lorsque le potentiel de membrane mitochondrial est élevé) sur la fluorescence verte (JC-1 sous forme de monomères lorsque le potentiel de membrane mitochondrial est faible). Une procédure d'analyse standardisée par cytométrie en flux de la fonction mitochondriale des cellules mononucléées sanguines équines est exposée et des valeurs de référence de l'activité mitochondriale des lymphocytes de chevaux sains sont présentées.

Les valeurs moyennes de fluorescence associées à JC-1 et leurs rapports se sont avérés stables dans le temps chez un même cheval, indépendantes de l'âge et du sexe et très sensibles à une exposition à un dissipateur du potentiel de membrane (CCCP). Enfin, il a été démontré que le délai entre la prise de sang et l'évaluation de la fonction mitochondriale ne pouvait excéder cinq heures.

SUMMARY

Atypical equine myopathy, the main subject of this thesis, is first positioned in the general topic of equine myopathies, based on a comprehensive literature review of lesions. Two original studies are then successively presented.

The first study is a gross, microscopic and ultrastructural pathology description, based on necropsies of 32 horses, 6 months to 7 years old, found dead or euthanatized with a syndrome of ataxia and myoglobinuria compatible with atypical myopathies. Lesions of the striated muscles were typical of that disease, namely: (1) areas of necrosis in postural and respiratory muscles and, for some animals, in myocardium; (2) segmental Zenker degeneration, multifocal and monophasic, affecting predominantly type I fibers; (3) decreased mitochondrial enzymatic activity, with an intracytoplasmic heterogeneous distribution, as shown by NADH tetrazolium reductase staining; (4) absence of intracellular accumulation of calcium salts; (5) cytoplasmic accumulation of lipid droplets, and (6) ultrastructural alterations centered on mitochondria. Our observations suggested that atypical equine myopathy was to be included among toxic myopathies, in a broad sense. In order to confirm the hypothesis of a primary mitochondrial disease, an *in vivo* functional study was planned.

In the second study, a technique of quantitative evaluation of mitochondrial function was developed and validated, using the buffy coat layer of equine blood. The lipophilic cationic JC-1 fluorophore was chosen because of its ability to accumulate in mitochondrial membranes and because of its fluorescence spectrum, directly dependent on the membrane potential. The mitochondrial membrane potential could be optically measured by calculating the ratio between orange fluorescence (indicating the presence of JC-1 oligomers when the membrane potential was elevated) and green fluorescence (indicating the presence of JC-1 monomers when the membrane potential was low). A standardized technique of mitochondrial function by flow cytometry, based on equine mononuclear white blood cells was presented and reference values for equine lymphocytes mitochondrial activity were proposed. Mean fluorescence values associated with JC-1 and their ratios were found to be stable in a given horse, independent from age and sex, and very sensitive to exposure to CCCP, a dissipater of membrane potential. Finally, it was shown that the time period between blood harvesting and mitochondrial function evaluation could not exceed five hours.

AVANT-PROPOS

Depuis 2000, le service des autopsies de la Faculté de Médecine vétérinaire de Liège est confronté à des cas sporadiques de myopathie équine d'origine inconnue et dont les lésions ne cadrent pas avec les myopathies décrites dans la littérature.

L'objectif de cette thèse est de tenter de mieux caractériser ce qui paraît, de manière de plus en plus évidente, être une entité nouvelle. Sur le plan clinique, elle se définit par son caractère sporadique et inattendu (« atypique »), par une incidence saisonnière (printemps et automne), par une symptomatologie identifiable : apparition brutale, myoglobinurie, évolution aiguë et par un décours souvent fatal, en moins de 72 heures. A ce jour, les tentatives de traitement et les investigations entreprises n'ont permis ni de cerner l'étiologie de l'affection, ni de la guérir. Quant à sa pathogénie, elle est encore totalement mystérieuse, en particulier le mécanisme pathologique qui altère la fibre musculaire squelettique, cible privilégiée du tableau lésionnel de la maladie. L'imprévisibilité des cas, la rapidité du processus, le caractère sporadique de l'affection, l'impossibilité de la reproduire expérimentalement sont autant de défis auxquels il a fallu faire face. Afin de dégager une base solide pour le diagnostic, en caractérisant mieux les lésions, et de tenter une avancée dans la pathogénie en proposant un mécanisme d'atteinte de la fibre musculaire, une étude anatomo-pathologique à partir des cas disponibles nous a paru être une priorité. Elle nécessitait préalablement, afin d'éclairer nos observations, de reprendre avec l'œil du morphologiste les maladies musculaires décrites classiquement chez le cheval.

La revue des myopathies équines connues constitue la partie initiale de ce travail. Ensuite, une première étude présente, à partir des cas examinés, un inventaire des lésions macroscopiques, microscopiques et ultrastructurales observées dans la myopathie atypique. Sur base des résultats morphologiques qui indiquent une parenté lésionnelle entre la myopathie atypique et les myopathies toxiques, l'hypothèse d'une atteinte primitive des mitochondries a été proposée. La deuxième étude est une tentative d'étayer cette hypothèse par la mise au point d'un test d'activité mitochondriale des lymphocytes équins.

PREMIERE PARTIE

ARTICLE DE SYNTHESE

**REVUE MORPHOPATHOLOGIQUE
DES MYOPATHIES EQUINES**

Cassart D., Coignoul F., Desmecht D.

*Département de Morphologie & Pathologie, Secteur Pathologie,
Faculté de Médecine vétérinaire, Sart Tilman B43 , Université de Liège*

Correspondance : Dominique Cassart, Dominique.Cassart@ulg.ac.be

TITRES

Revue morphopathologique des myopathies équine

Morphopathologic review of myopathies among *equidae*

RÉSUMÉ

L'identification de la cause d'une myopathie est une vraie gageure dans toutes les espèces en raison de la grande diversité des étiologies, des manifestations cliniques et des lésions. Tant aux yeux du clinicien qu'à ceux de l'anatomo-pathologiste, le fil conducteur qui mène au diagnostic causal d'une myopathie particulière exige que soient identifiées des balises sûres permettant d'intégrer un cas individuel ou une série cohérente d'observations successives à une entité médicale particulière. Dans cette revue morphopathologique des myopathies du cheval, plus particulièrement de celles qui atteignent la musculature striée squelettique, l'accent est mis délibérément sur le fil conducteur histopathologique et, plus particulièrement, sur les éléments morphologiques qui permettent de classer les lésions observées dans un groupe d'entités connues.

SUMMARY

Identifying the cause of a myopathy is challenging in any species because of the great diversity of etiologies, clinical signs and lesions. Whenever a clinician or a pathologist is concerned, the way to the diagnosis of a myopathy must be paved with indisputable criteria allowing integration of an individual case in a precise medical entity. In this morphopathologic review of equine myopathies, the priority is given to the histopathologist way of using key morphologic clues for accurate categorization of a myopathy.

1. INTRODUCTION

L'identification de la cause d'une myopathie est une vraie gageure dans toutes les espèces en raison de la grande diversité des étiologies, des manifestations cliniques et des lésions. Tant aux yeux du clinicien qu'à ceux de l'anatomo-pathologiste, le fil conducteur qui mène au diagnostic causal d'une myopathie particulière, *a fortiori* celui qui conduit à la caractérisation d'une entité nouvelle, exige que soient identifiées des balises sûres, permettant d'intégrer un cas individuel ou une série cohérente d'observations successives à une entité particulière. Dans cette revue morphopathologique des myopathies du cheval, plus particulièrement de celles qui atteignent la musculature striée squelettique, l'accent est mis délibérément sur le diagnostic histopathologique et, plus particulièrement, sur les éléments morphologiques qui permettent de classer les lésions observées dans un groupe d'entités connues. En se donnant un tel cadre de réflexion, on distingue (1) les myopathies qui se caractérisent par une modification substantielle de la taille des fibres musculaires, (2) les myopathies qui se caractérisent par une modification évidente de l'aspect des fibres musculaires, (3) les myopathies qui se caractérisent par un infiltrat cellulaire de l'interstitium et (4) les myopathies sans expression morphologique typique.

Pour que la revue conserve un caractère pratique, des informations additionnelles concernant le tableau clinique et l'aspect macroscopique du muscle sur le cadavre complètent les descriptions. Certaines entités qui se distinguent par des lésions relevant de plusieurs catégories ont été, pour la clarté du texte, associées à une seule, tout en soulignant la mixité de l'image morphologique.

Dans un travail fondé sur la morphologie du muscle squelettique, il a été jugé nécessaire de présenter un rappel de l'histologie normale du muscle et, en raison du lien étroit qui existe, tout particulièrement dans le muscle, entre structure et fonction, d'y associer un rappel fonctionnel.

2. HISTOPHYSIOLOGIE DE LA MUSCULATURE STRIÉE

2.1. Histologie de la fibre musculaire striée de type squelettique

Les muscles striés squelettiques sont responsables des mouvements volontaires et du maintien de la posture. L'élément fondamental qui les constitue est la cellule - ou fibre - musculaire squelettique, aussi appelée myocyte. Il s'agit d'une cellule plurinucléée, allongée, dont les dimensions peuvent aller jusqu'à 100 microns de diamètre et plusieurs centimètres de longueur. Le sarcolemme enveloppe la cellule ; il est composé de la membrane plasmique, du cell-coat et de la lame basale. Les noyaux multiples sont périphériques, situés dans le cytoplasme, appelé sarcoplasme, adossés à la face interne de la membrane plasmique. Dans le sarcoplasme se trouvent les éléments contractiles qui sont constitués par les myofilaments d'actine et de myosine organisés en faisceaux appelés myofibrilles et disposés longitudinalement. C'est la superposition régulière de ces myofilaments qui est responsable de la striation transversale de la fibre musculaire visible au microscope optique. La contraction musculaire est la conséquence de l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine. Entre les myofibrilles, le sarcoplasme contient des organites tels que les mitochondries mais aussi un système d'extensions tubulaires de la membrane plasmique disposé transversalement à l'intérieur de la cellule. Ce système tubulaire, représenté par les tubes T, les citernes et le réticulum sarcoplasmique, présente donc une lumière en continuité avec l'espace extracellulaire. Ce réseau tubulaire permet un contact étroit entre la membrane plasmique et les unités contractiles, ce qui favorise la propagation de l'onde de dépolarisation et le passage du calcium du réticulum sarcoplasmique vers le sarcoplasme et plus particulièrement vers les myofibrilles. Ceci entraîne une contraction synchronisée au sein de la cellule. Le muscle est entouré de tissu conjonctif vasculaire : l'épimysium, d'où partent les travées conjonctives formant le périmysium qui entoure les faisceaux. Chaque fibre est également encerclée par l'endomysium provenant du périmysium (Antoine, 2006).

Les fibres musculaires striées squelettiques peuvent être divisées en trois groupes : (1) les cellules (fibres) de type I, (2) les cellules de type intermédiaire (II A) et (3) les cellules de type II (II B). Les fibres de type I sont des fibres lentes à métabolisme oxydatif, riches en myoglobine et en mitochondries et entourées par de nombreux capillaires. Les fibres de type II sont des fibres rapides à métabolisme glycolytique, pâles, pauvres en myoglobine, contenant moins de mitochondries et desservies par moins de capillaires que les fibres de type

I de même taille (Van Vleet et Valentine, 2007). Les fibres intermédiaires peuvent utiliser les deux processus pour la production d'énergie (MacEwen et Hulland, 1986).

2.2. Physiologie de la contraction musculaire

Suite à un stimulus nerveux, il y a libération au niveau de la synapse neuromotrice d'acétylcholine qui se lie et modifie la conformation des récepteurs nicotiniques au niveau de la fibre musculaire. Il en résulte une ouverture des canaux à ions entraînant une dépolarisation membranaire et la génération d'un potentiel d'action. L'entrée de Na^+ dans la cellule induit un changement de polarité de la membrane et l'onde de dépolarisation se propage par les tubes T vers les citernes du réticulum sarcoplasmique. Il en résulte une activation des canaux à Ca^{++} et la libération de Ca^{++} dans le sarcoplasme. Le calcium se lie à la troponine C, induisant un changement de conformation de la molécule de tropomyosine qui initie la contraction. La relaxation musculaire est liée au recaptage du calcium par le réticulum sarcoplasmique. C'est cette phase de relâchement du muscle qui nécessite un apport énergétique sous forme d'ATP produite par les mitochondries. Ce sont donc spécifiquement le calcium et l'ATP qui régulent la contraction et la relaxation musculaire (Valberg et Hodgson, 2002). Lors de contraction prolongée du muscle, le déficit d'ATP et l'excès de calcium peuvent entraîner une dégénérescence hyaline des fibres musculaires par coagulation des protéines (Guis *et al.*, 2005).

3. LES MYOPATHIES EQUINES

3.1. Les myopathies qui modifient la taille des fibres musculaires

3.1.1. *L'atrophie musculaire*

L'atrophie musculaire se définit morphologiquement comme une diminution du diamètre des fibres musculaires avec déplétion en éléments contractiles (Van Vleet, 1997). Les fibres atrophiées sont anguleuses avec un épaississement du tissu interstitiel endomysial et une prolifération de cellules adipeuses (Van Vleet et Valentine, 2007). Dans les stades avancés d'atrophie, les cellules peuvent être le siège d'une dégénérescence hyaline (Van Vleet, 1997). Les causes d'atrophie musculaire sont variées ; elles servent traditionnellement de base à leur classification.

L'atrophie neurogénique, ou atrophie de dénervation, s'observe lorsque l'innervation des fibres musculaires par le nerf moteur est interrompue. Si la dénervation est complète, ce type d'atrophie peut atteindre toutes les fibres d'un territoire musculaire. Si la dénervation est incomplète, seules certaines fibres sont atteintes, selon une distribution multifocale. Dans ce cas, les fibres voisines sont augmentées de volume par hypertrophie compensatoire. Ce cas de figure est illustré chez le cheval par l'*equine motor neuron disease* (EMND), maladie sporadique affectant des chevaux de tous âges et de toutes races (Valberg et Hodgson, 2002). L'EMND est une maladie dont l'incidence augmente avec l'âge ; l'âge moyen d'apparition étant de 16 ans. Elle se caractérise par une dégénérescence des neurones moteurs des cornes ventrales de la moelle épinière. L'étiologie est inconnue mais la maladie s'accompagne systématiquement de taux sériques très bas en vitamine E, ce qui laisserait supposer une cause carencielle (Valentine *et al.*, 1994). Dans l'EMND, ce sont surtout les fibres de type I qui sont atrophiées.

L'atrophie de non usage. Elle s'observe dans un territoire musculaire, souvent un membre, lors d'immobilisation prolongée. Elle peut également faire suite à une ténotomie. Ce processus d'atrophie est plus lent que dans l'atrophie neurogénique (Van Vleet, 1997). L'atrophie de non usage se caractérise par une atteinte des deux types de fibres.

L'atrophie associée à la cachexie. Il s'agit d'une atrophie visible tant sur l'animal vivant que sur le cadavre. Elle s'observe tout d'abord au niveau des muscles du dos et des cuisses. Au microscope, l'atrophie touche surtout les fibres musculaires de type II. Ce sont les muscles non posturaux qui sont les plus sévèrement atteints (Van Vleet et Valentine, 2007).

L'atrophie associée à la maladie de Cushing. Il s'agit d'une atrophie des fibres de type II avec perte de fibres de type IIB et accumulation de graisse périnysiale, endomysiale et intrasarcoplasmique (Aleman *et al.*, 2006).

3.1.2. *L'hypertrophie musculaire*

L'hypertrophie musculaire se définit, morphologiquement, comme une augmentation du diamètre de la fibre en coupe transversale avec un accroissement du nombre de myofibrilles dans les fibres (Van Vleet et Valentine, 2007). Ce processus est physiologique chez les

chevaux sportifs bien entraînés mais peut également accompagner un phénomène pathologique dans les cas d'hypertrophie compensatoire (Van Vleet, 1997).

3.2. Les myopathies qui modifient l'aspect des fibres musculaires

3.2.1. *Les lésions musculaires d'origine traumatique*

Les lésions traumatiques ont la double caractéristique d'entreprendre à la fois les fibres musculaires et le tissu interstitiel. Elles sont généralement la conséquence d'agressions extérieures mécaniques telles que, par exemple, les injections intramusculaires (Turner et Trotter, 1984) ou relèvent de causes physiques, comme c'est le cas lors d'exercices violents (Van Vleet, 1997). Les myopathies traumatiques les plus souvent rencontrées chez le cheval sont les suivantes.

La rupture/hernie diaphragmatique du poulain. Elle fait suite à une compression abdominale au moment du poulinage. Cette hernie acquise doit être différenciée d'une hernie congénitale.

L'élongation, avec ou sans rupture, des muscles tels que ceux de la région lombaire, les fessiers, les adducteurs, les gastrocnémiens, le dentelé ventral, les semi-membraneux et les semi-tendineux. Ces lésions sont la conséquence d'exercices violents ou inadaptés et présentent différents degrés selon la sévérité de la cause initiale : l'élongation, la rupture partielle et la rupture totale du muscle. Au microscope, les lésions traumatiques se caractérisent par des modifications des fibres musculaires et de l'interstitium. Au niveau des myocytes, on observe une perte de continuité des fibres. Dans l'interstitium, la zone lésée présente des hémorragies, de l'œdème et parfois un infiltrat inflammatoire riche en neutrophiles. Lors du passage à l'état chronique, la lésion se cicatrise avec formation de tissu fibreux (Van Vleet, 1997).

3.2.2. *La myopathie fibrosante (parfois appelée myopathie ossifiante)*

Cette maladie, souvent décrite chez le *Quarter Horse*, peut être observée chez n'importe quel cheval effectuant un travail à vive allure avec des changements de direction secs et des arrêts instantanés. Ces mouvements provoquent des traumatismes répétés, particulièrement au niveau des muscles semi-tendineux mais aussi des semi-membraneux, des biceps fémoraux et

des muscles graciles et gastrocnémiens (Valberg et Hodgson, 2002 ; MacLeay, 2004). Ces agressions récurrentes entraînent une réaction inflammatoire chronique qui évolue vers la fibrose avec perte de l'élasticité musculaire et adhérences avec les muscles voisins. Dans certains cas, ces lésions fibreuses sont accompagnées d'ossification (Gomez-Villamandos *et al.*, 1995). Une forme congénitale de cette maladie a été décrite chez des poulains de moins d'un an sans antécédent de traumatisme (Valberg et Hodgson, 2002). Les lésions histologiques sont une atrophie sévère des fibres musculaires, des regroupements de fibres d'un même type, une infiltration du tissu interstitiel par du tissu adipeux et une fibrose périnysiale et épimysiale sévère. Les lésions des fibres musculaires caractéristiques de la myopathie fibrosante sont similaires à celles décrites dans les atrophies de dénervation, ce qui suggère des altérations nerveuses concomitantes. Cette neuropathie périphérique pourrait par exemple être consécutive à une lésion du nerf sciatique (Valentine *et al.*, 1994).

3.2.3. Les myopathies dégénératives

A. généralités

Il en existe de plusieurs types. Leur dénominateur physiopathologique commun consiste en une surcharge calcique du sarcoplasme qui ne permet pas le relâchement musculaire. Cette surcharge peut, selon le cas, être la conséquence soit d'une lésion membranaire qui permet l'entrée sans frein du calcium dans la cellule, soit d'un déficit énergétique qui empêche le recaptage du calcium par le réticulum sarcoplasmique. La surcharge calcique entraîne donc une hypercontraction soutenue des fibres d'abord, laquelle évolue, ensuite, vers une coagulation des protéines contractiles par activation des protéases et des phospholipases (Warren *et al.*, 2002 ; Guis *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2005). Les dégénérescences musculaires sont pratiquement toujours segmentaires et présentent des sévérités différentes. Certains auteurs ont défini quatre niveaux de sévérité (Van Vleet et Valentine, 2007) en fonction des structures cellulaires atteintes : myofibrilles, noyaux, cellules satellites et/ou membranes. La capacité de régénération de la fibre dépend exclusivement de l'intégrité de la membrane basale.

Pour l'anatomo-pathologiste, les dégénérescences musculaires sont classées selon l'aspect microscopique des cellules.

La dégénérescence hyaline, fréquente, typique du muscle, se reconnaît par la présence de segments de fibres dilatés, hyperéosinophiliques, avec perte des striations transversales. L'intérieur des cellules peut apparaître fragmenté, floconneux, mais la structure tubulaire de la fibre est maintenue grâce à l'intégrité de la membrane basale. Endéans les 24 heures, des macrophages et quelques polymorphonucléaires neutrophiles affluent dans le segment lésé. Dans quelques cas, la dégénérescence hyaline s'accompagne de calcification précoce. La dégénérescence musculaire peut adopter différents aspects/topographies selon l'étiologie et la durée. Ainsi, elle peut être monophasique monofocale, monophasique multifocale, polyphasique monofocale ou polyphasique multifocale (Kakulas, 1988). L'aspect monophasique monofocal est celui que l'on observe lors d'agression unique localisée, telle qu'une injection intramusculaire. Les myocytes présentent tous un stade identique de dégénérescence dans une zone bien définie. Une exposition unique à des substances myotoxiques, comme par exemple la monensine, donne lieu à une dégénérescence monophasique multifocale dans laquelle toutes les fibres lésées sont au même stade de dégénérescence mais où la distribution est multifocale suite à une différence de sensibilité entre les divers types de fibres. Par contre, des agressions répétées, telles que des injections intramusculaires multiples dans le même muscle peuvent engendrer une dégénérescence polyphasique monofocale avec des fibres à des stades différents de dégénérescence dans un muscle précis. Dans le cas d'une myopathie nutritionnelle par carence en vitamine E et sélénium (voir plus loin), la dégénérescence musculaire est de type polyphasique multifocal avec des fibres à des stades différents de dégénérescence : dégénérescence hyaline stricte pour certaines, aspect fragmenté du cytoplasme pour d'autres, afflux de macrophages à d'autres endroits et enfin, présence de fibres en voie de régénération.

La dégénérescence granuleuse se caractérise par la présence de petits granules basophiles dans le cytoplasme des fibres musculaires ; ce type de dégénérescence est souvent observé au niveau du myocarde (Van Vleet, 1997).

La dégénérescence discoïde est une lésion liée à l'hypoxie où la striation transversale subsiste mais où une séparation entre les bandes Z est observée.

La dégénérescence vacuolaire, ou hydropique, est associée à un déséquilibre électrolytique comme l'hyperkaliémie chez le cheval.

La dégénérescence graisseuse s'observe occasionnellement dans les fibres musculaires d'animaux cachectiques.

L'accumulation anormale de polysaccharides est observée dans les maladies de stockage et peut être confirmée par une coloration de *Periodic Acid Schiff* (PAS).

Les fibres en anneaux peuvent être observées lors de dénervation mais aussi dans les muscles de chevaux atteints de myopathie postanesthésique. Il s'agit d'une image de régénération anormale avec formation de myofibrilles qui s'enroulent autour de la fibre musculaire (Van Vleet et Valentine, 2007).

B. *la myopathie nutritionnelle*

La myopathie nutritionnelle est une maladie musculaire, parfois associée à une cardiomyopathie, consécutive à une carence en vitamine E et sélénium ; la carence en sélénium semblant plus dommageable que la carence en vitamine E (Valberg et Hodgson, 2002). Le sélénium et la vitamine E sont des antioxydants importants pour la protection des membranes biologiques, particulièrement au niveau des muscles où le métabolisme oxydatif produit des radicaux libres hautement réactifs et en grandes quantités qui sont susceptibles d'entraîner une peroxydation des lipides membranaires. La vitamine E est un antioxydant liposoluble membranaire qui empêche les radicaux libres de former des hydroperoxydes avec les phospholipides insaturés des membranes (Dill et Rebhun, 1985). Le sélénium sarcoplasmique intégré à l'enzyme glutathion peroxydase participe à la transformation en eau et en alcools inoffensifs des peroxydes d'hydrogène et des lipoperoxydes déjà formés (Valberg et Hodgson, 2002). Il faut noter que certains métaux tels que l'argent, le mercure, le cuivre, le zinc, le cobalt et le cadmium diminuent la biodisponibilité du sélénium tandis que le fer, qui fixe la vitamine E, et l'ozone prédisposent l'animal à une carence en vitamine E (Van Vleet, 1997).

La physiopathologie précise de la myopathie nutritionnelle n'est pas complètement élucidée et l'incidence de cette maladie reste imprévisible (Van Vleet et Valentine, 2007), les poulains carencés ne présentant pas toujours des signes cliniques et les chevaux déclarés atteints n'étant pas nécessairement carencés (Löfstedt, 1997). Il est possible qu'il faille interpréter les taux de vitamine E et de sélénium en fonction du niveau de production des radicaux libres de

l'animal concerné plutôt qu'en termes absolus. En absence de protection suffisante, les membranes cellulaires, lésées par les radicaux libres, sont incapables de maintenir divers gradients, notamment le gradient calcique.

Le calcium entre alors massivement dans la cellule, entraînant la cascade physiopathologique menant à la dégénérescence. La myopathie nutritionnelle est favorisée par un climat froid et un exercice inhabituel, ce qui suggère, à son origine ou dans son mécanisme, la contribution d'un déficit énergétique (Van Vleet et Valentine, 2007).

Chez les *poulains*, la myopathie nutritionnelle s'observe entre la naissance et l'âge d'un an et peut se manifester sous deux formes, selon qu'elle atteint le muscle cardiaque ou les muscles squelettiques (Valberg et Hodgson, 2002). La forme cardiaque, souvent fatale en moins de 24 heures, entretient le myocarde mais aussi parfois le diaphragme et les muscles intercostaux ainsi que, plus rarement, les autres muscles striés squelettiques. Les signes cliniques traduisent les lésions musculaires : faiblesse, décubitus, tachycardie et détresse respiratoire. La forme squelettique, dont l'évolution est plus progressive, entretient généralement les muscles du cou, de l'épaule ainsi que les muscles gastrocnémiens, semi-tendineux, semi-membraneux et les biceps fémoraux. Les muscles intercostaux et le diaphragme peuvent être entretient ainsi que les masséters et la langue. Le myocarde n'est que rarement atteint. Les signes cliniques sont plus variables que dans la forme cardiaque : faiblesse musculaire, raideur, décubitus, détresse respiratoire, impossibilité de têter et dysphagie (Löfstedt, 1997). La myopathie nutritionnelle se rencontre également chez des chevaux *adultes* qui présentent, sur le plan clinique, des signes musculaires (raideur, incapacité à se nourrir, port de tête bas), urinaires (myoglobulinurie), circulatoires (œdèmes de la tête et du cou) et généraux (dépression). Les enzymes musculaires (CK) sont augmentées dans le sang.

A l'autopsie, on peut observer des lésions musculaires bilatérales avec un aspect bicolore, strié ou tigré, des muscles lésés. Les zones décolorées sont pâles, légèrement jaunâtres et d'aspect parfois sec. Lorsque le myocarde est atteint, c'est au niveau de la paroi ventriculaire gauche que les lésions sont le plus souvent présentes (Löfstedt, 1997). Il s'agit de bandes claires de myocarde nécrosé, calcifié, voire fibrosé dans les cas chroniques (Valberg et Hodgson, 2002). Les lésions histopathologiques sont de type polyphasique, multifocal avec dégénérescence hyaline, perte des striations, fragmentation du sarcoplasme, nécrose, calcification, afflux de macrophages et figures de régénération (Van Vleet, 1997). Alors que les fibres musculaires squelettiques abimées régénèrent facilement, ce n'est pas le cas des

fibres myocardiques qui sont remplacées par un tissu cicatriciel fibroconjonctif. Les trois caractéristiques histopathologiques qui permettent donc de reconnaître la myopathie nutritionnelle sont les suivantes : (1) un aspect polyphasique et multifocal, (2) une minéralisation précoce des segments nécrosés mise en évidence par la coloration *alizarin-red* et (3) une dégénérescence affectant surtout les fibres de type I (Van Vleet et Valentine, 2007).

C. *les myopathies d'exercice*

La myopathie d'exercice est connue chez les chevaux depuis plus de 100 ans sous des dénominations diverses telles que *azoturie*, *tying-up* et *maladie du lundi*. Plus adéquatement, il y a lieu de parler de rhabdomyolyse associée à l'effort (Art *et al.*, 2000 ; Van Vleet et Valentine 2007). Ces rhabdomyolyses s'observent chez des chevaux de toutes races et de toutes les disciplines sportives. En dépit de signes cliniques similaires, elles sont le dénominateur commun de plusieurs entités fondamentalement différentes quant à leur pathogénie (Valberg *et al.*, 1999).

Les signes cliniques sont variables. Ils vont de l'intolérance à l'effort jusqu'au refus et/ou l'impossibilité de bouger. Dans certains cas, on observe des douleurs musculaires lombosacrées accompagnées de sudation, d'une respiration superficielle et de tremblements musculaires (Van Vleet, 1997). La lésion fondamentale observée dans les rhabdomyolyses associées à l'effort est la dégénérescence musculaire massive accompagnée de myoglobinurie. Les myocytes préférentiellement atteints sont les fibres de type II (MacEwen et Hulland, 1986). Le diagnostic clinique est confirmé par une augmentation des taux sériques des enzymes musculaires et particulièrement des CK (Beech, 1997 ; Art *et al.*, 2000).

Les myopathies d'exercice comprennent trois entités : la rhabdomyolyse sporadique, la rhabdomyolyse récurrente (ou récidivante) et la myopathie d'épuisement.

La rhabdomyolyse d'exercice sporadique est une maladie aiguë qui atteint les chevaux de façon sporadique pendant ou après un exercice violent, excessif ou inadapté. Le degré d'augmentation des CK sériques reflète l'étendue des lésions musculaires (Valberg et Hodgson, 2002). Cette myopathie semble liée à un déficit énergétique cellulaire (Art *et al.*, 2000) et/ou à un déséquilibre électrolytique avec hypokaliémie (Van Vleet et Valentine, 2007). Bien que les mêmes facteurs favorisants que ceux évoqués ci-dessous pour la rhabdomyolyse récidivante aient été suggérés, l'élément déterminant associé à la rhabdomyolyse sporadique est exclusivement un exercice excessif.

La rhabdomyolyse d'exercice récidivante est une maladie qui se traduit par des épisodes récurrents de myopathie chez des chevaux génétiquement sensibles suite à un dysfonctionnement sous-jacent de la cellule musculaire. Deux causes héréditaires de rhabdomyolyse d'exercice récidivante ont été identifiées à ce jour : une maladie de stockage appelée *polysaccharide storage myopathy* (PSSM) qui sera détaillée dans la section consacrée aux maladies de stockage, et une maladie des pur-sang, trotteurs et arabes associée à un défaut de régulation de la contraction musculaire qui s'exprime lorsqu'un jeune cheval sensible est soumis au stress que représente le travail (Ward *et al.*, 2000). Contrairement à la forme sporadique précitée, les épisodes de rhabdomyolyse sont souvent liés à une surexcitation du cheval plutôt qu'à un exercice excessif, l'intensité de l'exercice qui déclenche les symptômes étant souvent très faible. Les crises sont récurrentes mais le délai entre les crises est très variable. Cette myopathie est la plus fréquente chez les pur-sang de course. Elle se caractérise cliniquement par des douleurs musculaires et d'un point de vue biochimique par une augmentation des CK sériques après l'exercice. La prévention du stress et un exercice quotidien semblent diminuer les crises chez les chevaux prédisposés. Différents facteurs favorisants ont été évoqués : des infections respiratoires même frustrées (Beech, 1997), un déséquilibre électrolytique consécutif à une carence ou à une sudation excessive, une carence en vitamine E-sélénium (Beech, 1997 ; Art *et al.*, 2000), des rations trop riches en hydrates de carbone (MacLeay *et al.*, 1999), un facteur hormonal (l'incidence des myopathies récidivantes est plus importante chez les femelles, les épisodes semblent, dans certains cas, liés aux chaleurs et des implants de progestérone peuvent diminuer la fréquence des épisodes) (MacLeay *et al.*, 1999), l'hypothyroïdie (Waldron-Mease, 1979) et des facteurs psychogéniques (MacLeay *et al.*, 1999 ; Art *et al.*, 2000). Par contre, l'ancienne théorie fondée sur l'acidose lactique est abandonnée. Ces facteurs prédisposants sont néanmoins régulièrement mis en doute, à l'exception du déséquilibre électrolytique. Le mécanisme physiopathologique incontesté est, une fois de plus, un défaut de régulation des taux intracellulaires de calcium avec, pour conséquence, hypercontraction, activation de protéases et de phospholipases et coagulation de la machinerie protéique contractile. Une quantité plus importante de calcium intracellulaire a d'ailleurs été dûment constatée dans des cellules musculaires arrondies de chevaux concernés par rapport aux chevaux normaux (Van Den Hoven *et al.*, 1986). La mutation causale n'a pas été identifiée à ce jour, mais son mode de transmission est clairement autosomal dominant (MacLeay *et al.*, 1999 ; Dranchak *et al.*, 2005). Il existe un test fonctionnel fiable pour dépister ou confirmer les chevaux génétiquement prédisposés. Ce test, *in vitro* sur base d'une biopsie, fait appel à une

provocation à la caféine, à l'halothane ou au potassium (Dranchak *et al.*, 2005). La sensibilité des cellules musculaires à ces substances pour induire une contraction est augmentée chez les chevaux concernés par rapport aux chevaux sains. Toutes ces données rappellent l'hyperthermie maligne du porc. Néanmoins, il ne s'agirait pas de la même mutation ; le récepteur de la ryanodine du canal à calcium du réticulum sarcoplasmique est intact et fonctionnel chez le cheval (Lentz *et al.*, 1999 ; Ward *et al.*, 2000). Incidemment, il est bon de retenir que beaucoup de pur-sang présentant cette rhabdomyolyse récidivante ont aussi développé des myopathies postanesthésiques.

Les lésions, semblables à celles signant les rhabdomyolyses sporadiques, entreprennent les muscles lombaires et fessiers qui apparaissent tuméfiés, congestifs et bicolores. Si l'animal a survécu deux ou trois jours, les muscles atteints peuvent apparaître plus pâles et secs à l'autopsie. L'examen histopathologique des muscles lésés permet d'observer une dégénérescence hyaline multifocale segmentaire avec fragmentation du cytoplasme. Dans un premier temps, ce sont les fibres de type II qui sont lésées, mais si l'atteinte est plus sévère, toutes les fibres peuvent être dégénérées localement (MacEwen et Hulland, 1986).

D. *les myopathies de stockage*

Les myopathies de stockage (deux entités chez le cheval) se caractérisent par une accumulation de polysaccharides dans les fibres musculaires. Cette accumulation peut être responsable d'épisodes récurrents de rhabdomyolyse.

