



UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES
SERVICE DE PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

Intoxication à l'hypoglycine A chez les animaux : pertinence du profil des acylcarnitines sériques

Benoît RENAUD

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTORAT EN SCIENCES VETERINAIRES

ANNEE ACADEMIQUE 2025-2026

REMERCIEMENTS

Ces remerciements seront volontairement réduits, dans l'espoir que ce dépouillement leur confère davantage de force.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Dominique Votion, Pascal Gustin et Hélène Amory, qui m'ont recruté pour mon premier poste et m'ont offert la chance d'exercer une activité de recherche puis d'assistanat. Je leur suis reconnaissant du travail qui m'a été confié et que j'ai eu beaucoup de plaisir à accomplir. Enseigner la pharmacologie, discipline dont la transversalité est, à mes yeux, inégalable, a été une source constante de satisfaction. Ces années d'assistanat auront passé à une vitesse surprenante, mais elles resteront marquées par le plaisir d'un travail qui avait du sens pour moi.

Enfin, je ne saurais conclure sans remercier ma Dream Team du quotidien : Anne-Christine François, Caroline-Julia Kruse et Benjamin Klein. Leur présence, leur soutien et leur amitié ont rendu le plaisir de venir travailler chaque jour bien plus grand.

RÉSUMÉ :

La myopathie atypique des équidés est une intoxication prairiale saisonnière, sévère et souvent fatale, consécutive à l'ingestion d'hypoglycine A et de composés analogues. Après bioactivation, les métabolites toxiques produits inhibent la bêta-oxydation mitochondriale, entraînant une rhabdomyolyse massive. Le diagnostic et le pronostic demeurent complexes, en particulier sur le terrain. De plus, un paradoxe persiste : tous les chevaux exposés à la toxine ne développent pas la maladie. La présence d'animaux apparemment sains au sein d'un même troupeau interroge sur l'existence de formes subcliniques, encore mal caractérisées.

Cette thèse évalue la pertinence du profil d'acylcarnitines sériques comme biomarqueur de l'intoxication à l'hypoglycine A. L'étude repose sur la plus vaste cohorte publiée à ce jour, comprenant deux cent soixante-trois chevaux répartis entre animaux malades, témoins, individus atteints d'autres affections et congénères exposés. Les résultats montrent que l'altération du profil des acylcarnitines est spécifique de la myopathie atypique et reflète directement le blocage de la bêta-oxydation. Parmi ces marqueurs, la C5-carnitine (isovalérylcarnitine / 2-méthylbutyrylcarnitine) apparaît comme un indicateur majeur, à la fois diagnostique et pronostique : des concentrations élevées étant associées à une mortalité accrue.

Au-delà des cas cliniques, des modifications métaboliques ont été mises en évidence chez des animaux exposés mais non symptomatiques, révélant l'existence d'intoxications subcliniques. Cette observation justifie l'intégration des congénères exposés dans la gestion des troupeaux. Par ailleurs, la mise en évidence du passage de l'hypoglycine A et de ses métabolites dans le lait de jument démontre une voie d'exposition secondaire pour les poulains (voir synthèse en figure 4)

Enfin, l'extension des travaux à d'autres espèces herbivores, comme les bovins, les cervidés ou les camélidés, confirme que l'hypoglycine A représente un risque inter-espèces, modulé par la physiologie digestive et notamment la fermentation ruminale. Les similitudes entre les profils métaboliques équins et humains, observées lors d'intoxications liées au litchi ou à l'ackée, confèrent à ces résultats une portée comparative et translationnelle.

Ainsi, cette thèse montre que l'étude des profils d'acylcarnitines constitue un outil central pour améliorer le diagnostic, affiner le pronostic et détecter les formes subcliniques de l'intoxication à l'hypoglycine A. Elle ouvre également des perspectives en médecine comparée et en santé publique, tout en posant les bases du développement de tests rapides utilisables en clinique vétérinaire ou directement en prairie.

ABRÉVIATIONS

Abréviation	Signification
Ala	Alanine
Asn	Asparagine
BCAA	Acides aminés à chaîne ramifiée (<i>Branched-Chain Amino Acids</i>)
BCAT	Aminotransférase d'acides aminés à chaîne ramifiée (<i>Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase</i>)
BCKD	Déshydrogénase des α -cétoacides à chaîne ramifiée (<i>Branched-Chain α-keto acid Dehydrogenase</i>)
CK	Créatine kinase
CVU-ULiège	Clinique Vétérinaire Universitaire de l'Université de Liège
Cys	Cystéine
DL50	Dose létale 50
Gln	Glutamine
Gly	Glycine
HGA	Hypoglycine A
HGB	Hypoglycine B
His	Histidine
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution (<i>High-resolution mass spectrometry</i>)
Ile	Isoleucine
LAT1	Transporteur des acides aminés de type L1
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
Leu	Leucine
Lys	Lysine
MA	Myopathie atypique des équidés
MCPA	Acide méthylèncyclopropylacétique
MCPF	Méthylèncyclopropylformyl
MCPrG	Méthylèncyclopropylglycine
MPT	Transition de perméabilité mitochondriale
Met	Méthionine
Phe	Phénylalanine
Pro	Proline
Ser	Sérine
Thr	Thréonine
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
UPLC-MS/MS	Chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem
Val	Valine

TABLE DES MATIÈRES

A. INTRODUCTION : L'HYPOGLYCINE A	1
1. GÉNÉRALITÉS STRUCTURELLES RELATIVES À L'HYPOGLYCINE A.....	1
1.1. <i>L'hypoglycine A, une structure d'acide aminé</i>	<i>1</i>
1.2. <i>L'hypoglycine A, une petite molécule</i>	<i>1</i>
1.3. <i>L'hypoglycine A, une molécule hydrosoluble</i>	<i>1</i>
1.4. <i>L'hypoglycine A, une molécule réactive.....</i>	<i>2</i>
2. QUELLES SONT LES SOURCES D'HYPOGLYCINE A ?	3
2.1. <i>L'érable sycomore.....</i>	<i>3</i>
2.2. <i>L'ackée.....</i>	<i>3</i>
2.3. <i>Le litchi</i>	<i>4</i>
2.4. <i>Autres espèces végétales.....</i>	<i>4</i>
3. L'HYPOGLYCINE A N'EST PAS LA SEULE TOXINE PRÉSENTE CHEZ LES SAPINDACÉES	4
B. INTOXICATION À L'HYPOGLYCINE A CHEZ LES ÉQUIDÉS	6
1. LA MYOPATHIE ATYPIQUE, UNE INTOXICATION PRAIRIALE SAISONNIÈRE	6
2. QUELS SONT LES ÉQUIDÉS TOUCHÉS ? EXISTE-T-IL DES FACTEURS DE RISQUE ?	6
3. QUELS SONT LES SIGNES CLINIQUES DE LA MYOPATHIE ATYPIQUE DES ÉQUIDÉS ?	7
4. COMMENT ÉTABLIR LE DIAGNOSTIC DE LA MYOPATHIE ATYPIQUE DES ÉQUIDÉS ?	7
5. QUEL EST LE PRONOSTIC VITAL ? COMMENT L'ÉVALUER ?	9
C. INTOXICATION A L'HYPOGLYCINE A CHEZ L'HOMME	10
1. L'ACKÉE EST RESPONSABLE D'UNE INTOXICATION SAISONNIÈRE : LA MALADIE DU VOMISSEMENT JAMAÏCAIN	10
1.1. <i>Quels sont les individus touchés ? Existe-t-il des facteurs de risque ?</i>	<i>10</i>
1.2. <i>Symptomatologie de la maladie du vomissement jamaïcain</i>	<i>11</i>
1.3. <i>Pronostic de la maladie du vomissement jamaïcain.....</i>	<i>11</i>
2. LE LITCHI EST RESPONSABLE D'ENCÉPHALITE SAISONNIÈRE : L'ENCÉPHALITE AIGÜE INDUITE PAR LE LITCHI.....	12
2.1. <i>Quels sont les individus touchés ? Existe-t-il des facteurs de risque ?</i>	<i>12</i>
2.2. <i>Symptomatologie de l'encéphalite aiguë induite par le litchi.....</i>	<i>12</i>
2.3. <i>Pronostic de l'encéphalite aiguë induite par le litchi</i>	<i>13</i>
3. CONCLUSION SUR L'INTOXICATION AUX TOXINES DES SAPINDACÉES CHEZ L'HOMME	13
D. INTOXICATION À L'HYPOGLYCINE A CHEZ D'AUTRES ESPÈCES ANIMALES	14
1. INTOXICATIONS EXPÉRIMENTALES CHEZ LES ANIMAUX DE LABORATOIRE	14
1.1. <i>Espèces et observations cliniques.....</i>	<i>14</i>
1.2. <i>Influence des conditions expérimentales.....</i>	<i>14</i>
1.3. <i>Signes biochimiques</i>	<i>14</i>
2. INTOXICATIONS PRAIRIALES CHEZ LES HERBIVORES EN PARC ZOOLOGIQUES	14

2.1.	<i>Espèces touchées et facteurs de risque</i>	15
2.2.	<i>Signes cliniques</i>	15
2.3.	<i>Diagnostic et épidémiologie</i>	15
2.4.	<i>Pronostic</i>	15
E.	TOXICOCINÉTIQUE DE L'HYPOGLYCINE A	16
1.	ACIDES AMINÉS : PASSAGE DE LA MEMBRANE APICALE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES	16
1.1.	<i>Transport intestinal des acides aminés : le rôle du système B</i>	16
1.2.	<i>Variations inter-espèces</i>	16
1.3.	<i>Rôle complémentaire de BOAT2 dans le transport de l'hypoglycine A</i>	17
1.4.	<i>Une absorption colique : une hypothèse à explorer</i>	17
2.	ACIDES AMINÉS : PASSAGE DE LA MEMBRANE BASOLATÉRALE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES	18
3.	ACIDES AMINÉS : ÉLIMINATION RÉNALE	18
4.	HYPOGLYCINE A : TOXICOCINÉTIQUE EXPÉRIMENTALE	19
4.1.	<i>Absorption</i>	19
4.2.	<i>Elimination</i>	20
F.	TOXICODYNAMIE DE L'HYPOGLYCINE A	22
1.	MÉTABOLISATION DE L'HYPOGLYCINE A EN ACIDE MÉTHYLÈNECYCLOPROPYLACÉTIQUE	22
1.1.	<i>Une première étape catalysée par une aminotransférase ubiquitaire</i>	22
1.2.	<i>Une seconde étape mitochondriale</i>	24
1.3.	<i>Le métabolite produit est le méthylènenecyclopropylacétate</i>	25
2.	EFFETS DU MÉTHYLÈNECYCLOPROPYLACÉTYL-COÀ SUR LE CATABOLISME LIPIDIQUE	25
G.	PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INTOXICATION À L'HYPOGLYCINE A	27
1.	MÉCANISMES DE LA RHABDOMYOLYSE MASSIVE CHEZ LES ÉQUIDÉS	27
2.	EFFET SUR LA FONCTION MITOCHONDRIALE	28
3.	MYOGLOBINURIE ET TROUBLES RÉNAUX	29
H.	LES ACYLCARNITINES : BIOMARQUEURS DU BLOCAGE DE LA β-OXYDATION DANS L'INTOXICATION À L'HYPOGLYCINE A	32
1.	RÔLE PHYSIOLOGIQUE DE LA CARNITINE ET DES ACYLCARNITINES	32
2.	CATABOLISME LIPIDIQUE ET RÔLE CENTRAL DES ACYLCARNITINES	32
3.	INTÉRÊT CLINIQUE ET DIAGNOSTIQUE DES ACYLCARNITINES	33
I.	OBJECTIFS	34
J.	ÉTUDE PRÉLIMINAIRE	35
1.	CONTEXTE ET OBJECTIF	35
2.	OBJECTIF DE L'ÉTUDE PRÉLIMINAIRE	35

3.	CHOIX DE LA MATRICE ET MÉTHODOLOGIE ANALYTIQUE.....	35
3.1.	<i>Choix de la matrice sanguine.....</i>	35
3.2.	<i>Méthodologie analytique et sensibilité</i>	35
4.	RÉSULTATS PRINCIPAUX	36
5.	LIMITES ANALYTIQUES	36
6.	CONCLUSION DE L'ÉTUDE PRÉLIMINAIRE.....	37
K.	ARTICLE 1.....	38
L.	ARTICLE 2.....	55
M.	ARTICLE 3.....	69
N.	DISCUSSION	77
1.	CONFIRMATION DE L'INTÉRÊT DES PROFILS D'ACYLCARNITINES COMME BIOMARQUEURS DIAGNOSTIQUES ET PRONOSTIQUES DANS LA MYOPATHIE ATYPIQUE	77
1.1.	<i>Validation diagnostique</i>	77
1.2.	<i>Association avec les autres biomarqueurs</i>	78
1.3.	<i>Valeur pour le dépistage précoce</i>	78
1.4.	<i>Valeur pronostique des acylcarnitines dans la myopathie atypique</i>	78
2.	MEILLEURE DÉFINITION DES CHEVAUX COPÂTURANTS	79
2.1.	<i>Notion de copâturants et importance clinique</i>	79
2.2.	<i>Mise en évidence d'expositions subcliniques à l'hypoglycine A.....</i>	79
2.3.	<i>Implications pour le diagnostic et la gestion</i>	80
3.	MISE EN PERSPECTIVE AVEC LES FACTEURS DE RISQUE ÉPIDÉMIOLOGIQUES	80
3.1.	<i>Âge</i>	80
3.2.	<i>Sexe et statut reproducteur.....</i>	80
4.	EXTENSION AUX AUTRES ESPÈCES ET IMPLICATIONS COMPARATIVES	81
4.1.	<i>Espèces concernées et premiers cas documentés.....</i>	81
4.2.	<i>Différences physiologiques et hypothèse de transformation ruminale</i>	81
5.	PERSPECTIVES COMPARATIVES ET SANTÉ PUBLIQUE	82
5.1.	<i>Contamination des denrées alimentaires.....</i>	82
5.2.	<i>Perspectives de transposition vers la médecine humaine</i>	82
6.	CONCLUSION INTÉGRATIVE DE LA DISCUSSION	83
O.	PERSPECTIVES ET CONCLUSION	85
1.	OUVERTURES POUR LA RECHERCHE FUTURE	85
2.	CONCLUSION GÉNÉRALE	86
P.	BIBLIOGRAPHIE.....	86

A. INTRODUCTION : L'HYPOGLYCINE A

1. Généralités structurelles relatives à l'hypoglycine A

1.1. L'hypoglycine A, une structure d'acide aminé

L'hypoglycine A (HGA) est identifiée chimiquement comme 2-méthylèncyclopropylalanine. Sa formule moléculaire est $C_7H_{11}NO_2$ (Hassall et al. 1954; Leppla & von Holt 1956). Elle présente une structure typique d'acide aminé, avec un groupement carboxyle (-COOH) et un groupement amine (-NH₂) liés à un même carbone alpha (figure 1). L'HGA est un acide aminé non protéinogénique, ce qui signifie qu'elle ne participe pas à la synthèse des protéines (Bressler et al. 1969).

Le carbone alpha de l'HGA est lié à quatre groupes différents, ce qui en fait un centre chiral. L'HGA existe donc sous deux énantiomères de configuration absolue D et L, selon la représentation de Fischer. Comme pour la grande majorité des composés naturels avec un centre chiral, l'HGA se trouve à l'état naturel sous la forme L (Leppla and von Holt, 1956; Nelson & Cox, 2012).

1.2. L'hypoglycine A, une petite molécule

L'HGA est une petite molécule dont la masse moléculaire est de 141 daltons (Da) (Bressler et al. 1969). Ce poids moléculaire est du même ordre de grandeur que celui des acides aminés à chaîne ramifiée (BCAA : *Branched-Chain Amino Acids*), notamment la leucine (131 Da), l'isoleucine (131 Da) et la valine (117 Da).

Une des conséquences de ce faible poids moléculaire et de son analogie structurale avec les BCAA (*i.e.* présence d'un squelette aminé et motif latéral rappelant les BCAA) est sa capacité à utiliser les voies métaboliques des BCAA. Cela contribue à la toxicodynamie de l'HGA, puisqu'elle entre en compétition avec les BCAA pour les mêmes enzymes métaboliques (Billington and Sherratt, 1981). Il est également probable que l'HGA emprunte le transporteur des acides aminés de type L1 (LAT1) des BCAA pour son transport membranaire.

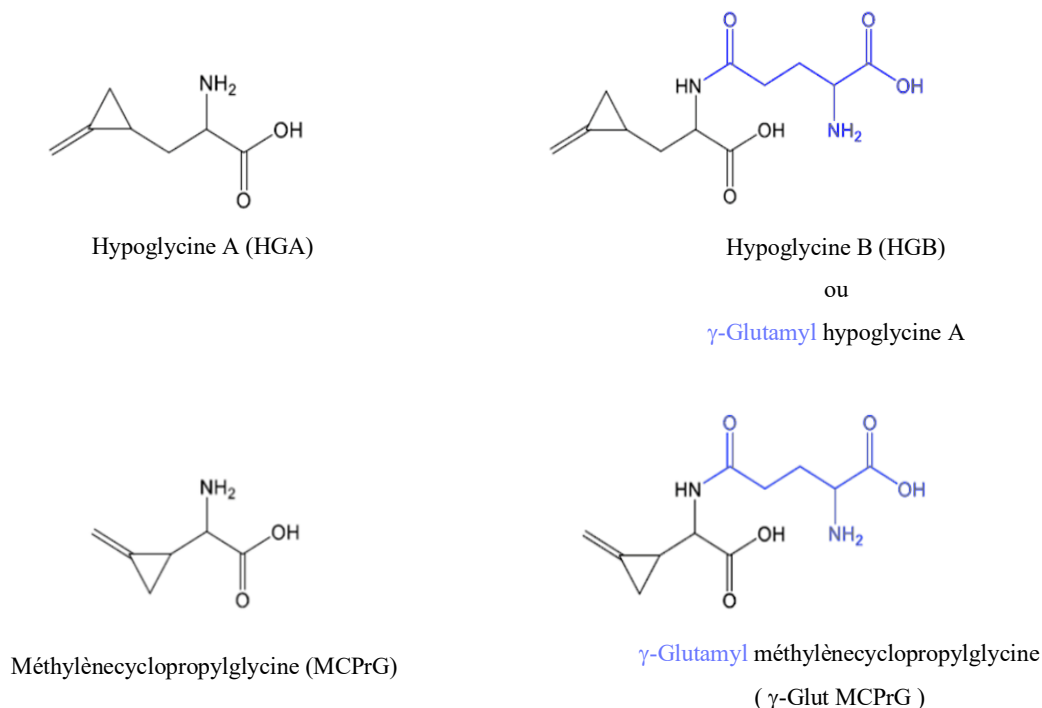
De plus, à cause de son poids moléculaire et de son encombrement stérique proche de ceux des BCAA, le dosage de l'HGA s'avère un défi et nécessite le recours à des techniques de dosage spécifiques et avancées, comme la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS, LC-MS/MS, HRMS-MS) pour l'identification et la quantification fiables de l'HGA et de ses métabolites dans les fluides biologiques (Kean, 1974).

1.3. L'hypoglycine A, une molécule hydrosoluble

L'HGA est une molécule hydrophile, grâce à la présence de groupements polaires tels que le groupement amine (-NH₂) et le groupement carboxyle (-COOH). Son groupe latéral inclut une structure unique, le méthylèncyclopropyl qui augmente sa polarité. En conséquence, l'HGA est fortement soluble dans l'eau et dans des solvants polaires tels que l'acide acétique dilué. Ces propriétés facilitent son extraction depuis les matrices biologiques.

Figure 1 : Structure chimique de l'hypoglycine A et de ses analogues

Représentation de l'hypoglycine A (HGA), de l'hypoglycine B (HGB, γ -glutamyl-HGA) et de la méthylèncyclopropylglycine (MCPrG), mettant en évidence le motif méthylène-cyclopropyl commun.



1.4. L'hypoglycine A, une molécule réactive

Contrairement aux acides aminés protéinogéniques qui possèdent des chaînes latérales relativement simples (groupes alkyles ou aromatiques), l'HGA présente une structure unique comportant un cycle méthylèncyclopropyl (figure 1). Cette particularité lui confère une réactivité chimique accrue, notamment en raison de la tension dans le cycle cyclopropyl (Hassall et al. 1954; Bressler et al. 1969; de Meijere 1979).

La tension dans le cycle cyclopropyl est due aux angles très réduits du triangle formé entre les trois atomes de carbone, qui s'écartent de la géométrie idéale, rendant la structure instable et donc très réactive chimiquement. Le cycle méthylèncyclopropyl présente de plus une double liaison méthylène (-CH=). La présence de cette double liaison augmente encore l'instabilité du cycle (Nelson & Cox, 2012).

Il est ainsi décrit que l'HGA peut subir des réactions de bromation au niveau de la double liaison présente dans son cycle méthylèncyclopropyl. Elle forme également des complexes avec des ions métalliques, par exemple avec le cuivre (Hassall et al. 1954).

Une concentration élevée en ions métalliques dans le sang pourrait théoriquement interagir avec l'HGA, augmentant sa réactivité ou modifiant son comportement biologique. Par ailleurs, l'utilisation d'ions métalliques dans une stratégie de chélation pourrait constituer une approche potentielle pour modifier la biodisponibilité, le transport ou la reconnaissance enzymatique si des complexes métalliques HGA-

métal se forment. À ce jour, cette hypothèse, bien que plausible, n'a, à notre connaissance, pas été étudiée.

D'un point de vue biologique, après sa conversion métabolique en MCPA, l'HGA agit comme un inhibiteur des acyl-CoA déshydrogénases, bloquant l'oxydation des acides gras et interférant avec le métabolisme des BCAA. Cela contribue directement à sa toxicité et au déclenchement de pathologies graves chez plusieurs espèces animales (Bressler et al. 1969). Ce point est développé dans le chapitre toxicodynamie. Cette inhibition résulte de la formation du MCPA, qui agit comme un inhibiteur irréversible de type "suicide" des enzymes FAD-dépendantes, et ne se limite pas à une seule acyl-CoA déshydrogénase mais concerne plusieurs enzymes impliquées dans la β -oxydation des acides gras et le catabolisme des acides aminés à chaîne ramifiée, mécanismes détaillés dans le chapitre consacré à la toxicodynamie.

2. Quelles sont les sources d'hypoglycine A ?

L'HGA est une phytotoxine que l'on retrouve chez plusieurs espèces végétales de la famille des sapindacées.

2.1. L'érable sycomore

L'HGA a été détectée dans plusieurs espèces de la famille des sapindacées, notamment l'érable sycomore (*Acer pseudoplatanus*) (Fowden & Pratt 1973). Originaire d'Europe centrale, du Caucase et du nord de l'Asie mineure (Jager et al. 1992), l'érable sycomore est aujourd'hui un arbre distribué mondialement. Il a été naturalisé dans la majeure partie de l'Europe ainsi qu'en Amérique du Nord, en Amérique du Sud, en Nouvelle-Zélande, en Australie et en Inde (Weidema & Buchwald 2010). Cet arbre présente un intérêt considérable pour la sylviculture grâce à sa croissance rapide, à une tolérance élevée à diverses conditions de culture (pollution, sel, vents, basses températures estivales) et grâce à la grande valeur de son bois (Hein et al. 2009). Par ailleurs, son apparence attractive en fait une espèce ornementale fréquemment utilisée dans les parcs et jardins.

Cependant, malgré ces nombreux avantages apparents, ses graines (Unger et al., 2014), ses plantules (Baise et al. 2016), et dans une moindre mesure ses feuilles (Westermann et al. 2016) contiennent des toxines. Parmi celles-ci, l'HGA qui est connue pour provoquer des empoisonnements chez diverses espèces, y compris chez l'homme.