L'*equine polysaccharide storage myopathy* (PSSM) est une maladie héréditaire dont le mode de transmission est autosomal récessif mais dont la mutation causale n'a pas été identifiée à ce jour (De La Corte *et al.*, 2002). Décrite tout d'abord chez le *Quarter Horse*, cette maladie est la conséquence d'une accumulation de polysaccharides anormaux dans les fibres musculaires, ces polysaccharides ne pouvant être que difficilement utilisés comme substrat énergétique (Firshman *et al.*, 2006). Rapportée ensuite chez le cheval de trait belge, cette myopathie doit être aujourd'hui considérée comme une maladie commune à beaucoup de races de chevaux et de poneys, même si l'incidence est plus importante chez les *Quarter Horse*, les croisés *Quarter Horse*, les chevaux de trait et les croisés trait (Valentine, 1999 ; Valentine et Cooper, 2005), c'est-à-dire chez des animaux dotés d'un tempérament calme, ce qui distingue cette entité de la rhabdomyolyse d'exercice récidivante qui affecte surtout les chevaux de sang (Valberg et Hodgson, 2002). Les chevaux peuvent être atteints à tout âge (Valentine et

Cooper, 2005) et les signes cliniques, variables, sont assez typiques d'une atteinte musculaire : position campée, fasciculations musculaires, difficulté à engager les membres postérieurs ou à reculer, douleur, refus de bouger (Valentine, 1999). Ce sont surtout les membres postérieurs qui sont lésés mais le diaphragme peut également être atteint (Valentine *et al.*, 2002). Les enzymes musculaires (CK) sont généralement augmentées dans le sang. Dans les myocytes des chevaux atteints, les enzymes glycolytiques et glycogénolytiques ont une activité normale, ce qui suggère que l'accumulation de glycogène ne provient pas d'une incapacité de la cellule à le métaboliser (Valberg *et al.*, 1999). L'anomalie résulte plutôt d'une sensibilité accrue à l'insuline avec entrée de grandes quantités de glucose dans les cellules musculaires, ce qui entraîne la synthèse de beaucoup de glycogène mais aussi de polysaccharides anormaux, moins branchés (Firshman *et al.*, 2006). La formation de ces polysaccharides anormaux résulte d'une activation de la glycogène-synthase mais sans augmentation parallèle de l'activité de l'enzyme branchant du glycogène, qui a néanmoins une structure et un fonctionnement normaux. Ce déséquilibre enzymatique a pour conséquence la formation de grandes chaînes linéaires de glycogène mais avec moins de branchements que lorsque l'entrée du glucose est normalement régulée (Valberg *et al.*, 1999 ; De La Corte *et al.*, 2002). Ces formes polysaccharidiques anormales ont tendance à s'accumuler. Un régime pauvre en hydrates de carbone et riche en graisses exerce un effet préventif, probablement en diminuant la réponse glycémique postprandiale. Cette mesure diététique, combinée à un exercice régulier, diminue la fréquence d'apparition des épisodes de rhabdomyolyse (Valberg *et al.*, 1999 ; Zeyner *et al.*, 2006).

Les lésions histopathologiques caractéristiques de cette myopathie de stockage sont la présence d'une grande quantité de glycogène et d'inclusions anormales PAS-positives et amylase-résistantes dans les fibres de type II (Firshman *et al.*, 2006). Le diagnostic, réalisé à partir d'une biopsie du muscle semi-membraneux, est fondé sur l'observation simultanée de ces deux caractéristiques dans de nombreuses fibres (Valentine et Cooper, 2005). Ces lésions pathognomoniques peuvent être accompagnées d'autres atteintes musculaires : dégénérescence, afflux de macrophages, figures de régénération, changements dans la taille des fibres musculaires ou présence de noyaux centraux (Valentine et Cooper, 2005 ; Firshman *et al.*, 2006).

La *Glycogen branching enzyme deficiency* (GBED), ou amylopectinose est une maladie de stockage atteignant les muscles striés, le myocarde et le foie décrite en 1999 chez le *Quarter*

Horse et les croisés *Quarter Horse* (Render *et al.*, 1999). Il s'agit d'une maladie héréditaire dont le mode de transmission est autosomal et récessif (Sponseller *et al.*, 2003). La maladie se caractérise par une perte d'activité de l'enzyme branchant responsable de la formation de glycogène. Chez les chevaux normaux, la glycogène-synthase forme la chaîne linéaire du glycogène et la GBE est responsable de la structure branchée du glycogène qui permet la mise à disposition de résidus glucose terminaux rapidement mobilisables par la glycogène-phosphorylase (Valberg *et al.*, 2001). La perte d'activité de la GBE cause la synthèse de longues chaînes linéaires de glycogène avec seulement quelques points de branchement rappelant la structure de l'amylopectine (Sponseller *et al.*, 2003). Les tissus des poulains porteurs de la mutation sont donc dépourvus d'énergie rapidement mobilisable ce qui se traduit par de la mortalité fœtale avec avortement tardif, par une mortinatalité, ou par un syndrome néonatal caractérisé par de la faiblesse, un décubitus et une incapacité de têter. Les manifestations cliniques peuvent néanmoins apparaître plus tardivement avec un tableau d'intense faiblesse ou une mort subite. Généralement les poulains porteurs de la mutation meurent ou sont euthanasiés avant l'âge de 18 semaines. L'analyse sanguine montre une leucopénie, une hypoglycémie et une augmentation des enzymes musculaires CK (Valberg *et al.*, 2001).

L'examen histopathologique après coloration de PAS révèle la présence d'amas denses de matériel pourpre, amorphe ou filamenteux, suggérant des polysaccharides anormaux avec absence totale de glycogène normal ; ces images de stockage peuvent être accompagnées de nécrose avec infiltrat de macrophages (Sponseller *et al.*, 2003).

E. la myopathie de capture

Il s'agit d'une myopathie qui concerne plutôt le zèbre et les chevaux sauvages lors d'une capture avec immobilisation et/ou transport. Les signes cliniques comprennent de la faiblesse, des fibrillations musculaires, de l'ataxie et de la myoglobulinurie. Une acidose métabolique et de l'hyperthermie sont souvent associées. Cette maladie est souvent fatale. A l'autopsie, les muscles lésés sont bicolores ; ils sont parfois également œdématisés. Les lésions histologiques se caractérisent par une dégénérescence musculaire monophasique et multifocale avec afflux de macrophages, semblable à celles observées dans les myopathies d'exercice (Van Vleet, 1997 ; Van Vleet et Valentine, 2007).

F. les myopathies toxiques

La structure et la fonction des muscles striés squelettiques peuvent être altérées par de nombreuses substances chez les animaux de laboratoire et, de façon plus sporadique, chez l'animal domestique et chez l'homme. Chez le cheval, les seules myopathies d'origine toxique dûment décrites sont celles qui font suite à l'ingestion d'ionophores et de phytotoxines (MacLeay, 2004).

Les *ionophores* (monensine, salinomycine, narasin, lasalocid) sont des substances qui modifient les gradients ioniques transmembranaires. Parmi ceux-ci, la monensine, un antibiotique produit par la fermentation de *Streptomyces cinnamonensis*, est utilisée comme coccidiostatique chez la volaille et comme promoteur de croissance chez les ruminants (Whitlock, 1990). Le cheval est particulièrement sensible à la monensine (dose létale 50 : 2 - 3 mg/kg poids vif) (Whitlock, 1990 ; Bezerra *et al.*, 2000).

L'intoxication, généralement accidentelle, est consécutive à l'ingestion d'aliments pour ruminants ou à une contamination fortuite des aliments pour chevaux (Hall, 2001). La monensine est un complexe cationique liposoluble qui cause l'entrée massive de sodium et d'eau dans la cellule. Comme le fonctionnement de la pompe à calcium dépend du gradient électrolytique, le calcium entre alors en grandes quantités dans la cellule. Les mitochondries concentrent ce calcium jusqu'à saturation, ce qui entrave les phosphorylations oxydatives et, donc, la production d'ATP, et cause leur dilatation progressive par effet osmotique. À terme, les mitochondries se rompent, libérant de ce fait tout le calcium accumulé, ce qui provoque une hypercontraction et l'activation des enzymes précitées qui conduisent à la coagulation du matériel protéique constituant la machinerie contractile (Mollenhauer *et al.*, 1981 ; Whitlock, 1990 ; Van Vleet et Valentine, 2007).

Les signes cliniques associés à l'intoxication par les ionophores sont à la fois généraux et moteurs : anorexie, myasthénie, raideur, tremblements, incoordination, sudation, ataxie, polypnée, dyspnée, arythmie cardiaque, décubitus et mort. De la myoglobinurie et une augmentation des CK accompagnent ce tableau clinique (Matsuoka, 1976 ; Whitlock, 1990 ; Bezerra *et al.*, 2000). Les lésions macroscopiques telles qu'on les observe à l'autopsie, lorsqu'elles sont visibles, se caractérisent par un aspect bicolore du myocarde ventriculaire (Matsuoka, 1976) et la présence de zones symétriques de décoloration des muscles striés squelettiques des membres postérieurs et des épaules (Bezerra *et al.*, 2000 ; Van Vleet et Valentine, 2007). Certains auteurs rapportent une atteinte préférentielle des muscles

respiratoires et de posture à métabolisme plutôt oxydatif (Finno *et al.*, 2006). Les lésions histopathologiques consistent en une dégénérescence musculaire segmentaire, multifocale et monophasique, lors d'une exposition unique aux ionophores, avec afflux de macrophages. Les deux types de fibres sont atteints (Van Vleet et Valentine, 2007). Les lésions musculaires squelettiques peuvent régénérer, contrairement aux lésions myocardiques qui donnent lieu à la mise en place d'un tissu cicatriciel (Muylle *et al.*, 1981). Les lésions ultrastructurales les plus précoces montrent des altérations mitochondriales avec dilatations et ruptures. Des gouttelettes lipidiques ont également été observées dans les fibres myocardiques atteintes (Mollenhauer *et al.*, 1981).

Les phytotoxines. La plante *Cassia Occidentalis*, aussi dénommée *Senna occidentalis*, est tenue pour responsable d'un syndrome caractérisé par de la diarrhée, une démarche raide, de l'incoordination, de la faiblesse, un décubitus, une myoglobinurie et une augmentation des CK ; cette intoxication peut être fatale en quelques jours (Martin *et al.*, 1981 ; Whitlock, 1990). Cette plante n'existe pas en Europe, mais bien en Amérique du Nord où son appétence est augmentée par les gelées. L'examen nécropsique révèle un aspect pâle de certains muscles. Les lésions microscopiques sont classiques avec dégénérescence segmentaire, multifocale et monophasique. Le myocarde peut être atteint également (Whitlock, 1990). L'intoxication par *Senna* est utilisée chez les oiseaux comme modèle expérimental de myopathie mitochondriale (Calore *et al.*, 1997 ; Cavaliere *et al.*, 1997). La toxine spécifique n'a pas été identifiée à ce jour (Van Vleet et Valentine, 2007). Les plantes du genre *Eupatorium spp.* (particulièrement *E. rugosum*, également dénommée *Aristolochie*) sont également tenues pour responsables d'un syndrome caractérisé par de l'asthénie, des fasciculations musculaires, des coliques, une obstruction oesophagienne, une myoglobinurie et une augmentation des CK (Whitlock, 1990). La substance toxique, le trémétol ou trémétone, est un alcool de haut poids moléculaire qui cause des lésions du myocarde et des muscles striés squelettiques, principalement les muscles respiratoires et de posture (Finno *et al.*, 2006). Les lésions microscopiques sont classiques, quoique certains auteurs soulignent la présence d'une minéralisation des fibres myocardiques avec un infiltrat de cellules mononucléées (Finno *et al.*, 2006). Le trémétol peut être retrouvé dans d'autres plantes (Beier *et al.*, 1993) et reste biologiquement actif dans les fourrages (Valberg et Hodgson, 2002).

Dans cette section relative aux myopathies toxiques, il ne faut pas négliger certaines substances pouvant exercer une toxicité locale lors d'injections intramusculaires. Par exemple, des injections intramusculaires répétées d'ivermectine (ivomec®) causent des

lésions de dégénérescence focale, avec infiltration inflammatoire et, à terme, prolifération de tissu fibreux (Kilgore *et al.*, 1983).

G. *les myopathies d'origine circulatoire (ischémique)*

Les séquelles d'une ischémie sur les fibres musculaires dépendent avant tout de sa durée. Après une hypoxie tissulaire de quelques heures, on observe une coagulation des protéines contractiles des myofibrilles, tandis que les autres structures cellulaires sont préservées. La régénération par formation de myotubes permet de restaurer une structure et une fonction normales en vingt jours environ. Si l'ischémie dure entre six et vingt-quatre heures, on observe une nécrose multifocale des fibres et des noyaux des cellules satellites. La capacité de régénération ultérieure est moindre et l'observation histologique révèle un « patchwork » de cellules normales, de fibres régénérées et de petites zones fibreuses cicatricielles. Au-delà de vingt-quatre heures, toutes les fibres du territoire ischémié sont nécrosées, ce qui entraîne des séquelles définitives : une perte de fonction et une réaction cicatricielle fibreuse (Van Vleet et Valentine, 2007). Parmi les myopathies d'origine ischémique, on peut citer deux entités : les myoneuropathies postanesthésiques (localisées ou généralisées) et les myopathies post-thrombotiques. L'incidence des myopathies postanesthésiques a augmenté très largement depuis l'utilisation des anesthésies gazeuses, particulièrement à l'halothane. Elles peuvent se présenter sous deux formes : localisée ou généralisée, cette dernière étant assez similaire à l'hyperthermie maligne décrite chez l'homme et chez le porc (Manley *et al.*, 1983). Dans les deux formes, on note une augmentation des CK dans le sang.

La *myopathie postanesthésique localisée* est une maladie qui entretient les muscles en contact avec des surfaces dures ou les muscles dont la vascularisation est entravée à la suite d'une position anormale. Elle affecte plus spécifiquement les chevaux sportifs, bien musclés, de tous âges, après une anesthésie à l'halothane avec un décubitus latéral ou dorsal prolongé. Les muscles les plus fréquemment lésés sont le triceps, le deltoïde, le masséter, les extenseurs postérieurs et même les adducteurs et les fessiers lors de décubitus dorsal (Lindsay *et al.*, 1989 ; Valberg et Hodgson, 2002). Une atteinte concomitante des nerfs périphériques ne peut pas être écartée (Hennig et Court, 1991). Les muscles atteints sont tuméfiés, chauds et douloureux à la palpation. Le cheval évite de prendre appui sur le membre lésé et peut présenter de l'ataxie, voire un décubitus. Le pronostic est généralement bon et le cheval récupère en quelques heures ou quelques jours. Cette myopathie postanesthésique localisée

résulte de l'ischémie consécutive à la compression locale des masses musculaires et à l'hypotension systémique liée à l'anesthésie. L'augmentation de l'efflux de lactate à partir des muscles comprimés confirme que l'oxygénation est moins bonne chez les chevaux anesthésiés à l'halothane (Lindsay *et al.*, 1989). Le risque de myopathie postanesthésique augmente si la pression artérielle descend en dessous de 60 mmHg pendant plusieurs heures au cours d'une anesthésie gazeuse (Valberg et Hodgson, 2002). Une production accrue de radicaux libres au cours de la phase de reperfusion postischémique pourrait également intervenir dans la genèse des lésions (Serteyn *et al.*, 1994). L'examen nécropsique révèle des muscles de couleur sombre. L'examen microscopique met en évidence des fibres dégénérées, des fibres régénérées, des foyers de cicatrisation fibreuse et la présence occasionnelle de fibres en anneaux, ce qui suggère une atteinte nerveuse. Les altérations morphologiques précoces (dilatations mitochondriales, séparation des myofibrilles, etc) des fibres de type II précèdent celles des fibres de type I (Hodgson, 1999). Si l'ischémie persiste, toutes les fibres exhibent de la dégénérescence hyaline et des fragmentations. L'atteinte plus précoce des fibres de type II pourrait s'expliquer par le fait qu'elles sont irriguées par des capillaires moins nombreux que les fibres de type I de même taille (Van Vleet et Valentine, 2007).

La *myopathie postanesthésique généralisée*, également dénommée *hyperthermie maligne*, se caractérise par une hyperthermie et une acidose associées à une nécrose musculaire localisée, plus particulièrement aux membres postérieurs suite à une anesthésie gazeuse à l'halothane. Les signes cliniques incluent une anxiété, de la tachycardie, de la tachypnée, de la sudation et une myoglobinurie (Hennig et Court, 1991). Dans certains cas, la température corporelle augmente déjà pendant l'anesthésie, de même qu'apparaissent des contractures musculaires et une acidose métabolique (Manley *et al.*, 1983). Le pronostic est réservé. Dans cette forme généralisée, l'hypotension artérielle systémique et la compression de la forme localisée seraient accompagnées de perturbations systémiques consécutives au stress de l'anesthésie et à la sensibilité des cellules musculaires aux agents anesthésiques ou relaxants tels que l'halothane et la succinylcholine. Sur un plan physiopathologique et par analogie avec le porc et l'homme, on postule l'existence d'un excès de libération de calcium par le réticulum sarcoplasmique, lequel induit des contractures musculaires et produit de la chaleur (Valberg et Hodgson, 2002). D'autre part, chez les chevaux, il existerait une association entre la myopathie d'exercice, la myopathie postanesthésique et l'hyperthermie maligne. Cette association supposée repose sur les résultats livrés par le test fonctionnel qui utilise la provocation d'une biopsie musculaire par la caféine : chez les chevaux sensibles, les fibres

musculaires se contractent à des concentrations plus faibles que chez les chevaux normaux (Manley *et al.*, 1983). Une composante génétique a été évoquée (Van Vleet, 1997).

La myopathie post-thrombotique. Lors de thrombose sténosante ou occlusive d'une artère importante irriguant un membre, celui-ci devient froid, avec perte du pouls artériel, perte de la sudation cutanée et boiterie (Reef *et al.*, 1987). Ces conséquences peuvent n'être que transitoires du fait du développement d'une circulation collatérale. On peut néanmoins observer de la dégénérescence musculaire mais la régénération est rapide et complète. La cause la plus fréquente d'un tel syndrome est une endartérite thrombosante d'origine parasitaire due à *strongylus vulgaris* (Van Vleet et Valentine, 2007).

H. *la myopathie atypique*

Décrite pour la première fois en 1939 en Grande-Bretagne (Bowen et Craig, 1942), c'est en 1984, suite à une série de cas survenus en Ecosse (Hosie *et al.*, 1986), que cette maladie a été reconnue comme une entité spécifique. Depuis, elle a été rapportée dans de nombreux pays, sous diverses dénominations, dont *myoglobinurie atypique* (Anonymous, 1985), myopathie saisonnière de pâture ou rhabdomyolyse de pâture (Finno *et al.*, 2006). Depuis l'automne 2000, plusieurs dizaines de cas ont été identifiés en Belgique (Delguste *et al.*, 2002 ; Votion *et al.*, 2003 ; Cassart *et al.*, 2007).

Le terme « atypique » fait référence au caractère tout à fait inhabituel de ses conditions d'apparition. En effet, elle atteint des chevaux et des poneys en prairie, peu ou pas supplémentés, n'ayant fourni aucun exercice, et sans carence significative en vitamine E et/ou sélénium (Delguste *et al.*, 2002). Cette maladie présente un caractère saisonnier. Elle est observée au printemps ou en automne, dans des conditions climatiques humides. Le tableau clinique se caractérise par de la raideur, des douleurs musculaires, des tremblements, une difficulté à se déplacer, un décubitus, de la myoglobinurie, de la tachycardie, de la polypnée et /ou dyspnée et de la sudation (Brandt *et al.*, 1997 ; Delguste *et al.*, 2002). L'issue est fatale dans environ 80% des cas (Votion *et al.*, 2003) et la mort survient 12 à 72 heures après l'apparition des premiers symptômes. Une augmentation spectaculaire des CK est toujours observée. A l'autopsie, les lésions musculaires sont rarement visibles. Dans quelques cas, on observe un aspect bicolore de certains muscles squelettiques (dans la région de l'épaule et du cou surtout, parfois au niveau des fessiers, des intercostaux et/ou du diaphragme) et

éventuellement du myocarde (Delguste *et al.*, 2002). Les lésions microscopiques révèlent une atteinte préférentielle mais non exhaustive des fibres de type I ; les muscles cibles étant les muscles posturaux et respiratoires, particulièrement riches en fibres de type I (Votion *et al.*, 2003). Ces lésions histopathologiques sont caractérisées par une dégénérescence segmentaire multifocale plutôt monophasique des fibres musculaires striées squelettiques, un afflux occasionnel de macrophages et la présence de gouttelettes lipidiques dans le sarcoplasme (Harris et Whitwell, 1990 ; Cassart *et al.*, 2007).

Le myocarde peut également présenter des lésions microscopiques avec dégénérescence plutôt granuleuse, présence de gouttelettes lipidiques et éventuellement afflux de macrophages. La mort est soit la conséquence directe d'une défaillance cardiaque, soit est due à l'asphyxie consécutive à l'œdème pulmonaire secondaire à l'insuffisance cardiaque et à l'atteinte des muscles respiratoires. L'étiologie est inconnue, l'hypothèse d'une atteinte primaire mitochondriale a néanmoins été avancée sur base des lésions microscopiques et ultrastructurales. Cette hypothèse est compatible avec une origine toxique au sens le plus large (Cassart *et al.*, 2007). Une autre hypothèse, suggérant l'intervention de germes anaérobies de type *Clostridium*, a également été évoquée (Gerber *et al.*, 2006). Le diagnostic de cette myopathie atypique est basé sur l'anamnèse, les signes cliniques et les lésions microscopiques (Votion *et al.*, 2003).

3.3. Les myopathies caractérisées par un infiltrat interstitiel

3.3.1. *Les myopathies inflammatoires (myosites)*

Les processus inflammatoires du muscle strié squelettique entreprennent à la fois les fibres musculaires et le tissu interstitiel (Van Vleet, 1997). Curieusement, le diagnostic différentiel entre myosite et myopathie dégénérative peut s'avérer difficile, surtout dans les cas moins aigus, puisque la réaction inflammatoire induit des altérations dégénératives secondaires et que, à l'inverse, les altérations régressives du muscle entraînent une infiltration secondaire de l'interstitium par des cellules de l'inflammation (Van Vleet et Valentine, 2007). Généralement, les myosites primitives, dont il sera question dans cette section, sont associées à des infections bactériennes, virales ou parasitaires. Elles peuvent également être à médiation immunitaire (De Girolami et Anthony, 2000).

A. les myosites bactériennes

La myosite clostridienne du cheval, également dénommée *cellulite anaérobie*, *œdème malin* ou *gangrène gazeuse* (MacLeay, 2004) est souvent secondaire. Elle peut faire suite à des injections intramusculaires (Vengust *et al.*, 2003) ou accidentellement périveineuses (Peek *et al.*, 2003), à des blessures, à une intervention chirurgicale (castration) ou au part (MacLeay, 2004). Lors de myosite secondaire à une injection intramusculaire, la technique d'injection est moins en cause que la substance injectée. Ainsi l'association flunixin-méglumine, l'ivermectine, la phénylbutazone, les antihistaminiques, les complexes vitaminés, les prostaglandines synthétiques et certains vaccins sont connus pour n'être pas dénués de risque (Vengust *et al.*, 2003). Les localisations les plus fréquentes des myosites clostridiennes sont les sites d'injection ou les endroits exposés aux traumatismes comme le cou, les muscles fessiers, les semi-tendineux et les semi-membraneux (Peek *et al.*, 2003). Chez le cheval, les agents anaérobies les plus fréquents sont, par ordre décroissant, *Clostridium perfringens*, *C. septicum*, *C. chauvoei*, *C. sordellii*, *C. novyi* et *C. fallax* (Peek *et al.*, 2003 ; Vengust *et al.*, 2003 ; Van Vleet et Valentine, 2007). La question de savoir si les clostridies incriminées ou leurs spores sont réellement inoculées ou si elles dérivent de spores préinstallées que des conditions particulières ont réactivées reste difficile à trancher (Vengust *et al.*, 2003). Lors de blessures, il est aisé d'imaginer une contamination par les spores de clostridies présentes dans la terre et les matières fécales. Pour les myosites associées à des sites d'injection, certains auteurs suggèrent que des spores dormantes, arrivées dans les muscles via le foie et la circulation à partir du tractus digestif, pourraient germer et proliférer si le tissu musculaire est moins bien oxygéné (Vengust *et al.*, 2003 ; Van Vleet et Valentine, 2007). La prolifération des clostridies entraîne la libération de toxines responsables d'une nécrose musculaire locale et d'une toxémie. La nature des toxines varie selon le type de clostridies mais les toxines nécrosantes (lécithinases) et hémolytiques (hémolysines) sont les plus dommageables (Valberg et Hodgson, 2002). Les signes cliniques apparaissent rapidement et sont intenses : tuméfaction musculaire avec douleur et chaleur au début, rapidement suivies de froideur, d'insensibilité ou de crépitements sous-cutanés. Lorsque les lésions sont ouvertes, il peut y avoir un écoulement d'exsudat brunâtre, séro-hémorragique et malodorant. Ces altérations locales sont accompagnées de signes généraux : fièvre, anorexie, asthénie, ataxie, tachypnée, dyspnée, tremblements et décubitus. Dans les cas les plus graves, la mort par toxémie peut intervenir dans un délai de 24 à 48 heures. Le pronostic est généralement sombre et la mortalité élevée (Rebhun *et al.*, 1985). En outre, les animaux morts de toxémie clostridienne

présentent un gonflement rapide du cadavre avec autolyse, crépitements sous-cutanés et présence d'un exsudat séro-hémorragique brunâtre dans les muscles qui dégagent une odeur de beurre rance. Ces lésions locales sont accompagnées des lésions générales caractéristiques de toxémie. Les lésions microscopiques consistent en de larges zones de nécrose avec, en périphérie, une dégénérescence des fibres musculaires accompagnée d'œdème, de polymorphonucléaires neutrophiles et de colonies bactériennes (Van Vleet et Valentine, 2007).

Les myosites à Streptococcus equi equi. Célèbre pour être responsable de la gourme, cette bactérie est également capable de causer plusieurs entités pathologiques affectant la musculature striée : un purpura hémorragique, une atrophie lombo-fessière et une rhabdomyolyse aiguë sévère.

Le purpura hémorragique. Lors d'exposition à, ou de vaccination contre *S. equi equi*, les chevaux peuvent développer une vasculite thrombosante sévère et généralisée caractérisée par la présence d'infarcti de la peau, du tractus gastro intestinal, des poumons et des muscles. Cette vasculite est due à la formation et au dépôt de complexes immuns constitués d'IgA et de la protéine streptococcique M. Il s'agit d'une hypersensibilité de type 3 (Valberg et Hodgson, 2002). Les signes cliniques sont généraux. On observe de la fièvre, de l'asthénie, de l'anorexie, de la douleur musculaire, une démarche raide, une augmentation des CK et une leucocytose neutrophilique (Freestone et Carlson, 1991). A l'autopsie, on observe un purpura et des infarcti hémorragiques dans différents organes et dans les muscles striés. Microscopiquement, au niveau du tissu musculaire, on note une nécrose des fibres musculaires avec hémorragies et présence d'un infiltrat lymphocytaire en périphérie des infarcti, une nécrose fibrinoïde des parois vasculaires et des réactions de vasculite aiguë (Valentine *et al.*, 2002).

L'atrophie lombo-fessière. Il s'agit d'une seconde forme de myosite à médiation immunitaire liée à une exposition à *S. equi equi*. Cette maladie est décrite chez les *Quarter Horse*. La réaction immunopathologique fait intervenir les IgG et serait consécutive à une similarité antigénique entre la protéine M de certains streptocoques et la myosine (MacLeay, 2004). Les manifestations cliniques consistent en une fonte des muscles fessiers et lombaires en une à deux semaines avec augmentation concomitante des CK. Les animaux conservent un bon état général. L'examen histopathologique des muscles atteints révèle une atrophie des fibres

musculaires (surtout de type II), la présence d'un infiltrat inflammatoire diffus et d'une vasculite inflammatoire ainsi que des foyers de dégénérescence et de régénération (Valberg et Hodgson, 2002).

La rhabdomyolyse aiguë. Cette maladie est la complication fatale d'une infection à *S. equi equi* chez de jeunes chevaux *Quarter Horse*. Sa physiopathologie n'est pas claire et les signes cliniques sont ceux d'un choc toxinique. Il pourrait s'agir d'une stimulation non spécifique des lymphocytes T par les superantigènes streptococciques avec libération massive de cytokines inflammatoires. Le scénario inclut une bactériémie suivie d'une multiplication locale des streptocoques produisant des exotoxines ou des protéases dans les muscles (Sponseller *et al.*, 2005). Sur le plan symptomatologique, on observe de la fièvre, de la raideur, une augmentation des CK, un décubitus, puis la mort. A l'autopsie, on note des zones pâles au niveau des muscles semi-membraneux, semi-tendineux, fessiers, quadriceps fémoraux et laryngés. Les lésions microscopiques consistent en une myonécrose avec infiltration de macrophages.

Les myosites abcédatives (purulentes). Ces lésions peuvent être d'origine hématogène ou consécutives à une inoculation ou à l'extension d'un foyer voisin (MacLeay, 2004 ; Van Vleet et Valentine, 2007). *Staphylococcus aureus*, un des agents étiologiques les plus fréquents, peut être responsable de l'apparition d'abcès ou de granulomes dans les régions cervicale et pectorale lors d'infections persistantes. Les lésions microscopiques sont assez semblables à celles observées dans les cas de botriomyose avec, au centre, des colonies bactériennes entourées d'un matériel protéique puis d'un infiltrat inflammatoire constitué de neutrophiles, de lymphocytes, de macrophages et, dans la partie la plus externe, de tissu fibreux lâche. Les fibres musculaires montrent de la dégénérescence et/ou de l'atrophie (Van Vleet et Valentine, 2007).

Corynebacterium pseudotuberculosis et Streptococcus equi zooepidemicus peuvent également être responsables de lésions abcédatives. Les signes cliniques sont variables, soit localisés avec gonflement, chaleur et douleur, soit généralisés avec fièvre, anorexie, asthénie et amaigrissement (MacLeay, 2004). Des lésions musculaires suppurées ont également été associées à une infection par *Salmonella infantum*, chez un cheval *Quarter Horse* de cinq ans présentant des nodules au niveau du cou et des épaules (Pellegrini-Masini *et al.*, 2004).

B. *les myosites virales*

Des nécroses musculaires et cardiaques sont parfois associées à des maladies virales dues aux virus influenza A, EHV1 et de l'anémie infectieuse équine. Il s'agit d'une des manifestations locales d'une atteinte systémique. En plus des signes cliniques spécifiques à chaque virus, on observe des myalgies, une myoglobulinurie, une augmentation des CK et de la raideur musculaire (Valberg et Hodgson, 2002). L'examen microscopique des muscles met en évidence une dégénérescence des fibres, de l'œdème et un infiltrat inflammatoire aigu à subaigu (Freestone et Carlson, 1991).

C. *les myosites parasitaires*

Les sarcocystes. Il existe deux espèces de sarcocystes à tropisme musculaire chez le cheval : *Sarcocystis bertrami* en Europe et *Sarcocystis fayeri* aux Etats-Unis. La prévalence de l'infestation est élevée mais elle ne provoque que rarement des signes cliniques chez l'hôte intermédiaire (Traub-Dargatz *et al.*, 1994). L'infestation provient d'une contamination de la nourriture, de l'herbe, par des matières fécales de carnivores et plus particulièrement de chiens (Valberg et Hodgson, 2002). Ces parasites ont une reproduction asexuée dans les endothéliums vasculaires et dans les myocytes des hôtes intermédiaires où ils forment de petits kystes qui peuvent persister pendant de longues périodes (Van Vleet et Valentine, 2007). Lors d'infestation sévère, les signes cliniques peuvent être de deux types : (1) fièvre, pétéchies, œdème, anémie, ictère pendant la période parasitémique ou (2) faiblesse musculaire, boiterie, raideur, fasciculations, troubles de la mastication et de la déglutition, léthargie et amaigrissement (Freestone et Carlson, 1991 ; Traub-Dargatz *et al.*, 1994). Les lésions histopathologiques comprennent une dégénérescence musculaire et la présence de kystes parasitaires ceinturés par un infiltrat inflammatoire de macrophages (Traub-Dargatz *et al.*, 1994).

Les nématodes. Le seul nématode connu pouvant coloniser les fibres musculaires du cheval est *Trichinella spiralis* mais cette infestation est rare et asymptomatique (MacLeay, 2004). Un cas d'infestation d'un cheval par un nématode appelé « hayckonema-like » a été rapporté en Suisse avec atteinte des masséters, de la langue et des muscles du poitrail (Eckert et Ossent, 2006).

3.3.2. Les myopathies néoplasiques

Les tumeurs présentes dans les muscles sont soit primitives, soit métastatiques. Les tumeurs primitives du muscle trouvent leur origine dans la fibre musculaire mais aussi dans les cellules mésenchymateuses de l'interstitium (Van Vleet et Valentine, 2007). Les tumeurs primaires de la fibre musculaire striée squelettique sont le rhabdomyome et le rhabdomyosarcome. Ces deux tumeurs sont extrêmement rares ; les rhabdomyosarcomes seraient néanmoins deux fois plus fréquents que les tumeurs bénignes, toutes espèces confondues. Cette rareté engendre une difficulté à les caractériser. Chez le cheval, seul un cas de rhabdomyome diaphragmatique de type kystique a été rapporté chez une pouliche de deux ans (Cooper et Valentine, 2002).

Quant aux rhabdomyosarcomes, ils sont généralement localisés au niveau de la tête, du cou et des membres ; ces tumeurs malignes apparaissent souvent sur d'anciennes lésions musculaires avec cicatrisation (MacLeay, 2004). Histologiquement, le rhabdomyome est constitué de grandes cellules polygonales à cytoplasme très éosinophile abondant avec ou sans striations. Les caractères histologiques qui les différencient du tissu musculaire strié squelettique normal sont la variabilité de la taille des cellules, l'absence éventuelle de striations et un léger pléomorphisme nucléaire. Le rhabdomyosarcome se caractérise par des cellules plus petites, un grand pléomorphisme cellulaire, l'absence de striations, la présence de cellules multinucléées avec noyaux périphériques et un cytoplasme moins abondant et plus pâle (Cooper et Valentine, 2002).

Des tumeurs peuvent également se développer à partir des vaisseaux sanguins du muscle ; il s'agit d'une prolifération de cellules allongées de nature endothéliale, formant des conduits vasculaires irréguliers. Ces tumeurs bénignes, les hémangiomes, ou malignes, les hémangiosarcomes, ont généralement un aspect hémorragique et peuvent être confondues avec un hématome intramusculaire. Les rares cas décrits chez le cheval sont des hémangiosarcomes (Cooper et Valentine, 2002).

On décrit également une tumeur musculaire bénigne impliquant les cellules adipeuses : le lipome infiltrant. Il s'agit d'une prolifération d'adipocytes bien différenciés s'infiltrant non seulement entre les faisceaux musculaires mais aussi entre les myocytes (Van Vleet et Valentine, 2007).

Des tumeurs métastatiques peuvent également être observées ; il s'agit de tumeurs malignes dont l'origine n'est pas le tissu musculaire, et qui colonisent le tissu interstitiel plutôt que le tissu musculaire (Van Vleet et Valentine, 2007). Chez le cheval, des métastases par contiguïté de mélanomes et de carcinomes à cellules squameuses ont notamment été observées dans les muscles de l'arrière-main (observation personnelle).

3.4. Les myopathies dénuées d'expression morphologique typique

3.4.1. L'arthrogrypose (rigidité articulaire congénitale)

Cette maladie, qui peut entreprendre un ou plusieurs membres du poulain nouveau-né, est d'origine neurogénique. Elle se caractérise par une diminution du nombre ou par des anomalies des neurones moteurs des cornes ventrales de la moelle épinière. L'affection est généralement bilatérale et létale *in utero* sauf dans de rares cas où elle est unilatérale et où le poulain naît vivant. Macroscopiquement, on perçoit un déficit de masse musculaire sur le, ou les membres atteints. Dans certains cas, la masse musculaire semble normale de loin mais un examen détaillé révèle que le tissu musculaire est remplacé par du tissu adipeux. Plusieurs images histopathologiques sont possibles : des faisceaux musculaires normaux, des faisceaux constitués de fibres atrophiées ou des faisceaux composés d'un mélange de fibres anormalement petites qui jouxtent des fibres d'aspect hypertrophique. Dans tous les cas cependant, les faisceaux sont séparés les uns des autres par un abondant tissu adipeux avec présence de tissu fibreux au voisinage des articulations. Il faut également noter une tendance aux regroupements de fibres de même type, probablement lié à une innervation collatérale (Mayhew, 1984 ; Van Vleet et Valentine, 2007).

3.4.2. L'hypocalcémie

Il s'agit d'une maladie affectant le tonus musculaire. Les signes cliniques sont assez similaires à ceux qui se manifestent lors de tétanos, avec augmentation du tonus musculaire, raideurs, ataxie postérieure, fasciculations musculaires et trismus. Sur le plan général, on observe de la dysphagie, une dilatation des naseaux, de la salivation, de l'anxiété, de la sudation, de la tachycardie, des arythmies cardiaques, des convulsions et éventuellement un coma, puis la mort (Valberg et Hodgson, 2002). Cette maladie a reçu diverses appellations telles que *tétanie de lactation*, *tétanie de transport*, *hypocalcémie idiopathique* ou encore *éclampsie*.

Typiquement, elle affecte les juments en lactation (Baird, 1971). Un exercice prolongé ou un transport peuvent favoriser le déclenchement de la maladie. L'anamnèse, les signes cliniques et l'hypocalcémie, confirmée par une analyse sanguine ou par un test thérapeutique avec disparition des symptômes suite à l'administration intraveineuse de calcium, permettent de poser le diagnostic. Cette maladie n'entraîne aucune altération morphologique.

3.4.3. La myotonie

Cette maladie du tonus musculaire se caractérise par une contraction anormalement prolongée de la musculature striée squelettique en réponse à une stimulation. Chez le cheval, bien que la maladie soit congénitale, les premiers signes cliniques apparaissent entre la naissance et l'âge de deux ans. Le plus souvent, elle est détectée entre deux et quatre mois.

La myotonie est la conséquence d'une anomalie de la conduction électrique à travers la membrane de la fibre musculaire suite à des dysfonctionnements des canaux à ions. Chez le cheval, l'étiologie précise reste indéterminée (Van Vleet et Valentine, 2007). Bien que peu de cas aient été répertoriés chez le cheval, l'incidence semble être plus grande chez les *Quarter Horse*, les pur-sang et les trotteurs (Valberg et Hodgson, 2002). Les quatre membres peuvent être affectés mais les membres postérieurs le sont plus fréquemment. Les poulains atteints ont une démarche anormale avec raideur mais aussi parfois asthénie et difficulté à se relever. A l'examen clinique, la stimulation musculaire par percussion induit une contraction musculaire localisée prolongée d'une minute ou plus, créant une impression de « fossette » entre le ou les muscles atteints et les autres muscles (Hodgson, 1999).

Macroscopiquement, les muscles entrepris peuvent être soit augmentés de volume, soit atrophiés. L'augmentation de volume est liée à la présence de dépôts graisseux et fibreux surajoutés. Le diagnostic de certitude de la myotonie est basé sur l'électromyogramme (Jamison *et al.*, 1987).

L'examen histopathologique révèle des modifications très diverses. De surcroît, tous les muscles fonctionnellement défailants ne présentent pas nécessairement des lésions (Valberg et Hodgson, 2002). Les lésions microscopiques les plus fréquemment observées consistent en une grande variation de la taille et de la forme des fibres, une modification de la proportion relative des divers types de fibres à l'avantage des fibres de type I et, parfois, un

regroupement des fibres de même type. On observe également des masses sarcoplasmiques pâles, la présence de noyaux internes, de grandes cellules incomplètement cloisonnées suggérant des subdivisions incomplètes, quelques images de dégénérescence segmentaire, la présence de petites vacuoles claires, de rares fibres en anneaux et un épaississement des tissus interstitiels périnysial et endomysial (Jamison *et al.*, 1987 ; Valberg et Hodgson, 2002 ; Van Vleet et Valentine, 2007).

Des signes cliniques comparables à des épisodes de myotonie et associés à une procidence de la troisième paupière ont été rapportés chez le cheval dans des cas d'infestation massive par des tiques dans les oreilles (Madigan *et al.*, 1995).

3.4.4. L'hyperkaliémie périodique paralysante

Cette entité, également dénommée *syndrome paramyotonique*, peut également être classée parmi les myopathies consécutives à des dysfonctionnements des canaux à ions (Van Vleet et Valentine, 2007). Cette maladie, héréditaire, dont la transmission se fait selon un mode autosomal dominant (Naylor, 1997), affecte les chevaux *Quarter Horse*, *Paint*, *Apaloosa* et croisés *Quarter Horse*. Une recherche généalogique a en effet permis de remonter à un seul étalon *Quarter Horse*, baptisé « *Impressive* », ce qui explique la dénomination occasionnelle de « *Impressive disease* » (MacLeay, 2004).

Cette maladie est la conséquence d'une mutation dans un domaine transmembranaire de la sous-unité alpha du canal à ion sodium entraînant une durée d'ouverture allongée (Naylor, 1994). Chez les chevaux normaux, l'entrée de sodium par les canaux à ions dans la cellule musculaire permet une dépolarisation membranaire ; lorsque la membrane est dépolarisée, les canaux à ions Na se ferment et les canaux à ions K s'ouvrent pour initier la repolarisation membranaire par sortie des ions potassium. Chez les chevaux atteints, les canaux à ions sodium restent ouverts, le potentiel de membrane diminue, entraînant un état de dépolarisation permanente où le potentiel membranaire de repos est très proche du potentiel d'action. L'entrée accrue de sodium dans la cellule est compensée par une sortie de potassium, ce qui explique l'hyperkaliémie (Naylor, 1997). L'épisode de myotonie est lié à un niveau de dépolarisation tel que l'excitabilité est encore possible tandis que l'asthénie est la conséquence d'une dépolarisation accrue qui entraîne une inexcitabilité membranaire (Naylor, 1994). Les animaux homozygotes présentent des signes cliniques sévères : des spasmes

laryngés, de la dysphagie et de l'émaciation. Les hétérozygotes présentent des crises intermittentes qui durent en moyenne de 15 à 60 minutes ; entre ces crises, les chevaux ont un comportement normal. Les symptômes commencent par une phase de myotonie avec fasciculations musculaires, sudation et procidence de la troisième paupière, et se poursuivent par une faiblesse et une hypotonie généralisées qui se traduisent par un décubitus involontaire chez un animal néanmoins toujours conscient.

Contrairement à la myotonie, les crises d'hyperkaliémie périodique paralysante sont favorisées par différents facteurs tel que le froid, l'exercice, la gestation, des rations riches en potassium et l'inhalation d'anesthésiques gazeux. L'hyperkaliémie périodique paralysante n'est que rarement mortelle (Valberg et Hodgson, 2002). La confirmation du diagnostic est basée sur un test ADN. Chez le cheval, aucune modification histologique n'a été observée (Van Vleet et Valentine, 2007).

3.4.5. La myopathie d'épuisement

Rencontrée chez les chevaux d'endurance lors de conditions climatiques chaudes et humides, cette maladie se caractérise par de l'hyperthermie, de la dépression et de la déshydratation. Les chevaux présentent aussi des signes de douleur, de la raideur, des crampes et même des spasmes des muscles de la locomotion (Foreman, 1998). Bien que les manifestations de dysfonctionnement musculaire soient similaires à celles de la myopathie d'exercice, elle ne s'accompagne ni de myoglobinurie, ni d'une augmentation significative des CK sériques. Cette myopathie est liée à la déshydratation, au déséquilibre électrolytique et à des perturbations de la thermorégulation et de la circulation locale (Valberg et Hodgson, 2002). La myopathie d'épuisement est parfois accompagnée d'un « flutter diaphragmatique » qui se manifeste par une contraction spastique du diaphragme synchronisée avec la dépolarisation auriculaire. Une hypothèse postule que les déséquilibres électrolytique et acidobasique perturbent le potentiel de membrane du nerf phrénique qui serait stimulé lors de la dépolarisation cardiaque (Hinton *et al.*, 1976). Cette myopathie ne s'accompagne d'aucune lésion ni macroscopique, ni microscopique.

3.4.6. Les myopathies mitochondriales

Un cas de déficience en complexe enzymatique I de la chaîne respiratoire mitochondriale a été rapporté chez un jument arabe référée pour intolérance à l'effort et raideurs musculaires. Ce cheval ne montrait pas d'augmentation des CK après l'exercice, ce qui a permis d'exclure la présence d'une rhabdomyolyse. Par contre, cet animal a révélé un degré d'acidose lactique proportionnel à l'effort imposé et une consommation en oxygène très faible. La biopsie musculaire a mis en évidence de gros agrégats de mitochondries dont les crêtes apparaissaient anormales. Quant aux analyses biochimiques, elles ont révélé une activité très faible de la NADH CoQ réductase. L'intolérance à l'effort et les raideurs musculaires ont été attribuées à un métabolisme oxydatif altéré (Valberg *et al.*, 1994).

Une déficience multiple en acétyl coenzyme A déshydrogénases (MADD) a été identifiée chez deux chevaux avec des signes cliniques de myopathie aiguë. Une augmentation des acétylcarnitines a été mise en évidence dans le sang mais aussi dans les urines. Les mesures de l'activité enzymatique dans le tissu musculaire montrent une déficience en acétyl coenzyme A déshydrogénases des acides gras à chaînes courtes et à chaînes moyennes et de l'acide isovalérique. Les lésions histologiques musculaires se caractérisent par une accumulation de lipides dans les fibres de type I et les lésions ultrastructurales montrent des altérations mitochondriales (Westermann *et al.*, 2007).

4. BIBLIOGRAPHIE

- ALEMAN M., WATSON J.L., WILLIAMS D.C., LECOUTEUR R.A., NIETO J.E., SHELTON G.D. Myopathy in horses with pituitary pars intermedia dysfunction (Cushing's disease). *Neuromuscul Disord.*, 2006, **16** :11, 737-744.
- ANTOINE N. Les tissus musculaires. In : Histologie générale des animaux domestiques. Syllabus de second baccalauréat. Office des Cours (Ed)., Faculté de Médecine vétérinaire, 2006, 84-106.
- ANONYMOUS. Atypical myoglobinuria : a new disease in horses ? *Vet. Rec.*, 1985, **116** : special report, 86-87.
- ART T., AMORY H., LEKEUX P. Affections musculaires et intolérance à l'effort. 1. Pathogénie et approche diagnostique. *Prat Vét Equine*, 2000, **32**, 59-69.
- BAIRD J.D. Lactation tetany (eclampsia) in a Shetland pony mare. *Aust Vet, J*, 1971, **47**, 402-404.
- BEECH J. Chronic exertional rhabdomyolysis. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1997, **13** : 1, 145-168
- BEIER R.C., NORMAN J.O., REAGOR J.C., REES M.S., MUNDY BP. Isolation of the major component in white snakeroot that is toxic after microsomal activation : possible explanation of sporadic toxicity of white snakeroot plants and extracts. *Nat Toxins.*, 1993, **1** : 5, 286-293.
- BEZERRA P.S.JR., SILVA-ILHA M.R., LANGOHR I.M., BARROS C.S.L. Intoxicação experimental por monensina em eqüinos. *Pesq Vet Bras.*, 2000, 20: 3, 102-108.
- BOWEN J.N., CRAIG J.F. Myoglobinuria in horses. *Vet. Rec.*, 1942, **35**: 54, 354-355.
- BRANDT K., HINRICHS U., GLITZ F., LANDES E., SCHULZE C., DEEGEN E., POHLENZ J., COENEN M. Atypische Myoglobinurie der Weidepferde. *Pferdeheilkunde*, 1997, **13**, 27-34.
- CALORE E.E., CAVALIERE M.J., HARAGUCHI M., GORNIAC S.L., DAGLI M.L., RASPANTINI P.C., PEREZ CALORE N.M. Experimental mitochondrial myopathy induced by chronic intoxication by Senna occidentalis seeds. *J Neurol Sci.*, 1997, **146**:1, 1-6.
- CASSART D., BAISE E., CHEREL Y., DELGUSTE C., ANTOINE N., VOTION D., AMORY H., ROLLIN F., LINDEN A., COIGNOUL F., DESMECHT D. Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy. *Equine Vet J.*, 2007, **39** : 1, 26-32.
- CAVALIERE M.J., CALORE E.E., HARAGUCHI M., GORNIAC S.L., DAGLI M.L., RASPANTINI P.C., CALORE N.M., WEG R. Mitochondrial myopathy in Senna occidentalis-seed-fed chicken. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 1997, **37** : 2,181-185.

- COOPER B.J., VALENTINE B.A. Tumors of striated muscle. In : MEUTEN D.J., Tumors in domestic animals. Iowa State Press, a Blackwell Publishing company : 2002, 341-363.
- DE GIROLAMI U., ANTHONY D.C. Diseases of Skeletal Muscle and Peripheral Nerve. In : Richard Dickersin G., Diagnostic Electron Microscopy. Springer. Verlag : New-York, 2000, 912-988.
- DE LA CORTE F.D., VALBERG S.J., MCLEAY J.M., MICKELSON J.R. Developmental onset of polysaccharide storage myopathy in 4 Quarter Horse foals. *J Vet Intern Med.*, 2002, **16**, 581-587.
- DELGUSTE C., CASSART D., BAISE E., LINDEN A., SCHWARZWALD C., FEIGE K., SANDERSEN C., ROLLIN F., AMORY H. Myopathies atypiques chez les chevaux au pré : une série de cas en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 235-248.
- DILL S.G., REBHUN W.C. White muscle disease in foals. *Compend Cont Ed*, 1985, **7** : 11, S627, S634.
- DRANCHAK P.K., VALBERG S.J., ONAN G.W., GALLANT E.M., MACLEAY J.M., MACKENZIE E.C., DE LA CORTE F.D., EKENSTEDT K., MICKELSON J.R. Inheritance of recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc*, 2005, **227** : 5, 762-767.
- ECKERT J., OSSENT P. *Haycocknema*-like nematodes in muscle fibres of a horse. *Vet Parasitol*, 2006, **139**, 256-261.
- FINNO C.J., VALBERG S.J., WÜNSCHMANN A., MURPHY M.J. Seasonal pasture myopathy in horses in the Midwestern United States : 14 cases (1998-2005). *J Am Vet Med Assoc*, 2006, **229** : 7, 1134-1141.
- FIRSHMAN A.M., VALBERG S.J., BENDER J.B., ANNANDALE E.J., HAYDEN D.W. Comparison of histopathologic criteria and skeletal muscle fixation techniques for the diagnosis of polysaccharide storage myopathy in horses. *Vet Pathol.*, 2006, **43**, 257-269.
- FOREMAN J.H. The exhausted horse syndrome. *Vet Clin North Am Equine Prac.*, 1998, **14** : 1, 205-219.
- FREESTONE J.F., CARLSON G.P. Muscle disorders in the horse: a retrospective study. *Equine Vet J.*, 1991, **23** : 2, 86-90.
- GERBER V., STRAUB R., FREY J. Equine botulism and acute pasture myodystrophy : new soil-borne emerging diseases in Switzerland? *Schweiz Arch Tierheilkd.*, 2006, **148**:10, 553-559.
- GOMEZ-VILLAMANDOS R., SANTISTEBAN J., RUIZ I., AVILA I. Tenotomy of the tibial insertion of the semitendinosus muscle of two horses with fibrotic myopathy. *Vet Rec.*, 1995, 136, 67-68.
- GUIS S., MATTEI J.-P., COZZONE P.J., BENDAHAN D. Pathophysiology and clinical presentations of rhabdomyolysis. *Joint Bone Spine* 72, 2005, 382-391.

- HALL J.O. Toxic feed constituents in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, 2001, **17**:3, 479-489.
- HARRIS P., WHITWELL K.E. Atypical myoglobinuria alert. *Vet. Rec.*, 1990, **127**, 603.
- HENNIG G.E., COURT M.H. Equine postanesthetic myopathy: an update. *Continuing Education article #5, North American Edition*, 1991, **13** : 11, 1709-1714.
- HINTON M., YEATS J.J., HASTIE P;S. MCGUINNESS A., CONSTANCE L. Synchronous diaphragmatic flutter in horses. *Vet Rec*, 1976, **99**, 402-403.
- HODGSON D.R. Diseases of Muscle. In : Colaham P., Merritt A., Moore J., Mayhew J. (Eds), *Equine Medicine and Surgery*. Mosby Inc. 1999, 1483-1496.
- HOSIE B.D., GOULD P.W., HUNTER A.R., LOW J.C., MUNRO R., WILSON H.C. Acute myopathy in horses at grass in east and south east Scotland. *Vet. Rec.*, 1986, **119**, 444-449.
- JAMISON J.M., BAIRD J.D., SMITH-MAXIE L.L., HULLAND T.J. A congenital form of myotonia with dystrophic changes in a Quarterhorse. *Equine Vet J.*, 1987, **19** : 4, 353-358.
- KAKULAS B.A. Experimental muscle disease. In : Walton J, (Ed), *Disorders of voluntary muscle*. Churchill Livingstone : New-York, 1988, 427-454.
- KILGORE R.L., BROKKEN E.S., PULLIAM J.D., SEWARD R.S., FULTON R.K. Response of horses to repeated intra-muscular injections of ivermectin. *Vet Med*, 1983, **78**, 1894-1897.
- LENTZ L.R., VALBERG S.J., BALOG E.M., MICKELSON J.R., GALLANT E.M. Abnormal regulation of muscle contraction in horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Am J Vet Res*, 1999, **60** : 8, 992-999.
- LINDSAY W.A., ROBINSON G.M., BRUNSON D.B., MAJORS L.J. Induction of equine postanesthetic myositis after halothane-induced hypotension. *Am J Vet Res.*, 1989, **50** : 3, 404-410.
- LÖFSTEDT J. White muscle disease of foals. *Vet Clin North Am : Equine pract.*, 1997, **13** : 1, 169-185.
- MACEWEN S.A., HULLAND T.J. Histochemical and morphometric evaluation of skeletal muscle from horses with exertional rhabdomyolysis (tying-up). *Vet. Pathol.*, 1986, **23**, 400-410.
- MACLEAY J.M., SORUM S.A., VALBERG S.J., MARSH W.E., SORUM M.D. Epidemiologic analysis of factors influencing exertional rhabdomyolysis in Thoroughbreds. *Am J Vet Res.*, 1999, **60** : 12, 1562-1566.
- MACLEAY J.M., VALBERG S.J., SORUM S.A., SORUM M.D., KASSUBE T., SANTSCHI E.M., MICKELSON J.R., GEYER C.J. Heritability of recurrent exertional rhabdomyolysis in Thoroughbred racehorses. *Am J Vet Res*, 1999, **60** : 2, 250-256.

- MACLEAY J. Diseases of the musculoskeletal system. In : Reed S., Bayly W., Sellon D.(Eds.), Equine Internal Medicine. Saunders an imprint of Elsevier, 2004, 461-521.
- MADIGAN J.E., VALBERG S.J., RAGLE C., MOODY J.L. Muscle spasms associated with ear tick (*Otobius megnini*) infestations in five horses. *J Am Vet Med Assoc*, 1995, **207** : 1, 74-76.
- MANLEY S.V., KELLY A.B., HODGSON D. Malignant hyperthermia-like reactions in three anesthetized horses. *J Am Vet Med Assoc*, 1983, **183** : 1, 85-89.
- MARTIN B.W., TERRY M.K., BRIDGES C.H., BAILEY E.M. JR. Toxicity of *Cassia occidentalis* in the horse. *Vet Hum Toxicol.*, 1981, **23** : 6, 416-417.
- MATSUOKA T. Evaluation of monensin toxicity in the horse. *J Am Vet Med Assoc*, 1976, **169** : 10, 1098-1100.
- MAYHEW I.G. Neuromuscular arthrogryposis multiplex congenita in a Thoroughbred foal. *Vet. Pathol.*, 1984, **21**, 187-192.
- MOLLENHAUER A.H., ROWE L.D., CYSEWSKI S.J., WITZEL D.A. Ultrastructural observations in ponies after treatment with monensin. *Am J Vet Res.*, 1981, **42** : 1, 35-40.
- MUYLLE E., VANDENHENDE C., OYAERT W., THOONEN H., VLAEMINCK K. Delayed monensin sodium toxicity in horses. *Equine Vet J.*, 1981, **13** : 2, 107-108.
- NAYLOR J.M. Equine hyperkalemic periodic paralysis: review and implications. *Can Vet J.*, 1994, **35**, 279-285.
- NAYLOR J.M., Hyperkalemic periodic paralysis. *Vet clin North Am : Equine practice*, 1997, **13** : 1, 129-144.
- PEEK S.F., SEMRAD S.D., PERKINS G.A. Clostridial myonecrosis in horses (37 cases 1985-2000). *Equine Vet J*, 2003, **35** : 1, 86-92.
- PELLEGRINI-MASINI A., DOLENTE B.A., HABECKER P.L., JESTY S.A. Myonecrosis and cutaneous infarction associated with *Salmonella* serovar Infantum infection in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 2004, **225** : 5, 722-725.
- REBHUN W.C., SHIN S.J., KING J.M., BAUM K.H., PATTEN V. Malignant edema in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 1985, **187** : 7, 732-736.
- REEF V.B., ROBY K.A., RICHARDSON D.W., VAALA W.E., JOHNSTON J.K. Use of ultrasonography for the detection of aortic-iliac thrombosis in horses. *J Am Vet Med Assoc*, 1987, **190** : 3, 286-288.
- RENDER J.A., COMMON R.S., KENNEDY F.A., JONES M.Z., FYFE J.C. Amylopectinosis in fetal and neonatal Quarter Horses. *Vet Pathol.*, 1999, **36**, 157-160.

- SERTEYN D., PINCEMAIL J., MOTTART E., CAUDRON I., DEBY C., DEBY-DUPONT G., PHILIPPART C. ET LAMY M. Approche directe pour la mise en évidence des phénomènes radicalaires lors de myopathie postanesthésique équine : étude préliminaire. *Can J Vet Res.*, 1994, **58**, 309-312.
- SINGH D., CHANDER V., CHOPRA K. Rhabdomyolysis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, 2005, **27-1** : 39-48.
- SPONSELLER B.T., VALBERG S.J., WARD T.L., FALES-WILLIAMS A.J., MICKELSON J.R. Muscular weakness and recumbency in a Quarter Horse colt due to glycogen branching enzyme deficiency. *Equine Vet Educ.*, 2003, **15** : 4, 182-188.
- SPONSELLER B.T., VALBERG S.J., TENNENT-BROWN B.S., FOREMAN J.H., KUMAR P., TIMONEY J.F. Severe acute rhabdomyolysis associated with *Streptococcus equi* infection in four horses. *J Am Vet Med Assoc*, 2005, **227** : 11, 1800-1807.
- TRAUB-DARGATZ J.L., SCHLIPF J.W., GRANSTROM D.E., INGRAM J.T., SHELTON G.D., GETZY D.M., LAPPIN M.R., BAKER D.C. Multifocal myositis associated with *Sarcocystis sp* in a horse. *J Am Vet Med Assoc*, 1994, **205** :11, 1574-1576.
- TURNER A.S., TROTTER G.W. Fibrotic myopathy in the horse. *J Am Vet Med Assoc.*, 1984, **184** : 3, 335-338.
- VALBERG S.J., CARLSON G.P., CARDINET G.H.^{3RD}, BIRKS E.K., JONES J.H., CHOMYN A., DIMAURO S. Skeletal muscle mitochondrial myopathy as a cause of exercise intolerance in a horse. *Muscle Nerve*, 1994, **17** : 3, 305-312.
- VALBERG S.J., MCLEAY J.M., BILLSTROM J.A., HOWER-MORITZ M.A., MICKELSON J.R. Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with “tying-up” due to polysaccharide storage myopathy. *Equine Vet J.*, 1999, **31** :1, 43-47.
- VALBERG S.J., MICKELSON J.R., GALLANT E.M., MCLEAY J.M., LENTZ L., DE LA CORTE F. Exertional rhabdomyolysis in Quarter Horses and Thoroughbreds : one syndrome, multiple aetiologies. *Equine Vet J.*, 1999, **30**, 533-538.
- VALBERG S.J., WARD T.L., RUSH B., KINDE H., HIRARAGI H., NAHEY D., FYFE J., MICKELSON J.R. Glycogen branching enzyme deficiency in Quarter Horse foals. *J Vet Intern Med.*, 2001, **15**, 572-580.
- VALBERG S. J., HODGSON D.R. Diseases of Muscle. In: Smith B.P. (Ed), Large Animal Internal Medicine. Mosby Inc. 2002, 1266-1291.
- VALENTINE B.A., DE LAHUNTA A., GEORGE C., SUMMERS B.A., CUMMINGS J.F., DIVERS T.J., MOHAMMED H.O. Acquired Equine Motor Neuron Disease. *Vet Pathol.*, 1994, **31**, 130-138.
- VALENTINE B.A., ROUSSELLE S.D., SAMS A.E., EDWARDS III R.B. Denervation atrophy in three horses with fibrotic myopathy. *J Am Vet Med Assoc*, 1994, **205** : 2, 332-336.

- VALENTINE B.A. Polysaccharide storage myopathy in draft and draft-related horses and ponies. *Equine Practice*, 1999, **21** : 6, 16-19.
- VALENTINE B.A., HAMMOCK P.D., LEMISKI D., HUGHES F.E., GERSTNER L., BIRD K.E. Severe diaphragmatic necrosis in 4 horses with degenerative myopathy. *Can J Vet*, 2002, **43**, 614-616.
- VALENTINE B.A., COOPER B.J. Incidence of polysaccharide storage myopathy : necropsy study of 225 horses. *Vet Pathol.*, 2005, **42**, 823-827.
- VAN DEN HOVEN R., BREUKINK H.J., WENSING T., MEIJER A.E.F.H., TIGGES A.J. Loosely coupled skeletal muscle mitochondria in exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet J.*, 1986, **18** : 5, 418-421.
- VAN VLEET J.F. Skeletal muscle. In Carly Jones T., Duncan Hunt R., King N. (Eds), *Veterinary Pathology*. Lippincott Williams & Wilkins, 1997, 873-897.
- VAN VLEET J.F., VALENTINE B.A. Muscle and tendon. In: Jubb K.V., Kennedy P.C., Palmer N.C. *Pathology of Domestic Animals*. Grant Maxie M.(Ed), Elsevier Limited, 2007, 185-277.
- VENGUST M., ARROYO L.G., WEESE J.S., BAIRD J.D. Preliminary evidence for dormant clostridial spores in equine skeletal muscle. *Equine Vet J*, 2003, **35** : 5, 514-516.
- VOTION D.M., DELGUSTE C., BAISE E., CASSART D., DESMECHT D., LINDEN A., ROLLIN F., SANDERSEN C., AMORY H. Diagnostic différentiel en cas de présomption de myopathie atypique des équidés : illustration au travers de cas référés à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège au cours du printemps 2003. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, **147**, 183-193.
- WALDRON-MEASE E. Hypothyroidism and myopathy in racing Thoroughbreds and Standardbreds. *J Equine Med Surg.*, 1979, **3**, 124-128.
- WARD T.L., VALBERG S.J., GALLANT E.M., MICKELSON J.R. Calcium regulation by skeletal muscle membranes of horses with recurrent exertional rhabdomyolysis. *Am J Vet Res*, 2000, **61** : 3, 242-247.
- WARREN J.D., BLUMBERGS P.C., THOMPSON P.D. Rhabdomyolysis : a review. *Muscle & Nerve*, 2002, 332-347.
- WESTERMANN C.M., DE SAIN-VAN DER VELDEN M.G.M., VAN DER KOLK J.H., BERGER R., WIJNBERG I.D., KOEMAN J.P., WANDERS R.J.A., LENSTRA J.A., TESTERINK N., VAANDRAGER A.B., VIANEY-SABAN C., ACQUAVIVA-BOURDAIN C., DORLAND L. Equine biochemical multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) as a cause of rhabdomyolysis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2007, 362-369.
- WHITLOCK R.H. Feed additives and contaminants as a cause of equine disease. *Veterinary Clin North Am Equine Prac*, 1990, **6** : 2, 467-478.

ZEYNER A., HOFFMEISTER C., EINSPANIER A., GOTTSCHALK J., LENGWENAT O.,
ILLIES M. Glycaemic and insulinaemic response of quarter horses to concentrates high
in fat and low in soluble carbohydrates. *Equine Vet J.*, 2006, **36**, 643-647

DEUXIEME PARTIE

CONTRIBUTION PERSONNELLE

5. PREMIERE ÉTUDE

LES ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES DES MUSCLES A METABOLISME OXYDATIF ET DE LA STRUCTURE MITOCHONDRIALE ASSOCIEES A LA MYOPATHIE ATYPIQUE EQUINE

5.1. Contexte.

Depuis l'automne 2000 et par épisodes saisonniers irréguliers jusqu'à ce jour, des chevaux suspects de myopathie atypique ont été autopsiés à la Faculté de Médecine vétérinaire de Liège (Tableau I). Ces suspicions étaient fondées sur une convergence d'observations anamnestiques, cliniques et pathologiques décrites précédemment comme relevant d'une même entité.

Les myopathies sont des maladies décrites chez le cheval depuis longtemps mais l'entité en question ne rentre dans aucune des catégories de myopathies dites classiques, ce qui justifie son appellation de *myopathie atypique* ou *myoglobinurie atypique*, le terme *atypique* faisant référence au caractère tout à fait inhabituel de ses conditions d'apparition (Bowen et Craig, 1942 ; Irwin et Pulsford, 1951 ; Pope et Heslop, 1960 ; Trischler et Miles, 1966 ; Carthé *et al.*, 1976 ; Linklater, 1984 ; Anonymous, 1985 ; Hosie *et al.*, 1986 ; Whitwell *et al.*, 1988 ; Harris et Whitwell, 1990 ; Robinson, 1991 ; Harris, 1996 ; Brandt *et al.*, 1997 ; Delguste *et al.*, 2002 ; Votion *et al.*, 2003).

La myopathie atypique atteint des chevaux et poneys en prairie ne recevant pas ou peu de compléments alimentaires. Ces chevaux n'ont fourni aucun travail ni avant ni au moment de l'apparition des premiers symptômes. Cette myopathie survient généralement au printemps ou en automne (Brandt *et al.*, 1997). Les chevaux atteints sont souvent en bon état d'embonpoint et présentent subitement des signes de myopathie aiguë (raideur, douleurs musculaires, tremblements, démarche anormale, décubitus, myoglobinurie, tachycardie, sudation). Il n'y a pas d'hyperthermie et l'appétit est conservé. Contrairement aux autres types de myopathie, l'issue est généralement fatale endéans les 12 à 72 heures. L'analyse sanguine montre de

façon constante une augmentation spectaculaire des enzymes musculaires, notamment les créatine-kinases (Delguste *et al.*, 2002).

5.2. Objectifs

Le but de ce travail était de caractériser les altérations morphologiques des muscles striés squelettiques et du myocarde afin de progresser dans la compréhension de la maladie. Cette première étude incluait (i) une description des lésions macroscopiques et, surtout, microscopiques, (ii) la mise en oeuvre de colorations histologiques susceptibles de préciser la nature des lésions musculaires observées, (iii) la réalisation de tests enzymatiques musculaires visant à typer les fibres atteintes et à visualiser l'activité mitochondriale et (iv) l'examen de fragments de tissu musculaire squelettique et myocardique en microscopie électronique.

5.3. Résultats

5.3.1. Lésions macroscopiques

Les 32 chevaux atteints de myopathie atypique ayant fait l'objet d'un examen nécropsique présentaient un bon état d'embonpoint, à l'exception du cas 28 qui était maigre. L'examen externe du cadavre révélait la présence d'une mousse blanchâtre au niveau des naseaux chez 14 chevaux (cas 2, 3, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22 et 24).

Lorsque les cadavres n'étaient pas congestifs (cas 20, 26, 29, 30 et 32), certains groupes de muscles pouvaient apparaître décolorés (Fig 1). Les muscles concernés, par ordre décroissant de fréquence, étaient les intercostaux, les muscles de l'épaule, certains muscles du cou et les masséters. Au niveau des organes thoraciques, les poumons étaient généralement remarquables par leur congestion bilatérale, souvent accompagnée d'œdème. Dans neuf cas, les plèvres, tant viscérale que pariétale, présentaient des pétéchies (chevaux 5, 6, 7, 8, 9, 11, 22, 28 et 32). Sur 17 chevaux (cas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 16, 20, 25, 26, 27, 29 et 32), des décolorations très importantes du myocarde ont été observées, le plus souvent en région sous-endocardique ventriculaire (Fig 2). Un hydropéricarde (cas 3 et 32) ou de l'œdème sous-cutané de la tête et du cou (cas 17) étaient occasionnellement remarqués. Trois chevaux (cas 4, 22 et 23) présentaient une impaction de l'œsophage. Les organes abdominaux ne montraient pas de lésion visible à l'ouverture, à l'exception du duodénum qui, parfois, était

congestif. Après incision, quelques observations fréquentes ont été faites au niveau de l'estomac et du duodénum. Le contenu de l'estomac de 10 chevaux était rare et séreux de couleur rouge-noirâtre (chevaux 1, 2, 3, 4, 5, 12, 14, 16, 23 et 29). Dans ce cas, la muqueuse antrale était également de couleur rouge-noirâtre et présentait des érosions et des pétéchies. La muqueuse duodénale était congestive chez sept chevaux (cas 1, 2, 3, 4, 7, 11 et 26), le contenu local était alors rouge ou rose, donnant une image compatible avec un diagnostic d'entérite proximale ou d'intestin de shock. Des lésions gastrointestinales associées à la présence de parasites étaient mises en évidence sur de nombreux cas : gastérophiles sur 11 chevaux, ascaris sur les cas 20 et 32, anoplocéphales sur 7 chevaux et cyathostomes sur les cas 2 et 32. Sur cinq chevaux (1, 3, 4, 6, et 17), le foie exhibait une dégénérescence grasseuse. Bien que les reins ne présentaient aucune lésion visible, l'observation macroscopique la plus systématique (une seule exception) concernait le contenu de la vessie, qui était de couleur rouge-brunâtre, suggérant une myoglobinurie. Il n'y avait pas de lésion macroscopique significative au niveau du système nerveux central.

5.3.2. Lésions microscopiques

C'est au niveau des fibres musculaires squelettiques que les lésions étaient les plus sévères et les plus significatives. Ces lésions dégénératives, voire nécrotiques, compatibles avec la dégénérescence de Zenker, étaient de type monophasique adoptant une distribution multifocale (Fig 3). Les fibres lésées, disséminées parmi des cellules apparemment saines, étaient tantôt oedématisées et très éosinophiles, avec perte de striation, tantôt revêtaient un aspect granuleux, fragmenté et floconneux. Les images décrites ci-dessus étaient parfois associées à la présence de macrophages et plus rarement de neutrophiles. Des foyers de régénération étaient parfois visibles (Fig 3) avec formation de myotubes. Généralement, la membrane externe de la fibre, le tissu de soutien endomysial, l'innervation et les capillaires sanguins étaient intacts. Seuls quelques très rares foyers de fibrose ont été observés.

Les premières modifications semblaient se situer au niveau des fibres, avec perte des striations et éosinophilie du cytoplasme suite à la coagulation des protéines. L'évolution du phénomène dégénératif se traduisait par une distension de la fibre avec irrégularité et fragmentation du cytoplasme (Fig 3). Sur quelques rares lames, des bandes d'hypercontraction étaient observées dans les fibres dégénérées. En section transversale, les fibres oedématisées apparaissaient parfois jusqu'à quatre fois plus volumineuses que les fibres

adjacentes normales. La présence, l'étendue et la sévérité des lésions variaient d'un cheval à l'autre mais aussi entre les différents muscles d'un même cheval et même entre différents prélèvements d'un même muscle. Toutefois, ces lésions dégénératives étaient plus fréquentes et plus sévères au niveau des muscles de positionnement et des muscles respiratoires.

L'examen microscopique du tissu myocardique était rarement significatif. Neuf cas (2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 20 et 29) exhibaient néanmoins une dégénérescence granuleuse et le cheval 21 présentait des lésions de myocardite multifocale avec myolyse associée à un infiltrat de macrophages (Fig 4).