2.2. L'ackée

L'ackée (*Blighia sapida*), originaire d'Afrique de l'Ouest, est un arbre de la famille des sapindacées largement cultivé dans les Caraïbes et en Floride. Le fruit de l'ackée est prisé pour ses usages culinaires, notamment en Jamaïque où il est un ingrédient du plat national "*ackee and saltfish*". Ce fruit est néanmoins connu pour ses risques de toxicité liés à la présence d'HGA Hassall et al. 1954; Barceloux 2009). C'est en 1954 que Hassall et ses collaborateurs ont isolé pour la première fois l'HGA à partir des

arilles et des graines du fruit de l'ackée. De ce fait, il existe des limites réglementaires strictes sur la teneur en HGA des produits en conserve, notamment par la FDA (Food and Drug Administration) des États-Unis. Malgré cela, l'ackée continue de poser des défis en matière de sécurité alimentaire, en particulier dans les régions défavorisées où le contrôle de la maturité et de la préparation de ces fruits est limité (Hassall et al. 1954; Barceloux 2009).

2.3. Le litchi

Le litchi (*Litchi chinensis*), fruit de la famille des sapindacées, est reconnu pour ses qualités nutritionnelles et son arôme délicat (Nath et al. 2016). Toutefois, des études ont mis en évidence la présence d'HGA principalement dans ses graines (Gray & Fowden 1962; Isenberg et al. 2016). Contrairement à l'ackée où l'HGA est présente dans les parties comestibles, les concentrations dans l'arille comestible du litchi sont nettement plus faibles (Isenberg et al. 2016). La teneur en HGA dans les arilles de litchi est de 300 à 6 000 fois plus faible que dans les arilles de l'ackée (Barceloux, 2009; Hassall et al., 1954; Isenberg et al., 2016).

2.4. Autres espèces végétales

Fowden et Pratt (1973) ont mené des travaux pionniers sur la distribution de l'HGA au sein du genre *Acer*, identifiant cette phytotoxine dans plusieurs espèces en plus de l'érable sycomore. Parmi celles-ci figurent l'érable négondo (*Acer negundo*), l'érable argenté (*Acer saccharinum*), l'érable à sucre (*Acer saccharum*), l'érable du Japon (*Acer palmatum*) et l'érable trident (*Acer buergerianum*). Des études ultérieures ont confirmé la présence d'HGA dans différentes parties de ces arbres, notamment les samares, les feuilles et les plantules (Novotná et al. 2023). Bien que l'érable sycomore et l'érable négondo soient les seuls, à ce jour, directement reliés à des cas d'intoxication animale, les autres espèces du genre *Acer* pourraient également représenter un risque pour les animaux herbivores pâturent à proximité.

3. L'hypoglycine A n'est pas la seule toxine présente chez les sapindacées

En plus de l'HGA, plusieurs toxines analogues ont été identifiées au sein des arbres de la famille des sapindacées, notamment la méthylèncyclopropylglycine (MCPrG), le γ -glutamyl-MCPrG, ainsi que l'hypoglycine B (HGB) (figure 1).

La MCPrG, un homologue structurel de l'HGA, a été isolée pour la première fois en 1962 dans les graines et arilles du litchi (Gray and Fowden, 1962). Depuis, elle a également été détectée dans d'autres espèces végétales, telles que le ramboutan (*Nephelium lappaceum*) et le longane (*Dimocarpus longan*) (Isenberg et al. 2016). Bien que présente à des concentrations bien plus faibles que l'HGA, la MCPrG contribue à des effets toxiques similaires, notamment par des mécanismes comparables d'inhibition du métabolisme énergétique (Sander et al., 2020).

L'HGB est un dipeptide constitué d'un résidu γ -glutamyl lié à l'HGA (figure 1). Elle se retrouve principalement dans les graines de l'ackée. Bien que sa toxicité semble inférieure à celle de l'HGA,

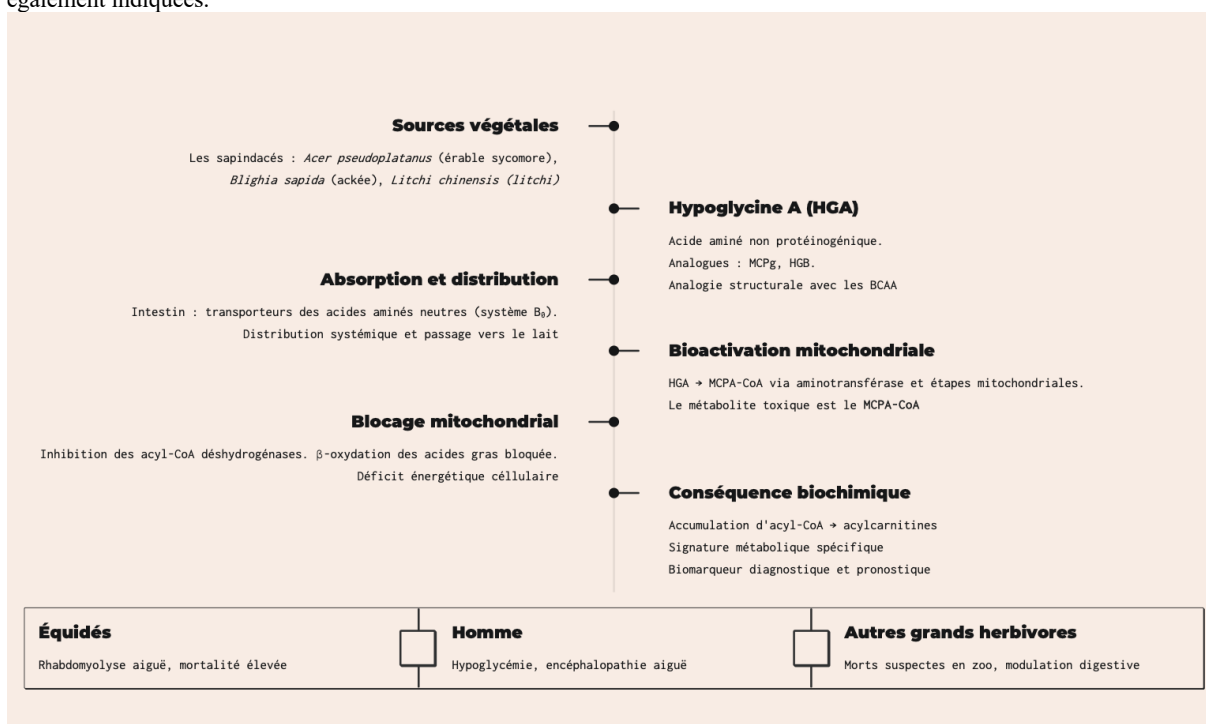
comme le suggère une dose létale 50 (DL50) deux fois plus élevée dans des études expérimentales sur le rat, l'HGB est néanmoins décrite comme expérimentalement létale chez plusieurs espèces animales, notamment le rat, le cobaye et le chat (Hassall et al. 1954). Il a été démontré qu'il existe une relation inverse entre les concentrations d'HGA et d'HGB dans les graines du fruit ackée au cours de la maturation: la quantité d'HGA diminue tandis que le niveau d'HGB augmente. Cette conversion de l'HGA en HGB serait catalysée par l'enzyme γ -glutamyl-transpeptidase (Bowen-Forbes and Minott, 2011).

L'enzyme γ -glutamyl-transpeptidase est conservée au cours de l'évolution dans les trois grands domaines du vivant (bactéries, archées et eucaryotes) (Verma et al. 2015). Elle a été identifiée dans divers organes de l'ackée (Kean & Hare 1980), chez l'érable sycomore (El-Khatib et al. 2022), ainsi que chez plusieurs espèces animales, notamment les équidés, et au sein de bactéries. Alors que les études de toxicodynamie de l'HGA sont manquantes, dans le contexte de cette thèse, ces observations suggèrent que les plantes toxiques, les animaux pâturant et leur microbiote intestinal disposent d'une machinerie enzymatique capable de catalyser la conversion de l'HGA en HGB ou celle de la MCPrg en γ -glutamyl-MCPrg.

Afin de synthétiser les principales étapes de l'intoxication à l'hypoglycine A, de l'exposition à la perturbation métabolique et à ses conséquences cliniques, un schéma intégratif est proposé en figure 2.

Figure 2 : Schéma intégratif de l'intoxication à l'hypoglycine A

Les principales étapes de l'intoxication sont représentées, depuis les sources végétales d'hypoglycine A et son absorption, jusqu'à sa bioactivation mitochondriale en MCPA-CoA. L'inhibition des acyl-CoA déshydrogénases entraîne un blocage de la β -oxydation des acides gras, un déficit énergétique cellulaire et une accumulation d'acyl-CoA dérivés, secondairement conjugués en acylcarnitines. Les conséquences cliniques majeures observées chez différentes espèces herbivores sont également indiquées.



B. INTOXICATION À L'HYPOLYCYCINE A CHEZ LES ÉQUIDÉS

C'est en 2013 que l'HGA a été reliée à la myopathie atypique des équidés (MA), une intoxication prairiale observée aussi bien en Europe qu'aux États-Unis (Valberg et al. 2013; Votion et al. 2014). En Europe, la source principale de cette toxine a été identifiée dans les fruits de l'érable sycomore, un arbre présent dans les prairies où survenaient des cas de MA (Unger et al., 2014). Aux États-Unis, c'est un autre arbre de la même famille, l'érable négundo, qui est impliqué (Valberg et al. 2013).

1. La myopathie atypique, une intoxication prairiale saisonnière

Dans nos régions européennes tempérées, la MA est le plus souvent causée par l'ingestion de samares d'érable sycomore sur les prairies à l'automne ou de plantules du même arbre au printemps. Le genre *Acer* appartient à la famille des *Sapindaceae*, famille dans laquelle d'autres espèces d'arbres ont été identifiées comme contenant de l'HGA (Scott et al. 1916; Fowden & Pratt 1973; Barceloux 2009). Il est à noter que les autres érables communs de nos forêts tempérées européennes, tels que l'érable plane (*Acer platanoides*) et l'érable champêtre (*Acer campestre*), ne contiennent pas d'HGA détectable (Westermann et al. 2016; Sponseller & Evans 2024).

2. Quels sont les équidés touchés ? Existe-t-il des facteurs de risque ?

Parmi les chevaux présents dans une même pâture et donc soumis à une même pression toxique, tous ne développeront pas la maladie. Les chevaux partageant la prairie avec un cheval intoxiqué sont appelés copâturants. À ce jour, la différence entre les malades et les copâturants n'est pas entièrement éclaircie, mais plusieurs facteurs de risque et facteurs protecteurs ont été identifiés dans la littérature (van Galen et al., 2012b; Votion et al., 2009).

La MA a été rapportée chez plusieurs espèces d'équidés (chevaux, ânes et zèbres) ainsi que chez leurs hybrides. Cette maladie semble toucher toutes les races, sans distinction et indépendamment de leur rusticité (van Galen et al., 2012b, 2012a).

Dans la littérature, certains facteurs démographiques ont été associés à un risque accru d'intoxication (Votion et al. 2009). L'âge est apparu comme un discriminant entre les copâturants d'apparence cliniquement sains et les chevaux cliniquement affectés. Dans les premières études publiées sur le sujet, les chevaux de moins de 3 ans ont été identifiés comme étant principalement à risque. Ces résultats suggèrent une résistance à l'intoxication liée à l'âge. Cependant, au fil des années, la répartition des cas par âge semble s'élargir (Votion et al. 2020), remettant en question cet effet lié à l'âge. La question d'une exposition toxique indirecte des poulains, notamment via le lait maternel, est abordée dans la littérature et synthétisée en figure 4.

De la même façon, les études épidémiologiques précoces ont suggéré un risque plus élevé de MA chez les mâles entiers, et un risque réduit chez les hongres (Votion et al. 2007). Toutefois, une publication ultérieure a révélé que l'âge était un facteur de confusion dans la prédisposition sexuelle (Votion et al.

2009). Les chevaux de moins de 3 ans ont été décrits comme le groupe d'âge le plus à risque de développer la MA. Cependant, la castration étant généralement pratiquée après l'âge de 3 ans, les jeunes mâles entiers sont surreprésentés au pâturage. Une fois ces facteurs de confusion établis, les résultats des études antérieures ont été relativisés, et aucune prédisposition sexuelle inhérente à la MA n'a été retenue (Votion et al. 2007, 2009).

3. Quels sont les signes cliniques de la myopathie atypique des équidés ?

Comme il sera précisé dans les chapitres suivants, l'intoxication à l'HGA est responsable d'une clinique variée selon les espèces. Chez le cheval, elle se manifeste de manière prédominante par une rhabdomyolyse aiguë, sévère, et souvent mortelle. Lors de la première évaluation, les signes cliniques observés chez plus de 50 % des cas incluent : faiblesse, raideur, décubitus, tremblements, sudation, pigmenturie (myoglobinurie), muqueuses congestionnées, tachycardie et normothermie (van Galen et al., 2010; D.-M. Votion et al., 2007; Votion, 2012; Votion et al., 2020). L'appétit des équidés atteints est variable et va de l'anorexie (28 % des cas) à un appétit exacerbé (18 % des cas). De plus, un quart des chevaux souffrant de MA présentent une dysphagie qui peut ou non être associée à une obstruction œsophagienne (van Galen et al. 2012a).

La biochimie sanguine peut être modifiée et une hyperglycémie ainsi qu'une hyperlipémie sont souvent présentes. De plus, des déséquilibres électrolytiques tels que l'hyperphosphatémie, l'hyponatrémie, l'hypochlorémie, l'hypocalcémie et l'hyperkaliémie sont parfois observés, bien qu'ils ne soient pas constants (Delguste et al., 2002; van Galen et al., 2012a; D.-M. Votion et al., 2007; K. Whitwell et al., 1988).

4. Comment établir le diagnostic de la myopathie atypique des équidés ?

Le diagnostic de la MA repose essentiellement sur l'examen clinique. Le principal aspect clinique distinctif chez les équidés est une myopathie aiguë. Bien que les signes cliniques (décrits ci-dessus) ne soient pas pathognomoniques de la MA, ils orientent le diagnostic vers une pathologie musculaire. À cela s'ajoutent des éléments d'anamnèse, tels que le caractère saisonnier de la maladie et la présence d'érables dans les prairies.

Le profil sanguin des chevaux atteints est notamment caractérisé par une augmentation sévère de l'activité sérique de la créatine kinase (CK) ($> 10\,000$ UI/L). L'article de van Galen et collaborateurs de 2012 décrit ainsi un algorithme diagnostique qui, basé sur les signes cliniques et/ou des paramètres sanguins de première ligne, permet de confirmer un diagnostic de MA avec une haute probabilité (van Galen et al., 2012b).

Bien que la détection des toxines dans le sang soit possible et puisse apparaître comme une option diagnostique spécifique, elle est peu pratique pour le vétérinaire praticien. En effet, à ce jour, le dosage sérique de la toxine HGA et de ses métabolites (acide méthylèncyclopropylacétique (MCPA) conjugué à la glycine ou à la carnitine) repose sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

(LC-MS), ce qui rend la détection de la toxine et de ses métabolites non réalisable sur le terrain ni immédiate (Valberg et al. 2013; Votion et al. 2014; Bochnia et al. 2019; Sander et al. 2020). De plus, étant donné que la présence d'HGA a été observée chez des chevaux cliniquement sains partageant la pâture avec les malades, l'HGA est considérée comme simple facteur d'exposition (Baise et al. 2016). Concernant les analyses sanguines, il est actuellement établi que seule la présence conjointe d'HGA et d'un des conjugués de MCPA en quantités significatives confirme le diagnostic de MA en présence de signes cliniques compatibles (Bochnia et al., 2015).

La notion de l'existence d'animaux subcliniques a été évoquée (Baise et al. 2016, Votion et al. 2007) mais jamais formellement prouvée (Bochnia et al. 2015; Baise et al. 2016).

En 2008, Westermann et ses collaborateurs ont publié une étude portant sur le *screening* des troubles du métabolisme lipidique chez les chevaux souffrant de MA. Cette étude a révélé, entre autres, une élévation significative de plusieurs acylcarnitines dans le sérum et l'urine des chevaux malades (Westermann et al. 2008). Depuis, plusieurs publications ont corroboré ces résultats, décrivant une augmentation sévère des taux d'acylcarnitines sériques chez les animaux atteints de MA. Cependant, ces études ne parviennent pas à un consensus quant au groupe d'acylcarnitines le plus touché. Les groupes identifiés incluent la carnitine libre (van der Kolk et al. 2013), les acylcarnitines à chaînes courtes (C2-C5) (Westermann et al. 2007, 2008; Sponseller et al. 2012; van der Kolk et al. 2013; Karlíková et al. 2016; Bochnia et al. 2019), les acylcarnitines à chaînes moyennes (C6-C12) (Westermann et al. 2007, 2008; Sponseller et al. 2012; van der Kolk et al. 2013; Karlíková et al. 2016; Bochnia et al. 2019), les acylcarnitines à longues chaînes (C14-C20), les acylcarnitines à très longues chaînes (C22-C26) ainsi que les acylcarnitines à chaînes insaturées (Karlíková et al. 2016) voire toutes les catégories d'acylcarnitines (Lemieux et al. 2016; Boemer et al. 2017).

L'examen post-mortem peut, lui, révéler des décolorations musculaires et de l'urine foncée dans la vessie, dans les cas où elle n'aurait pas été observée par miction spontanée ou par collecte d'urine (Whitwell et al. 1988; Cassart et al. 2007). Les principales observations histopathologiques associées à la MA incluent des changements myodégénératifs (Whitwell et al. 1988; Palencia & Rivero 2007; Cassart et al. 2007) et une accumulation de lipides dans les fibres musculaires de type I (Finno et al. 2006; Cassart et al. 2007). Dans certains cas, une nécrose myocardique peut également être observée (Cassart et al. 2007). Cependant, ces lésions sont inconstantes et focales, ce qui augmente le risque de faux négatifs.

À ce jour, la méthode la plus fiable pour diagnostiquer la MA repose donc sur une combinaison de facteurs :

- (i) une anamnèse compatible avec cette maladie saisonnière, incluant un accès à la pâture dans les cinq derniers jours, ainsi que l'observation de signes cliniques tels que la myoglobinurie, la raideur musculaire ;
- (ii) une élévation des activités de la CK sérique au-dessus de 10 000 UI/L ;

(iii) la détection des toxines et métabolites toxiques dans le sang ou l'urine ;

(iv) une altération sévère du profil des acylcarnitines sériques.

Un élément important du diagnostic différentiel réside dans la présentation initiale de certains chevaux atteints de MA avec des signes de coliques. En effet, entre 10 et 20 % des cas rapportés sont admis pour coliques (Votion et al. 2007, 2020; van Galen et al. 2010; Votion 2012). Ces douleurs peuvent être liées à une distension vésicale secondaire à une rétention urinaire ou à une anurie, mais des coliques d'origine abdominale concomitantes à la myopathie ont également été décrites. Cette présentation clinique peut retarder la reconnaissance du caractère musculaire de l'affection et doit inciter à inclure la MA dans la liste des diagnostics différentiels des chevaux présentés pour coliques en période à risque.

5. Quel est le pronostic vital ? Comment l'évaluer ?

Le taux de létalité rapporté varie selon les études de 43 à 97 % (Brandt et al. 1997; van Galen et al. 2012a). Dans la littérature, l'administration de soins intensifs et l'hospitalisation des chevaux malades ont été identifiées comme des facteurs augmentant les chances de survie (Dunkel et al. 2020). De plus, l'administration de vitamines et d'antioxydants (vitamines B, C et E, sélénium, carnitine) a été associée à un meilleur pronostic (Finno et al., 2006; van Galen et al., 2012b).

Sur la base d'observations cliniques, plusieurs facteurs démographiques pourraient être associés à un risque accru de létalité, bien que ces informations n'aient pas encore été validées par des études basées sur des preuves solides. Par exemple, l'âge moyen des survivants semble être plus élevé que celui des non-survivants. Comme pour l'incidence de la maladie, ces observations suggèrent une résistance potentielle à l'intoxication liée à l'âge. En revanche, aucune différence liée au sexe n'a été démontrée en ce qui concerne le pronostic de survie (van Galen et al., 2012b).

En ce qui concerne les marqueurs sanguins facilement accessibles en première ligne, la mesure de la lactatémie et de la CK à l'admission n'a pas été identifiée comme ayant un impact pronostique significatif. Toutefois, dans le cadre d'un suivi longitudinal, Dunkel et ses collaborateurs (2020) ont observé qu'une augmentation continue de la CK au fil du temps était associée à un pronostic défavorable. De plus, ni la concentration de la toxine HGA ni celle de son métabolite, la MCPA-carnitine, n'ont été prouvées comme étant d'intérêt pronostique (Boemer et al., 2017; van Galen et al., 2012b). Néanmoins, sur la base de l'hypothèse selon laquelle le profil des acylcarnitines reflète une privation d'énergie, un modèle statistique intégrant les acylcarnitines à chaînes courtes, moyennes et longues a été proposé pour estimer les chances de survie chez les chevaux cliniquement atteints de MA (Boemer et al. 2017).

Enfin, il est pertinent, dans ce contexte de pronostic de survie, de s'interroger sur le devenir sportif des chevaux ayant souffert de MA. La question du retour à l'activité sportive sans séquelles est cruciale, mais peu documentée dans la littérature. Un cas a cependant été rapporté, où des anomalies électrocardiographiques et échocardiographiques ont persisté pendant au moins deux mois après la résolution des signes cliniques (Verheyen et al., 2012).

C. INTOXICATION A L'HYPOGLYCINE A CHEZ L'HOMME

En dehors de l'érable sycomore, d'autres arbres de la famille des sapindacées sont porteurs de la toxine HGA. Chez l'homme l'intoxication à l'HGA est liée à deux arbres : l'ackée et le Litchi.

1. L'ackée est responsable d'une intoxication saisonnière : la maladie du vomissement jamaïcain

L'ackée est responsable de la maladie du vomissement jamaïcain. C'est à la fin du XIXe siècle qu'une corrélation a été soupçonnée pour la première fois entre les décès d'enfants dans la région de Vere, en Jamaïque, et la consommation de fruits de l'ackée (Barceloux 2009). Par la suite, plusieurs cas cliniques potentiellement liés à cette intoxication ont été documentés (Bowrey 1887; Hassall & Reyle 1955b; Rashford 1996). Cependant, ce n'est qu'en 1915 qu'un lien causal définitif a été établi entre la « maladie du vomissement jamaïcain » et la consommation de fruits non mûrs de l'ackée (Scott et al., 1916).

Sur le plan épidémiologique, la maladie du vomissement jamaïcain présente une incidence saisonnière, se manifestant principalement durant les mois les plus froids, de décembre à mars. Il a été observé que l'ackée est plus toxique durant cette période, une observation qui pourrait être liée à une baisse de sa teneur en matières grasses (Evans & Arnold 1938). Plusieurs travaux ont montré que la concentration en HGA diminue progressivement au cours de la maturation de l'ackée, jusqu'à devenir quasi indétectable dans les arilles de fruits pleinement ouverts et naturellement mûrs ouverts (Brown et al. 1992; Bowen-Forbes & Minott 2011). Toutefois, des conditions environnementales plus chaudes et plus humides ont été associées à des concentrations résiduelles plus élevées d'HGA à des stades équivalents de maturation, suggérant que le climat peut ralentir ou moduler la cinétique de maturation et de détoxification du fruit ouverts (Bowen-Forbes & Minott 2011).

La nature récurrente de ces épidémies annuelles a été étudiée sur une période de plus de cinquante ans. Celles-ci ont mis en évidence que la population jamaïcaine avait conscience des dangers liés à la consommation d'ackée non mûr. En effet, le fruit de l'ackée n'est pas entièrement comestible : seules les arilles charnues entourant les graines sont consommables, et la récolte traditionnelle du fruit ne se fait qu'à pleine maturité, lorsque celui-ci s'ouvre naturellement (Scott et al., 1916; Sherratt, 1986).