Aucune accumulation de glycogène ou de sels de calcium n'a été mise en évidence dans le tissu musculaire strié squelettique après colorations de PAS (*periodic acid Schiff*) et *alizarin-red*. Par contre, la coloration ORO (*oil red O*) a permis de déceler la présence de lipides neutres sous forme de gouttelettes dans les fibres musculaires lésées. Elles avaient une distribution multifocale dans les fibres squelettiques (Fig 6) et diffuse dans les fibres myocardiques (Fig 7).

La réaction ATPase myofibrillaire a révélé une atteinte préférentielle des fibres de type I (Fig 8). Les fibres de type I étant plus volumineuses que les fibres de type II, elles les comprimaient et leur donnaient un aspect plus anguleux visible, en coupe transversale. La coloration intracellulaire était hétérogène dans certaines fibres, indiquant une perte d'activité enzymatique ATPasique de certaines myofibrilles. De plus, la coloration NADH tétrazolium réductase était plus faible dans les muscles atteints que dans les tissus contrôles, suggérant une activité enzymatique mitochondriale diminuée. Cette observation était associée à une anomalie de répartition de l'activité mitochondriale dans le cytoplasme de certaines cellules avec, d'une part, des zones hyperchromatiques (hyperactives) et, d'autre part, des zones hypochromatiques (dépourvues d'activité) (Fig 9).

L'examen microscopique du foie, du pancréas, de la vessie, de l'encéphale, de la moelle épinière et des ganglions parasymphatiques n'a révélé aucune lésion significative. L'observation des reins montrait la présence systématique de cylindres hyalins dans la lumière des tubules (Fig 5).

Des bandes d'hypercontraction ont été remarquées au niveau des muscles lisses digestifs (estomac, intestin grêle) dans quelques cas.

5.3.3. Lésions ultrastructurales

Les altérations ultrastructurales des fibres musculaires striées squelettiques consistaient en une dilatation des mitochondries avec perte de matrice associée à une fragmentation et/ou disparition des crêtes. Dans le cytoplasme, on observait une accumulation de globules lipidiques et une désorganisation des myofibrilles. Par contre, la membrane, les noyaux et le réticulum endoplasmique apparaissaient généralement normaux.

Dans le tissu myocardique, la seule anomalie observée était la présence de petites gouttelettes lipidiques intracytoplasmiques entre les myofibrilles.

Les fragments tissulaires, musculaires striés et myocardiques issus des chevaux témoins ne présentaient aucune anomalie.

Cette étude morphologique musculaire a donc mis en évidence (1) des zones de nécrose au niveau des muscles de posture, des muscles respiratoires et parfois du myocarde, (2) une dégénérescence de type Zenker segmentaire, monophasique et multifocale affectant préférentiellement les fibres de type I, (3) une activité enzymatique mitochondriale diminuée avec une distribution modifiée révélée par la coloration NADH tétrazolium réductase, (4) l'absence de sels de calcium intracellulaires, (5) l'accumulation intracytoplasmique de gouttelettes lipidiques et (6) des modifications ultrastructurales touchant essentiellement les mitochondries.

5.4. Discussion

La cause de la mort est soit une défaillance cardiaque associée à des lésions myocardiques, soit l'asphyxie consécutive à l'œdème pulmonaire suite à une parésie des muscles respiratoires. Les lésions microscopiques se caractérisaient par un phénomène dégénératif aigu et synchrone des fibres musculaires striées squelettiques avec un potentiel régénératif apparemment intact. La dégénérescence musculaire affectait surtout les fibres de type I, à métabolisme oxydatif, ce qui est en harmonie avec les lésions macroscopiques observées surtout au niveau des muscles respiratoires et de posture.

L'activité mitochondriale diminuée et sa distribution anormale suggèrent que la mitochondrie a un rôle prépondérant dans le processus dégénératif (De Girolami et Anthony, 2000). Les altérations secondaires sont souvent consécutives à une atteinte membranaire ou nucléaire de

la cellule ; or, dans le cas présent, les noyaux, la membrane sarcoplasmique et la membrane du réticulum endoplasmique apparaissent intactes en microscopie électronique. De plus, il n'y avait pas de précipités calciques. Ces précipités apparaissent généralement lors de lésion membranaire avec des mitochondries intactes, ces dernières accumulant activement le calcium cytosolique dans une tentative ultime de maintien de l'homéostasie (Karp, 1979). L'absence de précipités calciques suggère donc que, chronologiquement, la première altération dans la myopathie atypique équine est mitochondriale.

L'accumulation de lipides dans le cytoplasme est également compatible avec une défaillance mitochondriale puisque le ralentissement de l'oxydation mitochondriale des acides gras conduit à l'accumulation de globules lipidiques (Gopalakrishnakone *et al.*, 1984 ; Eaton *et al.*, 1996). Cette étude permet d'affirmer que la myopathie atypique est morphologiquement différente des myopathies d'exercice où les fibres de type II sont atteintes de façon privilégiée (McEwen et Hulland, 1986 ; Hulland, 1992 ; Valberg, 1996 ; Van Vleet, 1997) et des myopathies de stockage caractérisées par une accumulation intracytoplasmique de polysaccharides (Freestone et Carlson, 1991 ; Valberg *et al.*, 1999).

La myopathie atypique n'a également rien de commun avec les myopathies ischémiques qui entreprennent un groupe musculaire sans distinction du type de fibre, ni avec les myopathies inflammatoires où un infiltrat cellulaire est présent (Hodgson, 1990 ; Hulland, 1992 ; Van Vleet, 1997). Une myopathie par carence en vitamine E et sélénium pourrait être envisagée puisque les lésions sont multifocales et entreprennent plutôt les fibres de type I. Néanmoins les lésions liées à cette myopathie carencielle évoluent sur une longue période, sont toujours polyphasiques et sont caractérisées par des lésions membranaires, une calcification précoce et l'absence de globules lipidiques (Dill et Rebhun, 1985 ; Hulland, 1992 ; Lofstedt, 1997 ; Van Vleet, 1997).

C'est en comparant la myopathie atypique avec les myopathies toxiques que l'on relève le plus de similitudes. Elles se caractérisent, comme l'entité que nous tentons de comprendre, par une dégénérescence segmentaire des fibres musculaires striées sans minéralisation, une faible activité des enzymes oxydatifs mitochondriaux, l'accumulation cytoplasmique de lipides neutres ainsi que par des altérations ultrastructurales mitochondriales sans lésion nucléaire ou membranaire (Martin *et al.*, 1981 ; Mollenhauer *et al.*, 1981 ; Muylle *et al.*, 1981 ; Hulland, 1992 ; Van Vleet, 1997 ; Bezerra *et al.*, 2000).

5.5. Conclusions

Les données morphopathologiques rassemblées dans cette étude révèlent que la myopathie atypique équine possède la plupart des caractéristiques morphologiques des myopathies toxiques au sens le plus large. Pour confirmer l'hypothèse d'une atteinte mitochondriale primaire, une étude fonctionnelle *in vivo* serait nécessaire.

5.6. Bibliographie

Anonymous. (1985) Special Report. Atypical myoglobinuria : a new disease in horses ? *Vet. Rec.* **116**, 86-87.

Bezerra, JrP.S., Ilha, M.R.S., Langohr, I.M., Barros, C.S.L. (2000) Intoxicação experimental por monensina em eqüinos. *Pesq. Vet. Bras.* **20**, 102-108.

Bowen, J.N., Craig, J.F. (1942) Myoglobinuria in horses. *Vet. Rec.* **35**, 354-355.

Brandt, K., Hinrichs, U., Glitz, F., Landes, E., Schulze, C., Deegen, E., Pohlenz, J., Coenen, M. (1997) Atypische Myoglobinurie der Weidepferde. *Pferdeheilkunde* **13**, 27-34.

Carthe, D., Ansay, M., Lomba, F., Bienfet, V., Chauvaux, G. (1976) Myoglobinurie chez des poulains demi-sang de sept mois. *Ann. Méd. Vét.* **120**, 325-331.

De Girolami, U., Anthony, D.C. (2000) Diseases of Skeletal Muscle and Peripheral Nerve. In: *Diagnostic Electron Microscopy*. 2nd edn., Ed: R. G. Dickersin, Springer, New-York. pp 912-988.

Delguste, C., Cassart, D., Baise, E., Linden, A., Schwarzwald C., Feige, K., Sandersen, C., Rollin, F., Amory, H. (2002) Myopathies atypiques chez les chevaux au pré : une série de cas en Belgique. *Ann. Méd. Vét.* **146**, 231-243.

Dill, S.G, Rebhun, W.C. (1985) White Muscle Disease in Foals. *The Compendium on Continuing Education* **7**, 627-634.

Eaton, S., Bartlett, K., Pourfarzam, M. (1996) Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.* **320**, 345-357.

Freestone, J.F., Carlson, G.P. (1991) Muscle disorders in the horse: a retrospective study. *Equine Vet. J.* **23**, 86-90.

Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B.J., Elder, H.Y. (1984) Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. *Toxicon.* **22**, 85-98.

Harris, P. (1996) Differential diagnosis of an acute episode of a primary myopathy out at pasture. *Equine vet. Educ.* **8**, 272-276.

Harris, P., Whitwell, K.E. (1990) Atypical myoglobinuria alert. *Vet. Rec.* **127**, 603.

Hodgson, D. R. (1990) Diseases of Muscle. In : *Large Animal Internal Medicine*, Ed : B.P. Smith, The C.V. Mosby Company, S^t Louis, pp 1335-1360.

Hosie, B.D., Gould, P.W., Hunter, A.R., Low, J.C., Munro, R., Wilson, H.C. (1986) Acute myopathy in horses at grass in east and south east Scotland. *Vet. Rec.* **119**, 444-449.

Hulland, T.J. (1992) Muscle and Tendon. In : *Pathology of Domestic Animals*, 4th edn., Ed: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, N. Palmer, Academic Press, San Diego, pp 183-265.

- Irwin, C.P.F., Pulsford, M.F. (1951) Enzootic myoglobinuria in a horse. *Aust. Vet. J.* **27**, 101-102.
- Karp, G. (1979) Mitochondria and the Conservation of Chemical Energy. In : *Cell Biology*. Ed: Mc Graw-Hill Book Company, New York, London, pp 342-377.
- Linklater, K.A. (1984) Myopathy in horses and ponies. *Vet. Rec.* **115**, 666.
- Lofstedt, J. (1997) White muscles disease of foals. *Vet Clin North Am Equine Pract.* **13**, 169-185.
- Martin, B.W., Terry, M.K., Bridges, C.H., Bailey, E.M.Jr. (1981) Toxicity of *Cassia occidentalis* in the horse. *Vet. Hum. Toxicol.* **23**, 416-417.
- McEwen, S.A., Hulland, T.J. (1986) Histochemical and Morphometric Evaluation of Skeletal Muscle from Horses with Exertional Rhabdomyolysis (Tying-up) *Vet. Pathol.* **23**, 400-410.
- Mollenhauer, H.H., Rowe, L.D., Cysewski, S.J., Witzel, D.A. (1981) Ultrastructural Observations in Ponies After Treatment with Monensin. *Am. J. Vet. Res.* **42**, 35-40.
- Muyllé, E., Vandenhende, C., Oyaert, W., Thoonen, H., Vlaeminck, K. (1981) Delayed monensin sodium toxicity in horses. *Equine Vet. J.* **13**, 107-108.
- Pope, D.C., Heslop, C.H. (1960) An outbreak of myoglobinuria in light horses. *Can. Vet. J.* **1**, 171-174.
- Robinson, H.C. (1991) Atypical myoglobinuria. *Vet. Rec.* **128**, 44.
- Tritschler, L.G., Miles, D. (1966) An outbreak of myoglobinuria. *Vet. Med.* **61**, 649-651.
- Valberg, S.J., Carlson, G.P., Cardinet, G.H. 3rd, Birks, E.K., Jones, J.H., Chomyn, A., DiMauro, S. (1994) Skeletal muscle mitochondrial myopathy as a cause of exercise intolerance in a horse. *Muscle Nerve.* **17**, 305-312.
- Valberg, S.J. (1996) Muscular causes of exercise intolerance in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* **12**, 495-515.
- Valberg, S.J., Macleay, J.M., Billstrom, J.A., Hower-Moritz, M.A., Mickelson, J.R. (1999) Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with 'tying-up' due to polysaccharide storage myopathy. *Equine Vet J.* **31**, 43-47.
- Van Vleet, J.F. (1997) The musculoskeletal system. In : *Veterinary pathology*, 6th edn., Ed: T.C. Jones, R.D. Hunt, N.W. King, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 873-897.
- Votion, D.M., Delguste, C., Baise, E., Cassart, D., Desmecht, D., Linden, A., Rollin, F., Sandersen, C., Amory, H. (2003) Diagnostic différentiel en cas de présomption de myopathie atypique des équidés : illustration au travers de cas référés à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège au cours du printemps 2003. *Ann. Méd. Vét.* **147**, 183-193.

Whitwell, K.E., Harris, P., Farrington, P.G. (1988) Atypical myoglobinuria : an acute myopathy in grazing horses. *Equine Vet. J.* **20**, 357-363.

TABLEAU I : Présentation des cas

	Race	Age (mois)	Sexe	Date de mort	Date d'autopsie
1	Fjord	18	F	05/11/00, MN	08/11/00
2	Fjord	6	F	08/11/00, EU	09/11/00
3	Fjord	18	F	08/11/00, MN	09/11/00
4	Quarter Horse	18	F	08/11/00, EU	10/11/00
5	Demi-sang	132	F	09/11/00, MN	11/11/00
6	Demi-sang	48	F	11/11/00, MN	13/11/00
7	Demi-sang	72	F	14/11/00, MN	15/11/00
8	Haflinger	24	F	16/11/00, MN	20/11/00
9	Fjord	84	F	26/11/00, EU	27/11/00
10	Fjord	18	H	27/11/00, MN	28/11/00
11	Haflinger	24	E	15/04/01, MN	18/04/01
12	Haflinger	48	F	15/04/01, MN	17/04/01
13	Fjord	18	E	29/10/02, MN	30/10/02
14	Fjord	18	F	29/10/02, EU	31/10/02
15	Fjord	18	F	30/10/02, EU	31/10/02
16	Part-Arabe	30	F	31/10/02, EU	01/11/02
17	Cheval de selle	36	E	04/11/02, MN	05/11/02
18	Poney Shetland	48	H	01/11/02, MN	05/11/02
19	Demi-sang	18	F	04/11/02, EU	06/11/02
20	Fjord	6	F	06/11/02, EU	06/11/02
21	Fjord	6	F	05/11/02, MN	06/11/02
22	Demi-sang	84	F	05/11/02, MN	07/11/02
23	Demi-sang	30	F	08/11/02, EU	12/11/02
24	Poney de selle	108	F	11/11/02, MN	12/11/02
25	Demi-sang	120	F	09/11/02, MN	13/11/02
26	Demi-sang	24	F	16/11/02, MN	18/11/02
27	Fjord	24	F	10/12/02, MN	11/12/02
28	Poney de selle	36	F	07/04/03, EU	08/04/03
29	Croisé Fjord	24	F	16/04/03, EU	16/04/03
30	Cheval de selle	96	F	21/05/03, EU	23/05/03
31	Lusitanien	18	F	16/10/03, EU	17/10/03
32	Trait Belge	6	F	05/11/03, EU	05/11/03
C1	Trait Belge	8	F	27/11/00, EU	27/11/00
C2	Demi-sang	36	H	05/11/02, EU	06/11/02
C3	Poney de selle	48	F	18/12/02, EU	18/12/02
C4	Demi-sang	24	F	14/01/03, EU	15/01/03
C5	Haflinger	72	H	20/01/03, EU	20/01/03
C6	Cheval de selle	12	F	17/10/03, EU	17/10/03

MN, mort naturelle ; EU, euthanasié ; E, étalon ; H, hongre ; F, femelle ; C, chevaux témoins



Figure 1 : Bicoloration d'un muscle strié squelettique (triceps brachial, cas 32).

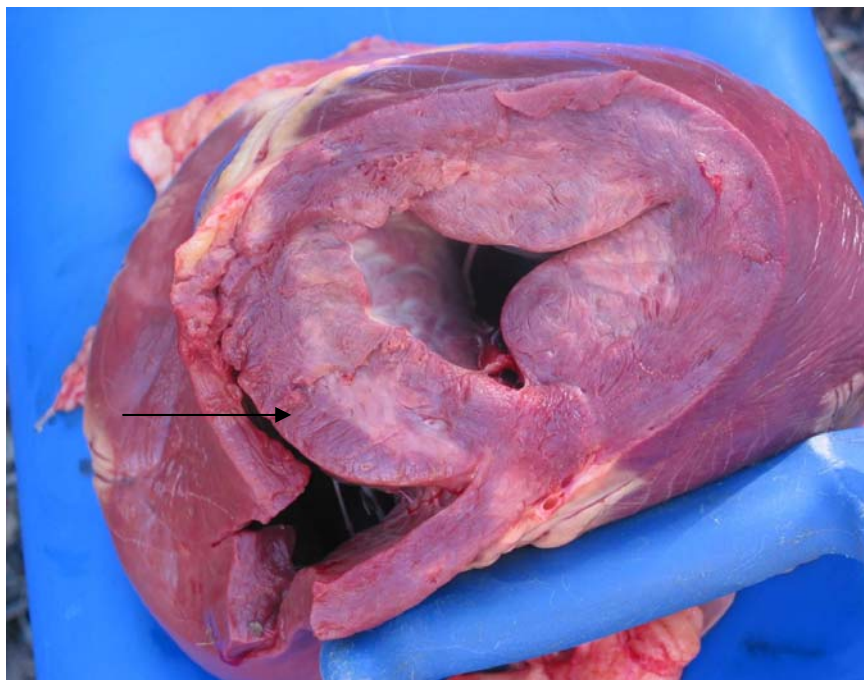


Figure 2 : Bicoloration du myocarde (flèche) (cas 29).

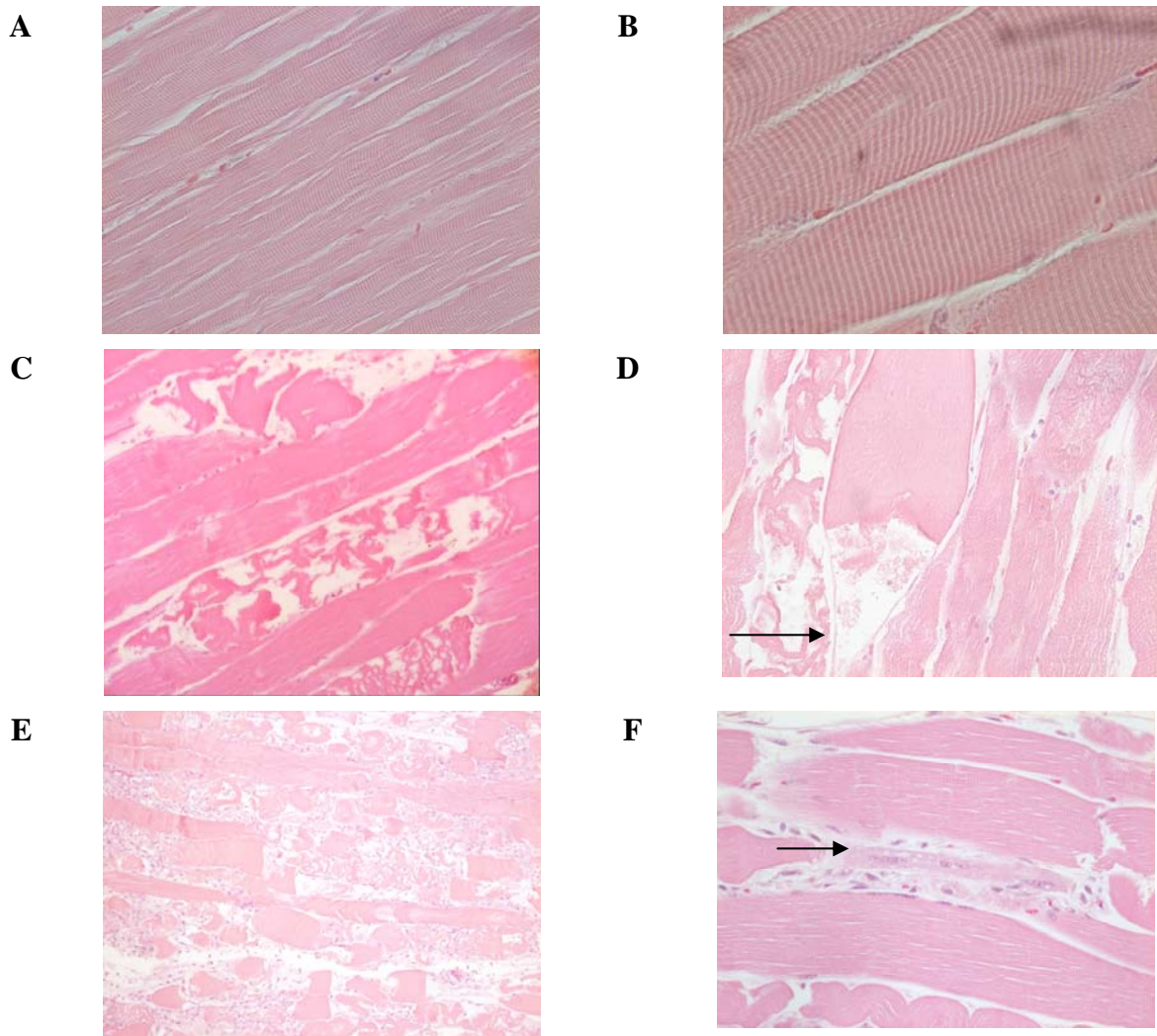


Figure 3 : Lésions microscopiques des muscles striés squelettiques (H&E). **A** : muscle témoin (sous-épineux, x400) ; **B** : muscle témoin (intercostal, x1000) ; **C** : dégénérescence segmentaire multifocale (cas 7, intercostal, x200) ; **D** : dégénérescence du cytoplasme sans altération visible des noyaux et avec conservation de l'intégrité de la membrane basale (flèche) (cas 16, sous-épineux, x400) ; **E** : dégénérescence multifocale sévère avec infiltration de macrophages (cas 29, diaphragme, x100) ; **F** : foyer régénératif avec des myoblastes et ébauche d'un myotube (flèche) (cas 3, brachiocéphalique, x200).

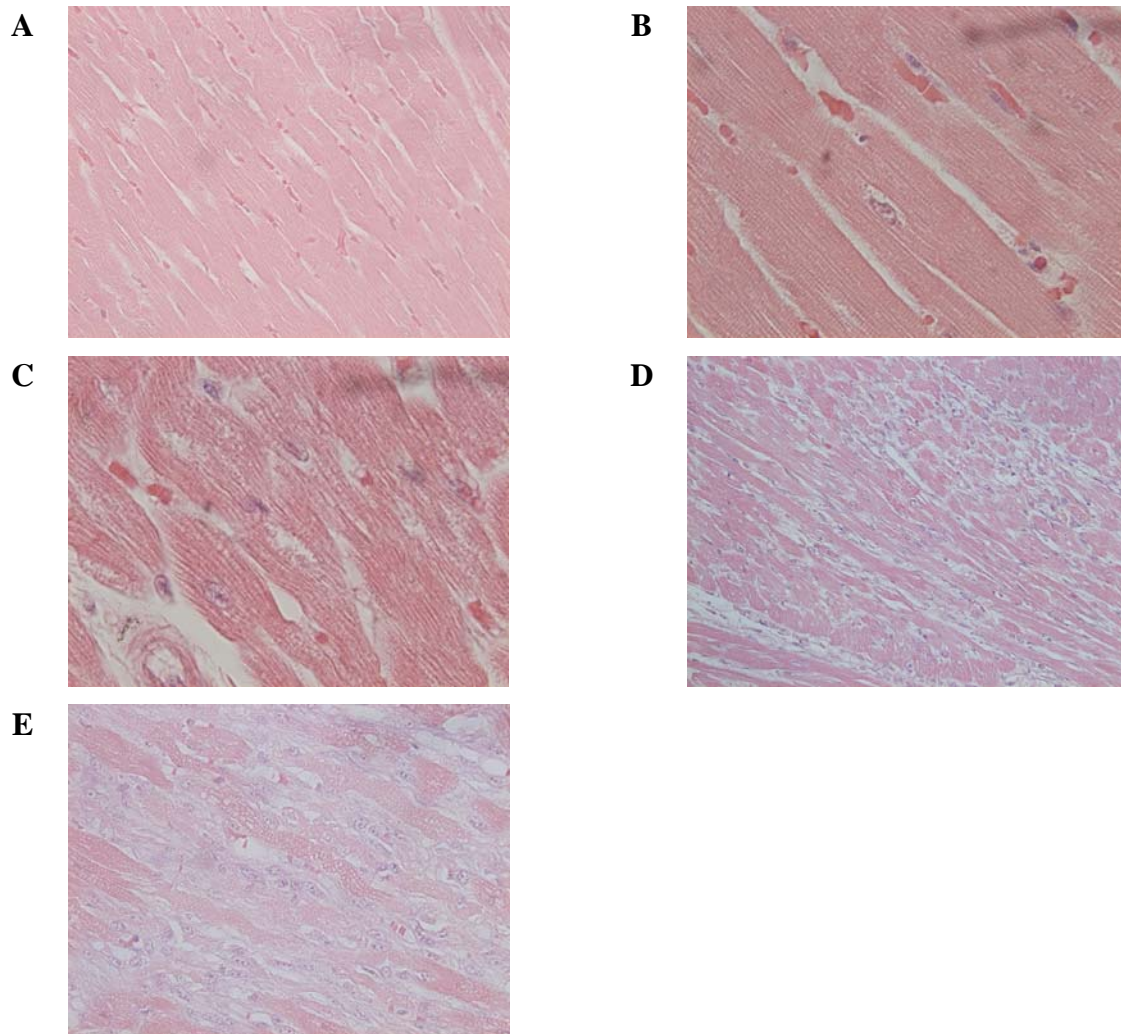


Figure 4 : Lésions microscopiques myocardiques (H&E). **A :** myocarde d'un cheval témoin (x400) ; **B :** myocarde d'un cheval témoin (x1000) ; **C :** dégénérescence granuleuse des cellules myocardiques (cas 20, x1000) ; **D :** dégénérescence multifocale du myocarde avec infiltrat cellulaire (cas 21, x200) ; **E :** dégénérescence multifocale du myocarde avec infiltrat de macrophages (cas 21, x400).

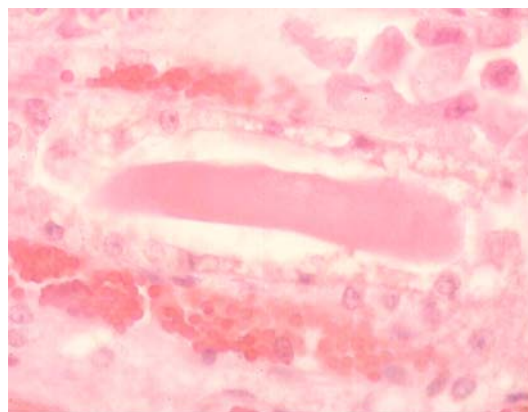


Figure 5 : Cylindre de myoglobine dans un tubule rénal (cas 10, x400).

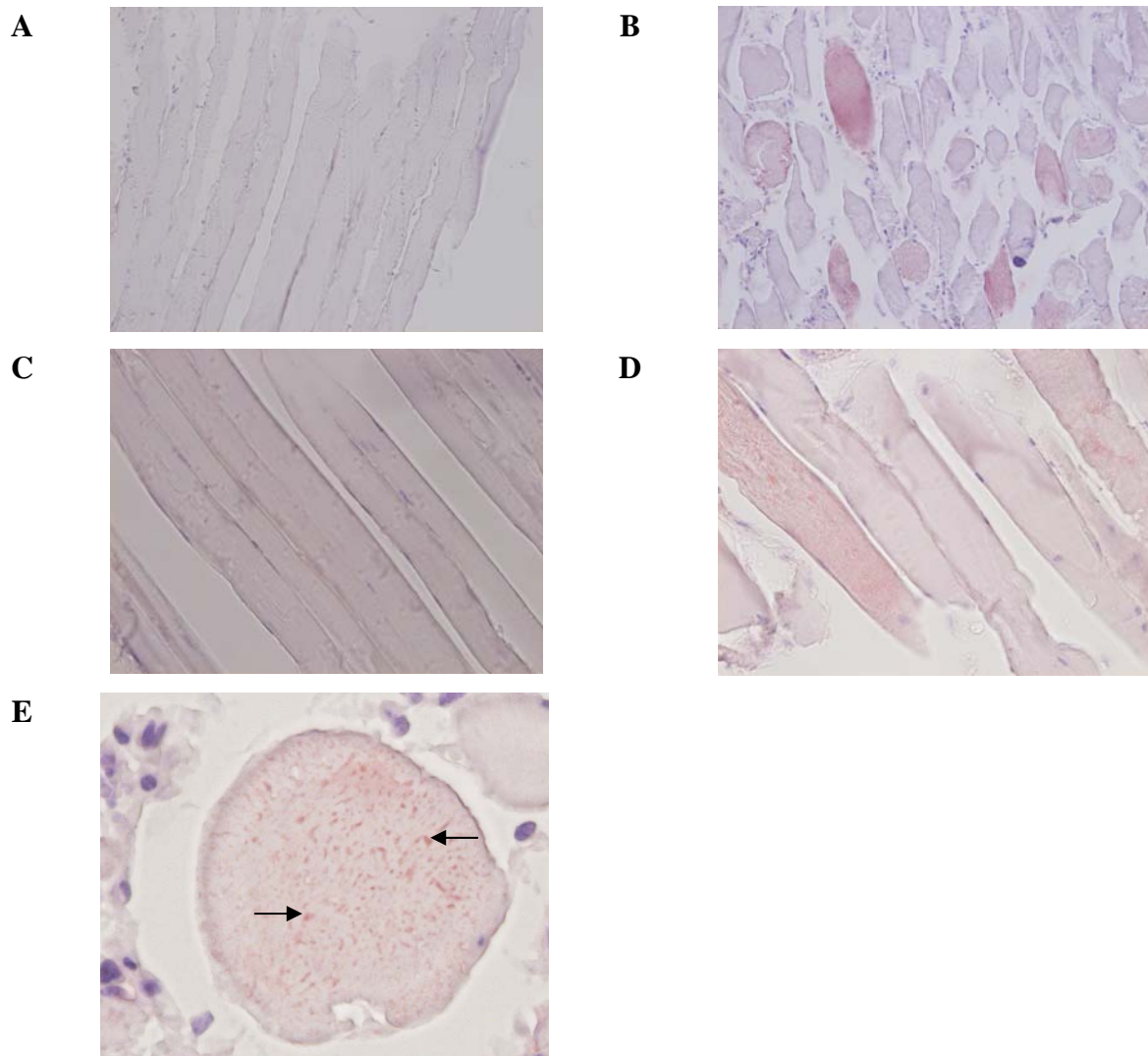


Figure 6 : Coloration ORO pour la mise en évidence de gouttelettes lipidiques (rouge) dans les muscles striés squelettiques de chevaux contrôles et de chevaux atteints de myopathie atypique. **A** : muscle d'un cheval témoin (sous-scapulaire, x200) ; **B** : présence de gouttelettes lipidiques dans quelques fibres musculaires (cas 21, sous-scapulaire, x200) ; **C** : muscle témoin (sous-épineux, x400) ; **D** : gouttelettes lipidiques dans quelques fibres musculaires (cas 16, diaphragme, x400) ; **E** : gouttelettes lipidiques (flèches) (cas 21, sous-scapulaire, x800).

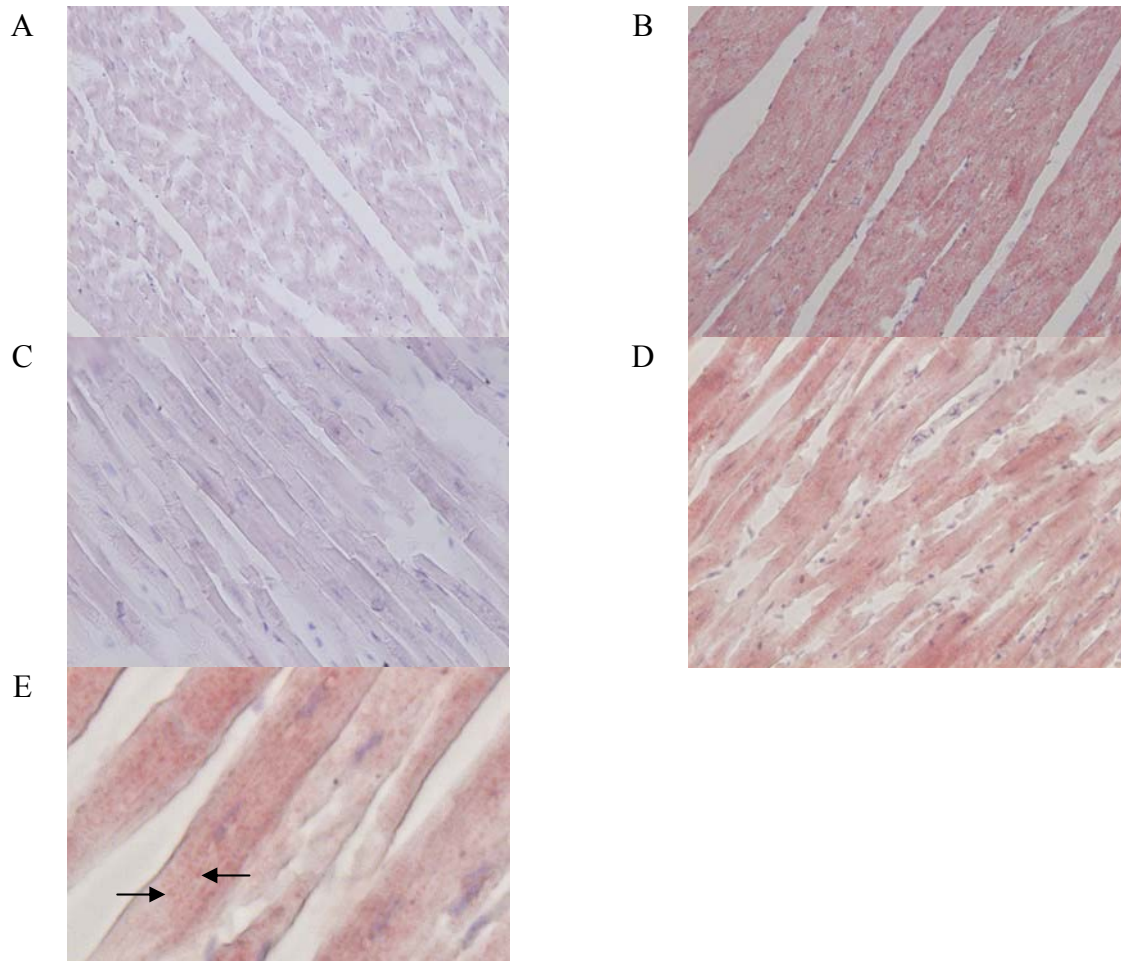


Figure 7 : Coloration ORO pour la mise en évidence de gouttelettes lipidiques (rouge) dans les fibres myocardiques de chevaux témoins et de chevaux atteints de myopathie atypique. **A :** myocarde d'un cheval témoin (x200) ; **B :** gouttelettes lipidiques dans les fibres myocardiques du cheval 31 (x200) ; **C :** myocarde d'un cheval témoin (x400) ; **D :** gouttelettes lipidiques dans les fibres myocardiques du cheval 32 (x400); **E :** gouttelettes lipidiques dans les fibres myocardiques du cas 32 (flèches) (x800).