1.1. Quels sont les individus touchés ? Existe-t-il des facteurs de risque ?

L'intoxication est principalement observée dans les régions où l'ackée est indigène et où la consommation est moins strictement contrôlée, par exemple en Afrique centrale, en Guyane française, en Haïti et en Jamaïque. La maladie est plus répandue dans les zones rurales, notamment parmi les populations socio-économiquement défavorisées, vivant dans des conditions sanitaires précaires. Elle affecte par ailleurs plus fréquemment les enfants que les adultes (Jordan & Burrows 1937). L'intoxication s'est produite dans la plupart des cas par ingestion, par les enfants, de purée ou de soupe d'ackée, mais aussi de l'eau de cuisson de ces mêmes fruits (Scott et al., 1916).

1.2. Symptomatologie de la maladie du vomissement jamaïcain

Les rapports de cas indiquent que les symptômes apparaissent rapidement, entre 2 et 4 heures après l'ingestion de soupe d'ackée chez les enfants. Cependant, chez les adultes ayant consommé le fruit, l'apparition des signes d'intoxication est plus tardive, pouvant aller jusqu'à 3 jours après ingestion (Barceloux, 2009; Meda et al., 1999; Scott et al., 1916). La maladie du vomissement jamaïcain tire son nom de l'un de ses principaux symptômes (les vomissements), mais il s'agit en réalité d'une encéphalopathie plutôt que d'une atteinte du tractus digestif (Meda et al. 1999). La littérature précoce sur le sujet décrivait des cas « méningite-like », ainsi qu'une épidémie de méningite cérébrospinale, qui sont en fait une seule et même intoxication : la maladie du vomissement jamaïcain (Scott et al., 1916). Pour la plupart des cas, cette maladie évolue en deux phases distinctes. La première est caractérisée par des maux de tête, des vomissements et des paresthésies, suivie d'une seconde phase marquée par des signes cliniques tels que des convulsions toniques, une somnolence et, dans les cas graves, une progression vers le coma voire la mort (Scott et al. 1916; Joskow et al. 2006). Dans les formes les plus aiguës et souvent fatales, la phase initiale de vomissements peut être absente (Scott et al. 1916). Les cas sévères entraînent un coma et un décès en moins de 12 heures (Bressler et al. 1969; Brown et al. 1992; Blake et al. 2004).

Cette intoxication est également décrite comme une source de dépression respiratoire nécessitant une ventilation assistée par intubation endotrachéale. Cependant, en cas de survie, un rétablissement complet est observé dans un délai d'une semaine (Barceloux 2009).

Les altérations histopathologiques observées comprennent des pétéchies diffuses, un stéatose hépatique et rénale, des modifications nécrobiotiques au niveau du pancréas, des reins et du foie, ainsi que des œdèmes des tissus conjonctifs et des hémorragies étendues (Joskow et al. 2006).

Les analyses de laboratoire révèlent une hypoglycémie sévère, des concentrations élevées d'acylcarnitines, telles que l'octanoylcarnitine (C8), et une augmentation des acides dicarboxyliques dans les urines (Joskow et al. 2006).

1.3. Pronostic de la maladie du vomissement jamaïcain

Le pronostic de cette maladie a évolué au fil du temps. Alors que les premiers cas rapportés étaient quasi systématiquement mortels, les données épidémiologiques récentes montrent une réduction significative des taux de létalité. En 2011, 194 cas ont été signalés en Jamaïque dont 23 décès (soit 12%) (Jordan & Burrows 1937). La mort est plus fréquente chez les enfants que chez les adultes (Barceloux 2009).

2. Le litchi est responsable d'encéphalite saisonnière : l'encéphalite aiguë induite par le litchi

Depuis le milieu des années 1990, en Inde, des épidémies saisonnières d'encéphalite aiguë sont rapportées, avec un pic de cas observé à la mi-juin. Ces épidémies se caractérisent par un taux de létalité infantile élevé. Les foyers de ces épidémies sont concentrés dans les régions où la culture du litchi est extensive (Shrivastava et al., 2017).

En plus de l'HGA, une seconde toxine analogue, le MCPrG, a été identifiée comme étant à l'origine de ces encéphalites. La MCPrG a été initialement isolée dans les graines de litchi (Gray & Fowden 1962; Minakata et al. 1985), mais elle a également été retrouvée dans les arilles, où elle coexiste avec l'HGA (Isenberg et al. 2016). Ces deux toxines sont donc présentes dans la fraction consommée du fruit.

En outre, l'HGB a également été isolée dans les litchis, mais aucune relation causale n'a pu être démontrée à ce jour entre cette molécule et les syndromes d'encéphalopathie associés à la consommation de ce fruit (Isenberg et al. 2016; El-Khatib et al. 2022).

2.1. Quels sont les individus touchés ? Existe-t-il des facteurs de risque ?

Tout comme pour la maladie du vomissement jamaïcain, l'encéphalite aiguë induite par la consommation de litchi touche principalement les jeunes enfants (Shrivastava et al., 2017).

De manière similaire à ce qui est observé pour l'HGA dans l'ackée, les teneurs en HGA et en MCPrG dans le litchi présentent une corrélation négative avec la maturation du fruit. Ainsi, dans les arilles du litchi, la concentration en HGA et en MCPrG dans la matière sèche diminue environ de moitié lorsque le fruit est mûr (Bowen-Forbes & Minott 2011; Shrivastava et al. 2017). Il a également été montré que le fait de sauter le repas du soir après avoir consommé une grande quantité de litchis représente un facteur de risque important pour le développement de cette maladie (Shrivastava et al. 2017).

La combinaison synergique entre la consommation de litchis, l'absence de repas en soirée et d'autres facteurs potentiels, tels qu'un mauvais état nutritionnel, pourrait contribuer à l'apparition de cette maladie. De plus, comme cela a été suspecté chez les chevaux atteints de MA, des différences génétiques encore non identifiées pourraient également jouer un rôle dans l'apparition de cette pathologie (Shrivastava et al. 2017). À ce jour, ce dernier aspect n'a pas encore été étudié chez l'homme. Concernant les équidés, bien que la question d'une prédisposition génétique à la MA n'ait pas été directement investiguée, aucune prédisposition raciale n'a pu être mise en évidence à ce jour (Votion et al., 2009).

2.2. Symptomatologie de l'encéphalite aiguë induite par le litchi

L'encéphalite aiguë induite par le litchi se caractérise par l'apparition soudaine des symptômes, avec une altération de l'état mental. Les principaux symptômes incluent des convulsions, une perte de conscience, de la léthargie, de la transpiration excessive (diaphorèse) et une faiblesse générale (Zhang & Fontaine 2017).

Au niveau sanguin, une hypoglycémie marquée a été observée associée à une déplétion du glycogène hépatique (Bressler et al., 1969; Shrivastava et al., 2017). De plus, selon l'étude de Shrivastava et collaborateurs (2017), 90 % (n=75) des cas présentaient un profil sérique en acylcarnitines modifié.

2.3. Pronostic de l'encéphalite aiguë induite par le litchi

Le cours clinique de la maladie est souvent court, ne durant que quelques jours (Seidelin 1913; Sander et al. 2020). Le taux de létalité rapporté est de 32 % (Shrivastava et al. 2017).

3. Conclusion sur l'intoxication aux toxines des sapindacées chez l'homme

La maladie du vomissement jamaïcain et le syndrome d'encéphalite aiguë affectent tous deux majoritairement des populations issues de milieux socio-économiquement défavorisés. Cette situation rend difficile l'évaluation précise de leur prévalence épidémiologique. Par ailleurs, les convictions culturelles entourant la consommation d'ackée et de litchi contribuent à une sous-déclaration des cas, ce qui limite encore davantage notre compréhension de l'ampleur de ces phénomènes. Il est important de souligner que ces maladies ne disposent actuellement d'aucun traitement spécifique.

Dans ce contexte, toute avancée en médecine vétérinaire, notamment dans la gestion des nombreux cas de MA, pourrait avoir des répercussions sur la médecine humaine. Ces progrès pourraient ouvrir la voie à de nouvelles perspectives en matière de prévention ou de traitement de maladies similaires, notamment celles liées à l'intoxication alimentaire.

Les similitudes observées entre les profils métaboliques équins et humains concernent essentiellement les perturbations biochimiques induites par l'inhibition de la β -oxydation, en particulier l'accumulation d'acylcarnitines spécifiques. En revanche, l'expression clinique de ces perturbations diffère profondément selon les espèces, l'atteinte musculaire prédominant chez les équidés, tandis que les manifestations neurologiques sont centrales chez l'homme. Ces divergences suggèrent une modulation espèce-spécifique de la vulnérabilité tissulaire, possiblement liée à des différences de distribution de la toxine, de métabolisme énergétique et de réserves glycogéniques.

D. INTOXICATION À L'HYPOLYCYCINE A CHEZ D'AUTRES ESPÈCES ANIMALES

1. Intoxications expérimentales chez les animaux de laboratoire

Suite à la découverte initiale de l'HGA comme source d'intoxication en médecine humaine, divers modèles expérimentaux incluant les rats, souris, lapins, chiens, chats, pigeons, cobayes et singes ont été utilisés (Chen et al. 1957). Ces études ont permis de caractériser les manifestations cliniques et biochimiques associées à l'intoxication, qui reproduisent, en partie, celles observées chez l'homme et chez les équidés.

1.1. Espèces et observations cliniques

Chez les rats, l'administration d'HGA, orale ou en injection intrapéritonéale, provoque une hypoglycémie profonde, une déplétion quasi-totale du glycogène hépatique, une léthargie et, à des doses élevées, un coma suivi de la mort (Hassall et al. 1954; Feng & Patrick 1958). Les lapins et cobayes montrent également une hypoglycémie sévère accompagnée de signes neurologiques comme des tremblements et des convulsions (Chen et al. 1957). Chez les pigeons, l'administration intraveineuse d'HGA provoque des vomissements dans les 30 à 75 minutes suivant l'injection, mais sans hypoglycémie significative. À des doses plus élevées (25 à 100 mg/kg), une dépression sévère suivie de la mort a été observée. De plus, des lésions hépatiques ont été rapportées chez certains oiseaux (Chen et al. 1957). Les chiens et chats, bien que moins étudiés, présentent des altérations similaires, notamment une faiblesse musculaire généralisée et des troubles respiratoires à des doses élevées (Chen et al. 1957). Enfin, chez les singes, les études ont rapporté des troubles métaboliques comparables, bien que les données spécifiques soient limitées (Chen et al. 1957).

1.2. Influence des conditions expérimentales

Les études ont révélé que le jeûne augmente significativement la gravité de l'intoxication, particulièrement chez les rats (Feng & Kean 1955; Feng & Patrick 1958). En revanche, les régimes riches en protéines semblent atténuer certains des effets toxiques, mettant en évidence, comme chez l'homme, l'importance des facteurs nutritionnels dans la modulation de la toxicité (Feng & Kean 1955).

1.3. Signes biochimiques

Outre l'hypoglycémie sévère, une augmentation des acides organiques urinaires et une inhibition de la β -oxydation des acides gras ont été observées dans toutes les espèces étudiées (Melde et al. 1991).

2. Intoxications prairiales chez les herbivores en parc zoologiques

L'intoxication à l'HGA a également été rapportée chez des herbivores non équidés, notamment dans des parcs zoologiques ou des élevages.

2.1. Espèces touchées et facteurs de risque

Des cas ont été documentés chez les cerfs du Père David (*Elaphurus davidianus*) et les chameaux de Bactriane (*Camelus bactrianus*), dans des enclos où les érables sycomores étaient à proximité (Bunert et al. 2018; Hirz et al. 2021). Ces espèces, bien que physiologiquement distinctes des équidés car étant des polygastriques, semblent néanmoins présenter une sensibilité à l'HGA. La saisonnalité des intoxications, avec des pics à l'automne et au printemps, reflète celle observée chez les chevaux, en lien avec la disponibilité des samares et plantules toxiques.

2.2. Signes cliniques

Les signes observés incluent faiblesse musculaire, raideur, myoglobinurie et, dans les cas graves, une incapacité à se relever. Les analyses de laboratoire révèlent des niveaux élevés d'activité sérique des CK traduisant une rhabdomyolyse sévère (Bunert et al. 2018; Hirz et al. 2021). Chez les chameaux, une dégénérescence sélective des fibres musculaires de type I a été rapportée, accompagnée d'une accumulation de lipides dans les muscles posturaux (Hirz et al. 2021).

2.3. Diagnostic et épidémiologie

Comme chez les équidés, le diagnostic repose sur les signes cliniques, les données environnementales (présence d'érables sycomores) et, dans certains cas, la détection de la toxine HGA et de ses métabolites toxiques dans le sang ou l'urine (Bunert et al. 2018).

2.4. Pronostic

Les herbivores atteints présentent souvent un pronostic sombre en raison de l'évolution rapide de la maladie, ce qui souligne l'importance de la prévention par la gestion des pâturages et des habitats (Hirz et al. 2021). Une prise en charge précoce, incluant un support métabolique et une réhydratation, pourrait améliorer les chances de survie ainsi qu'observé en médecine équine.

REM : L'interprétation des cas observés chez les herbivores non équidés doit néanmoins être abordée avec prudence. Chez les espèces polygastriques, la fermentation pré-gastrique est susceptible de modifier quantitativement et qualitativement l'exposition systémique à l'hypoglycine A, soit par une dégradation partielle de la toxine, soit par la production de métabolites intermédiaires. À ce jour, peu de données expérimentales permettent de caractériser précisément le devenir ruminal de l'hypoglycine A ni son impact sur la toxicité systémique, ce qui limite la portée des comparaisons inter-espèces.

E. TOXICOCINÉTIQUE DE L'HYPOGLYCINE A

Peu de données sont disponibles concernant la toxicocinétique de l'HGA. Cette section se concentrera donc sur les mécanismes décrits pour les acides aminés neutres, et en particulier pour les BCAA, dont la cinétique d'absorption intestinale et d'élimination rénale pourrait être proche de celle de l'HGA. Ces mécanismes seront complétés par des informations spécifiques relatives à l'HGA issues de la littérature scientifique.

1. Acides aminés : passage de la membrane apicale des cellules épithéliales intestinales

1.1. Transport intestinal des acides aminés : le rôle du système B

Les cellules épithéliales intestinales absorbent les BCAA à partir de la lumière intestinale grâce au transporteur protéique B0AT1. Ce mécanisme de transport est nommé système B, il est principalement exprimé dans les membranes apicales des entérocytes de l'intestin grêle, avec une expression croissante du duodénum jusqu'à l'iléon (Bröer et al. 2004; Terada et al. 2005; Romeo et al. 2006; Bröer 2008).

Le mécanisme de transport repose sur un cotransport avec le sodium. Le gradient électrochimique de sodium génère l'énergie nécessaire au transport actif des BCAA, favorisant leur entrée intracellulaire. De plus, les valeurs de K_m (constante de Michaelis-Menten) du transporteur vis-à-vis de ses substrats diminuent avec l'augmentation de la concentration de sodium dans la lumière intestinale (Terada et al. 2005; Romeo et al. 2006). Ce système B présente une spécificité large pour les acides aminés neutres, y compris les BCAA. Une affinité particulière pour les chaînes latérales hydrophobes des BCAA, telles que celles de la leucine, de l'isoleucine et de la valine, contribue à leur absorption efficace. L'ordre de préférence des substrats est : Met = Leu = Ile = Val > Gln = Asn = Phe = Cys = Ala = Ser > Gly = Tyr = Thr = His = Pro > Trp = Lys (Bröer et al. 2004).

Dans le cadre de la MA, un apport oral riche en acides aminés à forte affinité pour le système B pourrait donc permettre de limiter préventivement l'absorption intestinale de l'HGA.

1.2. Variations inter-espèces

Il est très probable que l'entrée de l'HGA depuis la lumière intestinale jusque dans les entérocytes se fasse via le système B. Si ce système est bien caractérisé chez le rat et l'homme, il n'existe que peu de données spécifiques aux équidés, et des variations dans l'expression ou l'efficacité des transporteurs ne peuvent être exclues.

Chez l'humain

Le gène codant pour le transporteur B0AT1 est SLC6A19. À ce jour, dix mutations de ce gène ont été répertoriées, associées à la maladie de Hartnup, qui entraîne une perte du transport des acides aminés neutres (Kleta et al. 2004; Seow et al. 2004). Ceci illustre les variations possibles dans les capacités de

transport inter- et intra-espèces, qui pourraient également affecter les niveaux d'HGA absorbés et expliquer des différences de sensibilité d'un cheval à l'autre dans une même prairie.

Chez le lapin

Des études ont montré une expression accrue de B0AT1 chez le lapin, ainsi que l'existence de sous-systèmes au sein du système B. Ces adaptations semblent liées à sa stratégie digestive d'herbivore à fermentation cæcale. Le lapin maximise l'absorption des acides aminés présents dans le chyme intestinal, souvent pauvres en acides aminés essentiels à cause de son régime riche en fibres (Schultz & Curran 1970; Bröer et al. 2004)

Chez les équidés

Les équidés possèdent eux aussi une physiologie digestive fondée sur la fermentation cæcale. Par analogie avec le lapin, ils pourraient présenter une expression accrue de transporteurs d'acides aminés, incluant potentiellement ceux impliqués dans le transport de l'HGA. En particulier, la présence d'un transport sodium-dépendant de type "système B" au niveau de la bordure en brosse du jéjunum équin a été démontrée fonctionnellement pour un acide aminé neutre (glutamine) (Salloum et al. 1993). Une telle adaptation, favorable à l'absorption d'azote et de BCAA dans un régime riche en fibres, pourrait contribuer à une absorption particulièrement efficace de l'HGA et expliquer la sévérité des intoxications observées chez ces espèces.

1.3. Rôle complémentaire de B0AT2 dans le transport de l'hypoglycine A

Bien que B0AT1 soit le principal médiateur du transport intestinal, B0AT2 joue un rôle complémentaire dans certaines espèces. Chez l'humain, B0AT2 a été initialement identifié comme spécifique au cerveau. Cependant, des études de RT-PCR ont montré son expression dans le rein de la souris, bien qu'il ne soit pas exprimé dans le rein humain (Takanaga et al. 2005; Bröer et al. 2006).

Ces variations d'expression entre tissus, et variables selon les espèces, pourraient impacter le transport de l'HGA. Cela pourrait expliquer les différences de sensibilité inter-espèces à l'intoxication par l'HGA et la variabilité des manifestations cliniques observées. En effet, l'homme est la seule espèce où l'intoxication à l'HGA est décrite comme associée à des symptômes neurologiques ; un passage accru de la toxine dans l'encéphale pourrait constituer une piste de réponse.

1.4. Une absorption colique : une hypothèse à explorer

Un transporteur Na⁺ dépendant pour certains acides aminés a été identifié dans le colon distal de certains mammifères (Munck 1985; Sloan & Mager 1999). Cela suggère que l'absorption des acides aminés, et potentiellement de l'HGA, ne serait pas strictement limitée à l'intestin grêle. Ce mécanisme pourrait compléter l'absorption intestinale proximale.

Chez le cheval, au-delà de l'intestin grêle, plusieurs travaux montrent que le cæcum et le colon du cheval contribuent partiellement à l'absorption de l'azote issu des protéines (Reitnour et al. 1969; Reitnour &

Salsbury 1972). L'administration d'azote microbien marqué (^{15}N) a ensuite confirmé que des acides aminés essentiels, notamment la lysine, pouvaient être absorbés par le gros intestin (Slade et al. 1971). Ces observations, auxquelles s'ajoute la mise en évidence d'une expression mesurable de transporteurs d'acides aminés dans le gros intestin équin (Woodward et al. 2010), indiquent que l'absorption n'est probablement pas limitée au grêle et soutiennent l'hypothèse d'une absorption colique de l'HGA, complémentaire de l'absorption jéjunale.

REM : Les hypothèses formulées concernant l'implication des transporteurs de type B0AT dans l'absorption intestinale de l'hypoglycine A chez les équidés reposent essentiellement sur des analogies fonctionnelles avec les BCAA et sur des données issues d'autres espèces. En l'absence de caractérisation directe de l'affinité de ces transporteurs pour l'HGA chez le cheval, ces propositions doivent être considérées comme plausibles mais non démontrées, appelant à des investigations expérimentales spécifiques.

2. Acides aminés : passage de la membrane basolatérale des cellules épithéliales intestinales

Une fois absorbés, les BCAA entrent dans la circulation sanguine via les transporteurs localisés dans la membrane basolatérale des entérocytes, tels que les transporteurs de type L (L-amino acid transporter) (Pineda et al. 1999). Chez le cheval, Woodward et al. (2010) ont montré que l'ARNm d'un des transporteurs de ce système L, LAT-3 (L-amino acid transporter 3), était détecté dans l'ensemble des segments étudiés (jéjunum, iléon, cæcum, colon ventral et colon dorsal), avec une expression plus marquée dans le cæcum et le colon ventral. Comme LAT-3 est généralement localisé à la membrane basolatérale des entérocytes chez d'autres mammifères, il contribue vraisemblablement à la sortie des acides aminés, et potentiellement de l'HGA, vers la circulation sanguine.

3. Acides aminés : élimination rénale

Dans les reins, les BCAA filtrés par les glomérules sont presque entièrement réabsorbés, et ce, principalement grâce au système B (Doyle & McGivan 1992; Böhmer et al. 2005; Camargo et al. 2005). Ce mécanisme est le même que celui précédemment décrit pour les entérocytes. La réabsorption des acides aminés neutres par le rein est entraînée par le gradient électrochimique de sodium. Ce transporteur est exprimé dans le tubule contourné proximal des reins (Bröer et al. 2004; Romeo et al. 2006).

Comme au niveau intestinal, des variations intra- et inter-spécifiques sont possibles. Il convient de noter qu'en plus du système B, d'autres transporteurs à affinités variables sont également présents. Il a été démontré que la perfusion sanguine d'alanine inhibe de manière surprenante non seulement la réabsorption d'autres acides aminés neutres, mais également celle des acides aminés cationiques. À des

concentrations élevées, elle peut même inhiber la réabsorption des acides aminés anioniques (Webber et al. 1961). Cette inhibition « non spécifique », probablement due à une compétition entre transporteurs utilisant le gradient de sodium, pourrait constituer une piste thérapeutique en cas d'intoxication à l'HGA, afin de favoriser l'élimination de la toxine.

4. Hypoglycine A : toxicocinétique expérimentale

4.1. Absorption

Chez les animaux de laboratoire

Parmi les modèles d'intoxication expérimentale à l'HGA publiés et discutés précédemment, l'HGA a été administrée par voie parentérale chez le chat, le lapin, le cobaye, le pigeon et le singe. L'administration entérale n'a été étudiée que chez le chien et le rat.

Chez le chien, bien que l'administration orale entraîne une absorption mesurable, les effets hypoglycémiques observés sont moins marqués que ceux induits par des voies injectables (Feng & Patrick 1958; Chen et al. 2021). Cela suggère une absorption partielle ou une possible métabolisation rapide dans le tractus digestif.

Chez le rat, l'administration orale d'HGA s'est avérée aussi délétère que l'administration intrapéritonéale. Cette équivalence indique une absorption efficace de la toxine, sans destruction significative dans le tractus gastro-intestinal (Feng & Patrick 1958). Une DL50 a été établie à 98 mg/kg pour la voie orale, proche de la valeur de 97 mg/kg pour la voie intrapéritonéale (Feng & Patrick 1958). Les rats à jeûn sont significativement plus sensibles à l'HGA. Chez ceux-ci, une dose de 50 mg/kg provoque une mortalité complète (6/6) alors qu'elle n'entraîne aucune mortalité chez les rats nourris (Feng & Patrick 1958).

Une observation similaire est rapportée chez l'homme dans les cas d'intoxication liés à la consommation de litchis. L'absence de repas en soirée, combinée à d'autres facteurs tels que l'état nutritionnel, semble contribuer à l'apparition de l'intoxication (Shrivastava et al. 2017).

Chez les équidés

À ce jour, aucune étude d'intoxication expérimentale à l'HGA n'a été menée chez le cheval. Cependant, une étude *ex vivo* réalisée sur des segments isolés d'intestin équin a montré que l'HGA traverse efficacement la paroi du jéjunum de manière dose-dépendante. La même étude montre que l'utilisation d'adsorbants, tels que le charbon actif, permet une réduction de cette absorption même si le caractère polaire et la solubilité aqueuse de l'HGA ne sont pas favorables à son adsorption. Ces résultats suggèrent l'intérêt du charbon actif à titre préventif chez les équidés exposés à cette toxine (Krägeloh et al. 2018), réduisant son passage dans la circulation systémique.

4.2. Elimination

Chez l'homme

À ce jour, aucune étude standardisée sur l'intoxication par l'HGA n'a été réalisée. Cependant, Sander et al. (2020) rapportent, à partir d'une étude réalisée sur un seul individu humain (n=1), que l'excrétion rénale de l'HGA sous forme non métabolisée est supérieure à celle de la MCPA-carnitine. De plus, l'excrétion rénale de l'HGA a été décrite comme proportionnelle à sa concentration sérique. Par conséquent, une augmentation de la filtration glomérulaire, obtenue par une fluidothérapie, pourrait potentiellement améliorer l'élimination de l'HGA plus efficacement que celle de la MCPA-carnitine (Sander et al. 2020).

Chez les équidés

Les données scientifiques publiées sur la cinétique sanguine de l'HGA et de l'un de ses métabolites, la MCPA-carnitine sont peu nombreuses (Sander et al. 2016; Jahn et al. 2022). Dans une étude portant sur un seul cheval atteint de MA, Jahn et collaborateurs (2022) ont observé une diminution des concentrations plasmatiques d'HGA et de MCPA-carnitine avec le temps. La concentration d'HGA a diminué progressivement et est restée détectable jusqu'à 96 heures après l'ingestion tandis que la MCPA-carnitine est devenue indétectable après 72 heures.

Une seconde étude portant sur deux cas suggère, au contraire, une diminution plus rapide de l'HGA comparée à son métabolite (MCPA-carnitine). En effet, Bochnia et collaborateurs (2015) ont décrit une élimination de l'HGA dès 24 heures après l'ingestion, suivie d'une augmentation des concentrations sériques de MCPA-carnitine, qui restaient élevées de 48 à 72 heures après l'apparition des signes cliniques. Ces observations contradictoires soulignent l'importance du timing dans le prélèvement des échantillons, les possibles variabilités entre les cas rapportés, et enfin, la nécessité de mener une étude de plus grande échelle et standardisée pour mieux comprendre la cinétique de l'HGA et de son métabolite.

L'excrétion lactée des toxines issues des sapindacées ne peut être négligée. La transmission verticale a d'abord été suspectée à la suite d'un cas de poulain présentant une MA dès les premières heures de vie, né d'une jument ayant souffert de MA durant la gestation. Les auteurs ont ainsi émis l'hypothèse d'un transfert transplacentaire ou via le lait maternel (Karlíková et al. 2018). Cette hypothèse a ensuite été confirmée dans une étude où le lait d'une jument atteinte de MA a été analysé. Il y a été détecté de l'HGA et ses métabolites (MCPA-glycine et MCPA-carnitine) parallèlement à une élévation marquée des acylcarnitines (Sander et al. 2021). Enfin dans le même article, l'examen de six laits de jument commerciaux destinés à la consommation humaine a révélé que l'un d'eux contenait HGA, MCPPrG et leurs conjugués carnitine, tandis que les cinq autres étaient exempts de toxines détectables. Cette étude a le mérite d'être la première à documenter directement la présence d'HGA et de ses métabolites dans le lait de jument, confirmant ainsi la plausibilité du transfert lacté. Néanmoins, elle repose sur un nombre

limité d'échantillons et ne permet pas de comparer les concentrations entre le sang maternel, le lait et le sang du poulain. Malgré ces limites, la mise en évidence de toxines dans le lait confirme que cette voie de transmission existe bel et bien, avec des implications cliniques (poulain sous la mère) et de santé publique (sécurité des produits laitiers équinés).

Le passage de l'HGA vers le lait trouve une explication plausible dans sa nature d'acide aminé non protéinogénique, analogue aux BCAA. Le lait de jument contient en effet des concentrations notables de BCAA (leucine, isoleucine, valine), aux côtés d'autres acides aminés libres (Mazhitova & Kulmyrzaev 2016; Boranbayeva et al. 2025). Ces teneurs ne sont pas constantes : elles varient en fonction de facteurs tels que la saison, le stade de lactation ou l'alimentation maternelle (Barłowska et al. 2023; Boranbayeva et al. 2025). Des travaux récents ont même montré que la supplémentation en BCAA augmente directement leurs concentrations dans le plasma et dans le lait de jument, établissant une corrélation entre les niveaux circulants et lactés (Ren et al. 2025). Ces observations confirment que les BCAA présents dans la circulation maternelle sont transférés vers le lait et suggèrent qu'une molécule exogène partageant leurs caractéristiques structurales, telle que l'HGA, puisse emprunter les mêmes voies de sécrétion.

Chez les autres espèces animales

Chez les autres espèces animales, les données sur l'élimination de l'HGA sont encore fragmentaires mais tendent à confirmer que, comme chez les équidés, la molécule suit les voies métaboliques des BCAA, dont elle mime la structure. Plusieurs travaux ont montré que les BCAA passent activement du plasma vers le lait chez différentes espèces, notamment la truie (Li et al. 2009), la vache (Lei et al. 2012; Xu et al. 2022) et même le lapin (Delgado et al. 2017). Leur présence y est attestée à la fois sous forme libre (Lei et al. 2012) et sous forme incorporée dans les protéines lactées (Li et al. 2009; Xu et al. 2022). Des travaux de supplémentation ont en outre montré une relation directe entre leurs concentrations plasmatiques et leurs concentrations dans le lait (Li et al. 2009; Lei et al. 2012; Xu et al. 2022). L'analogie structurale et métabolique entre HGA et BCAA laisse supposer que l'HGA peut emprunter ces mêmes transporteurs et mécanismes de sécrétion mammaire. Cette hypothèse est appuyée par la détection d'HGA et de ses métabolites dans le lait de juments atteintes de MA (Sander et al. 2021), mais aussi dans le lait de vaches laitières pâturant à proximité d'érables sycomores (Bochnia et al. 2021 ; Engel et al. 2023). En outre, la présence d'HGA a été confirmée dans le sérum de moutons et de cervidés exposés sans expression clinique (Karlíková et al. 2018; Bochnia et al. 2021), illustrant la possibilité d'une absorption subclinique. Ces observations renforcent la pertinence toxicologique et de santé publique de l'HGA : au-delà de l'impact vétérinaire, la contamination du lait destiné à la consommation humaine constitue un risque non négligeable.

F. TOXICODYNAMIE DE L'HYPOLYCINE A

1. Métabolisation de l'hypoglycine A en acide méthylèncyclopropylacétique

En 1958, von Holt montra chez le rat que l'HGA n'est pas toxique par elle-même mais qu'elle doit être métabolisée par le foie. Le métabolite obtenu a été identifié comme MCPA (von Holt & von Holt 1959). Par la suite il sera précisé que c'est le MCPA-CoA qui est la forme active, responsable de la physiopathologie de l'intoxication à l'HGA.

La métabolisation de L'HGA en MCPA se déroule en deux étapes via une machinerie enzymatique bien décrite dans la littérature car impliquée dans le métabolisme des BCAA, la leucine, isoleucine et valine (von Holt 1966; Melde et al. 1989).

1.1. Une première étape catalysée par une aminotransférase ubiquitaire

La première étape consiste en la synthèse du méthylènetricyclopropylpyruvate (MCP-pyruvate). Il s'agit d'une transamination réversible catalysée par une aminotransférase d'acides aminés à chaîne ramifiée (BCAT, *branched-chain aminotransférase*) (von Holt, 1966; von Holt & von Holt, 1959).

Localisation des aminotransférases d'acides aminés à chaîne ramifiée

La BCAT existe sous deux isoformes principales, cytosolique et mitochondriale. Contrairement aux hypothèses initiales qui limitaient la BCAT mitochondriale aux hépatocytes (Sweatt et al. 2004), celle-ci s'avère omniprésente dans les cellules contenant des mitochondries et est exprimée dans de nombreux tissus. En revanche, la BCAT cytosolique présente une expression beaucoup plus restreinte. Elle a été décrite de façon limitée à des tissus spécifiques tels que le cerveau, les ovaires et le placenta chez le rat (Hall et al. 1993; Suryawan et al. 1998). Ceci suggère des rôles distincts pour chaque isoforme dans le métabolisme des BCAA. Chez l'humain, l'expression de la BCAT cytosolique est confirmée dans le cerveau (Suryawan et al. 1998), alors que les ovaires et le placenta n'ont pas été testés. Ces données mettent en évidence la spécialisation fonctionnelle des isoformes BCAT dans le métabolisme des BCAA en fonction des tissus et des compartiments cellulaires. En outre, la BCAT cytosolique joue un rôle clé dans la synthèse du glutamate dans le système nerveux central (Hutson 2001). Il est à noter que chez l'homme et le rat, le nombre de tissus testés reste limité, et qu'aucune étude sur l'activité différentielle des BCAT selon les tissus n'a été menée chez les équidés. Cette distribution tissulaire est déterminante pour l'intoxication à l'HGA car la transamination initiale de la toxine dépend de la disponibilité locale des BCAT. Ainsi, la forte ubiquité de la BCAT mitochondriale suggère que l'HGA peut être métabolisée dans de nombreux tissus, alors que l'expression plus limitée de la BCAT cytosolique pourrait conditionner la sensibilité d'organes spécifiques, comme le système nerveux central (rat et homme) ou le placenta (rat). Chez les équidés, aucune étude n'a encore défini ce profil, ce qui limite notre compréhension de la variabilité tissulaire observée dans la MA.

Chez le mouton, une particularité a été observée. Contrairement au rat, au singe et à l'homme, le mouton exprime à la fois la BCAT mitochondriale et la BCAT cytosolique dans ses muscles squelettiques. Ainsi,

la BCAT mitochondriale ovine ne contribue qu'en partie (57-71 %) à l'activité totale des BCAT dans les muscles squelettiques. Les BCAT cytosoliques jouent donc également un rôle significatif. Cette co-expression unique pourrait refléter une adaptation métabolique propre au statut ruminant de l'espèce pour son métabolisme des BCAA (Bonfils et al. 2000). À notre connaissance, cette information n'a pas été vérifiée chez d'autres espèces ruminantes, ne nous permettant pas de conclure si cette particularité enzymatique est liée à une physiologie digestive de type ruminant. Une hypothèse reste que cette particularité de distribution enzymatique pourrait être présente chez plusieurs espèces herbivores, qui présentent un catabolisme intense des BCAA. Cette particularité d'expression des isoformes dans le muscle squelettique ovin illustre combien la première étape de métabolisation de l'HGA pourrait varier entre espèces. Chez les équidés, si un schéma analogue existait, il pourrait expliquer la sensibilité musculaire particulière et la sévérité des lésions observées dans la MA.

Conservation évolutive des aminotransférases d'acides aminés à chaîne ramifiée

La BCAT est bien conservée au cours de l'évolution. L'enzyme fait partie d'une famille d'aminotransférases présente chez de nombreuses espèces. Les BCAT sont présentes chez les levures, mais également chez les bactéries et les végétaux (Kispal et al. 1996; Brosnan & Brosnan 2006; Koper et al. 2022). Cette ubiquité, associée au fait que l'HGA est d'origine végétale, suggère une forte probabilité que la dégradation de l'HGA puisse également se produire dans des cellules des sapindacées. Chez les plantes, les BCAT semblent intervenir dans des fonctions spécifiques, incluant la biosynthèse et la dégradation des BCAA, ainsi que la régulation hormonale et le métabolisme énergétique (Schuster & Binder 2005; Gao et al. 2009). Plusieurs études traitent des BCAT chez les plantes. L'expression des BCAT varie selon l'organe de la plante et pourrait correspondre à des fonctions différentes entre les jeunes feuilles, les fleurs ou les fruits (Schuster & Binder 2005). Les BCAT végétales ont également été décrites comme intervenant dans les voies de régulation hormonale (Gao et al. 2009). Bien que cela ne fournisse pas directement d'éclaircissement sur le mécanisme d'intoxication par l'HGA, ces travaux pourraient servir de base pour explorer la fonction physiologique de la production d'HGA pour la plante. Le fait que les BCAT soient présentes dans les tissus des sapindacées, producteurs d'HGA, suggère que la plante elle-même possède les enzymes capables de métaboliser cette molécule. Cela soulève la question de la fonction physiologique de l'HGA pour la plante et pourrait expliquer son accumulation dans certaines parties végétatives, exposant ensuite les herbivores.

Par ailleurs, la dégradation de l'HGA par des bactéries apparaît théoriquement réalisable, ouvrant ainsi des perspectives pour des applications de biodégradation ou de détoxification. Les BCAT bactériens semblent accepter une gamme plus large de substrats par rapport aux enzymes des mammifères (Hutson, 2001).

Cette conservation évolutive suggère que la capacité à transaminer l'HGA est largement répandue dans le règne animal et même au-delà. Cela explique pourquoi l'HGA peut être métabolisée chez des espèces

aussi diverses que le rat, les ruminants ou les équidés, et pourquoi l'intoxication n'est pas limitée à une lignée taxonomique spécifique.

Régulation des aminotransférases d'acides aminés à chaîne ramifiée

Parmi les substrats des BCAT, l'isoleucine et la leucine présentent une affinité supérieure à celle de la valine (Hutson 2001). Par ailleurs, les BCAT montrent une sensibilité classique aux réactifs ciblant leurs groupements carbonyles, tels que l'amino-oxyacétate, un inhibiteur général des transaminases (Hutson et al. 1988). En complément de cet inhibiteur, Hutson (2001) a investigué l'effet de plusieurs analogues structuraux des BCAA (gabapentine, bromoleucine, HGA) et l'effet d'analogues des α -cétoacides ramifiés (*e.g.*, méthylèncyclopropylglyoxylate, MCPA, cyclohexenylglyoxylate) sur l'activité transaminase des BCAT de rat. Ces tests, réalisés à des concentrations physiologiques de leucine et d' α -cétoglutarate, ont révélé des effets variés. Parmi les molécules étudiées, la bromoleucine, l'HGA et la gabapentine se distinguent par leur forte capacité d'inhibition des BCAT cytosoliques (isolées à partir du cerveau de rat) avec des taux d'inhibition respectifs de 95 %, 85 % et 80 % vis-à-vis de la leucine. À l'inverse, l'inhibition des BCAT mitochondriales (foie de rat) s'avère plus modérée (≈ 40 % pour l'HGA, ≈ 60 % pour la bromoleucine) (Hutson 2001). D'autres composés, tels que le méthylèncyclopropylglyoxylate et le MCPA, présentaient également une inhibition intermédiaire des deux isoformes. Ces résultats mettent en évidence des différences nettes dans la sensibilité des BCAT cytosoliques cérébrales et mitochondriales hépatiques aux inhibiteurs testés, traduisant des spécialisations fonctionnelles distinctes.

L'inhibition marquée des BCAT par l'HGA souligne que, au-delà d'être un substrat, la toxine agit aussi comme un inhibiteur compétitif des premières étapes du catabolisme des BCAA. Ce double rôle (substrat et inhibiteur) explique en partie l'accumulation d'intermédiaires toxiques et la perturbation globale du métabolisme énergétique observées chez les équidés intoxiqués.

1.2. Une seconde étape mitochondriale

La seconde étape de métabolisation de l'HGA se déroule dans les mitochondries. Elle consiste en une décarboxylation irréversible ainsi qu'en une conjugaison réversible à une coenzyme A (CoA) par le complexe déshydrogénase des acides α -céto ramifiés (BCKD). Cela aboutit à la formation du MCPA-CoA, qui est le métabolite final et actif de l'HGA (Melde et al. 1991; Isenberg et al. 2015).

Localisation des complexes déshydrogénases des acides α -céto ramifiés

Les enzymes BCKD ne sont pas présentes dans toutes les cellules et leur expression varie selon les types de tissus. Elles sont particulièrement abondantes dans les muscles squelettiques, le cœur et les reins, où le catabolisme des BCAA est intense, tandis qu'elles sont peu exprimées dans le foie (Brosnan & Brosnan 2006). Contrairement à ce qui avait été décrit dans la littérature précoce, il est donc fortement probable que l'HGA ne soit pas métabolisée uniquement au niveau du foie. Les travaux récents de Sander et al. (Sander et al. 2023) confirment cette hypothèse : chez les chevaux atteints de MA, les concentrations de MCPA-carnitine et de MCPF-carnitine sont de loin les plus élevées dans les muscles

squelettiques, témoignant d'une activation massive de l'HGA et du MCPG dans ces tissus. En comparaison, dans le muscle cardiaque, la concentration de MCPA-carnitine ne représentait en moyenne qu'environ 1,3 % de la concentration d'HGA mesurée dans ce tissu au même moment. *In fine*, ces données désignent le muscle squelettique comme le principal site de biotransformation de l'HGA et comme le tissu clé de la toxicodynamie de la MA.

Conservation évolutive des complexes déshydrogénases des acides α -céto ramifiés

Comme pour les BCAT, les BCKD sont bien conservées au cours de l'évolution. Ces enzymes sont présentes chez de nombreuses espèces animales mais également chez les levures, les bactéries et les végétaux (Dickinson et al. 1998; Ward et al. 1999; Fujiki et al. 2002; Chowdhury et al. 2024).

1.3. Le métabolite produit est le méthylèncyclopropylacétate

Le MCPA-CoA, produit final de la dégradation de l'HGA, est instable (Osmundsen & Sherratt 1975). Cet ester de CoA est soit converti de manière réversible en acide MCPA sous l'action d'une acyl-CoA hydrolase, soit conjugué à la glycine ou à la carnitine. Dans l'urine, le MCPA-CoA est principalement conjugué à la glycine pour former le méthylèncyclopropylacétylglycine (MCPA-glycine). Dans le sérum, le MCPA est principalement sous forme conjuguée à la carnitine (MCPA-carnitine) (Isenberg et al. 2015).

En cas d'intoxication à l'HGA, il est à noter que le MCPA-glycine a été identifié dans l'urine d'équidés (Sponseller et al. 2012), chez des rats (Tanaka et al. 1971), ainsi que chez l'homme (Isenberg et al. 2015). Concernant le MCPA-carnitine, il a été formellement détecté dans le sérum humain (Sander et al., 2020), chez les équidés (Votion et al. 2014), ainsi que chez des cerfs du père David et des chameaux (Bunert et al. 2018; Hirz et al. 2021). Cependant, à notre connaissance, les études précoces sur l'intoxication à l'HGA n'ont pas recherché la présence de MCPA-carnitine dans le sérum des animaux de laboratoire.

2. Effets du méthylèncyclopropylacetyl-CoA sur le catabolisme lipidique

Le MCPA-CoA est responsable de l'inhibition de plusieurs acyl-CoA déshydrogénases (Osmundsen & Sherratt 1975; Ikeda & Tanaka 1990). Les conséquences métaboliques de la formation du MCPA-CoA sur la fonction mitochondriale sont schématisées en figure 3. Le mécanisme impliqué est irréversible et de type « *suicide inhibitor* », ciblant non pas directement les acyl-CoA déshydrogénases, mais leur cofacteur la flavine adénine dinucléotide (FAD) (Wenz et al., 1981a).

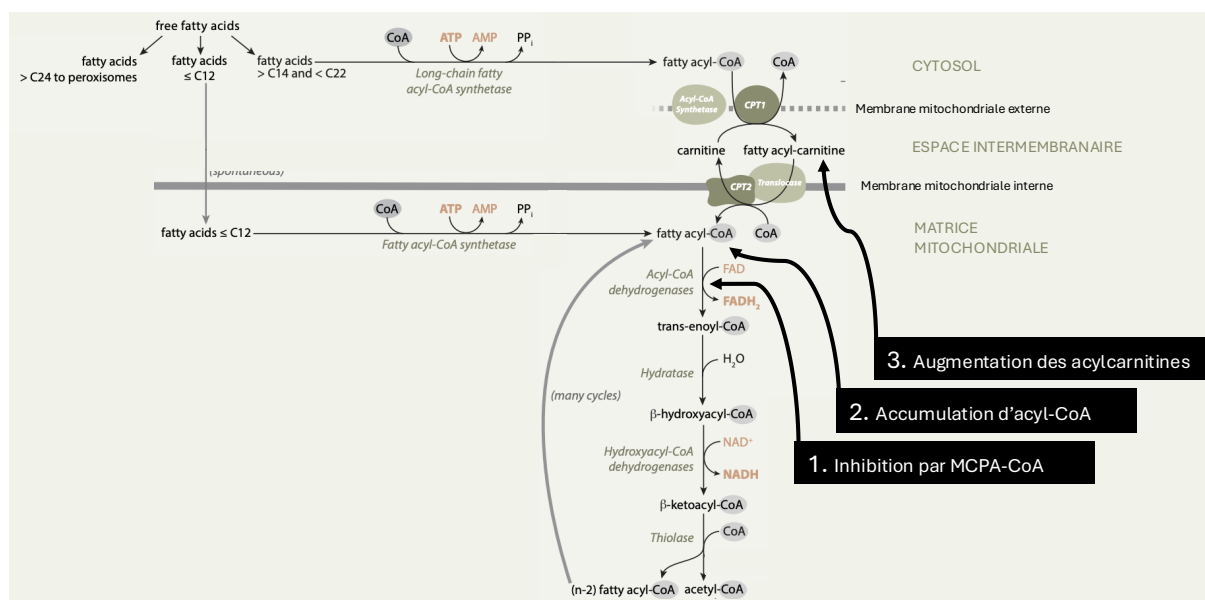
Cette inhibition est sélective car toutes les acyl-CoA déshydrogénases ne sont pas inhibées avec la même intensité. Des travaux sur enzymes purifiées montrent une inactivation forte et irréversible des déshydrogénases à chaîne courte et moyenne (SCADH, MCADH) ainsi que de l'isovaléry-CoA déshydrogénase (IVDH), tandis que la 2-méthyl-branched chain acyl-CoA dehydrogenase (2-meBCADH) n'est que faiblement et lentement affectée et que la long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCADH) apparaît préservée (Ikeda & Tanaka 1990).

Ces données concordent avec des observations plus anciennes montrant une inhibition marquée de l'étape isovaléryl-CoA (catabolisme de la leucine) par l'hypoglycine A et ses dérivés, alors que d'autres réactions d'oxydation d'acyl-CoA ramifiés sont moins touchées (Tanaka et al. 1971).

À noter, certaines données suggèrent également une susceptibilité d'autres déshydrogénases (p.ex. glutaryl-CoA déshydrogénase), ce qui pourrait contribuer à certains profils d'aciduries observés selon les modèles expérimentaux (Ikeda & Tanaka 1990).

Figure 3 - Inhibition mitochondriale de la β -oxydation induite par le MCPA-CoA :

Après bioactivation de l'hypoglycine A, le métabolite toxique MCPA-CoA inhibe les acyl-CoA déshydrogénases, entraînant un blocage de la β -oxydation des acides gras. Cette inhibition provoque à une accumulation d'acyl-CoA et conduit secondairement à la formation d'acylcarnitines détectables dans le compartiment sanguin. Les acylcarnitines venant tamponner l'engorgement des voies métabolique en acyl-CoA. Schéma original intégrant des informations complémentaires à partir des voies métaboliques décrites dans la carte *Pathways of Human Metabolism* (Stanford School of Medicine).



Il convient toutefois de souligner que les mécanismes enzymatiques précis de l'inhibition des acyl-CoA déshydrogénases par les métabolites de l'hypoglycine A ont principalement été caractérisés dans des modèles murins et chez l'homme. Bien que les voies fondamentales de la β -oxydation mitochondriale soient hautement conservées entre espèces, des différences quantitatives d'expression enzymatique, de régulation mitochondriale et de compartimentation métabolique ne peuvent être exclues chez les équidés. La transposition de ces mécanismes au cheval repose donc sur une convergence de données biochimiques indirectes, notamment les profils d'acylcarnitines, plutôt que sur une démonstration enzymatique directe.

G. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INTOXICATION À L'HYPOGLYCINE A

1. Mécanismes de la rhabdomyolyse massive chez les équidés

L'intoxication par l'HGA chez les équidés entraîne une rhabdomyolyse massive, caractérisée par une dégradation extensive des cellules musculaires squelettiques et la libération de composants intracellulaires potentiellement toxiques dans la circulation systémique (Giannoglou et al., 2007). Ce syndrome résulte principalement de deux mécanismes pathogéniques étroitement liés : une déplétion énergétique cellulaire sévère et une perturbation majeure de l'homéostasie calcique intracellulaire, qui déclenchent une cascade d'événements conduisant à la mort cellulaire (Rizzuto et al., 2003).

Les métabolites toxiques dérivés de l'HGA inhibent la β -oxydation des acides gras, entraînant une diminution marquée de la production d'ATP, indispensable au fonctionnement des pompes ioniques telles que la Na^+/K^+ -ATPase et la Ca^{2+} -ATPase. En situation de déficit énergétique, la défaillance de ces pompes conduit à une accumulation intracellulaire de Na^+ . Le renversement du gradient sodique perturbe alors le fonctionnement de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, qui bascule en mode inversé et favorise l'entrée de Ca^{2+} en échange de Na^+ , aggravant ainsi la surcharge calcique cytosolique (Rizzuto et al., 2003 ; Zhang, 2012). Cette surcharge en Ca^{2+} compromet à son tour davantage l'activité de la Ca^{2+} -ATPase, limitant l'élimination de l'excès de calcium et accentuant l'accumulation cytosolique.

Les compartiments de stockage intracellulaire du calcium, en particulier le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries, sont rapidement saturés, réduisant leur capacité tampon. Cette accumulation critique de Ca^{2+} dans le cytosol déclenche une série d'événements pathologiques, incluant l'activation d'enzymes protéolytiques telles que les calpaïnes et la phospholipase A_2 , responsables de la dégradation des membranes cellulaires et des organites (Rizzuto et al., 2003 ; Zhang, 2012).

Au niveau mitochondrial, l'accumulation excessive de Ca^{2+} est associée à une perte du potentiel de membrane, à une altération de la phosphorylation oxydative et à un gonflement de l'organite (Rimessi et al., 2008 ; Giorgi et al., 2008). Ces altérations favorisent l'activation d'une transition de perméabilité mitochondriale (mitochondrial permeability transition, MPT), définie comme une augmentation brutale et non sélective de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne. La littérature actuelle souligne que la MPT constitue un phénomène fonctionnel dépendant du calcium et du stress oxydant, étroitement associé à des mécanismes de mort cellulaire dominés par une défaillance énergétique, dont la nature moléculaire exacte demeure débattue et ne fait pas l'objet d'un consensus définitif (Bernardi & Di Lisa, 2015). Dans ce contexte, l'ouverture prolongée de la MPT entraîne un effondrement du potentiel mitochondrial, une perte irréversible de la capacité de production d'ATP et une rupture secondaire de l'intégrité cellulaire.

Chez les chevaux atteints de myopathie atypique, ces perturbations biochimiques se traduisent morphologiquement par des lésions mitochondriales caractéristiques, incluant une vacuolisation et une désorganisation des mitochondries, une perte des crêtes mitochondriales et une nécrose segmentaire des

fibres musculaires oxydatives, telles que décrites en microscopie électronique (Cassart et al., 2007 ; Cassart & Desmecht, 2008). Ces observations confirment que le stress mitochondrial et la surcharge calcique constituent des événements centraux dans la pathogénie de la maladie.

L'accumulation de calcium mitochondrial favorise également la production d'espèces réactives de l'oxygène, induisant un stress oxydatif qui altère les structures cellulaires et aggrave la dysfonction des organites, en particulier des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique (Rizzuto et al., 2003 ; Giannoglou et al., 2007 ; Feno et al., 2019 ; Hebert et al., 2023). Cette interaction entre surcharge calcique, stress oxydant et défaillance énergétique établit une boucle auto-amplificatrice du dommage cellulaire.

Le stress oxydatif et les lésions mitochondriales conduisent finalement à la libération de cytochrome c dans le cytosol, participant à la désorganisation et à la mort cellulaire. Dans ce contexte de déficit énergétique sévère, cette libération peut s'accompagner d'une activation partielle et incomplète de voies caspase-dépendantes, sans correspondre à une apoptose canonique pleinement exécutée (Giorgi et al., 2008 ; Galluzzi et al., 2018). L'ensemble de ces mécanismes converge vers une lyse cellulaire massive, responsable de la libération de myoglobine et d'autres composants intracellulaires dans la circulation, contribuant à l'aggravation des lésions tissulaires et systémiques.

Il convient enfin de souligner que les mécanismes moléculaires décrits ci-dessus ont été majoritairement établis chez l'homme ou dans des modèles cellulaires expérimentaux. Leur application à la rhabdomyolyse observée lors de la myopathie atypique équine repose donc sur une extrapolation raisonnée. Néanmoins, la forte dépendance énergétique de la fibre musculaire squelettique, la densité mitochondriale élevée et la concordance avec les lésions morphologiques décrites chez le cheval confèrent à ces mécanismes une pertinence physiopathologique plausible dans cette espèce. Ainsi, la rhabdomyolyse associée à la myopathie atypique peut être envisagée comme la conséquence d'une cascade de défaillances métaboliques et ioniques conduisant à une mort myocytaire dominée par des mécanismes nécrotiques liés à la défaillance énergétique, plutôt que comme l'expression d'un mécanisme moléculaire unique spécifiquement démontré chez le cheval.

2. Effet sur la fonction mitochondriale

Au niveau mitochondrial, le MCPA-CoA interfère avec la β -oxydation et le système de transfert des électrons (ETS, electron transfer system), contribuant de manière déterminante à l'effondrement énergétique observé lors des intoxications à l'HGA. Le lien entre inhibition de la β -oxydation, déficit énergétique et altération mitochondriale est résumé en figure 3. Ces altérations mitochondriales constituent un point central de la physiopathologie, même si elles ne résument probablement pas l'ensemble des effets de la toxine. Ce métabolite toxique altère le fonctionnement de l'ETS en modifiant irréversiblement la FAD, essentielle à la β -oxydation, ce qui entraîne une diminution de la production de FADH₂ (Wenz et al. 1981; Lemieux et al. 2016; Kruse et al. 2021). En conséquence, la réduction de

l'activité de la β -oxydation limite la génération de formes réduites de NADH et de FADH₂, privant l'ETS de ses principaux donneurs d'électrons associés à la β -oxydation (Lemieux et al. 2016).

Des études utilisant la respirométrie à haute résolution ont mis en évidence une diminution significative des capacités de phosphorylation oxydative et de l'ETS chez les chevaux atteints de MA. Ces réductions affectent particulièrement les complexes I et II, limitant leur capacité à maintenir un flux d'électrons convergent vers le complexe III, ce qui réduit de manière globale la production d'ATP (Lemieux et al. 2016; Kruse et al. 2021).

Par ailleurs, l'inhibition du flux d'électrons vers les complexes III et IV empêche l'oxygène de jouer son rôle d'accepteur final d'électrons. Kruse et al. (2021) ont montré que l'ajout de MCPA réduisait fortement la consommation d'oxygène, avec des diminutions atteignant environ 50 % dans certains états respiratoires. Dans cette même étude, lorsque des substrats lipidiques tels que l'acétylcarnitine, l'octanoylcarnitine ou la palmitoylcarnitine étaient utilisés pour alimenter la β -oxydation, la chute du flux d'oxygène mitochondrial était encore plus marquée, de l'ordre de 67 à 74 %. Cela illustre la vulnérabilité particulière des voies énergétiques dépendantes des acides gras face au MCPA.

3. Myoglobinurie et troubles rénaux

La lyse cellulaire va causer la libération massive de myoglobine et d'autres composés intracellulaires dans la circulation sanguine. Cette myoglobinémie est bien décrite chez l'homme comme exerçant une toxicité rénale. Filtrée par le glomérule, la myoglobine s'accumule dans les tubules rénaux où elle déclenche des dommages via plusieurs mécanismes. D'une part, dans le tubule proximal, elle est internalisée par les cellules épithéliales, où son hème est dégradé par l'enzyme hème-oxygénase-1 (Agarwal & Bolisetty 2013). Cette dégradation libère du fer libre, qui, en excès, favorise la production de ROS par le biais du cycle redox du fer (Hebert et al. 2023). Ces ROS, en retour, endommagent les membranes cellulaires par peroxydation lipidique, créant de l'apoptose et de la nécrose tubulaire (Holt & Moore 2000; Hebert et al. 2023). D'autre part, dans l'anse de Henlé, la myoglobine peut interagir avec les protéines de Tamm-Horsfall pour former des précipités insolubles, particulièrement en conditions acides (Holt & Moore 2000). Ces précipités obstruent les tubules distaux, augmentant la pression intra-tubulaire et réduisant la filtration glomérulaire, ce qui aggrave encore l'accumulation de myoglobine et la dysfonction rénale (Cabral et al. 2020; Hebert et al. 2023). Enfin, le stress oxydatif exacerbé et l'épuisement des défenses antioxydantes dans les tubules rénaux amplifient les lésions cellulaires, établissant un cercle vicieux de dommages tissulaires menant à l'insuffisance rénale aiguë (IRA) (Agarwal & Bolisetty 2013; Hebert et al. 2023).

Chez le cheval, les mécanismes de l'IRA associée à la rhabdomyolyse sont moins bien caractérisés. L'IRA serait dans ce contexte bien médiée par la myoglobine, des études montrent que le stress oxydatif joue un rôle prépondérant (El-Ashker 2011). Contrairement à l'humain, les chevaux présentent une résilience relative vis-à-vis de l'obstruction tubulaire sévère. Cela pourrait-être lié à des différences de

la dynamique de filtration glomérulaire ou de la réponse antioxydante intrinsèque. Il est à noter que ces lésions rénales aiguës induites par la rhabdomyolyse n'ont pas été décrites chez les chevaux souffrant de MA. Cependant, des études histopathologiques de reins de chevaux atteints de MA ont mis en évidence de manière constante des cylindres hyalins, granuleux et de myoglobine (Cassart et al. 2007), témoignant d'une atteinte tubulaire liée à la myoglobinurie. À ce jour, ces lésions n'ont toutefois pas été décrites comme associées à une élévation significative des marqueurs classiques de la fonction rénale tels que la créatinine sérique. Cette discordance suggère soit que les lésions tubulaires observées n'affectent pas suffisamment la fonction glomérulaire pour être détectées, soit que les biomarqueurs actuellement utilisés manquent de sensibilité pour révéler une atteinte subclinique. Cela ouvre des perspectives de recherche visant à identifier des indicateurs plus sensibles et spécifiques de la souffrance rénale dans le contexte de la MA.

Lien entre le risque d'insuffisance rénale aiguë et la cause de la rhabdomyolyse

Chez l'humain, le risque d'IRA dépend de la cause de la rhabdomyolyse, celle-ci impactant significativement ce risque. Un risque élevé d'IRA est rapporté dans les cas de rhabdomyolyse traumatique, notamment celle liée à un écrasement (*crush syndrom*) ou à une blessure sévère (Safari et al. 2016). Ce risque accru serait associé à une libération rapide et massive de myoglobine, de potassium et de phosphore dans la circulation sanguine, favorisant leur précipitation dans les tubules rénaux et provoquant des dommages directs. De plus, l'hypovolémie résultant des pertes de liquide vers les tissus endommagés (Scharman & Troutman 2013) contribue également à l'IRA, en exacerbant l'obstruction tubulaire et le stress oxydatif (Huerta-Alardín et al. 2004).

Un risque modéré d'IRA est observé dans les cas de rhabdomyolyse induite par un effort physique intense. Ces situations présentent généralement une incidence plus faible d'IRA comparée aux causes traumatiques sauf lorsqu'elles sont aggravées par des facteurs tels que la déshydratation, la chaleur ou des anomalies métaboliques préexistantes (Safari et al. 2016; Rojas-Valverde et al. 2021).

De plus, un risque modéré est également associé à la rhabdomyolyse post-opératoire ou à celle causée par une compression musculaire prolongée (syndrome d'immobilisation). Ce risque devient particulièrement important en présence d'un état de choc ou d'une hypoxie tissulaire (Scharman & Troutman 2013).

Lien entre le risque d'insuffisance rénale aiguë et l'activité de la créatine kinase sérique

Il est intéressant de souligner que l'activité de la CK sérique constitue un facteur clé associé au risque d'IRA suivant une rhabdomyolyse. Chez l'homme, plusieurs études ont établi une corrélation significative entre des niveaux élevés de CK et l'incidence de l'IRA, dans les cas de rhabdomyolyse traumatique. Safari et al. (2016) ont rapporté qu'un niveau de CK supérieur à 5 000 UI/L est significativement associé à une augmentation du risque d'IRA, avec une corrélation particulièrement

forte dans les cas de syndrome d'écrasement. La CK agirait principalement comme un marqueur indirect reflétant la libération massive de myoglobine, laquelle est connue pour induire des dommages rénaux par des mécanismes tels que l'obstruction tubulaire, le stress oxydatif et l'hypoperfusion rénale (Huerta-Alardín et al. 2004; Rodríguez-Capote et al. 2009).

Chez le cheval, une association similaire est observée entre des niveaux très élevés de CK et l'apparition de lésions rénales. El-Ashker (2011) a mis en évidence que, dans les cas sévères de rhabdomyolyse induite par l'exercice, caractérisés par des valeurs de CK dépassant 100 000 UI/L, les chevaux présentaient une augmentation notable des marqueurs de stress oxydatif tels que le malondialdéhyde (MDA) et une diminution significative des défenses antioxydantes. Ces perturbations contribuent à une toxicité rénale exacerbée, souvent aggravée par la déshydratation fréquemment observée dans ces cas. À l'inverse, les chevaux présentant des niveaux de CK inférieurs à 60 000 UI/L montraient une incidence beaucoup plus faible de complications rénales.

Là encore la MA semble faire exception. Chez les chevaux atteints de rhabdomyolyse liée à une intoxication à l'HGA, les taux sériques de CK dépassent fréquemment 100 000 UI/L mais aucun cas d'IRA n'a toutefois été rapporté dans ce contexte.

H. LES ACYLCARNITINES : BIOMARQUEURS DU BLOCAGE DE LA β -OXYDATION DANS L'INTOXICATION À L'HYPOGLYCINE A

1. Rôle physiologique de la carnitine et des acylcarnitines

La carnitine est un composé quaternaire d'ammonium présent dans la plupart des tissus, avec des concentrations particulièrement élevées dans le muscle squelettique et le myocarde. Elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme énergétique mitochondrial en facilitant l'entrée et l'utilisation des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie, où ils sont oxydés pour produire de l'ATP.

Ce transport dépend d'un système enzymatique spécifique (CPT1/CACT/CPT2) assurant la conversion réversible acyl-CoA/acylcarnitine et le passage trans-membranaire (Nelson & Cox, 2012).

Outre ce rôle de navette, la carnitine et ses esters participent au maintien de l'homéostasie métabolique en stockant et redistribuant des groupements acétyles, qui peuvent réintégrer les voies du cycle de Krebs, de la lipogenèse ou de la cétogenèse selon les besoins énergétiques (Farrell et al., 1986 ; Lligoña-Trulla et al., 1997). Elle exerce également une fonction de détoxification en piégeant les acyl-CoA excédentaires, ensuite éliminés sous forme d'acylcarnitines par voie urinaire.

2. Catabolisme lipidique et rôle central des acylcarnitines

Le catabolisme énergétique mitochondrial repose sur la dégradation de substrats glucidiques, protéiques et lipidiques qui convergent vers la formation d'acétyl-CoA, point d'entrée du cycle de Krebs. Parmi ces substrats, les lipides constituent la principale réserve énergétique de l'organisme. Ils sont stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux ou dans les fibres musculaires oxydatives et mobilisés sous l'action de la lipolyse.

Les acides gras libres issus de la lipolyse sont activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase. Les acides gras à chaîne courte et moyenne pénètrent directement dans la mitochondrie, tandis que les acides gras à longue chaîne nécessitent la navette carnitine. Le système CPT1/CACT/CPT2 constitue l'étape limitante du catabolisme lipidique, en permettant l'import mitochondrial des acides gras à longue chaîne et leur conversion en substrats oxydables pour la β -oxydation.

La β -oxydation est une voie hautement productive : l'oxydation complète d'un acide gras à longue chaîne peut générer plus de 100 molécules d'ATP, contre environ 30 pour une molécule de glucose. Toutefois, elle requiert davantage d'oxygène et son efficacité dépend de nombreux facteurs (état nutritionnel, intensité de l'exercice, statut hormonal). Des travaux expérimentaux ont montré que la régulation de CPT1 par le malonyl-CoA diffèrait selon les tissus et les types de fibres musculaires : certaines isoformes, notamment dans les muscles rouges, présentent une activité partiellement résistante à l'inhibition par le malonyl-CoA, permettant la poursuite de l'oxydation lipidique malgré des taux élevés de ce métabolite (Kim et al., 2002).

Parallèlement, les acylcarnitines ne doivent pas être vues uniquement comme de simples intermédiaires de transport. Elles participent aussi à la flexibilité métabolique : la carnitine acétyltransférase (CrAT), localisée dans la matrice mitochondriale, tamponne l'excès d'acétyl-CoA en formant de l'acétylcarnitine, régulant ainsi l'équilibre entre oxydation lipidique et glucidique. Des modèles animaux déficients en CrAT présentent une accumulation d'acylcarnitines et une intolérance au glucose, soulignant le rôle clé de ce mécanisme dans la régulation énergétique (Muoio et al., 2012).

Ainsi, les acylcarnitines sont non seulement des intermédiaires du catabolisme lipidique, mais aussi des indicateurs dynamiques de la capacité oxydative mitochondriale ; d'où leur pertinence comme biomarqueurs lors d'un blocage métabolique tel que celui induit par l'HGA.

3. Intérêt clinique et diagnostique des acylcarnitines

En médecine humaine

Les profils d'acylcarnitines sont utilisés comme biomarqueurs des erreurs innées du métabolisme depuis l'introduction de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) appliquée au dépistage néonatal (Millington et al., 1990). Cette technologie a permis de détecter des anomalies métaboliques à partir de simples buvards sanguins (cartes de Guthrie), avec une sensibilité et une spécificité inégalées.

Depuis, le dépistage néonatal élargi s'est généralisé en Europe et dans le monde et les acylcarnitines sont devenues un outil diagnostique universel (Loeber et al., 2012 ; Therrell et al., 2024 ; Koracin et al., 2021 ; Hwu et al., 2012). Un exemple emblématique est le MCADD, où l'accumulation d'octanoylcarnitine (C8) constitue un marqueur caractéristique. Des études multicentriques ont montré une corrélation entre les taux de C8, la sévérité des symptômes néonataux et certains génotypes chez les patients atteints de MCADD (Bentler et al., 2016).

Ces données illustrent comment les profils acylcarnitines permettent non seulement d'identifier une anomalie métabolique, mais aussi d'en préciser la gravité clinique et les déterminants génétiques.

En médecine vétérinaire

Le même raisonnement s'applique aux intoxications acquises. Dans le cas de l'intoxication par l'HGA, l'inhibition des acyl-CoA déshydrogénases entraîne l'accumulation d'acylcarnitines reflétant le blocage de la β -oxydation. Ce mécanisme, qui est détaillé dans la partie toxicodynamie, il s'accompagne d'une signature métabolique caractéristique identifiée comme biomarqueur robuste de la MA (Boemer et al., 2017).

REM : Bien que l'altération des profils d'acylcarnitines constitue un marqueur sensible du blocage de la β -oxydation, il convient de rappeler que ce signal métabolique n'est pas spécifique de l'intoxication à l'hypoglycine A. Des profils similaires peuvent être observés dans d'autres situations de dysfonction mitochondriale ou de déficit énergétique sévère. Leur interprétation diagnostique ne peut donc se faire qu'en intégrant le contexte clinique, environnemental et épidémiologique propre à chaque espèce

I. OBJECTIFS

État des lieux

Les études antérieures sur l'intoxication à l'HGA ont permis d'identifier plusieurs biomarqueurs d'intérêt. Le dosage de l'HGA dans le sang constitue un indicateur d'exposition, tandis que la MCPA-carnitine reflète l'activation métabolique de la toxine et le processus pathologique en cours. Plus récemment, l'étude du profil des acylcarnitines sériques a suggéré son potentiel comme outil diagnostique et pronostique pour les équidés dans le contexte de la MA.

Des cas d'excrétion lactée de l'HGA et de ses métabolites ont été rapportés chez la jument exposée, soulevant des préoccupations à la fois pour la santé des poulains allaités et pour la sécurité alimentaire. Sur le plan clinique, l'apparition d'un syndrome myopathique en période à risque est fortement suggestive de MA. Toutefois, le diagnostic différentiel, notamment vis-à-vis des coliques abdominales, reste indispensable. À ce jour, aucun test rapide de diagnostic n'est disponible et le développement d'un tel outil constituerait une avancée majeure. De plus, l'existence d'expositions subcliniques est suspectée, sans avoir été formellement démontrée.

Enfin, l'HGA et ses métabolites ont été détectés chez d'autres herbivores (cervidés, camélidés), posant la question du risque interspécifique et de l'éventuelle existence de formes subcliniques dans ces espèces.

Objectif 1

Préciser la valeur diagnostique et pronostique du profil des acylcarnitines sériques, en confirmant et en affinant leur intérêt sur une cohorte élargie, et en les comparant à d'autres biomarqueurs (HGA, MCPA-carnitine, MCPA-glycine).

Objectif 2

Mieux caractériser les chevaux malades et leurs copâturants grâce aux profils en acylcarnitines et aux concentrations sériques en toxines et métabolites toxiques. L'objectif est d'affiner à la fois le pronostic vital des animaux atteints en estimant leurs chances de survie, ainsi que le diagnostic préventif en identifiant précocement les individus subcliniques ou les plus à risque.

Objectif 3

Examiner l'influence des facteurs démographiques, en particulier l'âge et le sexe, sur les profils d'acylcarnitines lors d'intoxication à l'hypoglycine A, ces variables ayant été identifiées comme facteurs confondants majeurs dans les études épidémiologiques précédentes sur la myopathie atypique.

Objectif 4

Explorer la pertinence des biomarqueurs au-delà des équidés, en ciblant certaines espèces de grands mammifères herbivores (domestiques ou de parcs zoologiques), afin d'évaluer la transposabilité des résultats et leur intérêt en matière de diagnostic et de prévention de l'intoxication à l'HGA.

J. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

1. Contexte et objectif

Afin de définir la stratégie analytique retenue pour cette thèse, une étude préliminaire a été réalisée. L'objectif était de déterminer si le choix de cibler exclusivement la protoxine HGA et l'un de ses métabolites majeurs, le MCPA-carnitine constituait une approche scientifiquement défendable. Les autres toxines (HGB, MCPPrG) et métabolites (MCPA-glycine, MCPF) n'ont pas été intégrés dans le suivi de routine. L'HGB et le MCPPrG sont également évoquées à titre conceptuel ; toutefois, elles n'ont pas été analysées dans cette étude en raison de l'absence, à ce stade, de méthode de dosage validée dans le laboratoire avec lequel nous collaborons.

2. Objectif de l'étude préliminaire

Cette étude préliminaire avait pour objectif d'évaluer si le dosage limité de l'HGA et du MCPA-carnitine constituait une approche analytiquement et biologiquement défendable pour refléter l'exposition aux toxines des sapindacées et à leurs métabolites actifs chez le cheval.

Plus précisément, elle visait à déterminer dans quelle mesure la mesure conjointe de l'HGA et de la MCPA-carnitine pouvait être considérée comme représentative de l'ensemble des toxines apparentées (incluant le MCPPrG) et des métabolites toxiques dérivés (MCPA- et MCPF-conjugués), dans un contexte où les contraintes méthodologiques du laboratoire partenaire ne permettaient pas leur dosage direct.

3. Choix de la matrice et méthodologie analytique

3.1. Choix de la matrice sanguine

Le choix s'est porté sur la matrice sanguine, pour plusieurs raisons pratiques et scientifiques. Les prélèvements sanguins sont des actes vétérinaires de base, réalisables facilement et de manière peu invasive. De plus, la concentration sanguine en toxines et métabolites reflète directement l'exposition systémique et permet un suivi fiable des animaux intoxiqués et de leurs copâturants.