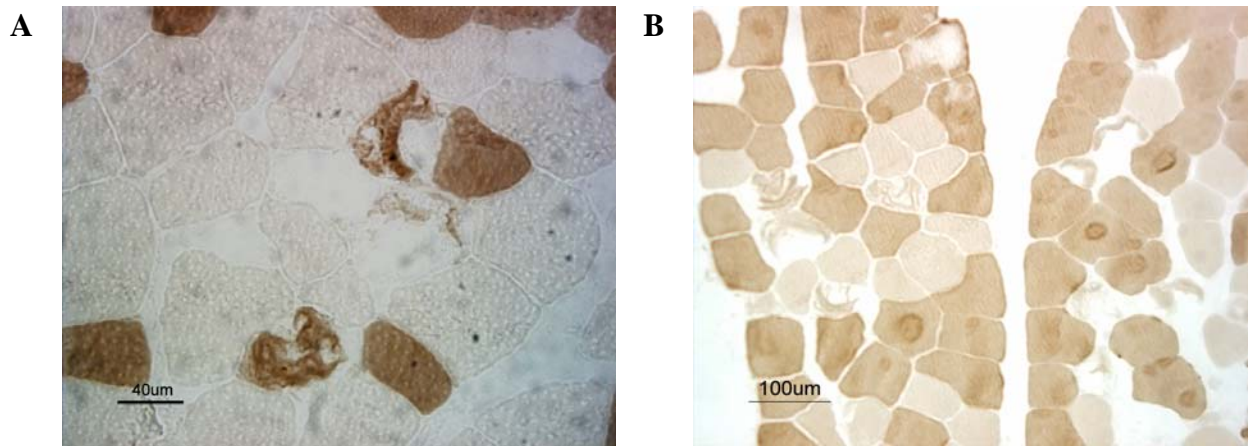


Figure 8 : Coloration ATPase myofibrillaire permettant de visualiser que la dégénérescence affecte préférentiellement les fibres de type I (cas 32, sous-scapulaire). **A :** pH 4,3 (les fibres de type I sont foncées) ; **B :** pH 10,4 (les fibres de type I sont pâles).

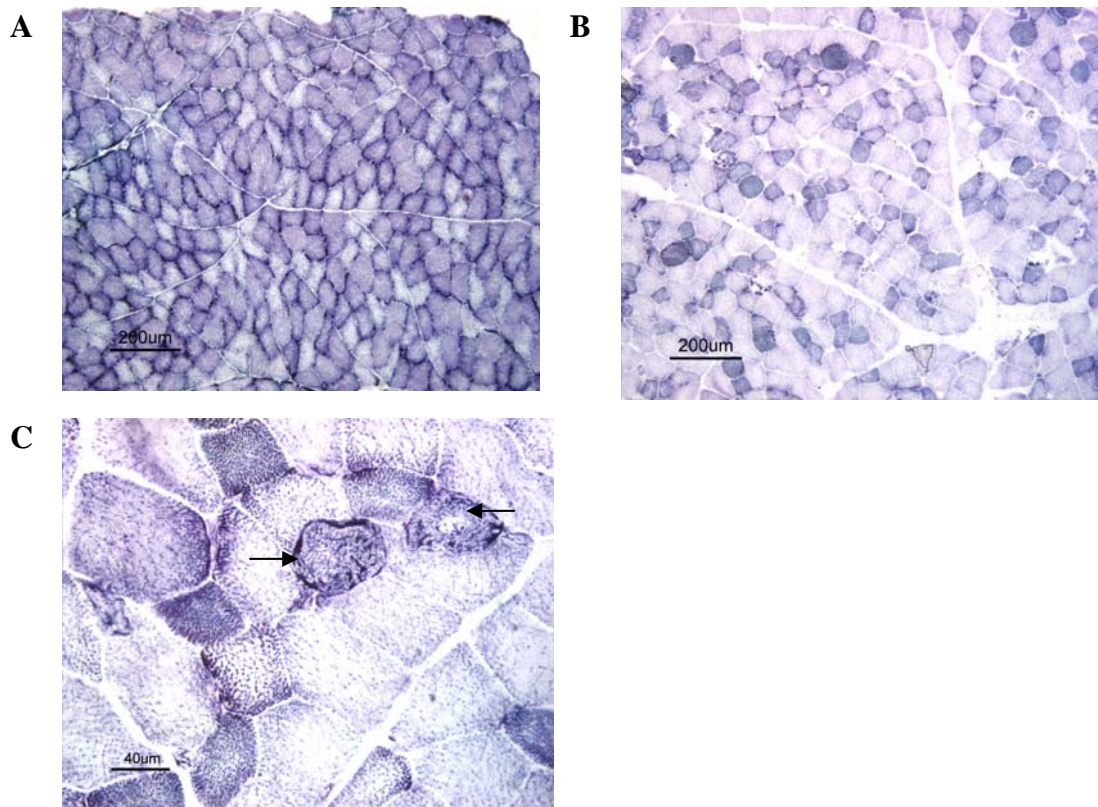


Figure 9 : Coloration NADH tétrazolium réductase mitochondriale. **A :** muscle témoin (sous-scapulaire) ; **B :** distribution anormale hétérogène de l'activité mitochondriale (cas 32, sous-scapulaire) ; **C :** coexistence de zones hyperchromatiques (activité mitochondriale intense) et de zones hypochromatiques (inactives) dans la même cellule (flèches) (cas 20, sous-scapulaire).

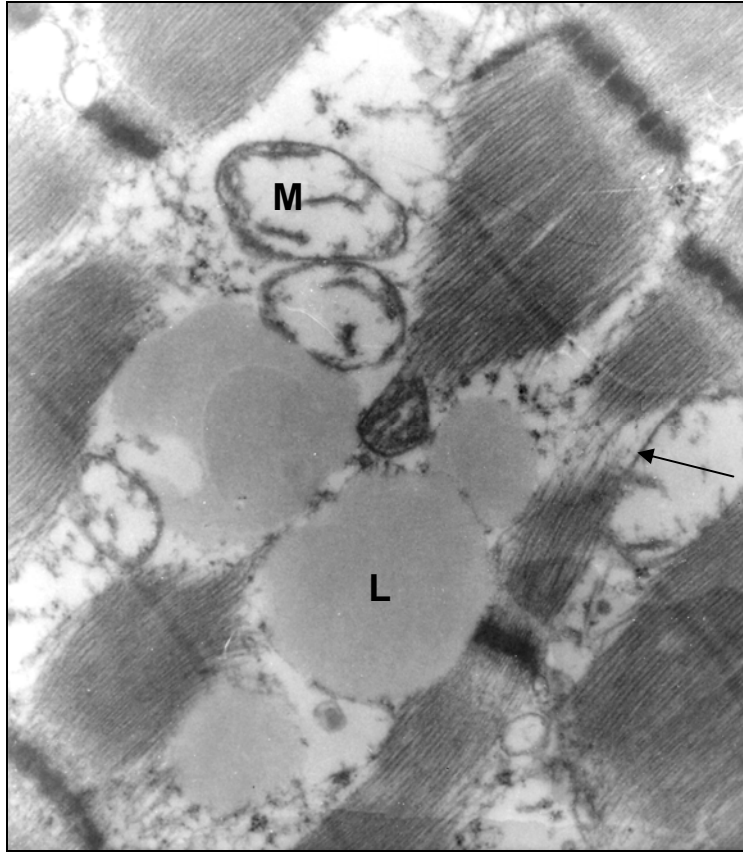


Figure 10 : Perte de la structure en crêtes des mitochondries (M), présence de globules lipidiques (L) et désorganisation des myofibrilles (flèche) dans une fibre musculaire striée squelettique (TEM, cas 29, intercostal, x 16000).

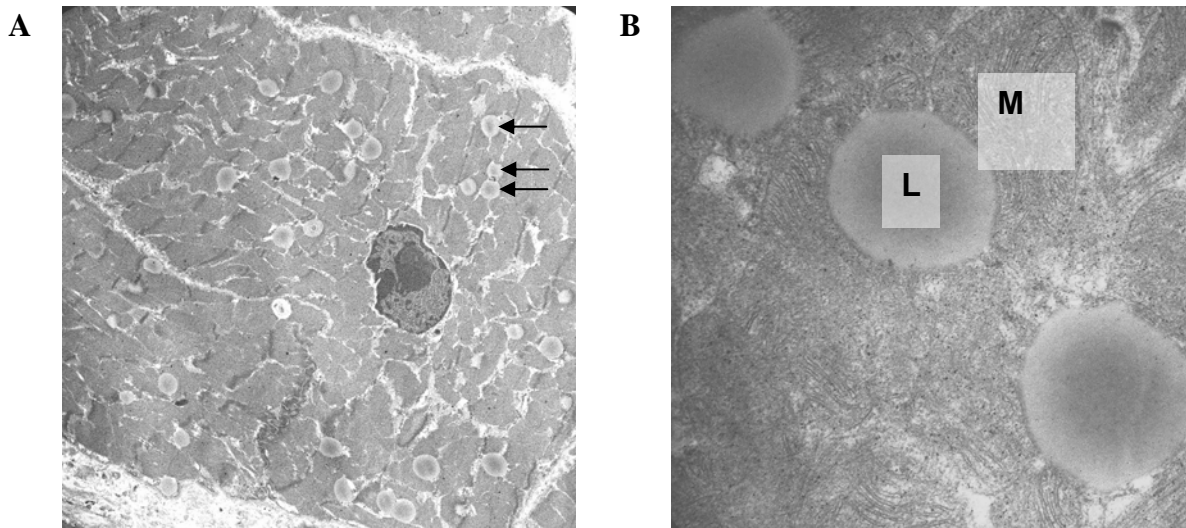


Figure 11 : Lésions ultrastructurales myocardiques. **A :** présence de gouttelettes lipidiques (flèches) (TEM, cas 20, x 4000) ; **B :** mitochondries normales (M) et globules lipidiques (L) (TEM, cas 20, x 31500).

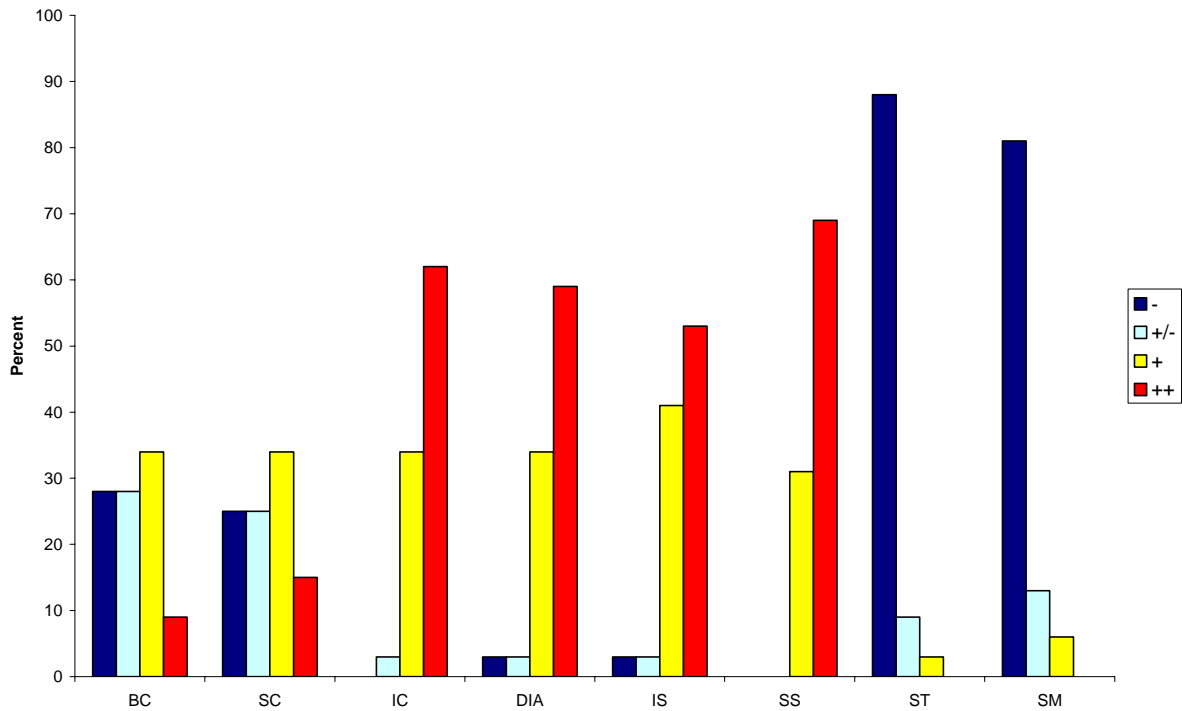


Figure 12: Distribution des lésions microscopiques des muscles squelettiques. BC: *Brachiocephalicus*; SC: *Sternocephalicus*; IC: *Intercostalis*; DIA: *Diaphragma*; IS: *Infraspinatus*; SS: *Subscapularis*; ST: *Semitendinosus*; SM: *Semimembranosus*; -: absence de lésions; +/-: quelques fibres dégénérées avec une distribution multifocale; +: dégénérescence musculaire multifocale; ++: dégénérescence musculaire multifocale sévère.

6. DEUXIEME ETUDE

ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE DES CELLULES SANGUINES MONONUCLEEEES EQUINES

6.1. Contexte

La myopathie atypique atteint des chevaux et poneys en prairie n'ayant fourni aucun travail ni avant, ni au moment de l'apparition des premiers symptômes. Cette myopathie survient généralement au printemps ou en automne (Brandt *et al.*, 1997). Les chevaux atteints présentent subitement des signes de myopathie aiguë (raideur, douleurs musculaires, tremblements, démarche anormale, décubitus, myoglobinurie, tachycardie, sudation). Il n'y a pas d'hyperthermie et l'appétit est conservé. Contrairement aux autres types de myopathie (Hulland, 1992 ; Van Vleet, 1997), l'issue est généralement fatale. L'analyse sanguine montre une augmentation spectaculaire des enzymes musculaires, notamment les créatine-kinases (Delguste *et al.*, 2002).

Une étude morphologique macroscopique, histopathologique, enzymologique et ultrastructurale réalisée à partir de 32 chevaux atteints de myopathie atypique équine a révélé des caractéristiques compatibles avec les myopathies toxiques (Martin *et al.*, 1981 ; Mollenhauer *et al.*, 1981 ; Muylle *et al.*, 1981 ; Bezerra *et al.*, 2000 ; Cassart *et al.*, 2007). Bien que de nombreux indices d'un dysfonctionnement mitochondrial aient été collectés dans la myopathie atypique équine, la confirmation fonctionnelle est toujours en attente. En outre, le diagnostic clinique n'étant possible que tard dans l'évolution de la maladie, quand les lésions définitives sont installées, l'identification d'un marqueur précoce est souhaitable. Celui-ci permettrait de confirmer le diagnostic clinique de cas avérés et de détecter des cas subcliniques éventuels qui pourraient ainsi bénéficier de mesures adéquates. Mieux encore, un test de laboratoire standardisé permettant un dépistage de masse serait un outil essentiel pour réaliser des enquêtes sur l'épidémiologie de cette maladie.

A cet égard, une méthode fiable et sensible de dépistage d'une altération de la fonction mitochondriale dans les tissus de chevaux nous a paru être une approche intéressante et tout

spécialement l'étude du fluorophore lipophile cationique JC-1 qui a la particularité de s'accumuler dans les membranes mitochondriales et dont le spectre de fluorescence varie en fonction du potentiel membranaire mitochondrial. Le spectre d'émission dépend en fait du degré d'oligomérisation de JC-1, lequel est lié au potentiel de membrane mitochondrial. La formation d'oligomères est détectée par un changement de fluorescence du vert vers l'orange (Reers *et al.*, 1991 ; Smiley *et al.*, 1991). En conséquence, le potentiel de membrane mitochondrial peut être optiquement mesuré par le rapport de la fluorescence orange sur la fluorescence verte qui représente le rapport des oligomères sur les monomères. Ce rapport dépend uniquement du potentiel de membrane mitochondrial et est indépendant d'autres facteurs tels que la taille, la forme ou la densité des mitochondries, ce qui fait de JC-1 une sonde fluorophore particulièrement fiable. Le rapport de fluorescence de JC-1 orange sur JC-1 vert a été utilisé comme indicateur du potentiel de membrane sur des mitochondries isolées (Cossarizza *et al.*, 1996) mais aussi sur des mitochondries de spermatozoïdes et de lignées cellulaires de myocytes et de neurones (Di Lisa *et al.*, 1995 ; White et Reynolds, 1996 ; Sick et Perez-Pinzon, 1999 ; Hoornstra *et al.*, 2003). L'application la plus fréquente de l'utilisation de JC-1 est la détection de la dépolarisation mitochondriale durant l'apoptose (Mancini *et al.*, 1997 ; Salvioli *et al.*, 1997 ; Kulkarni *et al.*, 1998 ; Wadia *et al.*, 1998).

Les différentes études rapportées dans la littérature nous ont incités à suggérer que le rapport de la fluorescence orange sur la fluorescence verte associé à JC-1 pourrait fonctionner comme marqueur de la fonction mitochondriale en clinique. Puisque le dysfonctionnement mitochondrial semble précéder les altérations morphologiques, ce test permettrait un diagnostic précoce des myopathies équine d'origine mitochondriale. Bien que les biopsies musculaires représentent les prélèvements de prédilection, elles posent de nombreux problèmes comme celui du choix du muscle et de la nécessité de multiplier les prélèvements, ce qui constitue une procédure trop invasive en clinique de routine et contrevient au respect du bien-être animal. Ces considérations nous ont amenés à tester la capacité de JC-1 de révéler un dysfonctionnement mitochondrial à partir des cellules mononucléées sanguines, en partant de l'hypothèse qu'un dysfonctionnement mitochondrial est généralisé mais que ses effets s'expriment différemment selon le métabolisme des tissus.

6.2. Objectifs

Ce travail a pour but la validation d'un test capable de quantifier l'activité mitochondriale des cellules sanguines mononucléées équine. Une procédure d'analyse standardisée par cytométrie en flux de la fonction mitochondriale des lymphocytes sanguins de chevaux est proposée avec une évaluation critique des aspects techniques, de la reproductibilité du test, de l'établissement de valeurs de référence et du délai entre la prise de sang et l'analyse.

6.3. Résultats

L'analyse par cytométrie en flux des caractéristiques physiques des cellules mononucléées sanguines équine, selon les index de diffusion axiale (FSC) et orthogonale (SSC), a permis d'observer deux sous-populations bien distinctes. La première se caractérisait par des valeurs basses de FSC et SSC ; cette sous-population correspondait aux lymphocytes, ce qui a été confirmé par un marquage par immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux. La deuxième sous-population qui montrait des valeurs plus élevées pour les deux paramètres, était compatible avec les monocytes. La première sous-population étant nettement moins dispersée que la deuxième, elle a été choisie pour étudier les fluorescences associées à JC-1 (Fig 1).

Avec une excitation laser à 488 nm et sans ajout de fluorophore, la population cellulaire sélectionnée exhibait une autofluorescence facilement identifiable et très homogène aux longueurs d'ondes de 530/30 nm et 585/42 nm. A partir des images obtenues, une fenêtre spécifique (Q2) où sera enregistrée la fluorescence propre au fluorophore JC-1 a été définie (Fig 2). En effet, les lymphocytes affichaient une fluorescence nettement plus intense avec le fluorophore JC-1 dans les deux longueurs d'ondes, ce qui traduit un excellent rapport signal détecté sur autofluorescence. Parmi les 120 échantillons dont les résultats contribuent à cette étude, la proportion de cellules émettant à une intensité de fluorescence supérieure à celle de l'autofluorescence dans les canaux orange et vert en présence de JC-1 dépasse systématiquement le seuil de 99%, ce qui signifie que la concentration de JC-1 utilisée était suffisante pour l'ensemble des cellules (Fig 3).

En présence du dissipateur du potentiel de membrane CCCP, des résultats identiques ont été obtenus. Pour être complet, il faut signaler quelques suspensions cellulaires où plus de 5% des

cellules présentaient un niveau de fluorescence dans le canal orange exclusivement, proche du niveau d'autofluorescence. Cette observation a été imputée à une dissipation totale du potentiel de membrane et à la disparition complète des oligomères dans ces cellules (Fig 4).

L'ajout de CCCP a entraîné la diminution attendue du rapport de fluorescence oligomères/monomères (orange/vert), la moyenne de fluorescence dans le canal orange diminuant plus nettement que la moyenne de fluorescence dans le canal vert (Fig 7). Une concentration de 100 μM de CCCP a été constamment utilisée au cours de ce travail. Cependant une étude dose-réponse réalisée sur deux chevaux a montré qu'une perte de fonction mitochondriale maximale est déjà atteinte avec une concentration de CCCP de 1 μM .

Cette étude a été réalisée à partir de lymphocytes sanguins isolés de 31 chevaux différents (Tableau I) ; les rapports de fluorescence (oligomères/monomères) en présence de JC-1 se sont avérés peu variables d'un individu à l'autre (Fig 7). De plus, il a été montré que les prélèvements effectués sur un même cheval avec un intervalle variant de 1 à 35 jours montraient une constance du rapport de fluorescence associé à JC-1 (Tableau II / Fig 5). Aucun effet significatif n'a pu être mis en corrélation avec l'âge, ou le sexe, tant sur les cellules soumises au CCCP que sur les témoins ($P > 0,05$).

Les valeurs moyennes de fluorescence et les rapports ont également été mesurés dans des échantillons sanguins conservés durant des laps de temps variables avant l'analyse de laboratoire (Fig 6). A température ambiante, aucune différence n'a été détectée jusqu'à cinq heures de conservation ($P > 0,05$). Par contre, l'analyse après 24 heures a révélé une chute significative du rapport de fluorescence associé à JC-1.

L'analyse des populations lymphocytaires sanguines des 31 chevaux a généré des valeurs moyennes qui peuvent être utilisées comme valeurs de référence : 42390 +/- 8226 (moyenne de fluorescence verte associée aux monomères), 27385 +/- 6391 (moyenne de fluorescence orange associée aux oligomères) et 0,64 +/- 0,11 (rapport de fluorescence orange sur verte).

6.4. Discussion

Une méthode d'analyse quantitative de la fonction mitochondriale à partir de lymphocytes sanguins purifiés de chevaux a été développée et validée après exposition au fluorophore JC-1

et via analyse par cytométrie en flux. A ce jour, ceci est le premier compte-rendu d'analyse de fonction mitochondriale des cellules sanguines équine avec JC-1.

Nous avons montré que la fluorescence des cellules était homogène et que le rapport signal mesuré sur autofluorescence était aussi significatif que dans les analyses rapportées dans la littérature sur lignées cellulaires (Di Lisa *et al.*, 1995 ; White et Reynolds, 1996). Il est intéressant de signaler que les valeurs de potentiel de membrane mitochondrial mesurées après exposition à un dissipateur de potentiel étaient 10 fois plus faibles que les valeurs mesurées à partir des lymphocytes témoins, ce qui offre une large marge de détection des variations de la fonction mitochondriale.

Ce travail révèle également qu'un cheval cliniquement sain génère des valeurs moyennes d'émission fluorescente constantes dans le temps. De plus, ces valeurs sont indépendantes de l'âge et du sexe et sont assez homogènes d'un cheval à l'autre. Dès lors, cette étude donne une valeur de référence de l'activité mitochondriale des lymphocytes avec un intervalle de confiance tel que 95% des chevaux sains s'y retrouvent : $0,64 \pm 0,22$ (rapport oligomères sur monomères ou fluorescence orange sur fluorescence verte, moyenne ± 2 DS).

Le point de départ de cette étude repose sur un postulat, étayé par de nombreux indices morphologiques : celui que la myopathie atypique serait consécutive à un dysfonctionnement mitochondrial. Ce postulat, pour être validé, doit être confirmé par des données fonctionnelles. En théorie, le test de fonction mitochondriale exposé dans cette étude pourrait apporter cette confirmation. Ceci ne sera évidemment démontrable que si le dysfonctionnement mitochondrial musculaire s'accompagne d'un dysfonctionnement mitochondrial affectant tous les tissus, y compris les leucocytes sanguins. En soi, il n'y a pas de relation directe entre la myopathie et l'activité mitochondriale des lymphocytes mais seulement l'hypothèse qu'une myopathie d'origine mitochondriale est l'expression d'une maladie polysystémique plutôt qu'un processus pathologique affectant spécifiquement les muscles. Selon cette même hypothèse, une maladie mitochondriale polysystémique devrait avoir des répercussions variables sur les différents tissus selon le métabolisme de chaque type cellulaire ; les manifestations des dysfonctionnements mitochondriaux sont généralement observées dans les tissus avec un métabolisme oxydatif élevé et dont les cellules contiennent de nombreuses mitochondries. C'est le cas des cellules de la musculature squelettique.

6.5. Conclusions et perspectives

Lorsqu'une mesure de la fonction mitochondriale est nécessaire chez un cheval, des échantillons sanguins (5ml) doivent être prélevés dans des tubes citratés et conservés à température ambiante pendant maximum cinq heures avant que l'analyse de laboratoire détaillée ici ne soit mise en oeuvre. Ce délai est compatible avec les conditions de terrain mais ne permet pas un envoi postal.

L'analyse quantitative de la fonction mitochondriale proposée et validée dans cette étude ouvre plusieurs perspectives concernant les myopathies équinés : confirmer ou infirmer une atteinte mitochondriale primaire dans la myopathie atypique et ainsi progresser dans la pathogénie de cette maladie mais aussi permettre de confirmer, étudier et prévenir d'autres myopathies d'origine toxique.

L'analyse par cytométrie en flux du potentiel de membrane mitochondrial dans des cellules intactes et non à partir de mitochondries isolées présente le grand avantage de maintenir les mitochondries dans leur environnement physiologique. En outre, cette méthode est à la fois qualitative (variations de fluorescence liées à la présence de monomères ou d'oligomères) et quantitative (intensité de fluorescence), ce qui permet d'étudier les variations, même légères, du potentiel de membrane dans les cellules vivantes.

6.6. Bibliographie

Brandt K, Hinrichs U, Glitz F, Landes E, Schulze C, Deegen E, Pohlenz J, Coenen M (1997) Atypische Myoglobinurie der Weidepferde. *Pferdeheilkunde*, **13**:27-34.

Bezerra JrPS, Ilha MRS, Langohr IM, Barros CSL (2000) Intoxicação experimental por monensina em eqüinos. *Pesq Vet Bras*, **20**:102-108.

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 Vet J*, **39**:26-32.

Cossarizza A, Ceccarelli D, Masini A (1996) Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level. *Exp Cell Res*, **222**:84-94.

Delguste C, Cassart D, Baise E, Linden A, Schwarzwald C, Feige K, Sandersen C, Rollin F, Amory H (2002) Myopathies atypiques chez les chevaux au pré : une série de cas en Belgique. *Ann. Méd Vét*, **146**:231-243.

Di Lisa F, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, Stern MD, Hansford RG (1995) Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J Physiol*, **486**:1-13.

Hornstra D, Andersson MA, Mikkola R, Salkinoja-Salonen MS (2003) A new method for *in vitro* detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicol In Vitro*, **17**:745-751.

Hulland TJ (1992) Muscle and Tendon. In : *Pathology of Domestic Animals*, 4th edn., Ed: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, N. Palmer, Academic Press, San Diego, 183-265.

Kulkarni GV, Lee W, Seth A, McCulloch CA (1998) Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts. *Exp Cell Res*, **245**:170-178.

Mancini M, Anderson BO, Caldwell E, Sedghinasab M, Paty PB, Hockenbery DM (1997) Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line. *J Cell Biol*, **138**:449-469.

Martin BW, Terry MK, Bridges CH, Bailey EMJr (1981) Toxicity of *Cassia occidentalis* in the horse. *Vet Hum Toxicol*, **23**:416-417.

Mollenhauer HH, Rowe LD, Cysewski SJ, Witzel DA (1981) Ultrastructural Observations in Ponies After Treatment with Monensin. *Am J Vet Res*, **42**:35-40.

Muyllé E, Vandenhende C, Oyaert W, Thoonen H, Vlaeminck K (1981) Delayed monensin sodium toxicity in horses. *Equine Vet J*, **13**:107-108.

Reers M, Smith TW, Chen LB (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, **30**:4480–4486.

Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A (1997) JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*, **411**:77-82.

Sick TJ, Perez-Pinzon MA (1999) Optical methods for probing mitochondrial function in brain slices. *Methods*, **18**:104-108.

Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**:3671-3675.

Van Vleet JF (1997) The musculoskeletal system. In : *Veterinary pathology*, 6th edn., Ed: T.C. Jones, R.D. Hunt, N.W. King, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia :873-897.

Wadia JS, Chalmers-Redman RME, Ju WJH, Carlile GW, Phillips JL, Fraser AD, Tatton WG (1998) Mitochondrial Membrane Potential and Nuclear Changes in Apoptosis Caused by Serum and Nerve Growth Factor Withdrawal: Time Course and Modification by (-)-deprenyl. *J Neurosci*, **18**:932-947.

White RJ, Reynolds IJ (1996) Mitochondrial Depolarization in Glutamate-Stimulated Neurons: An Early Signal Specific to Excitotoxin Exposure. *J Neurosci*, **16**:5688–5697.

Tableau I. Race, âge et sexe des 31 chevaux ayant fait l'objet de cette étude

ID	Race	Sexe	Age (années)
1	Demi-sang	H	15
2	Demi-sang	H	16
3	Demi-sang	H	10
4	Demi-sang	F	5
5	Demi-sang	F	3
6	Demi-sang	H	19
7	Shire	F	13
8	Demi-sang	F	14
9	Demi-sang	F	14
10	Demi-sang	F	6
11	Demi-sang	H	5
12	Demi-sang	F	7
13	Trotteur	F	14
14	Espagnol	H	12
15	Demi-sang	H	5
16	Frison	F	7
17	Demi-sang	H	8
18	Demi-sang	F	22
19	Demi-sang	H	11
20	Demi-sang	F	10
21	Demi-sang	F	5
22	Selle Français	F	17
23	Demi-sang	F	10
24	Demi-sang	E	7
25	Fjord	F	14
26	Trotteur	F	1
27	Trotteur	F	1
28	Demi-sang	F	1
29	Part Arabe	F	1
30	Demi-sang	F	2
31	Demi-sang	F	2

H, hongre ; E, étalon ; F, femelle

Tableau II. Reproductibilité de la fluorescence JC-1 associée aux lymphocytes de chevaux prélevés 2 ou 4 fois à plusieurs jours d'intervalle

	Sans intoxication			Avec intoxication		
	Vert* (monomères)	Orange* (oligomères)	Orange/vert	Vert* (monomères)	Orange* (oligomères)	Orange/vert
Jour 1 (n=8)	43785±2421	28461±4895	0.65±0.08	22159±2643	1426±108	0.06±0.01
Jour 2 (n=8)	45288±3290	27766±3796	0.61±0.09	25144±5357	1618±389	0.06±0.01
Jour 3 (n=4)	47075±6895	30789±5418	0.65±0.02	31141±13145	2160±1067	0.07±0.01
Jour 4 (n=4)	42055±4729	25426±2591	0.61±0.04	25886±13145	1812±1067	0.07±0.01

Les chevaux ayant fait l'objet de 2 prélèvements portent les numéros 1, 7, 8, 10, 13, 15, 16 et 23. Les chevaux ayant fait l'objet de 4 prélèvements sont les cas 1, 7, 8 et 16.* Les valeurs de fluorescence moyennes de 10,000 lymphocytes sont données en unités arbitraires. L'analyse de la variance n'a révélé aucun effet significatif du jour du prélèvement ($P>0,05$).

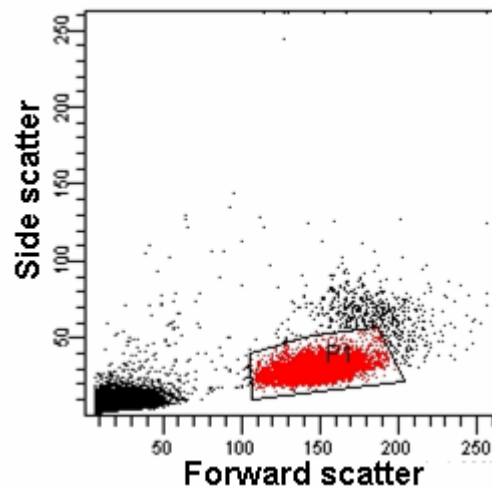


Figure 1 : Les paramètres morphologiques (taille et granulosité) ont permis de visualiser deux sous-populations ; la première (entourée par le polygone) a été choisie pour l'analyse de la fluorescence associée à JC-1 par cytométrie en flux et correspond aux lymphocytes. La deuxième sous-population, plus dispersée, correspond aux monocytes.

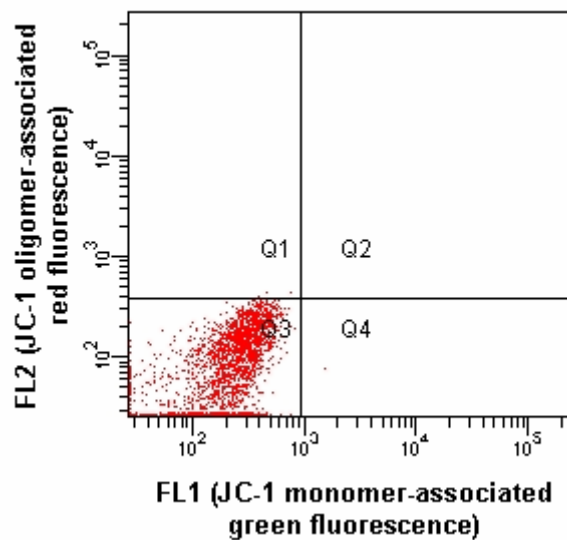


Figure 2 : Diagramme de dispersion FL2 versus FL1 montrant l'autofluorescence de la sous-population choisie avec une excitation laser de 488 nm.

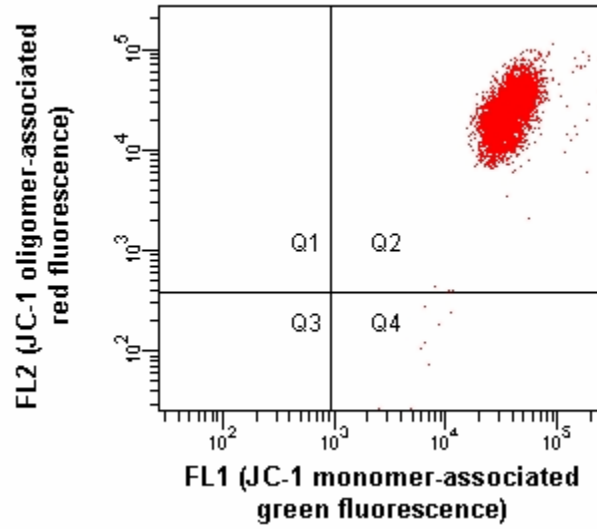


Figure 3 : Diagramme de dispersion FL2 versus FL1 montrant la fluorescence de la sous-population sélectionnée associée à JC-1 avec une excitation laser de 488 nm.

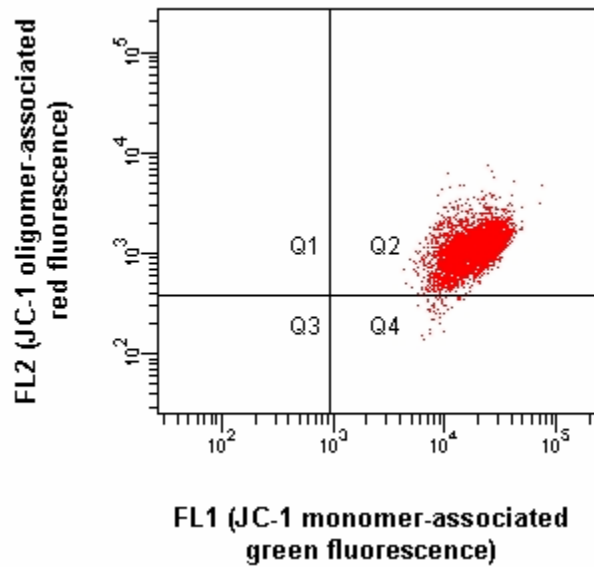


Figure 4 : Diagramme de dispersion FL2 versus FL1 montrant la fluorescence associée à JC-1, après intoxication avec CCCP qui est un dissipateur de $\Delta\psi_m$ (100 μM).