3.2. Méthodologie analytique et sensibilité

Sur le plan technique et économique, les dosages sériques en HGA et MCPA-carnitine ont été réalisés au Laboratoire de Génétique et de Biochimie du CHU de l'Université de Liège, par une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS). La technique appliquée pour l'HGA, décrite par Boemer et al. (2017, 2015), présente une limite de quantification de 0,090 µmol/L, supérieure mais d'ordre comparable à celles publiées (0,070 µmol/L, Bochnia et al., 2015 ; 0,034 µmol/L, Sander et al., 2016). Pour le MCPA-carnitine, la méthode validée en parallèle présente une

sensibilité de l'ordre du nanomolaire, également en ligne avec les valeurs rapportées dans la littérature, garantissant une quantification fiable dans les échantillons sériques équin. La possibilité d'analyser un grand nombre d'échantillons (près de 780 depuis 2018) en interne, à coût réduit, représentait un avantage considérable pour ce projet doctoral.

4. Résultats principaux

Afin de vérifier la robustesse du choix méthodologique, une série de 39 échantillons sériques (31 chevaux malades et 8 copâturants) a été analysée par un laboratoire externe disposant d'un panel plus large de dosages. Les corrélations entre toxines et métabolites ont été explorées à l'aide de deux approches statistiques complémentaires : le coefficient de Pearson, qui évalue la force d'une relation linéaire, et le coefficient de Spearman, qui mesure la monotonie indépendamment de la linéarité, et se montre moins sensible aux valeurs extrêmes. L'utilisation combinée de ces deux méthodes a permis de renforcer la robustesse des associations observées.

Les résultats (Tableau 1) ont confirmé des corrélations très fortes entre HGA et MCPPrG (r de Pearson $> 0,90$; ρ de Spearman $> 0,80$; $p < 0,0001$). De même, les deux métabolites principaux, MCPA-carnitine et MCPF-carnitine, étaient fortement associés ($r > 0,95$; $\rho \approx 0,94$; $p < 0,0001$). Enfin, l'étude préliminaire a permis de mettre en évidence, pour la première fois, que les conjugués glycine et carnitine de le MCPA (MCPA-glycine, MCPA-carnitine, MCPF-carnitine, MCPF-glycine) présentaient également des corrélations systématiquement élevées (souvent $r > 0,85$; $\rho > 0,83$).

Ces observations démontrent l'existence d'un réseau métabolique étroitement interconnecté entre les protoxines (HGA, MCPPrG) et leurs métabolites (MCPA et MCPF, sous formes conjuguées). Elles suggèrent que le dosage de l'HGA et du MCPA-carnitine constitue non seulement un reflet fidèle de l'exposition toxique globale, mais aussi un marqueur représentatif des autres composés non mesurés.

5. Limites analytiques

Il convient néanmoins de souligner certaines limites. Aucune méthode de dosage des toxines HGB et MCPPrG n'a été développée au sein de ce laboratoire, ce qui empêche une quantification complète de l'ensemble des toxines absorbées. Toutefois, la littérature suggère une relation étroite entre HGA et ses analogues. L'HGB (γ -glutamyl-HGA) peut être produite à partir de l'HGA via la γ -glutamyl-transpeptidase et, inversement, hydrolysée en HGA, ce qui suggère un équilibre dynamique entre les deux molécules (Bowen-Forbes & Minott 2011). Très récemment, Engel et al. (2025) ont renforcé cette hypothèse en démontrant *in vitro*, dans des cultures de fluide ruminal, la libération d'HGA à partir de l'HGB. Ces résultats confortent l'idée que l'HGB agirait comme un réservoir potentiel d'HGA et que le dosage de l'HGA reflète de manière intégrative l'exposition globale au couple HGA/HGB.

6. Conclusion de l'étude préliminaire

En conclusion, les données de cette étude préliminaire indiquent que l'HGA et le MCPA-carnitine constituent des marqueurs pertinents de l'exposition aux toxines des sapindacées et de leur bioactivation chez l'animal. Sans préjuger de l'implication d'autres composés, dont le dosage n'était pas accessible dans le cadre méthodologique de ce travail, ces résultats suggèrent que la combinaison HGA/MCPA-carnitine permet d'obtenir un reflet fonctionnel de l'exposition toxique et de ses conséquences métaboliques. Ils indiquent ainsi que le recours à ces marqueurs analytiquement disponibles constitue une approche méthodologiquement défendable, conciliant faisabilité technique et pertinence biologique.

TABLEAU 1 – Corrélation entre les différentes protoxines et métabolites

Variable 1	Variable 2	r (Pearson)	p (Pearson)	ρ (Spearman)	p (Spearman)
HGA	MCPPrG R	0,905	<0.0001	0,919	<0.0001
HGA	MCPPrG L	0,812	<0.0001	0,799	<0.0001
MCPA-carnitine	MCPA-glycine	0,799	<0.0001	0,874	<0.0001
MCPA-carnitine	MCPF-carnitine	0,953	<0.0001	0,945	<0.0001
MCPA-glycine	MCPF-glycine	0,784	<0.0001	0,876	<0.0001
MCPPrG R	MCPPrG L	0,854	<0.0001	0,836	<0.0001
MCPA-carnitine	HGA	0,783	<0.0001	0,679	<0.0001
MCPA-carnitine	MCPF-glycine	0,894	<0.0001	0,883	<0.0001
MCPA-glycine	MCPF-carnitine	0,777	<0.0001	0,839	<0.0001
MCPF-carnitine	MCPF-glycine	0,886	<0.0001	0,878	<0.0001
MCPF-carnitine	MCPPrG R	0,728	<0.0001	0,636	<0.0001
MCPF-carnitine	MCPPrG L	0,578	0.0001	0,488	0.0016

K. ARTICLE 1

Introduction à l'article 1

La MA est une intoxication grave liée à l'ingestion d'HGA, présente notamment dans les samares et plantules d'érable sycomore. Cette affection, souvent fatale, est caractérisée par une rhabdomyolyse aiguë résultant du blocage de la β -oxydation des acides gras par les métabolites toxiques de l'HGA.

Les avancées récentes ont permis d'identifier plusieurs biomarqueurs de l'exposition et du processus pathologique : l'HGA reflète l'ingestion de la toxine, tandis que la MCPA-carnitine témoigne de son activation métabolique. Toutefois, leur interprétation demeure limitée. En effet, la détection de ces molécules dans le sang ne permet pas de distinguer de façon fiable les animaux atteints de leurs compagnons de pâture apparemment sains, exposés aux mêmes sources toxiques. Cette observation soulève la question de l'existence de cas subcliniques, dont l'importance pourrait être sous-estimée.

Dans ce contexte, le profil des acylcarnitines sériques apparaît comme un outil prometteur. Ces métabolites, produits par la conjugaison d'acyl-CoA à la carnitine, reflètent fidèlement l'état du métabolisme lipidique mitochondrial. Leur altération pourrait constituer une signature spécifique de la perturbation métabolique induite par l'HGA. En outre, la comparaison du profil des acylcarnitines entre chevaux malades, témoins sains et animaux présentant des affections cliniquement proches (telles que des coliques abdominales) permettrait d'en préciser la valeur diagnostique.

L'étude présentée ici avait donc pour objectif d'évaluer la pertinence du profil des acylcarnitines sériques comme biomarqueur d'intoxication à l'HGA, en explorant son intérêt pour la détection d'intoxications subcliniques et son utilité dans le diagnostic différentiel de la MA.



Large-scale study of blood markers in equine atypical myopathy reveals subclinical poisoning and advances in diagnostic and prognostic criteria

Benoît Renaud ^{a,*}, Caroline-J. Kruse ^b, Anne-Christine François ^a, Carla Cesarini ^c,
Gunther van Loon ^d, Katrien Palmers ^e, François Boemer ^f, Géraldine Luis ^f, Pascal Gustin ^a,
Dominique-Marie Votion ^a

^a Department of Functional Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Pharmacology and Toxicology, Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), University of Liège, Liège 1 (Sart Tilman) 4000, Belgium

^b Department of Functional Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Physiology and Sport Medicine, Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), University of Liège, Liège 1 (Sart Tilman) 4000, Belgium

^c Equine Clinical Department, Faculty of Veterinary Medicine, Bât. B41, Sart Tilman, University of Liège, Liège 4000, Belgium

^d Department of Internal Medicine, Reproduction and Population Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Ghent 9820, Belgium

^e De Morette Equine Clinic, Asse 1730, Belgium

^f Biochemical Genetics Laboratory, CHU Sart Tilman, University of Liège, Liège 1 (Sart Tilman) 4000, Belgium

ARTICLE INFO

Keywords:

Hypoglycin A
Methylenecyclopropylacetyl-carnitine
Toxin
Poisoning
Equids
Equine atypical myopathy
Acylcarnitines
Sapindaceae

ABSTRACT

Equine atypical myopathy (AM) is a severe rhabdomyolysis syndrome primarily caused by hypoglycin A (HGA) and methylenecyclopropylglycine protoxins. This study aimed to refine diagnostic and prognostic criteria for AM while exploring apparently healthy cograzers. Blood samples from 263 horses, including AM cases (n= 95), cograzers (n= 73), colic horses (n= 19), and controls (n= 76), were analyzed for HGA, its toxic metabolite, and acylcarnitines profile. Diseased horses exhibited alterations in acylcarnitines that strongly distinguished them from controls and colic horses. Regression analyses identified distinct acylcarnitines profiles among groups, with cograzers showing intermediate alterations. Age and gelding status emerged as protective factors against AM. Furthermore, serum acylcarnitines profiling was valuable in predicting AM survival, with isovaleryl-/2-methylbutyrylcarnitine (*i.e.*, C5 acylcarnitine) showing promise as both a diagnostic and prognostic marker. Sub-clinical alterations in cograzers underscore a novel aspect: the presence of subclinical cases of AM.

1. Introduction

Equine atypical myopathy, referred to as atypical myopathy (AM) in Europe (Votion et al., 2014) and as seasonal pasture myopathy (SPM) in the US (Valberg et al., 2013), is an often fatal rhabdomyolysis syndrome affecting equids kept at pasture. To date, two protoxins have been incriminated: hypoglycin A (HGA) and methylenecyclopropylglycine (MCPG) (Bochnia et al., 2019). The toxicodynamic involves their activation into the toxic metabolites, methylenecyclopropylacetyl-CoA (MCPA-CoA) and methylenecyclopropylformyl-CoA (MCPF-CoA), respectively (Von Holt et al., 1964). These metabolites disrupt lipid

metabolism by inhibiting the degradation of fatty acids through fatty acid β -oxidation, leading to increased blood concentrations of various acylcarnitines in poisoned animals (Boemer et al., 2017; Lemieux et al., 2016; Westermann et al., 2008). These metabolites, once formed, exhibit high reactivity and readily form stable compounds through conjugation mainly with carnitine and glycine. The presence of these stable forms can be assessed in blood (Isenberg et al., 2015; Valberg et al., 2013), various tissues (Sander et al., 2023), and urine (Bochnia et al., 2019).

Currently, the provisional diagnosis of AM or SPM relies on acute signs of rhabdomyolysis, accompanied by pigmenturia as a common yet

Abbreviations: AM, atypical myopathy; CK, creatine kinase; MCPA, methylenecyclopropylacetyl acid; MCPF, methylenecyclopropylformyl; MCPG, methylenecyclopropylglycine; SPM, seasonal pasture myopathy.

* Correspondence to: Quartier Vallée 2, avenue de Cureghem 7A B41 - Route 22-23, Liège 1 4000, Belgium

E-mail addresses: benoit.renaud@uliege.be (B. Renaud), caroline.kruse@uliege.be (C.-J. Kruse), acfrancois@uliege.be (A.-C. François), ccesarini@uliege.be (C. Cesarini), gunther.vanloon@ugent.be (G. van Loon), katrien.palmers@demorette.be (K. Palmers), f.boemer@chuliege.be (F. Boemer), geraldine.luis@chuliege.be (G. Luis), p.gustin@uliege.be (P. Gustin), dominique.votion@uliege.be (D.-M. Votion).

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104515>

Received 24 May 2024; Received in revised form 15 July 2024; Accepted 17 July 2024

Available online 18 July 2024

1382-6689/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

not pathognomonic sign. Routine laboratory tests confirm extensive rhabdomyolysis through the assessment of serum creatine kinase (CK) activities, exceeding 10,000 IU/L (van Galen et al., 2012b; Votion et al., 2007).

The diagnostic confirmation involves blood testing to show the presence of at least one protoxin and its conjugated metabolites (Boemer et al., 2017). Various laboratories have developed analytical methods examining HGA and MCPA-conjugates in urine and/or blood (González-Medina et al., 2020; Rudolph et al., 2018; Sander et al., 2019). Serum or plasma HGA is considered an exposure marker (Baise et al., 2016; Renaud et al., 2022), while clinical poisoning is associated with significant quantities of both HGA and MCPA-carnitine in blood (Bochnia et al., 2015, 2016a; Karlíková et al., 2018; Sander et al., 2023).

Furthermore, based on the assumption that the acylcarnitines profile reflects energy deprivation, a statistical model integrating short, medium, and long-chain acylcarnitines has been proposed to estimate the chances of survival in clinically affected AM horses (Boemer et al., 2017).

One aspect of this study focuses on identifying blood markers useful for diagnosing AM and estimating the chances of survival in affected animals. The second aspect of this study focuses on the epidemiology of AM. In pastures close to toxic trees, all equids are exposed to the protoxins, including those that do not suffer from AM. These seemingly healthy equids have often been referred to as healthy cograzing animals (Baise et al., 2016; Bochnia et al., 2015; Kruse et al., 2024; Votion et al., 2007; Wimmer-Scherr et al., 2021). In the literature, a few demographic factors have been associated with an increased risk of poisoning (Votion et al., 2009) or, when intoxicated, an increased risk of lethality (Boemer et al., 2017; van Galen et al., 2012b). Notably, age has emerged as a key discriminant between healthy cograzers and clinically affected horses. Horses under 3 years old were described as primarily at risk. When diseased, the mean age of survivors was significantly higher than non-survivors. These results suggested an age-related resistance to intoxication. However, as the disease emerges over the years, the age distribution of cases seems to expand (Votion et al., 2020), making the age-related effect questionable.

Initial epidemiological studies suggested a higher risk of AM in intact males and a decreased risk in geldings (Votion et al., 2007); however, a later publication revealed age as a confounding factor for sex predisposition (Votion et al., 2009). Horses younger than 18 months were described as the age group with the highest risk of developing AM, however, castration is usually performed after the age of 18 months, therefore young intact males are overrepresented at pasture. Once these confounding factors were established, results of former studies were relativized, and no inherent sex predisposition for AM was considered.

This study aims to conduct a comprehensive analysis of clinical tools associated with risk factors, diagnosis, and prognosis related to AM. The objective is to refine diagnostic and prognostic criteria for AM. Additionally, we hypothesize that apparently healthy cograzers, sharing the pasture with equids suffering from atypical myopathy, may be better described as subclinical cases.

2. Material and methods

2.1. Animal inclusion and sampling

From autumn 2016 to autumn 2020, blood samples were systematically collected from horses referred to the equine hospital of the University of Liège (CVU-ULiège) with a tentative diagnosis of AM. Some horses with a presumptive diagnosis of AM were sampled outside of CVU-ULiège through collaboration with first-line equine practitioners, the equine hospital of Ghent University, and the equine clinic De Moriette. Whenever possible, blood samples were collected from cograzers of suspected AM cases within the following 48 hours.

Blood samples were obtained via jugular venipuncture and stored at 4°C until separated serum was aliquoted within the following 12 hours.

The aliquoted samples were then preserved at −80°C, until further analysis.

All procedures of this study are in accordance with both national and international guidelines for animal welfare. The Animal Ethics Committee of the University of Liège was consulted and since venipuncture is part of routine veterinary practice to establish a diagnosis or to prevent AM, an animal ethics approval was not required. Owners gave informed consent for their horses' inclusion in the study.

Data concerning medical history, pasture conditions, and clinical signs were obtained through online questionnaires and/or medical records. These collected data allowed the retrospective classification of the sampled horses into the following four groups:

I. Diseased horses: Horses included in the study were diagnosed with AM with a high probability based on a previously published diagnostic algorithm (van Galen et al., 2012a) and literature data (Boemer et al., 2017; González-Medina et al., 2017). These horses had no history of recurrent exertional rhabdomyolysis syndrome, had access to pasture, exhibited acute illness, and presented common clinical signs associated with AM. Additionally, they displayed serum CK activity levels over 10,000 IU/L and/or demonstrated signs of pigmenturia.

For the purposes of this study, certain analyses were conducted by dividing the group of Diseased Horses into two subgroups (survivors and dead horses).

I.a. Survivors: Horses within the affected group that survived the condition. Survival was assessed until the horse was discharged from the clinic. No follow-up was performed after discharge.

I.b. Dead horses: Horses among the diseased group that did not survive. This category includes horses that died naturally as well as those euthanised. Euthanasia was predominantly performed due to respiratory failure, with one exception (see further).

I. Cograzers: Clinically healthy horses with no clinical signs, within normal general examination parameters, that shared the same pasture as one of the diseased horses. The general examination consisted of an observational assessment from a distance, followed by a physical examination. Evaluation of the gingival mucosae included assessing moistness and confirming absence of icterus, hyperaemia, cyanosis, pallor, ulceration, and/or petechiae. Capillary refill time was determined by blanching the mucous membrane. Absence of submandibular lymphadenopathy was assessed through palpation of the intermandibular space. Examination of the lungs and heart was conducted through thoracic auscultation. Finally, a dynamic examination of the horses' locomotion was performed by observing their walk on a straight line.

II. Colic horses: Horses with access to pasture initially admitted with a tentative diagnosis of AM but later diagnosed, through ancillary examinations, as suffering from digestive colic. The diagnostic process included a general examination, digestive auscultation, transrectal palpation, nasogastric intubation, abdominal ultrasound and assessment of serum CK activities to exclude myopathy. To be included these horses had to have access to pasture.

III. Control horses: Horses at pasture, showing no clinical signs, with normal general examination parameters, and no detectable levels of HGA or MCPA-carnitine in their serum. It is noteworthy that the selection of control horses did not employ stratified sampling, which would have allowed for harmonization of age and sex with the groups of diseased horses or cograzers. Control horses' serum samples were obtained from an internal biobank at CVU-ULiège.

2.2. Hypoglycin A assay

Hypoglycin A assay was performed on serum according to a previously described methodology (Boemer et al., 2015; Votion, 2016). Quantification of HGA was carried out using aTRAQ® kit for amino acid analysis of physiological fluids. Hypoglycin A contained in samples was derivatised using an isotopic tag (mass m/z 121), while a second labelling reagent (mass m/z 113) allowed absolute quantification. Derivatised samples were introduced into a TQ5500 tandem mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) using a Prominence AR HPLC system (Shimadzu). The lower limit of quantification associated to this method was measured at 0.090 $\mu\text{mol/l}$ (Boemer et al., 2015).

2.3. MCPA-carnitine determination method

The separation and determination of MCPA-carnitine was conducted using ultra-performance liquid chromatography combined with subsequent mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as previously described (Valberg et al., 2013).

2.4. Acylcarnitines determination method

Free carnitine and twenty-one acylcarnitines (C2, C3, C3-DC, C4, C5, C5:1, C5-OH, C5-DC, C6, C8, C8:1, C10, C10:1, C10:2, C12, C12:1, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, and C18:1) (Boemer et al., 2017) were quantified in serum by tandem mass spectrometry (Chace et al., 2003). As described by Boemer et al. (2017), serum proteins were precipitated with a methanol solution with labelled internal standards. Supernatants were evaporated under nitrogen stream and derivatised with butanolic-HCl. The samples were then analysed with a TQ5500 mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA).

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses and graphical representations were performed using GraphPad Prism 7 or SAS 9.4M7. The Kolmogorov-Smirnov test was employed to assess the assumption of normal distribution for continuous explanatory variables, and, when necessary, data were normalised through Log10 transformation. The following analyses were conducted in three steps:

- (i) Logistic regression for risk assessment: Multiple logistic regressions were conducted in GraphPad Prism 7 to evaluate the trends of age and sex as risk and preventive factors associated with AM. Statistical significance was set at $p < 0.05$.
- (ii) Group comparisons of blood markers: Comparison of means were undertaken with the aim of identifying serum acylcarnitines that can effectively differentiate the pre-established groups of horses. Partial Least Squares regressions (PLS) were employed to compare acylcarnitines profile, as these are correlated variables. Initially, PLS included Diseased horses, Cograzers Colics, and Control Horses to distinguish these groups based on their acylcarnitine serum profiles. Subsequently, the Colics group was excluded from further analysis due to specific considerations. In PLS iteration 3, the Diseased Horses group was subdivided into Dead Horses and Survivors to focus on prognostic aspects by comparing their acylcarnitine profiles with those of Cograzers and Controls. The PLS outcome is a two-dimensional projection that enables discrimination between the groups and provides an overview of relevant variables. The most relevant variables, i.e., which have the strongest impact on the principal components of PLS, were extracted and analysed. The emphasis was placed on variables crucial for characterizing a group of animals, which were determined/ascertained using two metrics: variable importance in the projection (VIP) and centre parameter estimates. Acylcarnitines of primary interest have a VIP greater than

1 and an absolute value of the centre parameter estimates greater than 0.15 (Chong and Jun, 2005; Palermo et al., 2009).

- (iii) Diagnostic and prognostic modeling: based on the most discriminative acylcarnitines identified from the PLS analysis, we established a prediction model using multiple logistic regression (GraphPad Prism 7). This model was evaluated serum acylcarnitine profile for its diagnostic and prognostic utility in predicting outcomes in AM cases.

3. Results

3.1. Samples collection and data of individuals

Data of the groups are presented in Table 1 and include a total of 263 analysed samples. Throughout the study period, 95 horses were suspected of having AM with a high probability, constituting the “diseased horses” group (van Galen et al., 2012a). Among these 95 horses, 32 either died naturally or were euthanised, forming the “dead horses” group, while 26 horses survived, forming the “survivors” group. The outcome of the disease remains unknown for 37 horses of this group. Most diseased horses (87/95) were sampled in the clinics previously mentioned and the remaining on the field by the first-line equine practitioners. All euthanised horses, except for one (horse D33), were put down due to general deterioration. This was characterised by severe dyspnoea, low arterial partial oxygen pressure non-responsive to oxygen therapy, and significant neurological impairments such as nystagmus, altered pupillary reflexes, and/or convulsions. Horse D33 was euthanised for financial constraints and not for medical reasons.

For the remaining horses in the study: 73 were included as cograzers, 19 in the colic group, and 76 as control horses.

3.2. Age

The average age was similar between diseased horses (6.7 ± 5.9 years old) and clinically healthy cograzers (5.1 ± 2.9 years old) (Mann-Whitney test, $p = 0.8091$). However, a significant difference in age distribution between the two groups was noted (Kolmogorov-Smirnov test, $p = 0.0074$). Specifically, the age dispersion was greater for diseased horses, encompassing a wider range of ages, including more very young and older horses. Notably, 57 % of the diseased horses were either younger than 2 years or older than 10 years. In contrast, the age distribution for the cograzers was narrower, with 90 % of the horses falling between 2 and 10 years of age (Fig. A in the appendices).

No significant difference in mean or age distribution was observed between dead horses and survivors (Kolmogorov-Smirnov test, $p = 0.9865$; Mann-Whitney test, $p = 0.9195$) (Figure A in the appendices).

The multiple logistic regressions, considering confounding between the variables “age” and “sex,” indicated that among horses exposed to the toxins, those over 10 years of age are less susceptible to develop the disease compared to younger animals (see Table 2). No significant impact of age on survival probability was observed.

The average age was higher for control horses compared to both the diseased horses (Mann-Whitney test, $p < 0.0001$) or the cograzers (Mann-Whitney test, $p < 0.0001$) (see Table 1).

3.3. Sex

The sexes of the included horses are listed in Fig. B in the appendices.