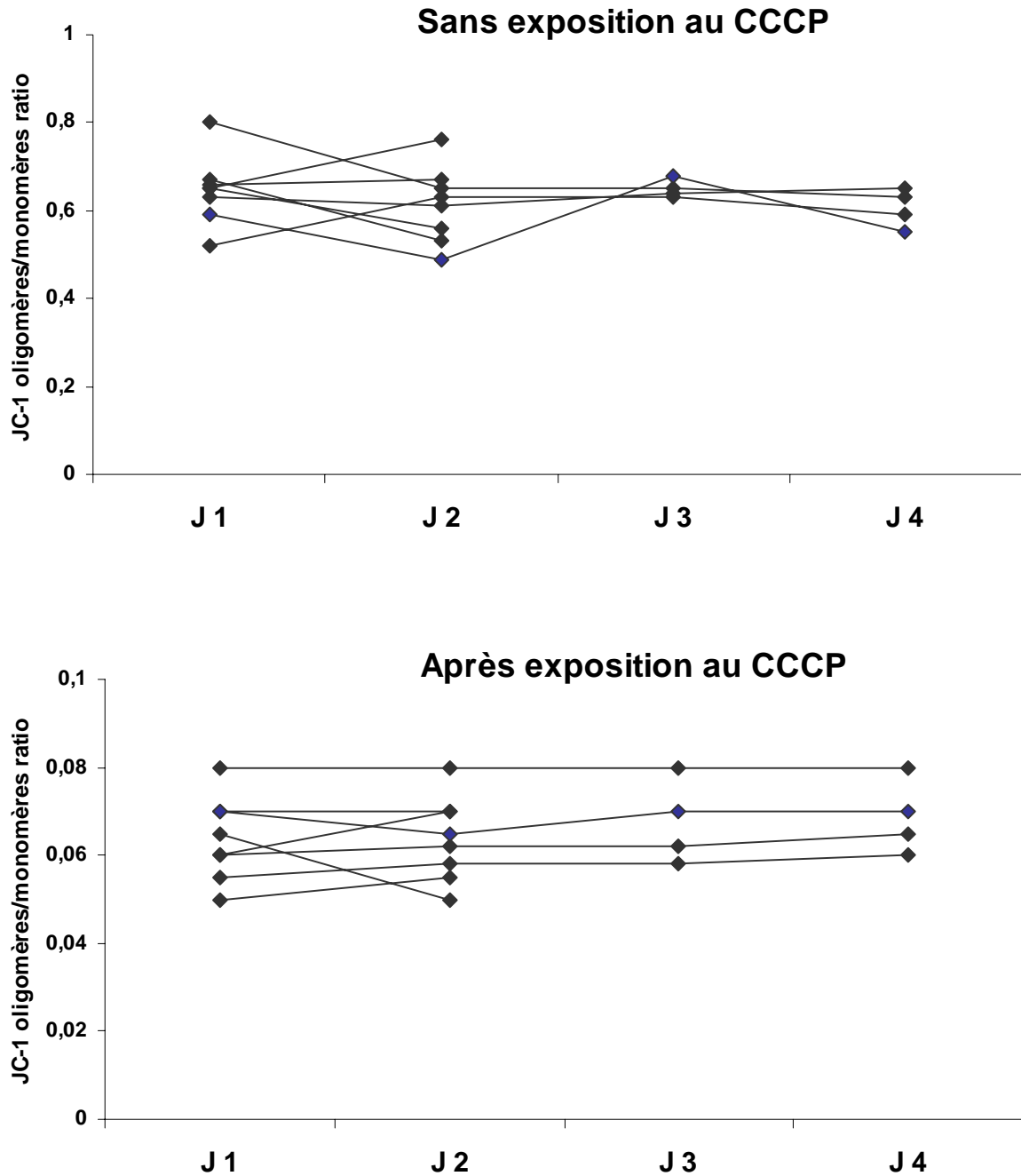


Figure 5 : Variations individuelles du rapport moyen de la fluorescence (oligomères/monomères) associée à JC-1 en fonction du jour de prélèvement. Huit chevaux (1, 7, 8, 10, 11, 15, 16, 23) ont fait l'objet de prélèvements multiples. Les rapports de fluorescence ont été calculés à partir de 10.000 lymphocytes. Il n'y avait pas de différence significative ($P > 0,05$).

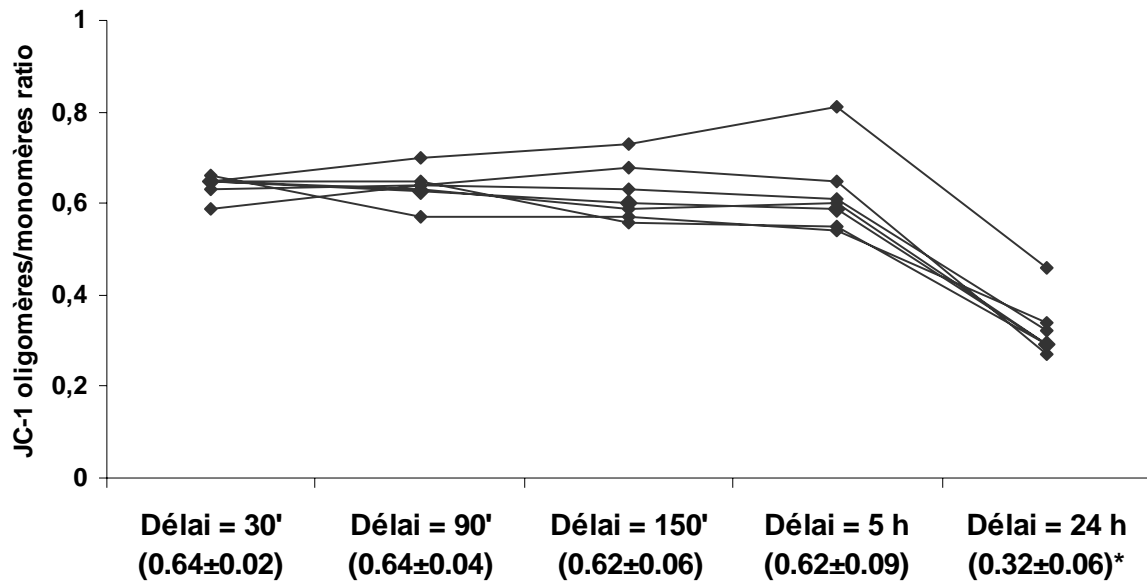


Figure 6 : Effet du délai entre la prise de sang et le début de l'analyse sur le rapport oligomères/monomères associé à JC-1. Sept chevaux ont fait l'objet de cette étude (1, 7, 8, 10, 15, 16, 23). Les rapports oligomères/monomères associés à JC-1 ont été calculés à partir des fluorescences moyennes de 10.000 cellules (sans intoxication). *Le rapport moyen oligomères sur monomères était significativement différent après 24 heures ($P < 0,05$).

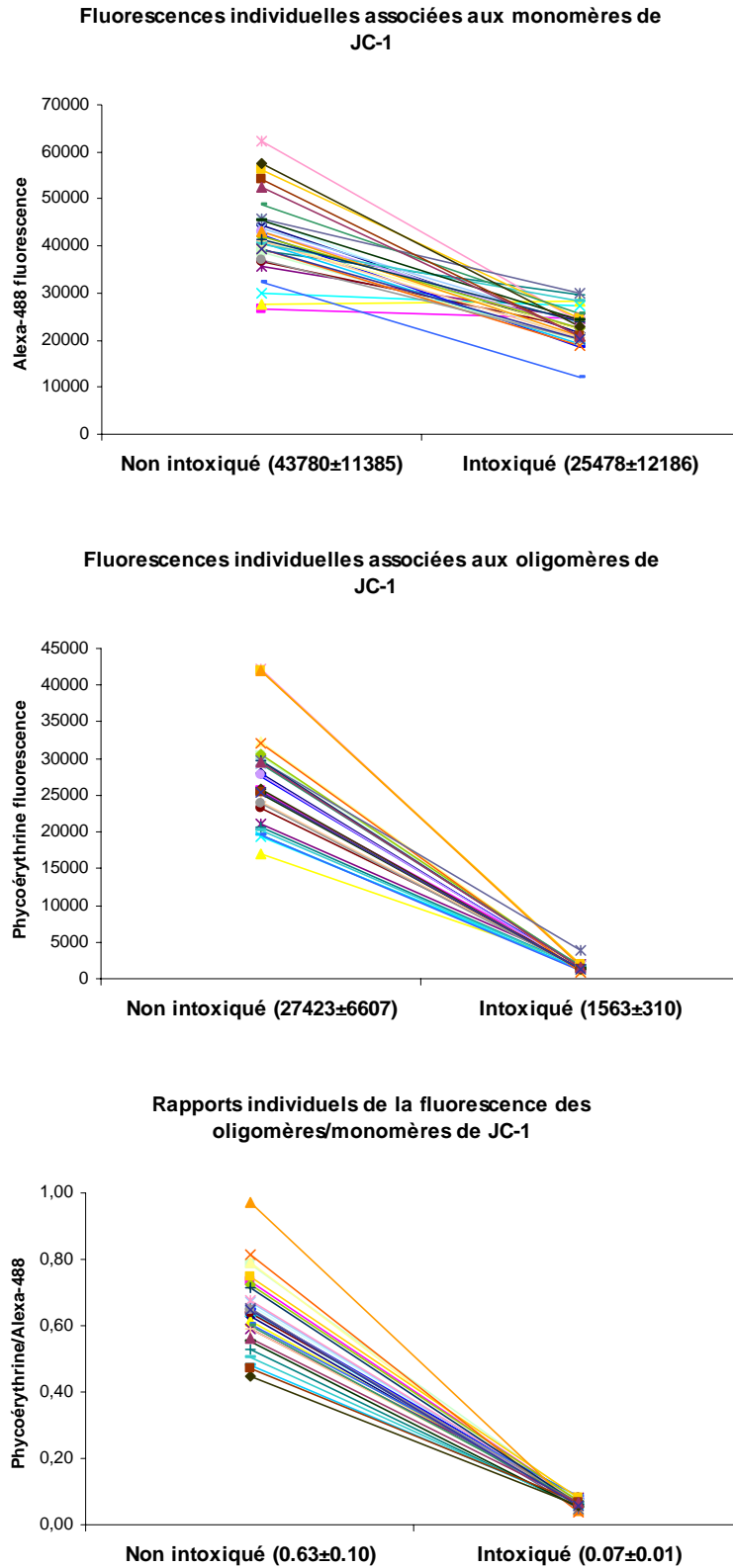


Figure 7 : Fluorescences individuelles associées à JC-1 et leur rapport chez les 31 chevaux cliniquement sains ayant fait l'objet de cette étude.

7. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Les résultats morphologiques de cette étude indiquent une parenté lésionnelle entre la myopathie atypique équine et les myopathies toxiques au sens large ; l'hypothèse d'une atteinte primitive des mitochondries a été proposée.

La vérification fonctionnelle d'une altération mitochondriale précoce s'imposant comme une suite logique à cette étude morphologique, une méthode d'analyse de la fonction mitochondriale à partir de lymphocytes sanguins purifiés a été développée et validée. Le choix des lymphocytes repose sur le postulat qu'une myopathie d'origine mitochondriale serait l'expression d'une maladie polysystémique avec des répercussions différentes selon le métabolisme cellulaire.

Les perspectives à court terme sont, évidemment, la mise en pratique de ce test sur du sang de chevaux atteints de myopathie atypique, ce qui, vu le caractère aléatoire de la maladie, n'a pas encore pu être réalisé. Cette analyse permettra de confirmer ou d'infirmer un dysfonctionnement mitochondrial dans la myopathie atypique équine. En fonction de la réponse, les perspectives à plus long terme seront adaptées.

TROISIEME PARTIE

ARTICLES ORIGINAUX

8. ARTICLE N°1

MORPHOLOGICAL ALTERATIONS IN OXIDATIVE MUSCLES AND MITOCHONDRIAL STRUCTURE ASSOCIATED WITH EQUINE ATYPICAL MYOPATHY

Dominique CASSART*, Etienne BAISE*, Yan CHEREL°, Catherine DELGUSTE#, Nadine ANTOINE*, Dominique VOTION#, Hélène AMORY#, Frédéric ROLLIN#, Annick LINDEN§, Freddy COIGNOUL*, Daniel DESMECHT*

Equine Veterinary Journal (2007), **39**(1) 26-32

**Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine
University of Liège, Sart Tilman B43, B-4000 Liège – Belgium*

°*Department of Pathology, UMR INRA 703, National veterinary school of Nantes, BP 40706, F-44703 Nantes
Cedex 03 - France*

#*Department of clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine
University of Liège, Sart Tilman B43, B-4000 Liège – Belgium*

§*Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Sart
Tilman B43, B-4000 Liège – Belgium*

Corresponding author: Daniel.desmecht@ulg.ac.be

Keywords

Atypical myoglobinuria / horse / mitochondrion / morphopathology

Summary.

Reasons for performing study: There is a lack of well documented studies about muscular lesions in Equine Atypical Myopathy (EAM).

Objectives: To characterize morphopathological changes of striated muscles and myocardium, with the aim to progress in the understanding of this disease.

Methods: Thirty-two 0.5- to 7 year-old horses kept on pasture were referred for a sudden ataxia/myoglobinuria syndrome. Clinical examination (stiffness, muscle pain, muscle fasciculations, abnormal gait, recumbency, myoglobinuria, tachycardia, sweating) and plasma CK, LDH and AST levels were consistent with extensive myonecrosis and, together with anamnestic data, with so-called “Equine Atypical Myopathy” (EAM), a disease of unknown etiology repeatedly reported in the literature since 1939. Macroscopic and microscopic (histology, histoenzymology, ultrastructure) lesions were evaluated.

Results: Necropsic examination revealed large areas of muscle necrosis, the extent and severity of which varied between cases and muscles, but which were clearly more constant and severe in respiratory and postural muscles and in the myocardium. Histology highlighted a multifocal and monophasic process compatible with Zenker degeneration/necrosis that mostly and segmentally affected type-1 fibres. Histochemical evaluation revealed a weak and disorganized pattern of NADH tetrazolium reductase staining, the absence of calcium salts precipitates and a dramatic accumulation of lipid droplets. Ultrastructural examination often revealed fibres of which the sole modifications were altered mitochondria and sarcoplasmic lipidosis.

Conclusions: Taken together, the data suggest that a primary alteration of mitochondria should be considered, although secondary mitochondrial abnormalities have yet to be ruled out.

Potential relevance: The morphologic features gathered here reveal that EAM shares most of the characteristics of toxic myopathies.

Introduction

Between September 2000 and December 2003, a series of horses with motor deficits and myoglobinuria were referred to the necropsy room of the Liege Faculty of Veterinary Medicine. The anamnestic data and clinical observations suggested a common entity compatible with a syndrome previously referred to as "atypical myoglobinuria" by authors in the United Kingdom (Bowen and Craig 1942; Linklater 1984; Anonymous 1985; Hosie *et al.* 1986; Whitwell *et al.* 1988; Harris and Whitwell 1990; Robinson 1991; Harris 1996), Australia (Irwin and Pulsford 1951), Canada (Pope and Heslop 1960), the U.S. (Tritschler and Miles 1966), Germany (Brandt *et al.* 1997) and Belgium (Carthe *et al.* 1976; Delguste *et al.* 2002; Votion *et al.* 2003) since 1939 (Bowen and Craig 1942).

The equine myopathies include rhabdomyolysis associated with exercise (McEwen et Hullahnd 1986; Valberg 1996), inflammatory myopathies (Hodgson 1990; Hullahnd 1992; Van Vleet 1997), nutritional myopathies (Dill and Rebhun 1985; Lofstedt 1997), toxic myopathies (Martin *et al.* 1981; Mollenhauer *et al.* 1981; Muylle *et al.* 1981; Bezerra *et al.* 2000), myopathies of vascular origin (Hodgson 1990; Hullahnd 1992; Van Vleet 1997) and polysaccharide storage myopathy (Freestone and Carlson 1991; Hullahnd 1992; Van Vleet 1997; Valberg *et al.* 1999). The entity studied here and in the previous publications was not compatible with any of these categories, which led to a diagnosis of "atypical myoglobinuria" or "atypical myopathy", in reference to the unusual conditions in which the disease appears (Anonymous 1985).

Atypical myopathy affects horses and ponies kept on pasture and receiving few or no nutritional supplements. These horses were not exercised either prior to or at the time of the first clinical signs. All previous cases had been reported in the springtime or autumn and after a sudden drop in the minimum daily temperature (Brandt *et al.* 1997). Affected horses are usually well and suddenly display signs of acute myopathy (stiffness, muscle pain, muscle fasciculations, abnormal gait, recumbency, myoglobinuria, tachycardia, sweating), with no hyperthermia (Delguste *et al.* 2002). Usually, appetite remains unchanged. Unlike the other types of myopathy, this condition is often fatal within 12 to 72 hours. Blood analysis consistently shows a spectacular increase in muscle enzymes, in particular the creatine-kinases (Delguste *et al.* 2002).

In this paper, macro- and microscopic morphological alterations are examined systematically in 32 clinical cases. Histopathological and enzymohistochemical changes are reported, as well as ultrastructural lesions in skeletal muscles and in the myocardium.

Materials and methods

Cases

Further to the apparition of the first suspected cases of atypical myopathy, an intervention network was set up in the autumn of 2000 in order to forward suspect cases to the equine clinic and to transfer dead animals to the necropsy room. Thirty-two horses were necropsied (Table 1) following a standard procedure and tissue samples were collected. The formal diagnosis of atypical myopathy was based on the coexistence of the following observations: (i) similar environmental conditions (spring/autumn, horse at pasture, lack of prior effort, swift and fatal progress), (ii) absence of significant non-muscular lesions, (iii) strictly degenerative muscular lesions and (iv) location of the lesions (Delguste *et al.* 2002). A group of horses in the same age range as the principals and euthanised for reasons unrelated to any neuromuscular condition were used as controls (Table 1).

Sampling

The carcasses were generally transported to the necropsy room within 24 hours and kept at 4°C. Three sampling procedures were used, depending on the delay between death and necropsy. Under 24 hours, liver, kidney, lung, encephalus, bladder, tongue, oesophagus, various segments of the gastrointestinal tract, myocardium and the striated muscles *masseter*, *brachiocephalicus*, *sternocephalicus*, *triceps brachii*, *infraspinatus*, *supraspinatus*, *subscapularis*, *intercostales*, *diaphragma*, *erector spinae*, *quadriceps femoris*, *semitendinosus*, *semimembranosus* and *gluteus profundus* were sampled (cases 2, 3, 7, 9, 10, 13, 16, 17, 20, 21, 27, 29, 31, 32). Under one hour, the pancreas and parasympathic ganglia were also sampled (cases 20, 29, 32). Over 24 hours, if the suspicion of atypical myopathy was confirmed at necropsy, only the striated muscles *brachiocephalicus*, *sternocephalicus*, *infraspinatus*, *subscapularis*, *erector spinae*, *diaphragma*, *intercostales*, *semitendinosus*, *semimembranosus* and *myocardium* were sampled (cases 1, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 14, 15, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 30).

Processing and staining

All the tissue samples were fixed in 10% buffered formalin, trimmed and embedded in paraffin wax according to standard laboratory procedures. Tissue sections of 4 µm thickness were stained with hematoxylin and eosin (H&E, all), periodic acid Schiff (PAS, *intercostalis*, *diaphragma*, *subscapularis* and *infraspinatus*) or alizarin-red (AZR, *intercostalis*, *diaphragma*, *sternocephalicus*, *infraspinatus*, *subscapularis* and *erector spinae*) and examined by light microscopy. Selected fixed striated muscle samples were frozen and trimmed to 10 µm for staining with oil red O (ORO, *myocardium*, *diaphragma*, *sternocephalicus*, *infraspinatus*, *subscapularis* and *erector spinae*) to detect accumulation of neutral lipids (cases 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 27, 28 and 30). Selected tissue samples were also frozen (-80°C) and trimmed to 10 µm for evidence of (i) myofibrillar ATPase activity at pH 10.4 and 4.3 and (ii) mitochondrial NADH tetrazolium reductase activity (*intercostalis*, *infraspinatus*, *subscapularis* and *erector spinae* of cases 17, 20, 21, 27, 29 and 32). When horses were necropsied just after euthanasia (cases 20, 29 and 32), heart and striated muscle (*intercostalis*, *diaphragma*, *erector spinae*) samples were immediately fixed in 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4), postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated and embedded in epoxy resin for transmission electron microscopy. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined on a Zeiss EM910 electron microscope.

Results*Necropsy lesions*

All but one horses were in good body condition (horse 28 was thin). Fourteen (cases 2, 3, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 22 and 24) had whitish foam around their nostrils. When carcasses were not congestive (cases 20, 26, 29, 30 and 32), certain muscle groups were found to be discoloured (Fig. 1). The muscles affected, in decreasing order of frequency, were the intercostal muscles, the shoulder muscles, certain neck muscles and the masseters. As far as the thoracic organs were concerned, the lungs were notable for diffuse bilateral congestion, increased weight and abundant foamy fluid which oozed at sectioning. In approximately one-third of the cases (horses 5, 6, 7, 8, 9, 11, 22, 28 and 32), petechiae were scattered over the pleurae, both visceral and parietal. In over half the cases (horses 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 16, 20, 25, 26, 27, 29 and 32), there were large whitish areas on the ventricular myocardium,

especially in the subendocardial areas (Fig. 2). In a few cases, hydropericardium (horses 3 and 32) or subcutaneous oedema of the head and neck (case 17) were also observed. The oesophagus was impacted in cases 4, 22 and 23. Abdominal lesions varied considerably from one animal to another. In one-third of the group (cases 1, 2, 3, 4, 5, 12, 14, 16, 23 and 29), the stomach contained a small quantity of blackish-red serous fluid, and the antral mucosa was blackish-red, with erosions and petechiae. In seven cases (1, 2, 3, 4, 7, 11 and 26), the duodenum was congestive with a reddish content compatible with proximal enteritis or a shock gut (Barker *et al.* 1992). Parasitic lesions were also noted in most cases: gastric nodules associated with *gasterophilus* larvae (cases 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 27 and 32), ascarids (cases 20 and 32) and anoplocephalae (cases 15, 19, 20, 21, 23, 24 and 32) in the small intestine and the ileocaecal valvula respectively, or small ulcers or nodules consistent with the presence of cyathostomids in the colon (cases 2 and 32). Lipidosis was present in the liver of five animals (cases 1, 3, 4, 6 and 17). Although there were no obvious renal lesions, the bladders almost systematically contained blackish-red urine. There were no macroscopic lesions of the central nervous system.

Microscopic lesions

The most severe and frequent lesions were in skeletal muscles. They were multifocal in distribution with a monophasic appearance compatible with Zenker degeneration/necrosis (Fig. 3C). Affected muscle fibres, interspersed among normal fibres, were segmentally swollen (up to four times the cross-section area of normal fibres), hypereosinophilic, devoid of cross-striations and myofibrils and displayed a homogenous hyaline glassy appearance. Hypercontraction bands were sometimes observed in some degenerative fibres. Alternately, some abnormal fibres exhibited a flocculent or granular pattern. The altered contractile material becomes frequently fragmented into blocks scattered along the sarcolemmal tube of persisting external lamina of muscle fibres (Fig. 3D). In some cases, sarcolemmal tubes were invaded with macrophages (Fig. 3E) or displayed typical myoblasts and myotubes suggesting a regenerating process (Fig. 3F). In general, the scaffolding of external lamina of the muscle fibres, the endomysial connective tissue, the innervation and the blood supply were intact, with only few foci of fibroblastic proliferation. The extent and severity of the degenerative process varied between cases and muscles, even among samples from the same muscle. Taken altogether, the results showed that respiratory and postural muscles were the most affected (Fig. 12).

About myocardium samples, the most frequent microscopic lesion was granular degeneration of myocardium cells (Fig. 4C; cases 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 20 and 29). Horse 21 showed multifocal myocarditis ; this cardiac lesion was characterized by myolysis with cellular infiltration of macrophages (Fig. 4D and 4E). No microscopic lesion was observed in the myocardium of other horses.

Neither glycogen nor calcium salts accumulation were detectable in skeletal muscles after PAS and AZR staining respectively. Conversely, a severe accumulation of neutral lipids was present into the affected skeletal muscles (Fig. 6) (multifocal pattern) and cardiac fibres (Fig. 7) (diffuse pattern), as demonstrated with the ORO stain. Myofibrillar ATPase staining revealed changes that mostly affected type-1 fibres, consisting of hypertrophy, anisocytosis and heterogeneous staining (Fig. 8). Overall, type-1 fibres were larger than type-2 fibres. Anisocytosis and angular cross-section areas of some fibers resulted from compression by adjacent voluminous round fibres. Intracellular heterogeneous staining resulted from the focal or multifocal presence of type-1 fibre myofibrils devoid of ATPase staining. Furthermore, NADH tetrazolium reductase staining of affected fibres was weaker than that of control fibres and underlined a severe alteration in the distribution of mitochondria throughout the cytoplasm, with multifocal aggregates on the one hand and optically empty areas on the other, thus contrasting with the typically homogeneous distribution (Fig. 9).

Microscopic examination of the liver, pancreas, urinary bladder, brain, spinal cord and parasympathetic ganglia did not reveal significant changes. Hyaline, granulous and myoglobin casts were consistently identified in the kidneys (Fig. 5). The gastrointestinal smooth muscle fibres were sometimes interrupted by hypercontraction bands.

Ultrastructural changes

Ultrastructural changes of skeletal muscles included swelling of mitochondria with matrix loss and cristae fragmentation and disappearance, a tremendous accumulation of lipid globules in the cytoplasm and disorganisation of the myofibrils (Fig. 10). By contrast, fibre membranes, endoplasmic reticulum and nuclei were intact. In the myocardium, only lipidosis was observed with large and excessive numbers of lipid vesicles in the cytoplasm between myofibrils (Fig. 11). The changes observed in principals were never observed in control samples.

Discussion

The 32 horses considered in this study suffered from a rapidly progressing muscular disease associated with degeneration and necrosis primarily affecting the respiratory muscles, the postural muscles and sometimes the myocardium. Spontaneous death was due to cardiac failure, caused either directly by extensive degeneration of the myocardium, or indirectly by asphyxia due to diffuse pulmonary oedema caused by congestive heart failure and restricted ventilation associated with necrosis of respiratory muscles. These conclusions are supported by the clinical data (see Introduction), the striated muscles lesions and by earlier reports on atypical myopathy (Whitwell *et al.* 1988; Harris 1996; Brandt *et al.* 1997; Delguste *et al.* 2002).

Microscopic examination revealed an acute, synchronous degenerative process affecting muscle fibres, with a seemingly intact regenerative potential. More specifically, the type 1 slow contracting fibres tended to be more affected, which is consistent with the macroscopic observation that respiratory and postural muscles were more severely affected. The sharp decrease of mitochondrial NADH reductase activity and its altered cytoplasmic distribution suggest a central role of mitochondria in the degenerative process. Secondary mitochondrial alterations may occur as a consequence of primary membrane or nuclear pathological processes. A membrane disease can be excluded based on the lack of ultrastructural changes at the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum membranes (TEM) and based on the fact that no calcium precipitates were detected, which systematically occurs in this case due to the capacity of intact mitochondria to retrieve/concentrate calcium from the cytosol (Karp 1979). Also, coexisting intact nuclei and dramatically altered mitochondria were the rule (TEM). It is therefore suggested that, chronologically speaking, the first disorder in EAM is located in mitochondria. Both the accumulation of lipids in the cytoplasm (ORO, TEM) and lack of calcium salts accumulation (AZR) are also compatible with a primary mitochondrial failure, since energy exhaustion results in failure of mitochondrial calcium retrieval from the cytosol on the one hand (Karp 1979), and slowing of mitochondrial oxidation of fatty acid lead to long-chain fatty acid acyl-CoA esters accumulation, cytosolic predecessor pathways inhibition, and ultimately FFA shunting into triglyceride and lipid globules neogenesis, on the other (Gopalakrishnakone *et al.* 1984; Eaton *et al.* 1996). The results therefore suggest that forthcoming studies should focus on the detection of causes that are capable to interrupt mitochondrial biochemical pathways.

The morphopathological data collected here also allow a comparison between atypical myopathy and the other equine myopathies. It clearly shows that the disease is radically different from the rhabdomyolysis associated with muscular effort (tying up or Monday morning disease), where the main lesions chiefly occur in type 2 fibres of the back and rear leg muscles with calcifications and no lipid accumulation (Hulland 1992; Van Vleet 1997). Atypical myopathy also differs from ischemic myopathies, that affect a (focal) muscle group without myocardial lesions (Hulland 1992; Van Vleet 1997), and from the myosites, where an inflammatory infiltrate is present. A deficiency-based myopathy (vitamin E, selenium) could be considered since the degenerative process was multifocal and equally affected the respiratory and cardiac muscles (Hulland 1992; Van Vleet 1997). However, such lesions are always polyphasic, appearing over a much longer period of time, and being characterized by extensive cell membrane lesions and calcifications, and no lipidic globules (Hulland 1992; Van Vleet 1997). Interestingly, comparison with the lesions caused by the consumption of ionophores, gossypol or *Cassia occidentalis* seeds reveals that they are not significantly different from those of atypical myopathy. In these toxic myopathies, segmental necrosis of striated muscle fibres without mineralization, weak activity of the oxidative enzymes, and lipid storage in muscle fibres are similarly observed, and electron microscopic examination also reveals disruption of mitochondrial cristae and swelling and rupture of mitochondria without consistent nuclear or membrane alterations (Martin *et al.* 1981; Mollenhauer *et al.* 1981; Muylle *et al.* 1981; Hulland 1992; Van Vleet 1997; Bezerra *et al.* 2000).

To conclude, the morphopathological data suggest that equine atypical myopathy seems to be a mitochondrial disorder, compatible with a myopathy of toxic origin. A brief inventory of the known etiologies encompasses a broad spectrum of possible causes, including plant (*C. occidentalis*), bacterial (monensin) and fungal (gossypol) toxins.

Acknowledgments

The authors are grateful to Drs. V. Toppets and J. Mast for their scientific expertise, and to C. Garot, M. Jansen, M. Sarlet and especially T. Fett for technical help and enthusiasm.

References

- Anonymous. (1985) Special Report. Atypical myoglobinuria : a new disease in horses ? *Vet. Rec.* **116**, 86-87.
- Barker, I. K., Van Dreumel, A. A., Palmer, N. (1992) The alimentary system. In : *Pathology of Domestic Animals*, 4th edn., Ed: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, N. Palmer, Academic Press, San Diego, pp 1-317.
- Bezerra, JrP.S., Ilha, M.R.S., Langohr, I.M., Barros, C.S.L. (2000) Intoxicação experimental por monensina em eqüinos. *Pesq. Vet. Bras.* **20**, 102-108.
- Bowen, J.N., Craig, J.F. (1942) Myoglobinuria in horses. *Vet. Rec.* **35**, 354-355.
- Brandt, K., Hinrichs, U., Glitz, F., Landes, E., Schulze, C., Deegen, E., Pohlenz, J., Coenen, M. (1997) Atypische Myoglobinurie der Weidepferde. *Pferdeheilkunde* **13**, 27-34.
- Carthe, D., Ansay, M., Lomba, F., Bienfet, V., Chauvaux, G. (1976) Myoglobinurie chez des poulains demi-sang de sept mois. *Ann. Méd. Vét.* **120**, 325-331.
- De Girolami, U., Anthony, D.C. (2000) Diseases of Skeletal Muscle and Peripheral Nerve. In: *Diagnostic Electron Microscopy*. 2nd edn., Ed: R. G. Dickersin, Springer, New-York. pp 912-988.
- Delguste, C., Cassart, D., Baise, E., Linden, A., Schwarzwald C., Feige, K., Sandersen, C., Rollin, F., Amory, H. (2002) Myopathies atypiques chez les chevaux au pré : une série de cas en Belgique. *Ann. Méd. Vét.* **146**, 231-243.
- Dill, S.G, Rebhun, W.C. (1985) White Muscle Disease in Foals. *The Compendium on Continuing Education* **7**, 627-634.
- Eaton, S., Bartlett, K., Pourfarzam, M. (1996) Mammalian mitochondrial β -oxidation. *Biochem. J.* **320**, 345-357.
- Freestone, J.F., Carlson, G.P. (1991) Muscle disorders in the horse: a retrospective study. *Equine Vet. J.* **23**, 86-90.
- Gopalakrishnakone, P., Dempster, D.W., Hawgood, B.J., Elder, H.Y. (1984) Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phosphatase A2 complex. *Toxicon.* **22**, 85-98.
- Harris, P. (1996) Differential diagnosis of an acute episode of a primary myopathy out at pasture. *Equine vet. Educ.* **8**, 272-276.
- Harris, P., Whitwell, K.E. (1990) Atypical myoglobinuria alert. *Vet. Rec.* **127**, 603.
- Hodgson, D. R. (1990) Diseases of Muscle. In : *Large Animal Internal Medicine*, Ed : B.P. Smith, The C.V. Mosby Company, S^t Louis, pp 1335-1360.

- Hosie, B.D., Gould, P.W., Hunter, A.R., Low, J.C., Munro, R., Wilson, H.C. (1986) Acute myopathy in horses at grass in east and south east Scotland. *Vet. Rec.* **119**, 444-449.
- Hulland, T.J. (1992) Muscle and Tendon. In : *Pathology of Domestic Animals*, 4th edn., Ed: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, N. Palmer, Academic Press, San Diego, pp 183-265.
- Irwin, C.P.F., Pulsford, M.F. (1951) Enzootic myoglobinuria in a horse. *Aust. Vet. J.* **27**, 101-102.
- Karp, G. (1979) Mitochondria and the Conservation of Chemical Energy. In : *Cell Biology*. Ed: Mc Graw-Hill Book Company, New York, London, pp 342-377.
- Linklater, K.A. (1984) Myopathy in horses and ponies. *Vet. Rec.* **115**, 666.
- Lofstedt, J. (1997) White muscles disease of foals. *Vet Clin North Am Equine Pract.* **13**, 169-185.
- Martin, B.W., Terry, M.K., Bridges, C.H., Bailey, E.M.Jr. (1981) Toxicity of *Cassia occidentalis* in the horse. *Vet. Hum. Toxicol.* **23**, 416-417.
- McEwen, S.A., Hulland, T.J. (1986) Histochemical and Morphometric Evaluation of Skeletal Muscle from Horses with Exertional Rhabdomyolysis (Tying-up) *Vet. Pathol.* **23**, 400-410.
- Mollenhauer, H.H., Rowe, L.D., Cysewski, S.J., Witzel, D.A. (1981) Ultrastructural Observations in Ponies After Treatment with Monensin. *Am. J. Vet. Res.* **42**, 35-40.
- Muyllé, E., Vandenhende, C., Oyaert, W., Thoonen, H., Vlaeminck, K. (1981) Delayed monensin sodium toxicity in horses. *Equine Vet. J.* **13**, 107-108.
- Pope, D.C., Heslop, C.H. (1960) An outbreak of myoglobinuria in light horses. *Can. Vet. J.* **1**, 171-174.
- Robinson, H.C. (1991) Atypical myoglobinuria. *Vet. Rec.* **128**, 44.
- Tritschler, L.G., Miles, D. (1966) An outbreak of myoglobinuria. *Vet. Med.* **61**, 649-651.
- Valberg, S.J., Carlson, G.P., Cardinet, G.H. 3rd, Birks, E.K., Jones, J.H., Chomyn, A., DiMauro, S. (1994) Skeletal muscle mitochondrial myopathy as a cause of exercise intolerance in a horse. *Muscle Nerve.* **17**, 305-312.
- Valberg, S.J. (1996) Muscular causes of exercise intolerance in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* **12**, 495-515.
- Valberg, S.J., Macleay, J.M., Billstrom, J.A., Hower-Moritz, M.A., Mickelson, J.R. (1999) Skeletal muscle metabolic response to exercise in horses with 'tying-up' due to polysaccharide storage myopathy. *Equine Vet J.* **31**, 43-47.
- Van Vleet, J.F. (1997) The musculoskeletal system. In : *Veterinary pathology*, 6th edn., Ed: T.C. Jones, R.D. Hunt, N.W. King, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 873-897.