The variables “sex of the horse” and “health status” (i.e., diseased horses vs cograzers) are independent (Chi-square test, $p = 0.3276$). The variables “sex of the horse” and “final outcome of the disease horses” (death or survival) are interdependent (Chi-square test, $p = 0.0233$).

The multiple logistic regressions, considering confounding between the variables “age” and “sex,” indicated that among horses exposed to the toxin, geldings are less susceptible to develop the disease horses compared to intact males and females (see Table 2). No significant

Table 1
Demographic composition in the different studied groups.

	Diseased horses	Dead horses	Survivors	Cograzers	Colic horses	Control horses
Number of horses	95	32	26	73	19	76
Age Mean $\pm$ SD (years)	6.7 $\pm$ 5.9 ^{a,b}	6.5 $\pm$ 5.5	6.6 $\pm$ 6.2	5.1 $\pm$ 2.9 ^{a,c}	10.2 $\pm$ 7.7	13.2 $\pm$ 6.8 ^{b,c}
Age minimum (years)	0.6	0.6	0.6	1.4	0.1	2.5
Age maximum (years)	22.5	20.0	21.0	13.9	24.8	31.4
Age median (years)	5.0	5.1	4.7	4.5	8.8	12.0
Ratio of:						
- intact male	15 %	13 %	25 %	8 %	5 %	7 %
- gelding	31 %	20 %	42 %	38 %	47 %	4 %
- female	55 %	67 %	33 %	53 %	47 %	79 %

SD = standard deviation

^a Significant difference in age distribution, $p = 0.0074$ ^b Significant difference of average age, $p < 0.0001$ ^c Significant difference of average age, $p < 0.0001$ **Table 2**
Odds ratio estimate (95 % confidence interval) for age and sex.

	Diseased horses Vs Cograzers	Survivors Vs Dead horses
0–2 years	0.19* (0.24–0.91)	1.61 (0.29–9.52)
3–10 years	0.17* (0.034–0.65)	1.67 (0.39–7.57)
Intact male	8.86* (1.36–72.90)	0.64 (0.12–3.18)
Female	3.88* (1.04–17.34)	0.98 (0.26–3.78)

The class of age “over 10 years” was used as reference.

The category of sex “gelding” was used as reference.

* Significant results with $p < 0.05$

impact of sex on survival probability was observed.

3.4. Hypoglycin A

Laboratory findings for HGA quantification are presented in Table 3 and Fig. 1.

The mean serum concentration of HGA was significantly higher in diseased horses compared to cograzers (unpaired t-test, $p < 0.0001$).

When comparing horses that died from AM to surviving horses, no significant difference was observed regarding average serum HGA concentrations (unpaired t-test, $p = 0.0849$).

It must be noted that:

- (i) only 2 out of 95 diseased horses had serum HGA concentrations under the limit of quantitation of 0.09 $\mu\text{mol/L}$, (horses D47 and D89);
- (ii) only 2 out of 73 cograzers had serum HGA concentrations under the limit of quantitation of 0.09 $\mu\text{mol/L}$.

Among the 19 individuals in the colic horses' group, only 2 exhibited HGA levels over the limit of quantification (0.09 $\mu\text{mol/L}$).

None of the control horses exhibited HGA levels above the limit of

detection, as this was part of their inclusion criteria.

3.5. MCPA-carnitine

Laboratory findings for MCPA-carnitine are presented in Table 4 and Fig. 2.

Mean serum concentration of MCPA-carnitine was significantly higher in diseased horses compared to cograzers (unpaired t-test, $p < 0.0001$).

When comparing dead horses to surviving horses, the mean serum MCPA-carnitine concentration was significantly higher in the first group (unpaired t-test, $p < 0.0001$).

Following additional observations were made:

- (i) only 1 out of 95 diseased horses had serum MCPA-carnitine concentration below the limit of detection of 0.01 nmol/L (horse D89), and this horse is 1 of the 2 diseased horses with serum HGA concentration below the limit of detection;
- (ii) only 7 out of 73 cograzers (9.6 %) had serum MCPA-carnitine concentrations below the limit of detection of 0.01 nmol/L.

None of the 19 individuals in the colic horses' group, exhibited MCPA-carnitine levels over the limit of detection (0.019 $\mu\text{mol/L}$).

None of the control horses exhibited MCPA-carnitine levels above the limit of detection, as this was part of their inclusion criteria.

3.6. Free serum carnitine and acylcarnitines profile

3.6.1. Mean comparisons

Laboratory findings are presented in Table C in the appendices, for both free carnitine and the serum acylcarnitines profile. The mean serum concentrations of free carnitine and the mean serum concentrations of 22 acylcarnitines (C2, C3, C3-DC, C4, C5, C5:1, C5-OH, C5-DC, C6, C8, C8:1, C10, C10:1, C10:2, C12, C12:1, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, and C18:1) were compared among groups of horses. The mean serum concentrations of both free carnitine and all acylcarnitines, except for C18-

Table 3 –
Serum hypoglycin A concentrations in the different studied groups.

Group	Diseased horses	Dead horses	Survivors	Cograzers	Colics horses	Control horses
Mean $\pm$ SDM ($\mu\text{mol/L}$)	5.16 $\pm$ 0.55*	7.22 $\pm$ 1.21	4.15 $\pm$ 0.74	1.41 $\pm$ 0.18*	< LOQ	< LOQ
Minimum ($\mu\text{mol/L}$)	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.01	< LOQ	< LOQ
Maximum ($\mu\text{mol/L}$)	25.20	25.20	14.40	7.32	0.25	< LOQ

SDM = Squared deviations from the mean

< LOQ = below the limit of quantification of 0.09 $\mu\text{mol/L}$ * Significant difference in mean serum concentration of HGA, $p < 0.0001$

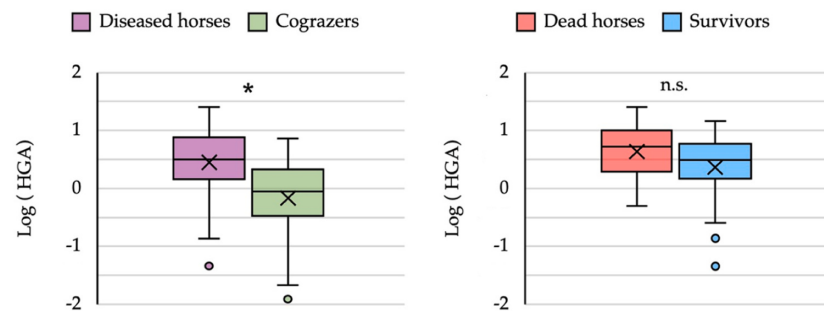


Fig. 1. Serum hypoglycin A concentrations Boxes range from the 25th to 75th percentiles. Medians are represented by horizontal lines in the box and means are symbolised by a cross. Box plot whiskers were established using the Tukey method. * stands for significant difference of mean serum HGA concentration, $p < 0.0001$ n.s. stands for no significant difference of average serum HGA, $p = 0.0849$.

Table 4 –
Serum methylenecyclopropylacetic-carnitine (MCPA-carnitine).

Group	Diseased horses	Dead horses	Survivors	Cograzers	Colic horses	Control horses
Mean + SDM ^a (nmol/L)	443.28 ± 84.08 ^a	751.83 ± 198.05 ^b	126.16 ± 39.74 ^b	8.44 ± 1.40 ^a	< LOD	< LOD
Minimum (nmol/L)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Maximum (nmol/L)	4480.00	4480.00	1040.00	56.10	< LOD	< LOD

< LOD = below the limit of detection of 0.01 nmol/L

^a SDM = Squared deviations from the mean

^a Significant difference in mean serum concentration of MCPA-carnitine, $p < 0.0001$

^b Significant difference in mean serum concentration of MCPA-carnitine, $p < 0.0001$

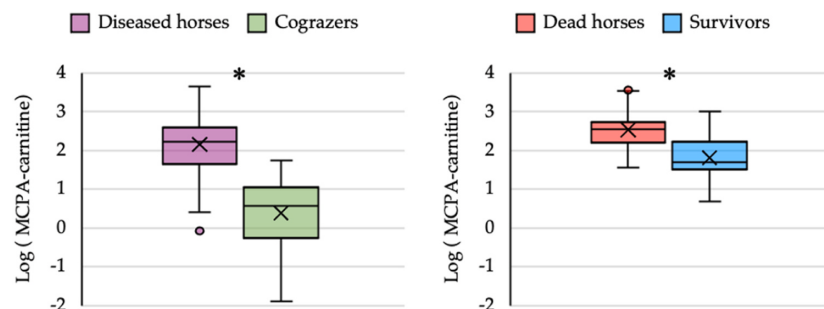


Fig. 2. Serum methylenecyclopropylacetyl-carnitine (MCPA-carnitine) observations Boxes range from the 25th to 75th percentiles. Medians are represented by horizontal lines in the box and means are symbolised by a cross. Box plot whiskers were established using the Tukey method. *Significant difference in mean serum concentration of MCPA-carnitine, $p < 0.0001$.

carnitine, were found to be higher in diseased horses compared to control horses (exceeding the 99th percentile of the control horse values). The mean serum concentration of C18-carnitine was the only one below the 99th percentile of the control horse values.

For the cograzers, 3 of the 23 variables (C4, C5 et C10:1) have a mean serum concentration exceeding the 99th percentile of the control horse values.

For the group of the colic horses, only 2 of the 22 variables (C10:1 et C14:1) have a mean serum concentration exceeding the 99th percentile of the control horse values.

3.6.2. Partial least squares regressions

Based on these 22 correlated variables, comprising free carnitine and the 22 acylcarnitines, 3 partial least squares regressions were performed, and their visual outcomes are depicted in Fig. 3. The key observations

are as follows:

- there is a significant distinction between the group of diseased horses and the other groups;
- the group of cograzers exhibits differences from the other groups, albeit with some internal variability. Within the cograzers group, certain horses profile aligns with the one of diseased horses, while others align with the profile of control horses.

In regression 1 (Fig. 3-a), the colic group displays a noticeable difference from the diseased horses and is represented close to the control horses.

A second regression was conducted, excluding the group of colic horses (Fig. 3-b). In this second regression, the differentiation between the remaining groups is enhanced and follows the same trends as previously described, with the cograzers positioned between the

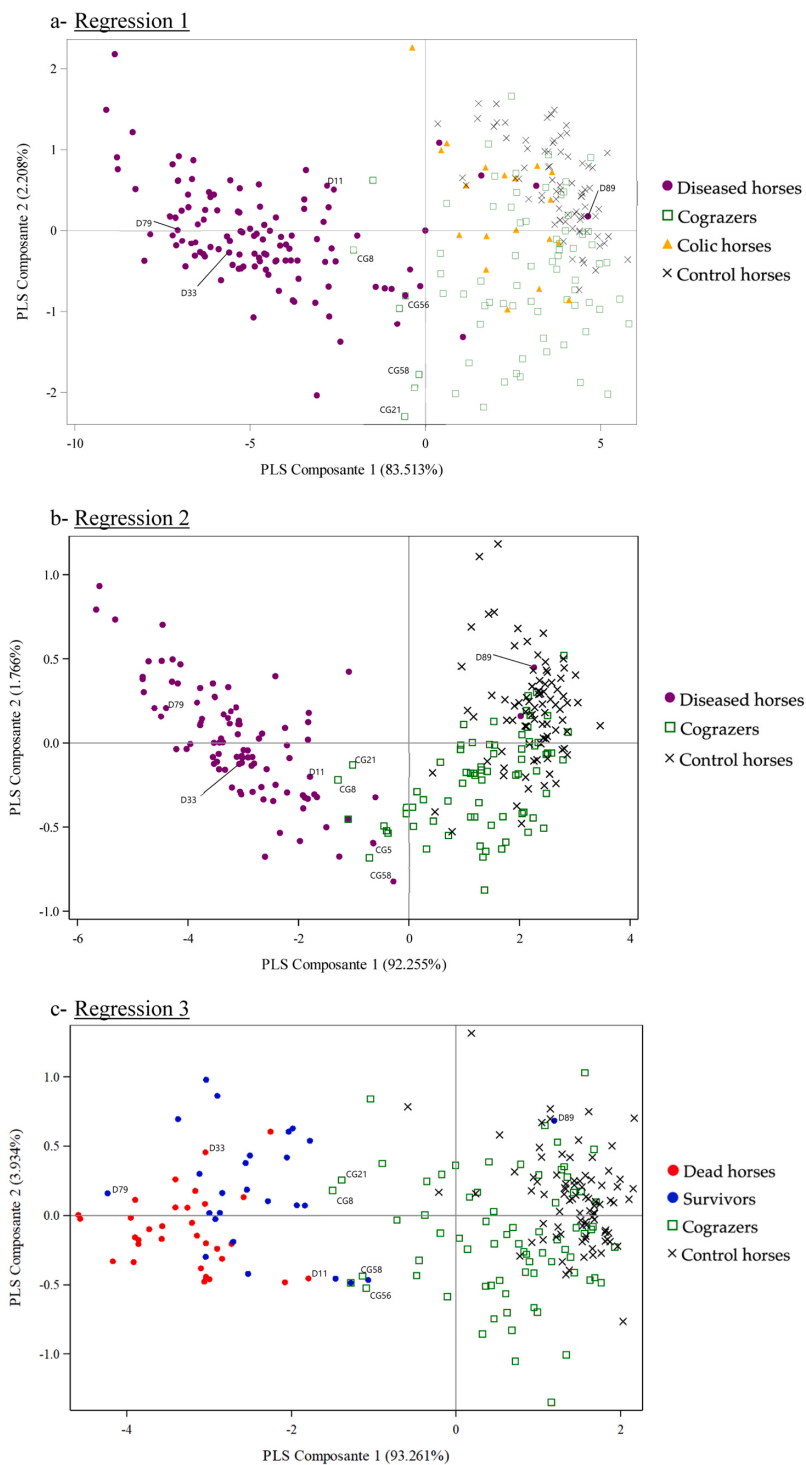


Fig. 3. a,b,c – Partial least squares regression between groups using free carnitine and 22 acylcarnitines.

diseased and control horses.

In regression 3, the diseased horses were further categorised into two groups: dead horses and survivors. This regression, still incorporating all 22 correlated variables, compares the groups of dead horses, survivors, cograzers, and control horses. The associated graphical representation can be observed in Fig. 3-c.

The horizontal component 1 accounts for 93 % of the difference between the groups. This trend, also observed in the previous regressions, is accentuated in this third PLS. The serum acylcarnitines profile of the sampled animals appears to oscillate between two extremes: the severely altered profile of animals that died from AM on the left side of the graph, and, on the right of the graph, control animals which were not exposed to the toxin. Survivors had an acylcarnitines profile close to that of the dead horses but appeared to be grouped closer to clinically healthy horses than the latter. Cograzers have an intermediate acylcarnitines profile between the diseased horses and the control horses.

Based on the analysis of these three regressions, with a particular focus on their primary horizontal component that accounts for most of the variation between the groups, certain individuals can be identified as outliers utilizing the ROUT method (Motulsky and Brown, 2006).

In Regression 2 (Fig. 3-b), two outliers were identified within the cohort of diseased horses: horses D89 and horse D47.

In Regression 3 (Fig. 3-c), within the survivor group, Horse D89 continues to stand out as an outlier while it is important to note that horse D47 no longer features in this projection, as it is classified within the subset of horses whose ultimate disease outcome is undetermined.

Nevertheless, in addition to the two aforementioned outliers, several animals with distinctive profiles can be identified in the regression analyses (Fig. 3):

- four cograzers, horses CG8, CG21, CG56 and CG58, display acylcarnitines profile that overlap with those of the diseased horses. These horses were selected as being part of the 5 % of the cograzers with the greatest acylcarnitines increase.
- within the cohort of dead horses, there is one individual, D11 whose acylcarnitines profile exhibit the least deviation from those of survivors and cograzers. This individual falls within the 95th percentile of the dead horses;
- among survivors, one standout case is D79, which exhibits a component 1 value lower than the 0.5 percentile of the survivor group;
- finally, one horse D33 was euthanised due to budgetary constraints.

Based on regression 3 (Fig. 3-c), but excluding both horses D47 and D89, it was possible to identify the variables with the most significant impact on distinguishing among the four groups: dead horses, survivors, cograzers, and control horses. Six variables had VIP scores exceeding 1 and negative central parameter estimates: C2, C3, C3DC, C4, C5, and C10:1 acylcarnitines (Table D). These variables were considered relevant and have been selected for subsequent analysis, with the aim of verifying if any of them could, on its own, serve as a reliable diagnostic and prognostic indicator. The sensitivity and specificity of these six markers in the differentiation of diseased horses (excluding horses D47 and D89), cograzers, dead horses, and survivors are represented by a ROC curve (Fig. E - appendices). The area under the curves (A) and associated standard error (SE) are also included in the same Figure E. In order to establish a predictive model, we sought discriminant markers useful for both diagnostic and prognostic purposes, including the 6 above-mentioned acylcarnitines, HGA, MCPA-carnitine, and CK, as it is one of the markers easily obtainable in the field. (Fig. E - appendices). The C5 carnitine emerges as the best candidate, with the largest area under the curve observed in both ROC curves comparing diseased horses to their cograzers ($A=0.9983$; $SE=0.005754$) and survivors to dead

horses ($A=0.8713$; $SE=0.04827$).

4. Discussion

In this study, the demographic profile of horses at risk for AM has been refined and factors that enable the differential diagnosis with digestive colics have been identified. This study highlights the significance of acylcarnitines profiling to prognosticate the chance of survival but also to document the existence of subclinical cases.

4.1. Update on demographic profile of diseased horses

In previous studies, age was identified as a confounding variable concerning the risk factors associated with the sex of the animal (Votion et al., 2009). However, this new study highlights that age exceeding 10 years and the gelding status serve as protective factors against the onset of the disease in horses exposed to the toxins. This observation is likely linked to the most recent epidemiological observations which suggest a gradual shift in the age distribution of horses affected by AM over the years. Over a 20-year period, the age group targeted by the disease has undergone significant change. Initially, nearly seventy percent of affected equids were less than 3 years old. However, presently, this age group constitutes less than forty percent of affected individuals (Votion et al., 2020). No factors related to age or sex were found to be indicative of chances of survival.

4.2. Update on the diagnostic blood markers

In this study, the observed serum concentrations of HGA (mean $\pm$ SDM = 5.16 ± 0.55 $\mu\text{mol/L}$) and MCPA-carnitine (mean $\pm$ SDM = 443.28 ± 82.84 nmol) in the diseased horses are consistent with the descriptions of equids suffering from AM, whose blood was tested using the same methods (Baise et al., 2016; Boemer et al., 2015; Hoffer et al., 2016). There was variability in serum HGA observations within the group of the diseased horses (median = 3.17 $\mu\text{mol/L}$; min = 0.00 $\mu\text{mol/L}$; max = 25.20 $\mu\text{mol/L}$), and it is worth noting that two affected animals did not have measurable HGA in their blood (horses D47 and D89).

Horse D47 had no detectable HGA in its blood at the time of sampling but had a low level of MCPA-carnitine (2.50 nmol/L) compared to other affected horses (MCPA-carnitine median = 155.00 nmol/L; min = 0.00 nmol/L; max = 4480.00 nmol/L, 1st percentile = 2.35 nmol/L). Its serum acylcarnitines profile was within the median range among affected horses and corresponds to the 65th percentile of observations (Fig. 3b). Based on this severe alteration in the serum acylcarnitines profile, we consider D47 to be effectively suffering from AM, despite the absence of protoxins and the low levels of metabolites in its blood. To explain these atypical findings, our hypothesis is that blood markers could have been modified by intravenous fluid therapy in this case, as the anamnestic elements do not allow us to determine whether venipuncture was performed before or after fluid initiation. Interestingly, the presence of MCPA-carnitine in the blood of this horse while the serum HGA level is already below the limit of detection, could be related to the differences in elimination kinetics. The literature on the dynamics of HGA and MCPA-carnitine in blood is limited (Bochnia et al., 2016b; Jahn et al., 2022). In a study of one horse suffering from MA, Jahn and collaborators (2022) observed a decrease in plasma concentrations of HGA and MCPA-carnitine. Hypoglycine A was detected in the blood of the affected horse for a longer time than its metabolites. The MCPA-carnitine, however, was no longer detectable 4 days post-onset of clinical signs. Another case study suggests a faster decrease of HGA compared to its metabolite: Bochnia and collaborators (2016) describe a fast metabolism of HGA into toxic metabolites with a subsequent increase in serum MCPA-carnitine levels after onset of clinical signs. Indeed, for these two cases, as well as for our study, the issue of timing before sampling arises, along with the variation that can exist between

the onset of clinical signs and the moment they are observed. To our knowledge, there is no standardised study on horses intoxication with HGA. Nevertheless, Sander and collaborators (2020) describe that, in a human individual, the renal excretion of unmetabolised HGA is higher than that of MCPA-carnitine. Furthermore, HGA renal excretion was described as proportional to its serum concentration. Therefore, increasing glomerular filtration via fluid therapy may increase the elimination of HGA more than that of MCPA-carnitine. This hypothesis could explain the atypical profile of horse D47, which presented MCPA-carnitine in its blood but no longer had HGA (Sander et al., 2020).

Horse D89 on the other hand, was the only animal included as diseased horse which had neither HGA toxin nor measurable amounts of MCPA-carnitine in his blood. Furthermore, D89 exhibits a serum acylcarnitines profile that was inconsistent, according to our results, with that of a horse suffering from AM. Indeed, D89's serum acylcarnitines profile overlapped with the ones of the control group (Fig. 3). This suggested an error in the tentative diagnosis of AM, which was later confirmed. Four months after his hospitalization, D89 underwent a genetic test which revealed a mutation in the glycogen synthase 1 enzyme, leading to the diagnosis of polysaccharide storage myopathy type 1. Despite meeting all our inclusion criteria, including pigmenturia and a serum CK activity exceeding 10,000 UI/L, D89 was not suffering from AM. This highlights the diagnostic potential of serum acylcarnitines, suggesting their role in potentially distinguishing between various types of myopathies.

As previously documented in existing literature, the levels of various serum acylcarnitines significantly increase in animals afflicted with AM. Nevertheless, previous publications fail to reach a consensus regarding the most affected group of acylcarnitines. These groups encompass free carnitine (van der Kolk et al., 2013), short-chain acylcarnitines (C2-C5) (Bochnia et al., 2019; Karlíková et al., 2016; Sponseller et al., 2012; van der Kolk et al., 2013; Westermann et al., 2008, 2007), medium-chain acylcarnitines (C6-C12) (Bochnia et al., 2019; Karlíková et al., 2016; Sponseller et al., 2012; van der Kolk et al., 2013; Westermann et al., 2008, 2007), long-chain acylcarnitines (C14-C20), very long-chain acylcarnitines (C22-C26), and unsaturated chain acylcarnitines (Karlíková et al., 2016).

Our study's findings indicate the following:

- (i) The modification of the serum acylcarnitines profile is severe, resulting in an increase in all acylcarnitines, irrespective of their chain length. This increase is significant when comparing diseased horses to their healthy pasture companions, with the exception of C18-carnitine.
- (ii) For the first time, this significant alteration was compared to another pathology, specifically horses with colic signs and another myopathy, initially suspected to have AM. Analysis of the serum acylcarnitines profile revealed a clear distinction between horses suffering from colic and those afflicted with AM (regression 1). This tends to highlight the value of the serum acylcarnitines profile in the diagnosis of AM. It allows a clear differentiation between horses suffering from AM and those suffering from abdominal colic, and seems to allow differentiation between horses suffering from AM and other types of myopathies. However, it's important to note that this study only included a single case of another myopathy, which is discussed further below. Recognizing the limitations of this study, further investigations, particularly comparative studies of acylcarnitines profile among cases of AM and various other myopathies, are warranted to elucidate broader diagnostic applications.
- (iii) Relying solely on HGA and/or MCPA-carnitine does not enable effective differentiation between diseased horses and their pasture companions. Given the inability to discriminate between cograzers and affected horses using HGA and MCPA-carnitine alone, our observations underscore the diagnostic significance of serum acylcarnitines. In addition, exceptionally, a case may be negative for HGA.
- (iii) Concerning CK, which is a marker that can be easily investigated even as a first-line test, the results of this study show a significant specificity of CK in distinguishing Diseased Horses vs. Control (Figure E.

g - appendices). The interpretation of this result remains debatable since the severe increase in CK to more than 10,000 IU/L was part of the inclusion criteria for Diseased Horses based on van Galen et al. (2012).