Votion, D.M., Delguste, C., Baise, E., Cassart, D., Desmecht, D., Linden, A., Rollin, F., Sandersen, C., Amory, H. (2003) Diagnostic différentiel en cas de présomption de myopathie atypique des équidés : illustration au travers de cas référés à la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège au cours du printemps 2003. *Ann. Méd. Vét.* **147**, 183-193.

Whitwell, K.E., Harris, P., Farrington, P.G. (1988) Atypical myoglobinuria : an acute myopathy in grazing horses. *Equine Vet. J.* **20**, 357-363.

TABLE 1 : Description of the case load

	Breed	Age (month)	Sex	Date of death	Date of necropsy
1	Fjord	18	F	05/11/00, FD	08/11/00
2	Fjord	6	E	08/11/00, EU	09/11/00
3	Fjord	18	F	08/11/00, FD	09/11/00
4	Quarter Horse	18	F	08/11/00, EU	10/11/00
5	Standardbred	132	F	09/11/00, FD	11/11/00
6	Standardbred	48	F	11/11/00, FD	13/11/00
7	Standardbred	72	F	14/11/00, FD	15/11/00
8	Haflinger	24	F	16/11/00, FD	20/11/00
9	Fjord	84	F	26/11/00, EU	27/11/00
10	Fjord	18	N	27/11/00, FD	28/11/00
11	Haflinger	24	M	15/04/01, FD	18/04/01
12	Haflinger	48	F	15/04/01, FD	17/04/01
13	Fjord	18	M	29/10/02, FD	30/10/02
14	Fjord	18	F	29/10/02, EU	31/10/02
15	Fjord	18	F	30/10/02, EU	31/10/02
16	Cross-bred arab horse	30	F	31/10/02, EU	01/11/02
17	Saddle horse	36	M	04/11/02, FD	05/11/02
18	Poney Shetland	48	N	01/11/02, FD	05/11/02
19	Standardbred	18	F	04/11/02, EU	06/11/02
20	Fjord	6	F	06/11/02, EU	06/11/02
21	Fjord	6	F	05/11/02, FD	06/11/02
22	Standardbred	84	F	05/11/02, FD	07/11/02
23	Standardbred	30	F	08/11/02, EU	12/11/02
24	Saddle poney	108	F	11/11/02, FD	12/11/02
25	Standardbred	120	F	09/11/02, FD	13/11/02
26	Standardbred	24	F	16/11/02, FD	18/11/02
27	Fjord	24	F	10/12/02, FD	11/12/02
28	Saddle poney	36	F	07/04/03, EU	08/04/03
29	Cross-bred Fjord	24	F	16/04/03, EU	16/04/03
30	Saddle horse	96	F	21/05/03, EU	23/05/03
31	Lusitanian horse	18	F	16/10/03, EU	17/10/03
32	Belgian draught-horse	6	F	05/11/03, EU	05/11/03
C1	Belgian draught-horse	8	F	27/11/00, EU	27/11/00
C2	Standardbred	36	N	05/11/02, EU	06/11/02
C3	Saddle poney	48	F	18/12/02, EU	18/12/02
C4	Standardbred	24	F	14/01/03, EU	15/01/03
C5	Haflinger	72	N	20/01/03, EU	20/01/03
C6	Saddle horse	12	F	17/10/03, EU	17/10/03

Date, dd/mm/yy ; FD, found dead ; EU, euthanized; N, neutered; C, control horses

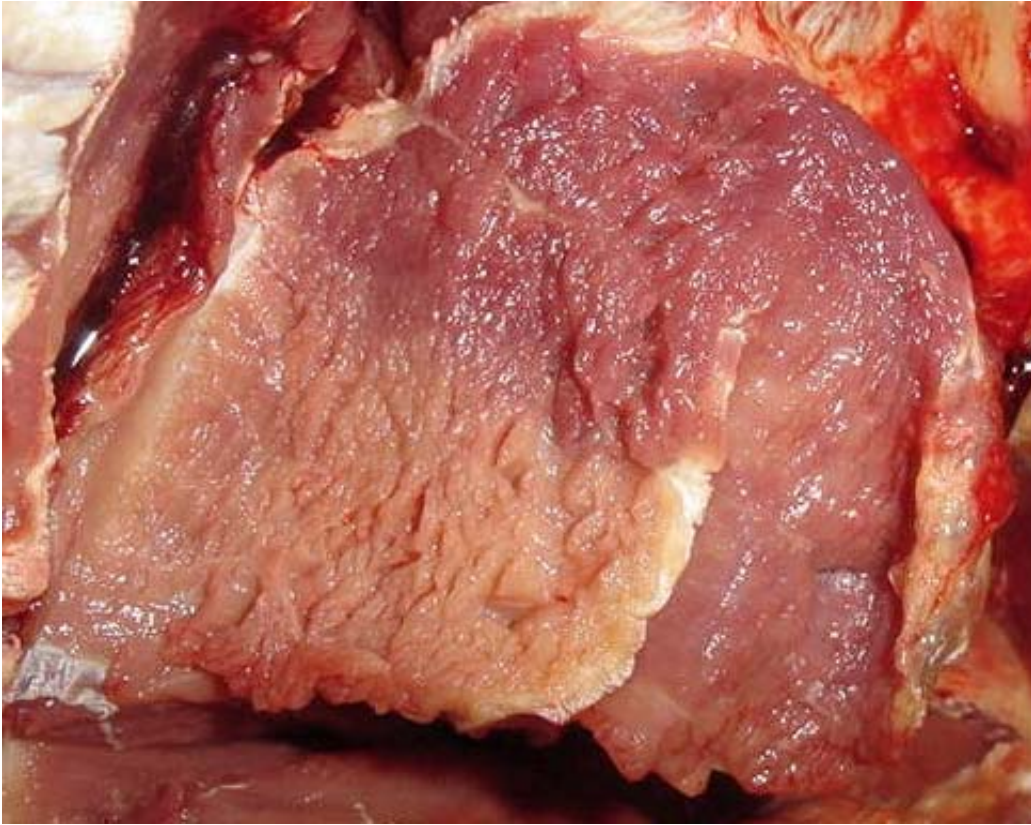


Figure 1 : Necrosis of skeletal muscle (*triceps brachii*, case 32)

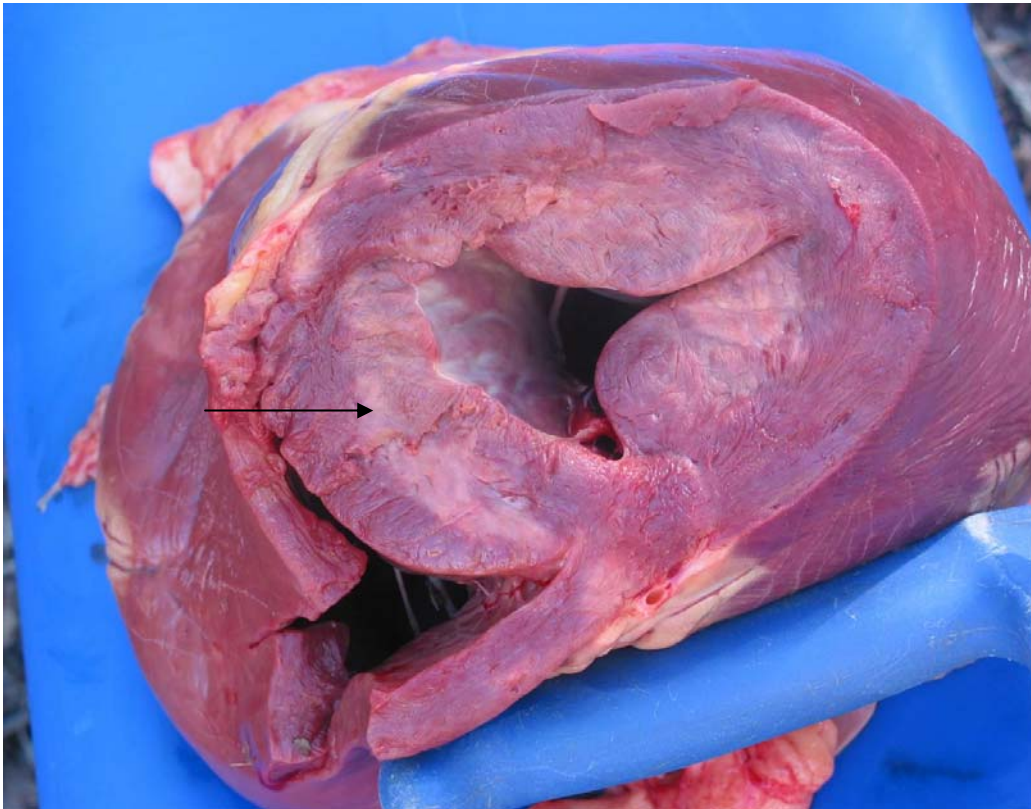


Figure 2 : Paleness of myocardium (arrow) (case 29)

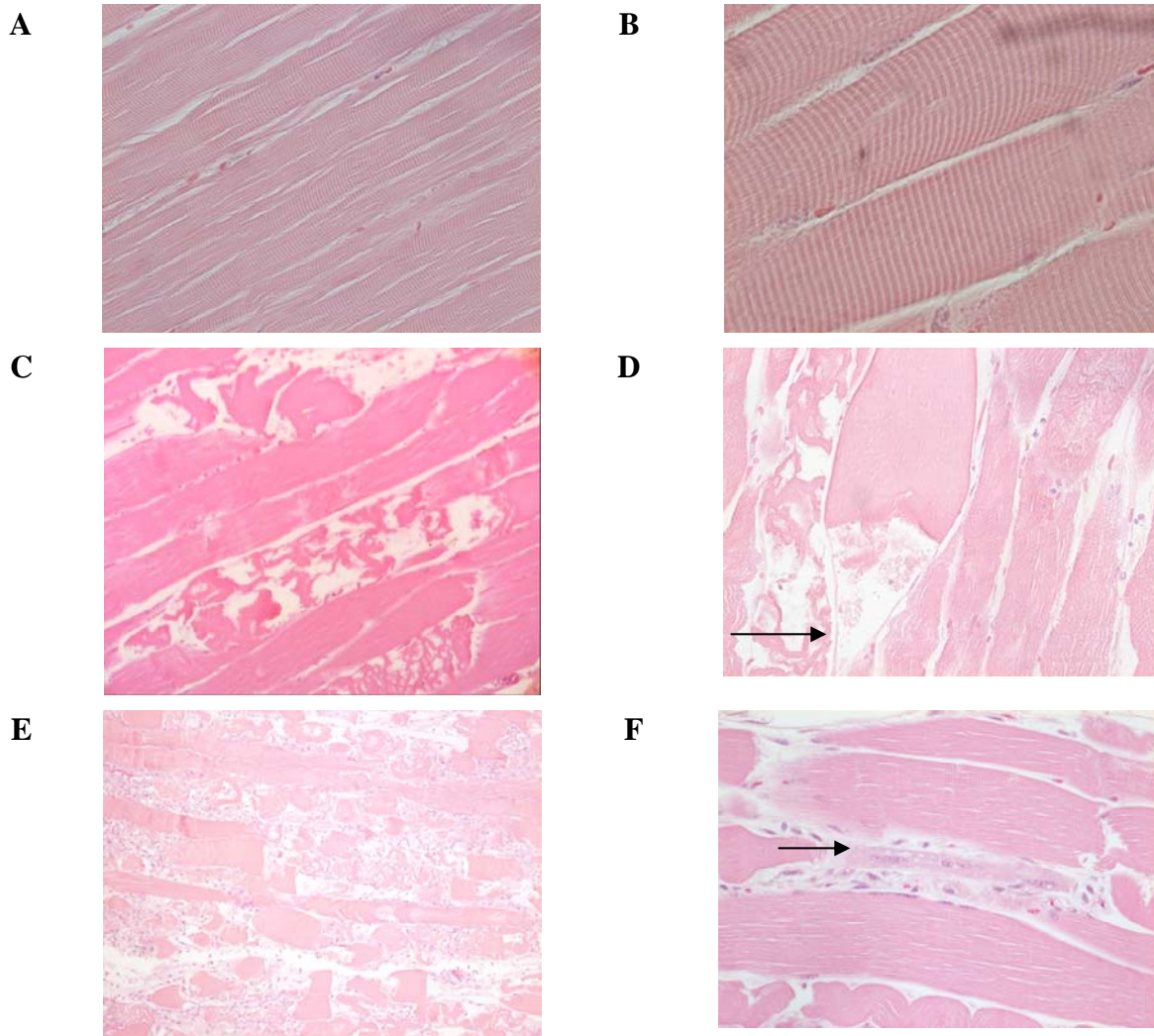


Figure 3 : Microscopic skeletal muscles lesions (H&E). **A :** control muscle (*infraspinatus* , x400) ; **B :** control muscle (*intercostalis*, x1000) ; **C :** multifocal and segmental necrosis (case 7, *intercostalis*, x200) ; **D :** degeneration of myofibrillar apparatus without visible alteration of nuclei or basal lamina (arrow) (case 16, *infraspinatus* , x400) ; **E :** severe multifocal necrosis with macrophages infiltration (case 29, *diaphragma*, x100) ; **F :** regenerative focus with myoblasts and outline of a myotube (arrow) (case 3, *brachiocephalicus* , x200)

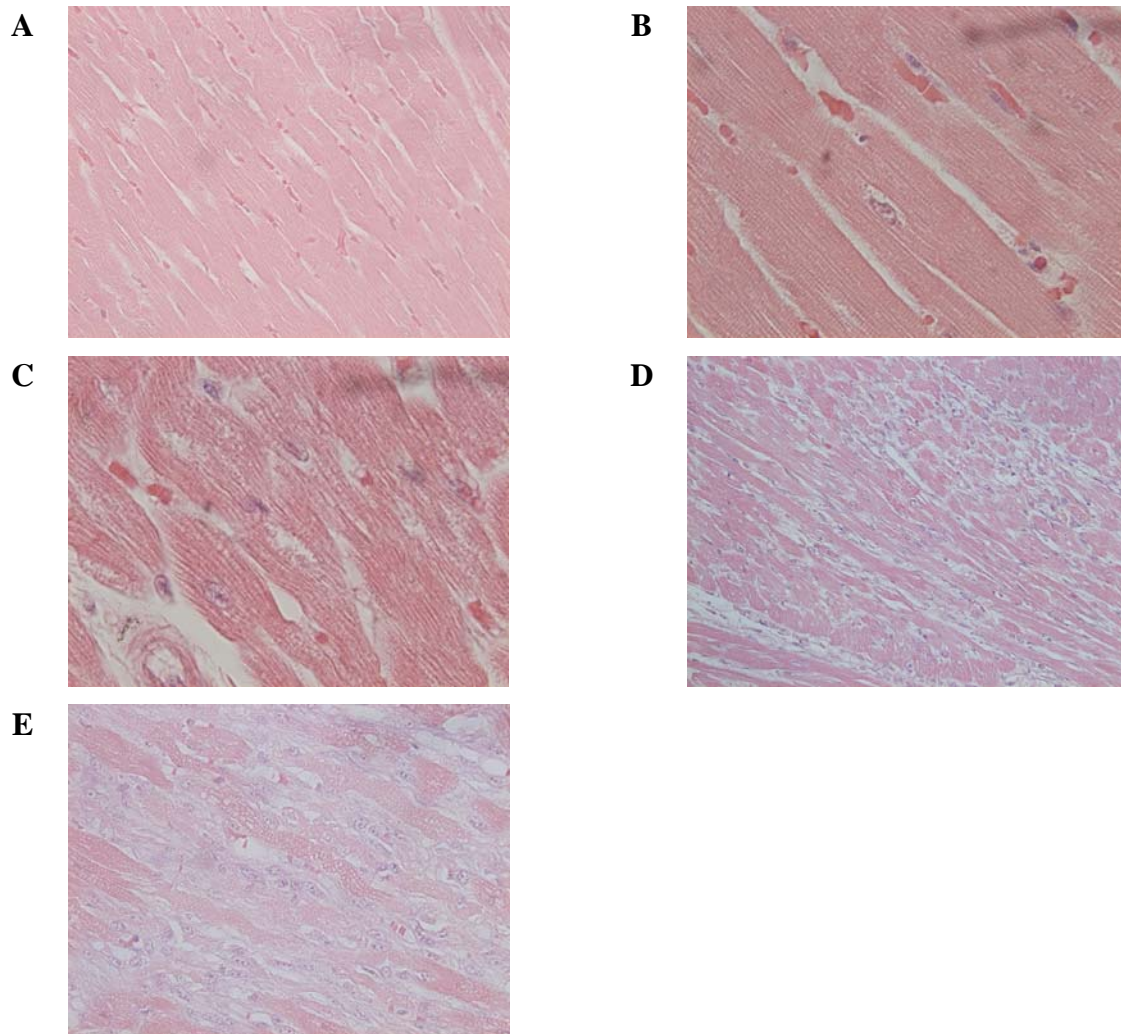


Figure 4 : Myocardial microscopic lesions (H&E). **A :** control myocardium (x400) ; **B :** control myocardium (x1000) ; **C :** granular degeneration of myocardium cells (case 20, x1000) ; **D :** multifocal myolysis of myocardium with cellular infiltration (case 21, x200) ; **E :** multifocal myolysis of myocardium with cellular infiltration of macrophages (case 21, x400)

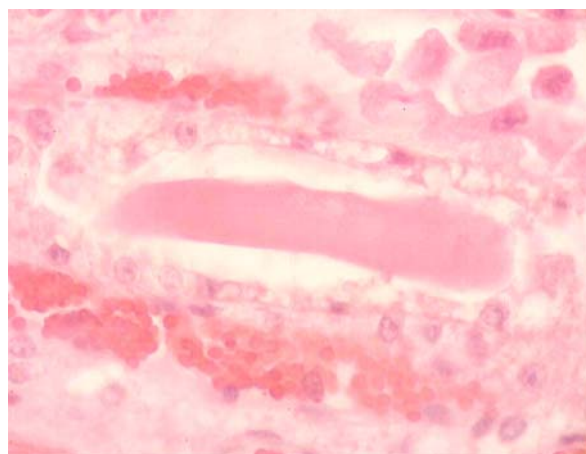


Figure 5 : Myoglobin cast in a renal tubule (case 10, x400)

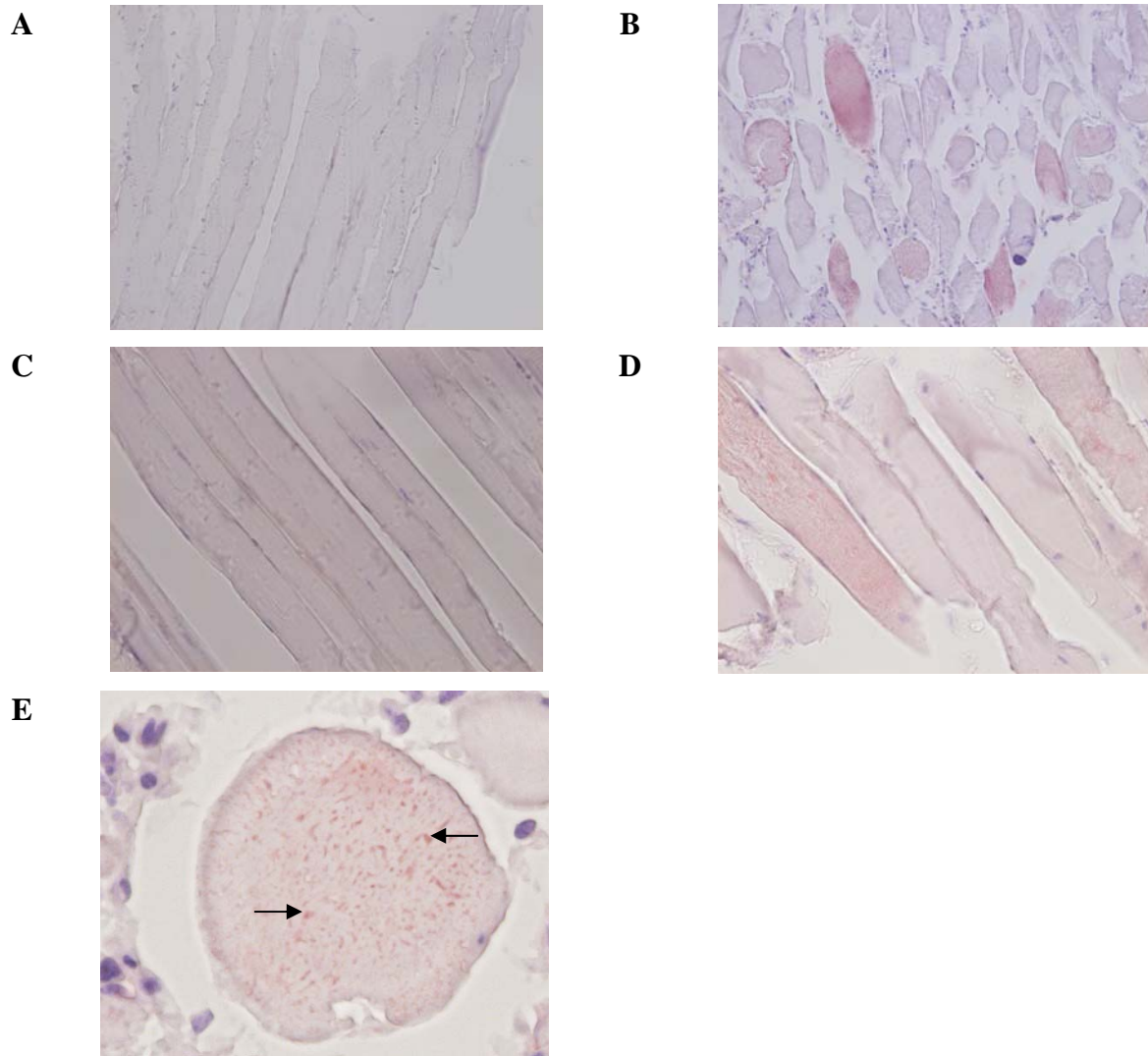


Figure 6 : Identification of lipids droplets (red, ORO stain) in samples of skeletal striated muscles from control (left) and principal animals. **A** : control muscle (*subscapularis*, x200) ; **B** : lipid droplets in some muscle fibres (case 21, *subscapularis*, x200) ; **C** : control muscle (*infraspinatus*, x400) ; **D**: lipid droplets in some muscle fibres (case 16, *diaphragma*, x400) ; **E** : lipid droplets (arrows) (case 21, *subscapularis*, x800)

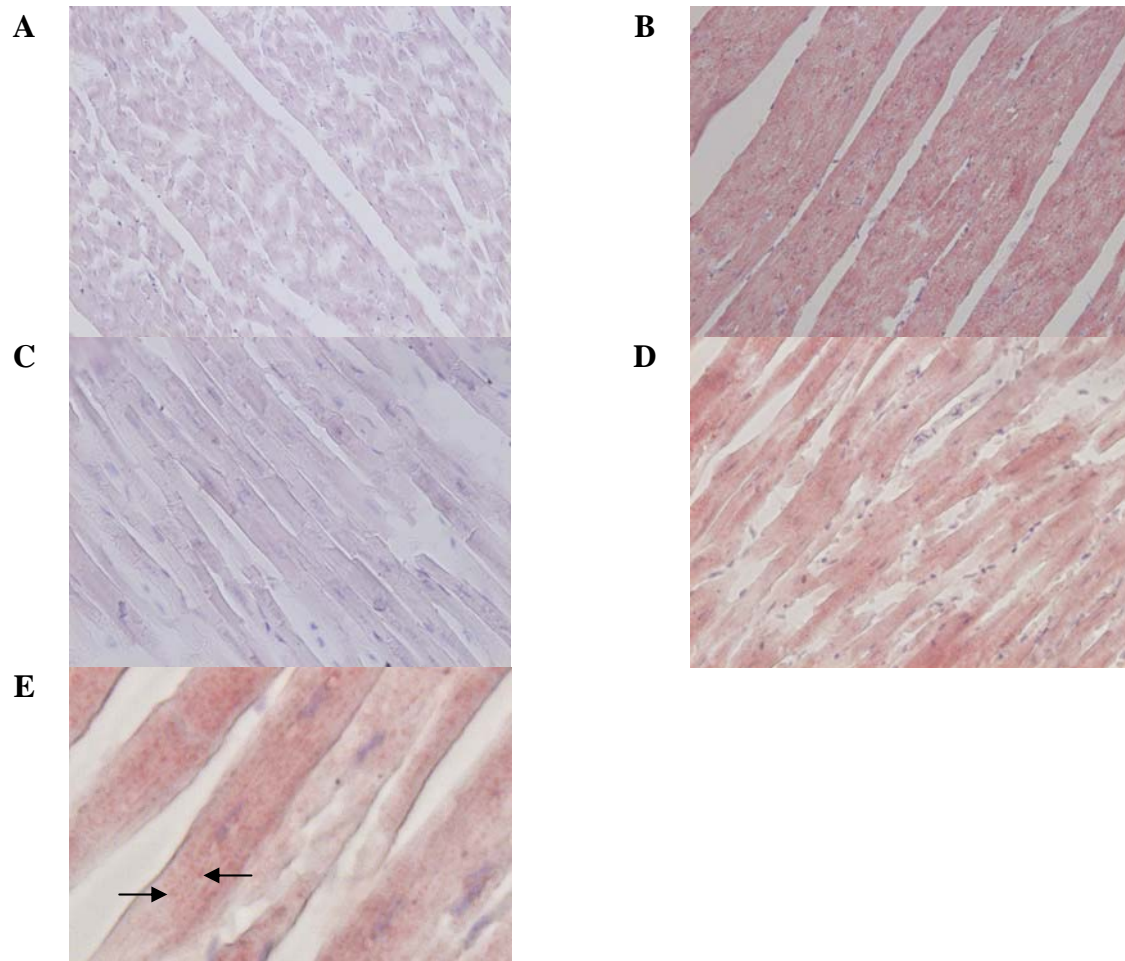


Figure 7 : Identification of lipid droplets (red, ORO stain) in samples of myocardium from control (left) and principal animals. **A** : control myocardium (x200) ; **B** : lipid droplets in myocardium fibres of case 31 (x200) ; **C** : control myocardium (x400) ; **D** : lipid droplets in myocardium fibres of case 32 (x400); **E** : lipid droplets in myocardium fibres of case 32 (arrows) (x800)

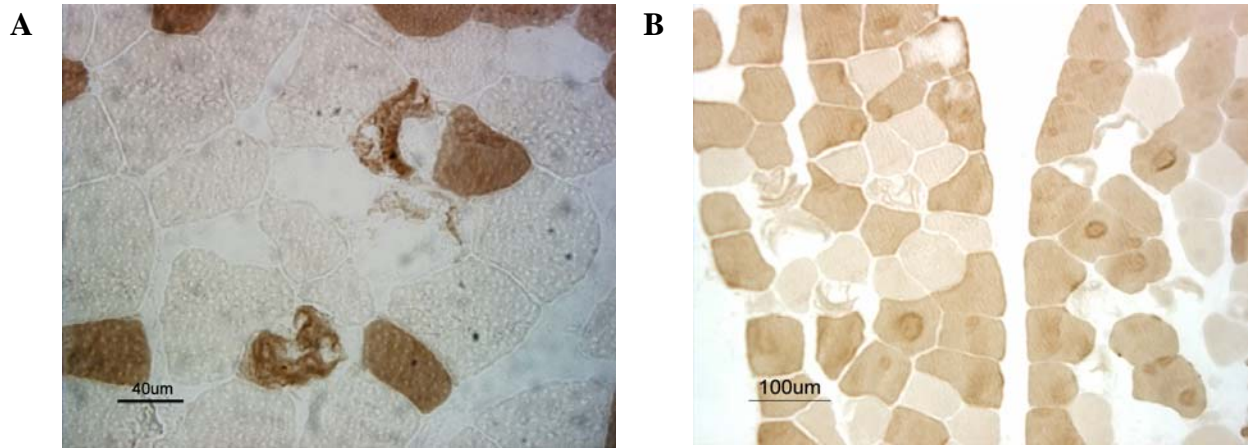


Figure 8 : Myofibrillar ATPase stains, with degenerative changes specifically affecting type-1 fibres (case 32, *subscapularis*). **A** : pH 4,3 (type-1 fibres are dark) ; **B** : pH 10,4 (type-1 fibres are pale)

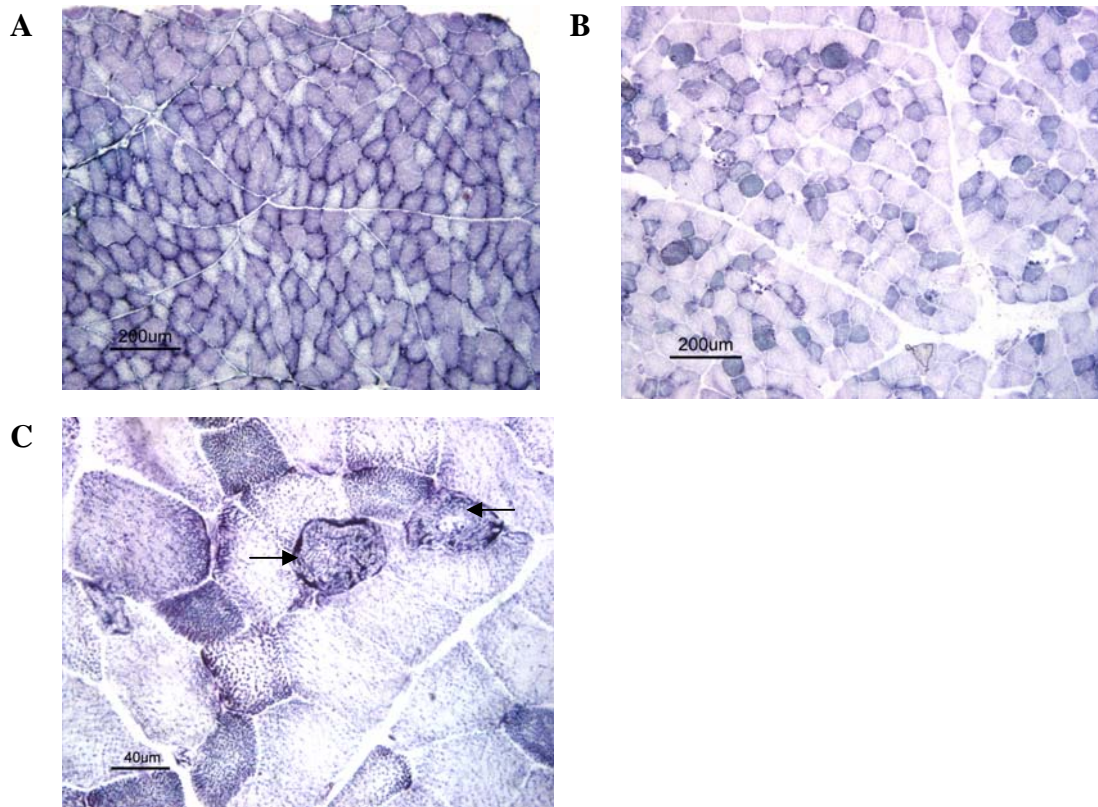


Figure 9 : Mitochondrial NADH tetrazolium reductase staining. **A** : control muscle (*subscapularis*) ; **B** : abnormal heterogeneous distribution of mitochondrial activity (case 32, *subscapularis*) ; **C** : coexisting hyper- (high-activity) and hypochromatic (inactive) areas in the same cell (arrows) (case 20, *subscapularis*).

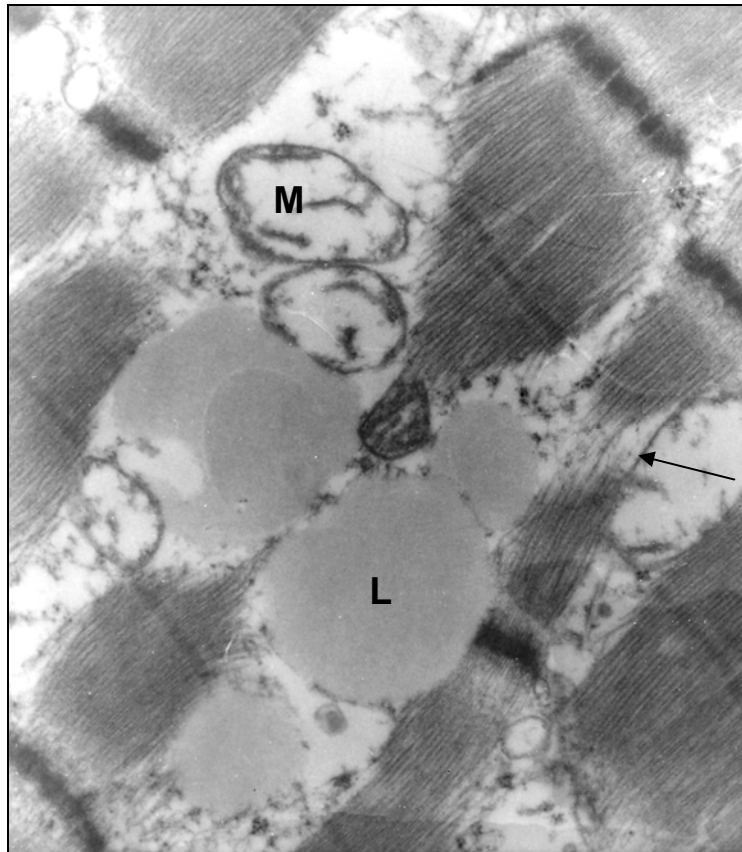


Figure 10 : Well established disintegration of mitochondria (M) and development of lipidic globules (L) with only beginning myofibrillar disorganization (arrow) in a muscle fibre (TEM, case 29, *intercostalis* , x 16000).

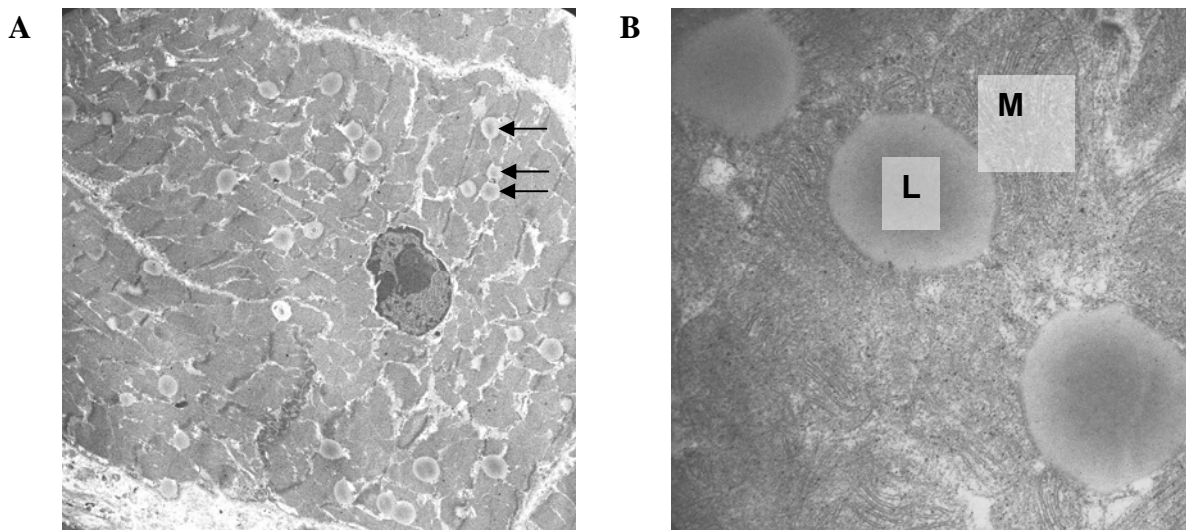


Figure 11 : Myocardial ultrastructural lesions. **A** : presence of lipid droplets (arrows) in myocardial fibres (TEM , case 20 , x 4000) ; **B** : normal mitochondria (M) and lipid droplets (L) (TEM , case 20 , x 31500).

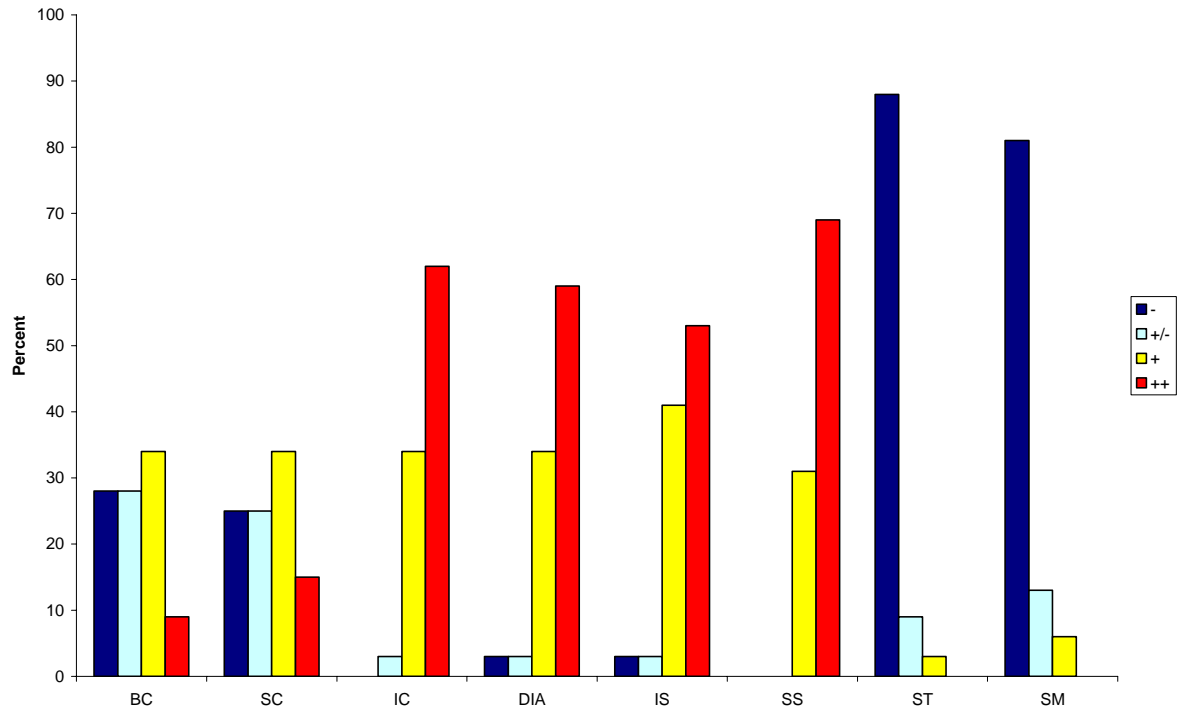


Figure 12: Microscopic lesions of skeletal muscles. BC: *Brachiocephalicus*; SC: *Sternocephalicus*; IC: *Intercostalis*; DIA: *Diaphragma*; IS: *Infraspinatus*; SS: *Subscapularis*; ST: *Semitendinosus*; SM: *Semimembranosus*; -: no lesion; +/-: some degenerated fibers with multifocal pattern; +: multifocal muscular degeneration; ++: severe multifocal muscular degeneration.

9. ARTICLE N°2

FLOW CYTOMETRIC PROBING OF MITOCHONDRIAL FUNCTION IN EQUINE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Dominique Cassart, Thomas Fett, Michaël Sarlet, Etienne Baise, Freddy Coignoul and Daniel Desmecht*

BMC Veterinary Research, 2007, 3:25

Address: Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Sart Tilman B43, B-4000 Liège – Belgium.

Email: Dominique Cassart - Dominique.Cassart@ulg.ac.be ; Thomas Fett - Thomas.Fett@ulg.ac.be ; Michaël Sarlet - Michael.Sarlet@ulg.ac.be ; Etienne Baise - Etienne.Baise@ulg.ac.be ; Freddy Coignoul - F.Coignoul@ulg.ac.be and Daniel Desmecht - Daniel.desmecht@ulg.ac.be

*Corresponding author

Keywords

Horse / mitochondrion / JC-1 / $\Delta\psi_m$

Abstract

Background: The morphopathological picture of a subset of equine myopathies is compatible with a primary mitochondrial disease, but functional confirmation *in vivo* is still pending. The cationic dye JC-1 exhibits potential-dependent accumulation in mitochondria that is detectable by a fluorescence shift from green to orange. As a consequence, mitochondrial membrane potential can be optically measured by the orange/green fluorescence intensity ratio. A flow cytometric standardized analytic procedure of the mitochondrial function of equine peripheral blood mononuclear cells is proposed along with a critical appraisal of the crucial questions of technical aspects, reproducibility, effect of time elapsed between blood sampling and laboratory processing and reference values.

Results: The JC-1-associated fluorescence orange and green values and their ratio were proved to be stable over time, independent of age and sex and hypersensitive to intoxication with a mitochondrial potential dissipator. Unless time elapsed between blood sampling and laboratory processing does not exceed 5 hours, the values retrieved remain stable. Reference values for clinically normal horses are given.

Conclusion: Whenever a quantitative measurement of mitochondrial function in a horse is desired, blood samples should be taken in sodium citrate tubes and kept at room temperature for a maximum of 5 hours before the laboratory procedure detailed here is started. The hope is that this new test may help in confirming, studying and preventing equine myopathies that are currently imputed to mitochondrial dysfunction.

Background

Equine atypical myopathy affects horses and ponies kept on pasture and not exercised either prior to or at the time of the first clinical signs. All cases have been reported in the springtime or autumn and after a sudden drop in the minimum daily temperature (1, 2). Affected horses are usually well and suddenly display signs of acute myopathy (stiffness, muscle pain, muscle fasciculations, abnormal gait, recumbency, myoglobinuria, tachycardia, sweating), with no hyperthermia and unchanged appetite (3). Unlike the other types of myopathy, this condition is often fatal within 12 to 72 hours. Blood analysis consistently shows a spectacular increase in muscle enzymes, in particular the creatine-kinases (3). Recently, a detailed macroscopical, histopathological, enzymohistochemical and ultrastructural study of 32 clinical cases was reported (2). The morphopathological picture of the disease suggested a mitochondrial disorder the characteristics of which are compatible with those of equine toxic myopathies due to plant, bacterial or fungal toxins (4-9). Although morphologic clues of mitochondrial dysfunction in these equine diseases have accumulated, a functional confirmation is still pending. Also, as the clinical diagnosis is only possible late in the course of these diseases, when definitive lesions have occurred, an early marker is crucially needed to improve the clinical prognosis of established cases and to detect subclinical cases that would benefit of preventive measures. Epidemiological studies aimed at delineating the precise environmental conditions that increase the risk of developing atypical myopathy would also gain from a standardized laboratory test that lends itself to mass screening. Therefore, reliable methods for the sensitive determination of a possible alteration of mitochondrial function in equine tissues are desirable.

The cationic dye JC-1 exhibits potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence shift from green (~529 nm) to orange (~590 nm). This potential-sensitive color shift is due to the concentration-dependent intramitochondrial formation of orange fluorescent oligomers (10-12). As a consequence, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) can be optically measured by the orange/green fluorescence intensity ratio. This ratio is dependent only on the $\Delta\psi_m$ and not on other factors such as mitochondrial size, shape, and density, which renders JC-1 far more reliable than any other single-component fluorescence signals to evaluate mitochondrial function. JC-1 orange-green fluorescence ratio has been used as an indicator of mitochondrial potential in isolated mitochondria (13) but also in intact tissues (14), spermatozoa (15) and cell lines, including myocytes (12) and neurons (16). Very

subtle heterogeneity in cellular responses were already discerned in this way (11, 13, 16), the most widely implemented application being for detection of mitochondrial depolarization occurring during apoptosis (17-20). This series of studies prompted us to suggest that JC-1-associated orange/green ratio could function as a marker of mitochondrial dysfunction in the clinic. Since mitochondrial dysfunction precedes morphologic alterations, it would permit an early diagnosis of mitochondria-associated rhabdomyolyses in horses. Although muscle biopsies would directly target the tissue of choice, questions remains about the muscle to be sampled (2). Furthermore, multiple biopsies should be avoided in the routine clinic due to animal welfare concerns. These practical considerations led us to evaluate the candidature of JC-1 as an indicator of mitochondrial potential in equine peripheral blood mononuclear cells. In this paper, a standardized analytic procedure is proposed along with a critical appraisal of the crucial questions of reproductibility, effect of time elapsed between blood sampling and laboratory processing and reference values.

Results

Flow cytometric analysis of physical characteristics of equine PBMC, using forward (FSC) and side (SSC) scatters, consistently revealed two distinct subpopulations (Fig. 1). The first is characterized by low FSC and SSC and presumably corresponds to lymphocytes. Subsequent analysis of fluorescent labelling of PBMC using appropriate monoclonal antibodies confirmed that this population indeed consisted of lymphocytes. The second subpopulation, showing slightly higher FSC and SSC, is rather compatible with monocytes. Because the first subpopulation was always less scattered than the second, it was chosen to gate the cell subpopulation of which the JC-1-associated fluorescences were studied.

Using 488 nm SapphireTM solid-state laser excitation, the gated nonstained cell populations showed readily identifiable and very homogeneous autofluorescent emissions within the 530/30 and 585/42 nm bandpass windows (Fig. 2). However, the gated stained cell populations displayed much more intense fluorescences in both windows (Fig. 3), which yielded an excellent signal-to-noise ratio. Among the ~120 stained cell populations of which the results contributed to this study, there was never >1% of cells falling in the green autofluorescence window, showing that the JC-1 concentration used is sufficient to stain all cells despite the unavoidable slight variation of the number of cells between cell suspensions. For the orange autofluorescence, identical results were obtained, excepted for a few cell

suspensions intoxicated with CCCP where up to 5% of the cells fell in the autofluorescence window, which is attributable to the total dissipation of the $\Delta\psi_m$, thus of oligomers formation, in these cells. The incorporation of CCCP led to the expected decrease of the oligomer/monomer (orange/green) fluorescences ratio (Fig. 4). Although 100 μ M CCCP was used throughout the study, a dose-response study made in 2 horses suggested that maximal mitochondrial dysfunction is already reached with 1 μ M.

Afterwards, mean absolute fluorescence values and ratio were measured in blood samples that had been kept at room temperature for different durations before laboratory processing (Fig. 5). No differences were seen up to 5 hours ($P>0.05$). Also, when horses were sampled several times (1 to 35 days apart), the JC-1-associated fluorescence values retrieved from the corresponding PBMC populations (Table 2, Fig. 6) remained unchanged ($P>0.05$). Regression of the orange/green ratio against age was not significant and sex-specific means of the ratio with (0.06 \pm 0.01 in females vs. 0.06 \pm 0.01 in neutered) and without intoxication (0.63 \pm 0.13 vs. 0.67 \pm 0.07) were not different ($P>0.05$). Together, the 31 horses studied have generated mean values that can be taken as references : 42390 \pm 8226 (monomer-associated fluorescence), 27385 \pm 6391 (oligomer) and 0.64 \pm 0.11 (oligomer/monomer ratio).

Discussion

A method for the quantitative analysis of mitochondrial function in horse blood samples has been developed and validated. After PBMC purification and resuspension in PBS, cells are stained with JC-1 and analysed by flow cytometry. To our knowledge, this is the first report of mitochondrial function analysis with JC-1 in peripheral blood cells. We have shown that the homogeneity of cell staining and the signal-to-autofluorescence ratio are as favourable as they were in cell lines (12,16). Interestingly, values measured after artificial intoxication are one order of magnitude (10x) lower than values measured from nontreated PBMC, which offers a large window to detect even subtle mitochondrial function changes. With respect to possible variation within each animal, we have shown that a clinically healthy horse generates similar mitochondrial function values over time. More, these values are independent of age and sex and were very homogeneous among the cohort of horses enrolled. Taken together, the present study therefore yields a reference value of mitochondrial function in equine PBMC, along with the calculation of the confidence interval in which 95% of healthy horses are predicted to fall: 0.64 \pm 0.22 (oligomer-to-monomer ratio, mean \pm 2SD). Should smaller

animals, such as dogs and cats, be assayed, histopaque columns designed for smaller volumes must be used for purification and the final concentration of mononuclear cells suspensions should not be less than 200.000 per millilitre.

The starting point of this study consists in the compilation of several morphologic clues suggesting that a subset of equine myopathies might be attributable to mitochondrial dysfunction. These morphological suspicions have to be confirmed by functional data to gain credibility. Here, a new assay system is validated that, theoretically, could bring such functional confirmation. By “theoretically”, it is meant that the assay will prove to be useful if and only if the mitochondrial dysfunction subjacent to a said clinical syndrome simultaneously affects circulating leucocytes. There is no relationship *per se* between myopathy and oxidative phosphorylation taking place in leucocytes, only the assumption that a mitochondrial myopathy is probably a polysystemic disease rather than a specific process affecting only the muscles. The polysystemic disease might clinically translate in a locomotor syndrome just because of the higher mitochondrial density in oxidative muscles.

Conclusions

Whenever a quantitative measurement of mitochondrial function in a horse is desired, blood samples should be taken in sodium citrate tubes and kept at room temperature for a maximum of 5 hours before the laboratory procedure detailed here is started. This delay fits well with most field conditions, provided the samples must not be sent by post. We hope that the quantitative analysis of mitochondrial function procedure validated here will help in confirming, studying and preventing Equine Atypical Myopathy and toxic myopathies due to plant, bacterial and fungal mitochondrial toxins.

Methods

Animals. A group of 31 clinically normal male, female or neutered horses ranging between 8 months and 22 years of age, were enrolled into the study (Table 1). All animals were chosen at random. Eight of them were sampled on different days in order to evaluate the overall reproducibility of $\Delta\psi_m$ measurements, i.e. the constancy of the orange/green fluorescence ratio when day, JC-1 working solution and laboratory handling are changed. In a second subset of horses (n=7), five tubes of venous blood were collected at the same time. These

tubes were kept at room temperature for variable durations (30 min., 90 min., 150 min., 5 h and 24 h) before laboratory processing was started, which permitted to assess whether and to what extent the delay between sampling and processing influences the value targeted.

Chemicals. JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA) and carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) was purchased from Sigma-Aldrich (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO, USA). Working solutions, 200 μ M (JC-1) and 50 μ M (CCCP), both in DMSO, were prepared and equilibrated to room temperature in advance.

Isolation of mononuclear cells. Five milliliters of venous blood was collected in BD Vacutainer sodium citrate 0.105M and kept at room temperature until processing. PBMC were separated from the blood by layering it over histopaque (density: 1.077 \pm 0.001) and centrifuging (1200 g for 20 min). The cell content and the purity of the preparations were checked by visual inspection using light microscopy. The viability of the cells was controlled by flow cytometry with propidium iodide staining and was found to exceed 95%. For flow cytometric PBMC autofluorescence and JC-1-associated fluorescence determinations, the mononuclear cells were then suspended in azid-free PBS at a final concentration of $\sim 10^6$ cells per millilitre.

Visualization of changes in the $\Delta\psi_m$. For each horse, one PBMC-containing 1 ml aliquot was used for autofluorescence measurements, and two others for $\Delta\psi_m$ determinations with or without intoxication with the $\Delta\psi_m$ dissipator CCCP. JC-1 staining was as follows: 1 ml of the PBMC suspension in PBS was incubated at 37°C for 10 min, stained with 10 μ l of JC-1 working solution (2 μ M final concentration) followed by another 25 min at 37°C under a carbon dioxide-enriched atmosphere (5% in air). Cells were then washed and the pellet was resuspended in PBS for flow cytometric analysis. For intoxication, 2 μ l of the CCCP working solution was incorporated into the PBMC suspension during the first incubation period (100 μ M final concentration).

Flow cytometry. Autofluorescence and JC-1-dependent fluorescence changes were recorded using a FACSCanto flow cytometer (Becton-Dickinson) using 488 nm excitation with 530/30 nm (FL1, green) and 585/42 nm (FL2, orange) bandpass emission filters. The reproducibility

of the fluorescence readings of the instrument was proven before all measurements using fluorescein isothiocyanate- and R-phycoerythrin-labeled polymethylmethacrylate microspheres (BD FACS 7-color Setup beads, Becton-Dickinson). The sample flow rate was adjusted to about 1000 cells/s. For one single analysis, the fluorescence properties of 10,000 mononuclear cells were collected. The respective gates were defined using the distinctive forward-scatter and side-scatter properties of the individual cell populations. The data were analyzed using the FACS DIVA software (Becton-Dickinson). After JC-1 staining, there were always less than 1 and 5% of cells within the green and orange predefined autofluorescence intervals respectively.

Statistical analysis. The results are presented as means \pm SD. Significant changes were assessed by Student's *t* test. A value of $P < 0.05$ was accepted as the level of significance.

List of abbreviations

JC-1, 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide ; $\Delta\psi_m$, mitochondrial membrane potential ; CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone ; PBMC, peripheral blood mononuclear cells ; FSC, forward scatter ; SSC, side scatter.

Authors' contributions

DC carried out the blood samplings, transportation and PBMC isolation. TF carried out flow cytometry calibration and analyses. MS carried out cell culture, intoxication and staining. DC, EB and FC participated in the design of the study and helped to structure analysis. DD conceived the study, participated in its design and coordination and drafted the manuscript.

Acknowledgements

The authors are very grateful to all the members of the Equine Clinic of the Faculty of Veterinary Medicine for their clinical expertise, help and enthusiasm. Many thanks are also due to Ecole Provinciale d'Élevage et d'Équitation (Gesves, Belgium) and to individual owners of horses for agreeing blood samplings and to Pr N. Antoine for her scientific expertise.

References

1. Brandt K, Hinrichs U, Glitz F, Landes E, Schulze C, Deegen E, Pohlenz J, Coenen M: **Atypische Myoglobulinurie der Weidepferde.** *Pferdeheilkunde* 1997, **13**:27-34.
2. Cassart D, Baise E, Cherel Y, Delguste C, Antoine N, Votion D, Amory H, Rollin F, Linden A, Coignoul F, Desmecht D: **Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy.** *Equine Vet J* 2007, **39**:26-32.
3. Delguste C, Cassart D, Baise E, Linden A, Schwarzwald C, Feige K, Sandersen C, Rollin F, Amory H: **Myopathies atypiques chez les chevaux au pré : une série de cas en Belgique.** *Ann. Méd Vét* 2002, **146**:231-243.
4. Martin BW, Terry MK, Bridges CH, Bailey EMJr: **Toxicity of *Cassia occidentalis* in the horse.** *Vet Hum Toxicol* 1981, **23**:416-417.
5. Mollenhauer HH, Rowe LD, Cysewski SJ, Witzel DA: **Ultrastructural Observations in Ponies After Treatment with Monensin.** *Am J Vet Res* 1981, **42**:35-40.
6. Muylle E, Vandenhende C, Oyaert W, Thoonen H, Vlaeminck K: **Delayed monensin sodium toxicity in horses.** *Equine Vet J* 1981, **13**:107-108.
7. Hülland TJ: **Muscle and Tendon.** In : *Pathology of Domestic Animals*, 4th edn., Ed: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy, N. Palmer, Academic Press, San Diego, 1992:183-265.
8. Van Vleet JF: **The musculoskeletal system.** In : *Veterinary pathology*, 6th edn., Ed: T.C. Jones, R.D. Hunt, N.W. King, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1997:873-897.
9. Bezerra JrPS, Ilha MRS, Langohr IM, Barros CSL: **Intoxicação experimental por monensina em eqüinos.** *Pesq Vet Bras* 2000, **20**:102-108.
10. Reers M, Smith TW, Chen LB: **J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential.** *Biochemistry* 1991, **30**:4480–4486.
11. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB: **Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:3671-3675.
12. Di Lisa F, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, Stern MD, Hansford RG: **Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition.** *J Physiol* 1995, **486**:1-13.
13. Cossarizza A, Ceccarelli D, Masini A: **Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level.** *Exp Cell Res* 1996, **222**:84-94.

14. Sick TJ, Perez-Pinzon MA: **Optical methods for probing mitochondrial function in brain slices.** *Methods* 1999, **18**:104-108.
15. Hoornstra D, Andersson MA, Mikkola R, Salkinoja-Salonen MS: **A new method for *in vitro* detection of microbially produced mitochondrial toxins.** *Toxicol In Vitro* 2003, **17**:745-751.
16. White RJ, Reynolds IJ: **Mitochondrial Depolarization in Glutamate-Stimulated Neurons: An Early Signal Specific to Excitotoxin Exposure.** *J Neurosci* 1996, **16**:5688–5697.
17. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A: **JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis.** *FEBS Lett* 1997, **411**:77-82.
18. Wadia JS, Chalmers-Redman RME, Ju WJH, Carlile GW, Phillips JL, Fraser AD, Tatton WG: **Mitochondrial Membrane Potential and Nuclear Changes in Apoptosis Caused by Serum and Nerve Growth Factor Withdrawal: Time Course and Modification by (-)-deprenyl.** *J Neurosci* 1998, **18**:932-947.
19. Mancini M, Anderson BO, Caldwell E, Sedghinasab M, Paty PB, Hockenbery DM: **Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line.** *J Cell Biol* 1997, **138**:449-469.
20. Kulkarni GV, Lee W, Seth A, McCulloch CA: **Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts.** *Exp Cell Res* 1998, **245**:170-178.

Figure legends

Fig. 1. Forward vs. side scatter plot of equine PBMC suspension in PBS. The cell subpopulation typically analysed for JC-1-associated fluorescences is marked by the polygon area. Although more dispersed, a second subpopulation is readily visible.

Fig. 2. FL2 vs. FL1 scatter plot showing autofluorescence emission of cell subpopulation gated in Fig. 1 under 488 nm Sapphire™ solid-state laser excitation.

Fig. 3. FL2 vs. FL1 scatter plot showing JC-1-associated fluorescence emission of cell subpopulation gated like in Fig. 1 under 488 nm Sapphire™ solid-state laser excitation.

Fig. 4. FL2 vs. FL1 scatter plot showing JC-1-associated fluorescence emission of cell subpopulation gated like in Fig. 1, after intoxication with the $\Delta\psi_m$ dissipator CCCP (100 μ M).

Fig. 5. Individual changes of JC-1 oligomer/monomer mean fluorescence ratio according to day of blood sampling. Eight horses were enrolled in this experimental setup (1, 7, 8, 10, 11, 15, 16, 23). JC-1 oligomer/monomer ratios were calculated from mean fluorescences generated by 10,000 PBMCs. There was no difference between days ($P>0.05$).

Fig. 6. Effect of time elapsed between blood sampling and start of laboratory processing on equine PBMC JC-1 oligomer/monomer ratio. Seven horses were enrolled in this experimental setup (1, 7, 8, 10, 15, 16, 23). JC-1 oligomer/monomer ratios were calculated from mean fluorescences generated by 10,000 PBMCs (without intoxication). Delay refers to elapsed time between blood sampling and its processing into the laboratory. * Mean oligomer/monomer ratio was significantly different at 24 hours ($P<0.05$).

Fig. 7. Individual JC-1 oligomer- and monomer-associated fluorescences and their ratio from PBMC retrieved from 31 clinically healthy horses.

Table 1 : Breed, age and sex of the 31 horses enrolled in the study

ID	Breed	Sex	Age (yr)
1	Warm blood	N	15
2	Warm blood	N	16
3	Warm blood	N	10
4	Warm blood	F	5
5	Warm blood	F	3
6	Warm blood	N	19
7	Shire	F	13
8	Warm blood	F	14
9	Warm blood	F	14
10	Warm blood	F	6
11	Warm blood	N	5
12	Warm blood	F	7
13	Standard bred	F	14
14	Spanish horse	N	12
15	Warm blood	N	5
16	Frisian	F	7
17	Warm blood	N	8
18	Warm blood	F	22
19	Warm blood	N	11
20	Warm blood	F	10
21	Warm blood	F	5
22	French saddle horse	F	17
23	Warm blood	F	10
24	Warm blood	M	7
25	Fjord	F	14
26	Standard bred	F	1
27	Standard bred	F	1
28	Warm blood	F	1
29	Cross-bred Arab horse	F	1
30	Warm blood	F	2
31	Warm blood	F	2

N, neutered ; M, male ; F, female

Table 2. Between-day reproducibility of JC-1 fluorescence in equine PBMC

	Without intoxication			With intoxication		
	Green* (monomer)	Orange* (oligomer)	Orange/green	Green* (monomer)	Orange* (oligomer)	Orange/Green
DAY 1 (n=8)	43785±2421	28461±4895	0.65±0.08	22159±2643	1426±108	0.06±0.01
DAY 2 (n=8)	45288±3290	27766±3796	0.61±0.09	25144±5357	1618±389	0.06±0.01
DAY 3 (n=4)	47075±6895	30789±5418	0.65±0.02	31141±13145	2160±1067	0.07±0.01
DAY 4 (n=4)	42055±4729	25426±2591	0.61±0.04	25886±13145	1812±1067	0.07±0.01

Horses contributing to days 1 and 2 were 1, 7, 8, 10, 13, 15, 16, and 23. Horses contributing to the four days were 1, 7, 8 and 16.* mean fluorescence values of 10,000 PBMCs are given in arbitrary units. Analysis of variance did not reveal any significant effect of the day of measurement ($p>0.1$).

Figure 1

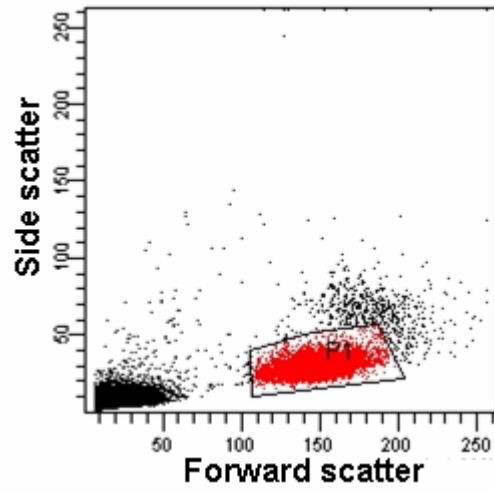


Figure 2

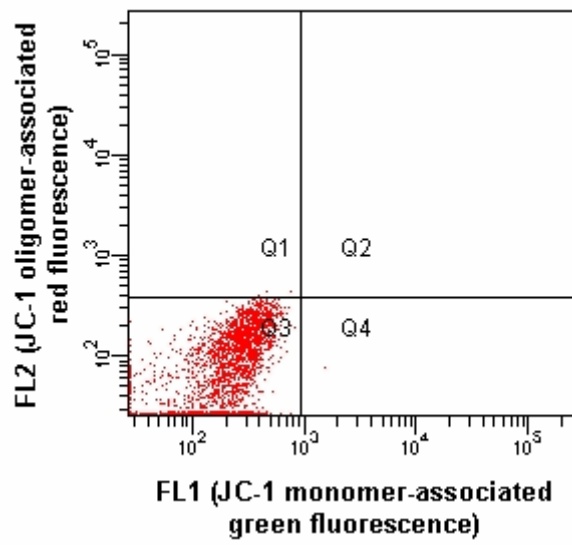


Figure 3

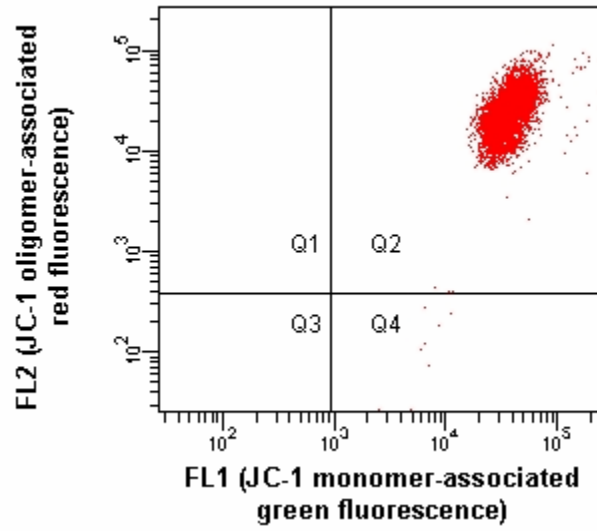


Figure 4

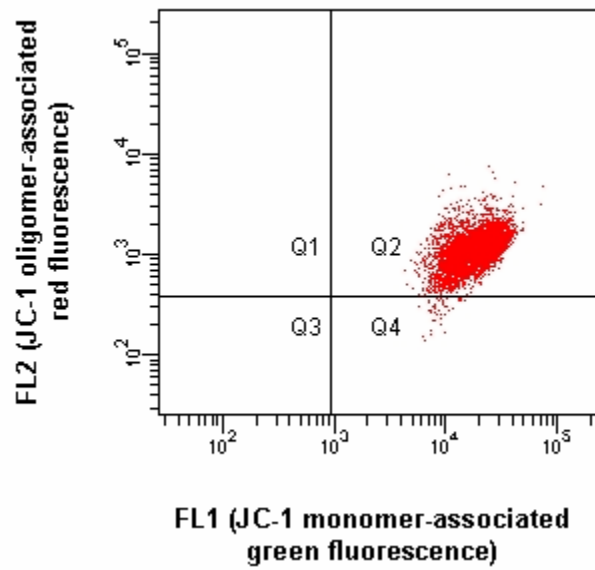


Figure 5

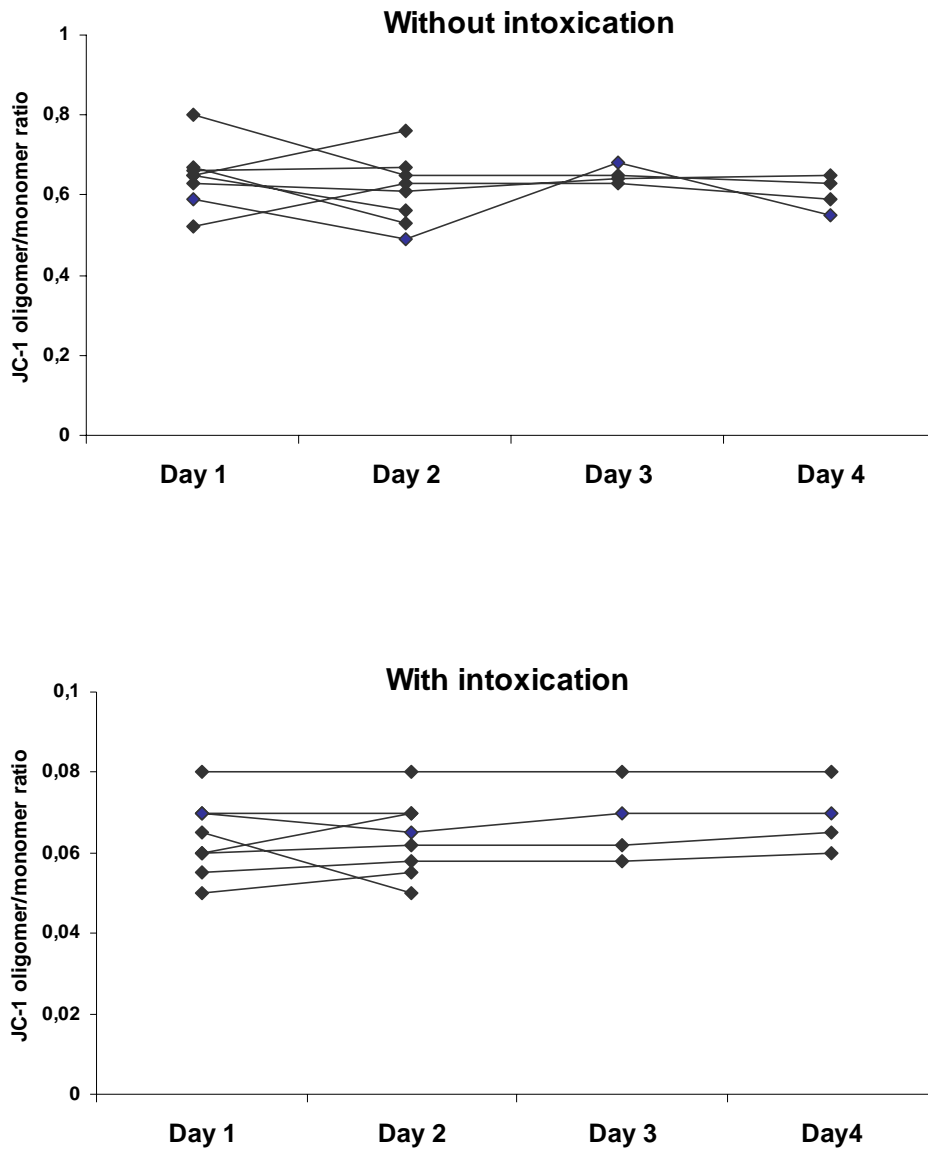


Figure 6

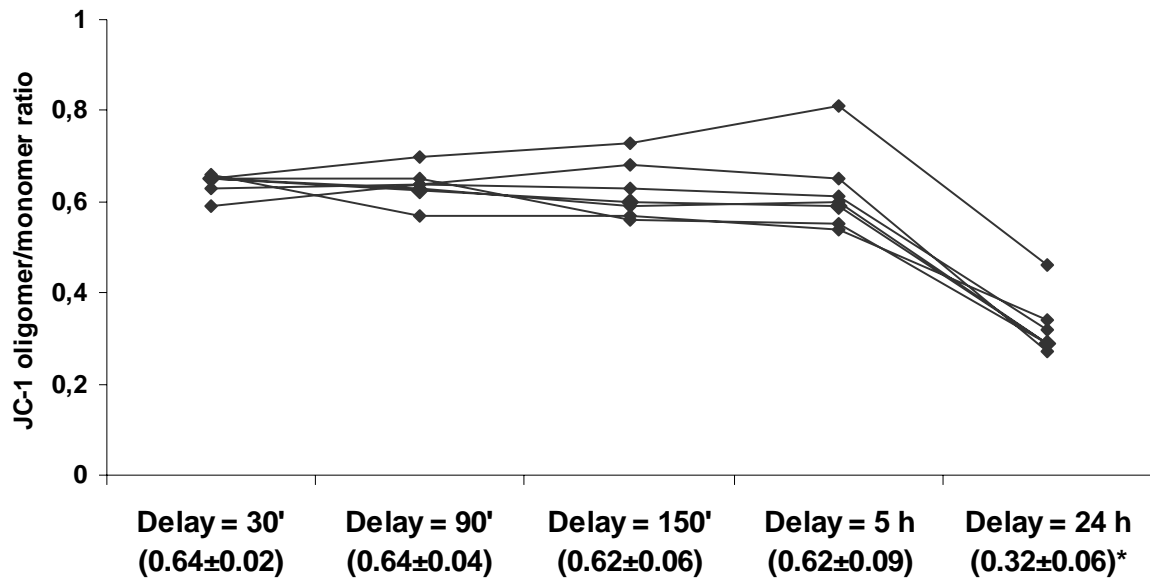


Figure 7