4.3. Update on the prognostic blood markers

Blood samples in this study were collected upon the admission of diseased animals to the clinic. We explored the possibility of using these early blood samples to predict the chances of the animal's survival. This would provide owners and the medical team with valuable information about the risks that must be considered before initiating financially and emotionally demanding therapies.

A similar approach was undertaken in the study by Boemer and colleagues in 2017, resulting in an estimation of outcomes based on three acylcarnitines (C2, C10:2, and C18-carnitines). This calculated prognosis was applied to the 32 survivors and the 28 dead horses in the study. This allowed us to generate a ROC curve (Figure E.j - appendices) with an area under the curve of 0.736. When applied to our samples, the test, as described by Boemer et al., was associated with a negative predictive power of 62 % and a positive predictive power of 67 % in distinguishing between diseased horses and cograzers (calculated prognosis cutoff at 0.44).

This test seems insufficiently specific for clinical practice. Among the blood markers studied in the present study, C5 carnitine appears to be the most suitable for developing a simple diagnostic and prognostic tool. Using C5 carnitine, we created two ROC curves, depicted in Figure E.e (in the appendices).

To estimate the chances of survival of a diseased animal based on C5 carnitine, the area under the ROC curve is 0.871. According to this model, a serum concentration of C5 carnitine would allow a correct identification of a diseased animal likely to die in 76 % of cases (negative predictive power with C5 cutoff at 12.21 $\mu\text{mol/L}$). Using the same test, a survivor would be correctly identified in 81 % of cases (positive predictive power with C5 cutoff at 12.21 $\mu\text{mol/L}$). A rapid on-site or clinic admission test could, therefore, provide a relatively reliable estimation of the disease outcome.

To distinguish between healthy and diseased horses, the area under the ROC curve is 0.988. According to this new model, a serum concentration of C5 carnitine would allow a correct identification of a diseased horse from a cograzer in 92 % of cases (negative predictive power with C5 cutoff at 3.04 $\mu\text{mol/L}$). Using the same test, a cograzer could be correctly identified in 97 % of cases (positive predictive power with C5 cutoff at 3.04 $\mu\text{mol/L}$). A rapid test could, therefore, confirm or exclude a diagnosis of AM in horses in pasture, exposed to sycamore maple trees during the risky seasons. The same continuum of serum C5 carnitine values could also help identify cograzers in which lipid catabolism is most affected, thereby providing insight into the animals at the highest risk of developing the disease.

It is interesting to note that neither the blood levels of HGA toxin, nor those of the MCPA-carnitine metabolite, nor those of CK can distinguish between horses that will survive and those that will die. In this study, the analyses were performed at a single and relatively early point in the clinical course of the disease. As described by Jahn and al. (2022), the blood parameters HGA, MCPA-carnitines, and CK evolve during the first hours of the disease. A longitudinal study focusing on the blood kinetics of these markers seems warranted to definitively conclude on their utility. This hypothesis has already been proposed by Dunkel et al. (2018), who observed that increasing CK over time worsened the prognosis. (Dunkel et al., 2018).

4.4. Subclinical cases of HGA poisoning

One of the strengths of this study is its extensive inclusion of cograzers (n=73). These clinically healthy animals, which shared pastures with diseased horses, were sampled within 48 hours of the onset of clinical signs of AM cases. At the time of sampling, cograzers had not

been removed from toxic exposure yet, maximizing the likelihood of obtaining a blood profile that closely mirrored their status at the onset of clinical signs in affected horses.

Additionally, it is worth noting that the presence of HGA in apparently healthy cograzers has been previously documented in the literature, both in inferior (Bochnia et al., 2015; Gröndahl et al., 2015) and in equivalent amounts to those found in affected horses (Baise et al., 2016; Bochnia et al., 2016a; Boemer et al., 2015). Our observations in this study reveal that most cograzers not only had HGA (97 % of cograzers) but also MCPA-carnitine (90 % of cograzers) in their blood.

Furthermore, while there is significant variability in protoxin and metabolite serum levels, in contrast to previous publications (Sander et al., 2016), it appears that the quantity of ingested toxin is not the sole factor determining whether an animal becomes ill as both HGA and MCPA-carnitine concentrations largely overlapped between diseased and cograzers horses. These new findings also challenge the hypothesis that the combined elevation of both blood parameters, HGA and MCPA-carnitine, coincides with typical signs of AM (Bochnia et al., 2016). Moreover, many cograzers not only displayed the presence of the protoxin and its metabolite in their blood but also showed elevated acylcarnitines level. These alterations overlap the range observed in control and diseased horses, suggesting that fatty acid catabolism of cograzers is already altered despite the absence of clinical signs. Therefore, it is appropriate to describe these cograzers as subclinically intoxicated animals rather than healthy pasture companions. It is noteworthy that a similar subclinical animal profile has been previously suggested in herbivores other than equids (Renaud et al., 2022).

From a practical standpoint, when a horse is suffering from AM, this study emphasizes the need to manage not only the affected animal but also the other equids in the pasture. The top priority is to remove these animals from toxin exposure.

4.5. Limitations of the Study

Limits of this study include several important considerations.

Firstly, the ideological framework of our investigation was constrained by markers already identified in previous studies as either protective or indicative of risk. Additionally, while the overall sample size was substantial, the group-specific and sex-specific sample sizes were comparatively small, limiting the statistical power of our observations.

Secondly, regarding the diagnostic marker aspect, our study focused primarily on markers previously suggested in the literature. Future research could benefit from including horses afflicted with other myopathies to further validate the initial findings of this study.

Thirdly, a longitudinal study assessing a larger cohort would be beneficial to definitively evaluate the kinetics of the toxin, its metabolites, CK levels, and the serum acylcarnitines profile. Such a study would provide more robust conclusions regarding their respective significance.

Lastly, from a practical standpoint, the rapid measurement of plasma C5, which could confirm diagnosis and estimate survival chances, is currently not easily accessible to veterinary practitioners. Improved accessibility to this diagnostic tool would greatly enhance its clinical utility.

5. Conclusion

Our findings highlight the complexity and variability within horses exposed to HGA. We observe that the serum concentrations of HGA and MCPA-carnitine alone do not provide a clear distinction between affected horses and their healthy pasture companions. Instead, it is the alteration of the serum acylcarnitines profile that stands out as a key diagnostic indicator. This study highlights that the acylcarnitines profile undergoes significant changes in horses suffering from AM, with an increase in nearly all acylcarnitines, regardless of their chain length. This differentiates affected animals from control horses and horses with colic

signs or with other myopathies.

Additionally, the present study makes advancements in prognostic markers for AM, with a specific focus on C5 carnitine. We found that C5 carnitine holds great potential to become a rapid on-site or clinic admission test to confirm or exclude an AM diagnosis and provide critical information about the likelihood of survival. Development of such a test could aid veterinarians and horse owners in making informed decisions about treatment and management strategies in cases of AM. Additional studies are necessary to assess the feasibility and potentially develop a simple and rapid diagnostic tool based on those findings.

Furthermore, this study introduces a critical dimension to the AM landscape by addressing HGA subclinical intoxication. This novel notion suggests the need for early management of both the affected horse and its pasture companions. It would be prudent to reduce toxin exposure by removing cograzers from affected pastures.

Formatting of funding sources

The study was supported by the la Wallonie agriculture SPW (Service public de Wallonie; Belgique) and by "Les Fonds Spéciaux pour la Recherche (FSR)" of Liege University (Liège, Belgium).

Institutional Review Board Statement

Ethical review and approval were waived for this study. The whole procedure is part of routine veterinary practice to establish a diagnosis in case of disease.

Informed Consent Statement

Not applicable.

CRediT authorship contribution statement

Benoît Renaud: Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Caroline-J. Kruse:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation, Conceptualization. **Géraldine Luis:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation. **François Boemer:** Writing – review & editing, Methodology, Investigation. **Dominique-Marie Votion:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization. **Pascal Gustin:** Writing – review & editing. **Carla Cesarini:** Writing – review & editing, Resources. **Anne-Christine François:** Writing – review & editing, Methodology, Conceptualization. **Katrien Palmers:** Resources. **Gunter van Loon:** Writing – review & editing, Resources.

Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process

During the preparation of this work the author(s) used Chatgpt in order to improve language. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Votion Dominique-Marie reports financial support was provided by Wallonie agriculture SPW. Votion Dominique-Marie reports financial support was provided by Les Fonds Spéciaux pour la Recherche (FSR) of Liege University (Liège, Belgium). If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

The authors thank David Stern, Claire Caron and Benjamin Klein for their invaluable technical support.

Appendices

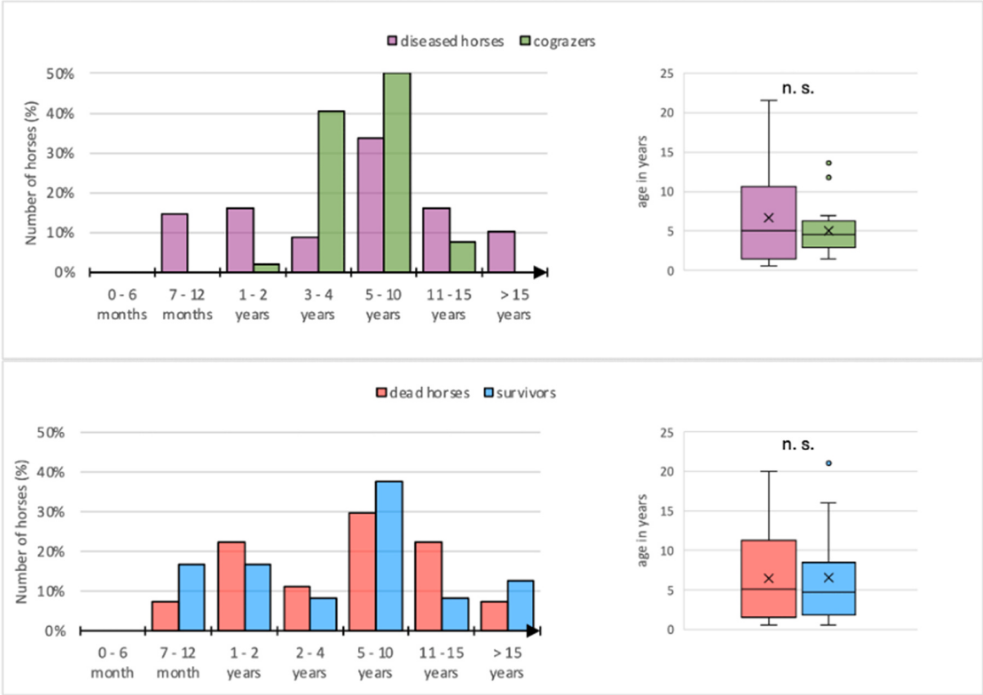


Fig. A. – Age distribution between groups: histograms and boxplots Boxes range from the 25th to 75th percentiles. Medians are represented by horizontal lines in the box and means are symbolized by a cross. Box plot whiskers were established using the Tukey method. n.s. stands for no significant difference of average age,

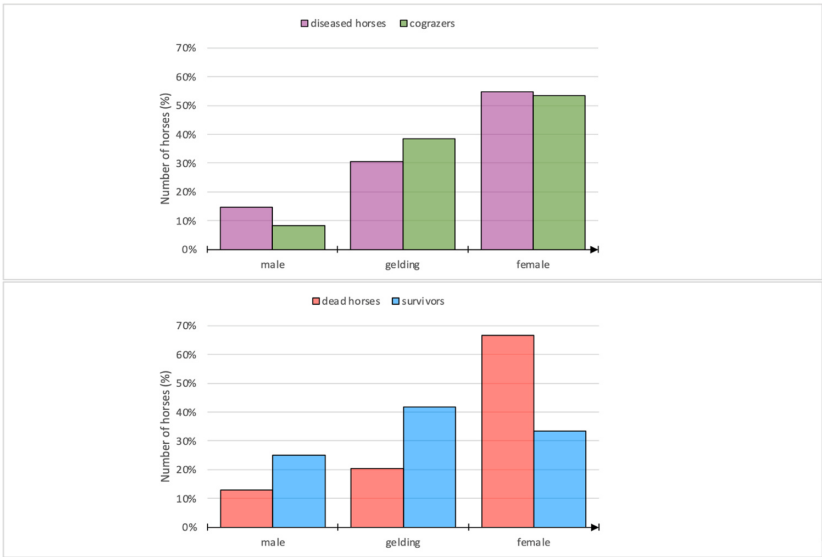


Fig. B. – Sex distribution between groups: histograms.

Table C

– Serum (mean ± standard deviation) concentrations of free carnitine and acylcarnitines (μmol/L)

	Diseased horses	Dead horses	Survivors	Cograzers	Colic horses	Control horses
Free Carnitine	89.69 ± 8.11*	90.28 ± 11.32*	49.92 ± 4.30	29.08 ± 1.20	29.44 ± 4.53	26.27 ± 1.16
C2	33.61 ± 2.06*	39.32 ± 3.21*	23.37 ± 2.14*	6.83 ± 0.32	13.26 ± 2.22	7.35 ± 0.39
C3	2.29 ± 0.16*	3.01 ± 0.33*	1.48 ± 0.14	0.74 ± 0.05	0.72 ± 0.18	1.00 ± 0.06
C3-DC	0.34 ± 0.04*	0.48 ± 0.10*	0.14 ± 0.02*	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
C4	17.99 ± 1.40*	24.95 ± 2.55*	11.58 ± 1.61*	1.33 ± 0.15*	0.41 ± 0.07	0.60 ± 0.02
C5	15.90 ± 1.23*	22.19 ± 2.07*	8.02 ± 1.28*	1.00 ± 0.11*	0.27 ± 0.07	0.25 ± 0.01
C5-OH	0.61 ± 0.08*	0.87 ± 0.21*	0.27 ± 0.04*	0.07 ± 0.00	0.11 ± 0.03	0.06 ± 0.01
C5-DC	1.71 ± 0.15*	2.07 ± 0.25*	0.90 ± 0.11*	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.14 ± 0.01
C6	3.96 ± 0.42*	5.37 ± 0.82*	2.46 ± 0.48*	0.15 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00
C8	1.54 ± 0.16*	1.95 ± 0.34*	1.08 ± 0.17*	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00
C8:1	1.06 ± 0.11*	1.40 ± 0.19*	0.59 ± 0.10*	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
C10	0.47 ± 0.04*	0.51 ± 0.05*	0.42 ± 0.06*	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
C10:1	0.39 ± 0.03*	0.45 ± 0.05*	0.30 ± 0.04*	0.05 ± 0.01*	0.07 ± 0.04*	0.01 ± 0.00
C10:2	0.72 ± 0.06*	0.98 ± 0.12*	0.50 ± 0.08*	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C12	0.25 ± 0.02*	0.26 ± 0.02*	0.20 ± 0.02*	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00
C12:1	0.20 ± 0.01*	0.21 ± 0.02*	0.17 ± 0.02*	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.01 ± 0.00
C14	0.22 ± 0.01*	0.24 ± 0.02*	0.17 ± 0.02*	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
C14:1	0.34 ± 0.03*	0.32 ± 0.03*	0.27 ± 0.04*	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.01*	0.01 ± 0.00
C16	0.61 ± 0.03*	0.62 ± 0.07*	0.50 ± 0.04*	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01
C16:1	0.11 ± 0.01*	0.25 ± 0.04*	0.17 ± 0.02*	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C18	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.03*	0.19 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01
C18:1	0.63 ± 0.04*	0.66 ± 0.09*	0.44 ± 0.04*	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.05 ± 0.01

* Mean value above the 99th percentile of the reference range obtained from control horses

Table D

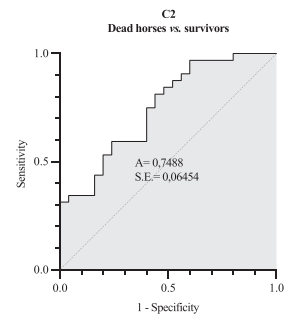
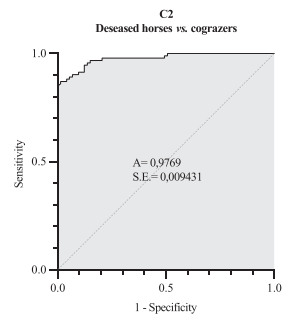
– Regression coefficients to select variables

Variable	VIP	Center/Scaled parameter estimates
C5*	1,14	−0,44
C3DC*	1,14	0,19
C10:1*	1,13	−0,19
C14:1	1,07	−0,09
C2*	1,06	−0,19
C12:1	1,04	0,03
C4*	1,04	−0,27
C12	1,03	−0,09
C10	1,02	0,04
C3*	1,02	0,30
C14	1,00	−0,05
C18:1	0,98	−0,20
C8	0,98	0,13
C18	0,95	0,01
C5DC	0,95	−0,15
C10:2	0,94	−0,08
C16:1	0,94	0,08
C8:1	0,94	0,08
C16	0,92	−0,13
C5OH	0,90	0,12
C6	0,90	0,03
Free carnitine	0,83	0,11

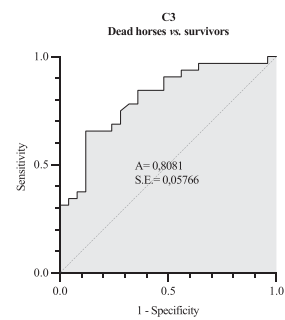
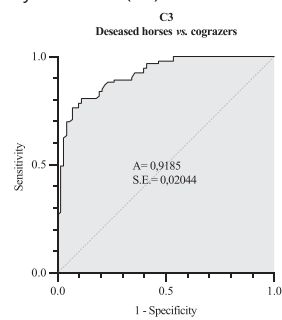
* Acylcarnitines with a variable importance in the projection scores greater than 1 and a center parameter lower than 0

VIP stands for variable importance in the projection

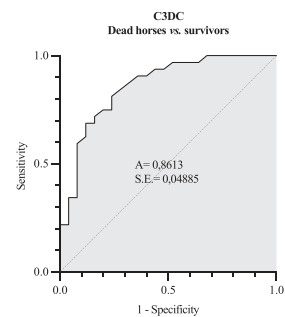
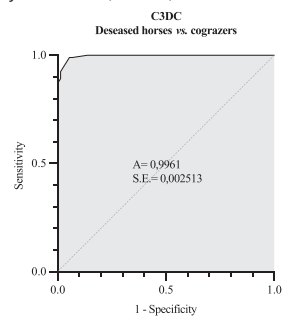
a- acetyl carnitine (C2)



b- propionyl carnitine (C3)



c- Malonylcarnitine (C3-DC)



d- butyryl-/isobutyrylcarnitine (C4)

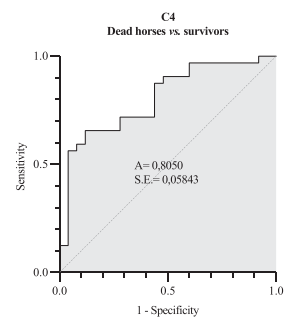
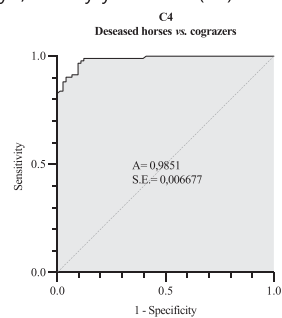
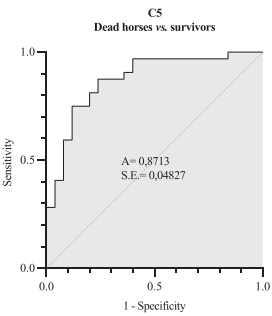
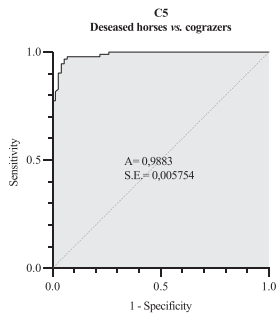
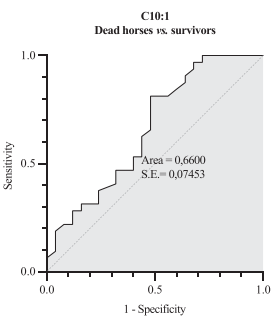
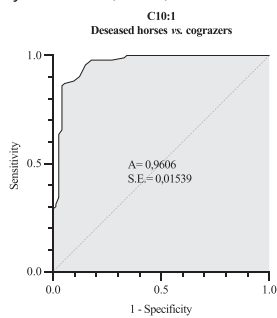


Fig. E. a-j – ROC curves with area under the curve (A) and standard error (S.E.). Excluding horses D47 and D89.

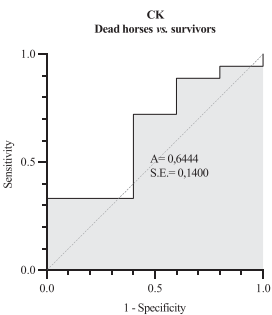
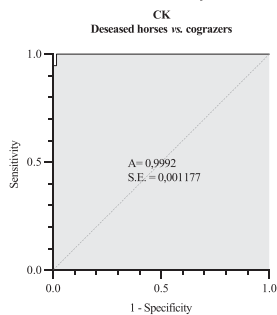
e- isovaleryl-/2-methylbutyrylcarnitine (C5)



f- decenoylcarnitine (C10:1)



g- Serum creatine kinase activity (CK)



h- Hypoglycin A

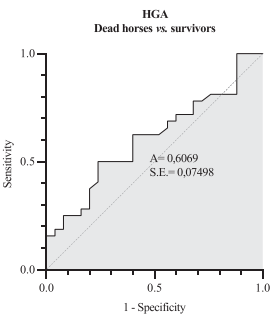
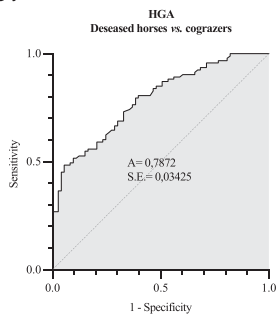


Fig. E. (continued).

i- MCPA-carnitine

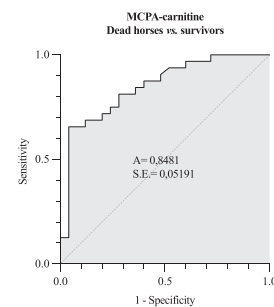
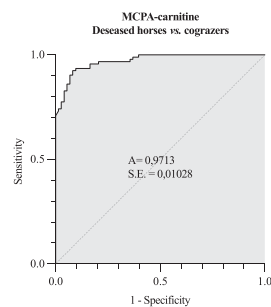
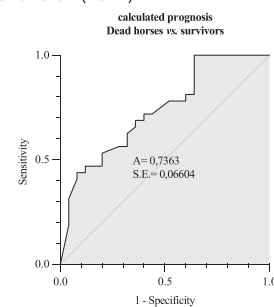
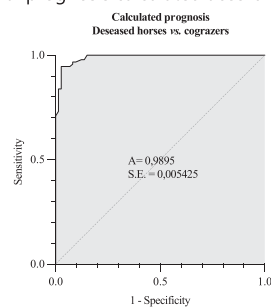
j- Survival prognosis calculated according to Boemer and *al.* (2017)

Fig. E. (continued).

References

- Baise, E., Habyarimana, J.A., Amory, H., Boemer, F., Douny, C., Gustin, P., Marcillaud-Pitel, C., Patarin, F., Weber, M., Votion, D.-M., 2016. Samaras and seedlings of *Acer pseudoplatanus* are potential sources of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy without necessarily inducing clinical signs. *Equine Vet. J.* 48, 414–417. <https://doi.org/10.1111/evj.12499>.
- Bochnia, M., Ziegler, J., Sander, J., Uhlig, A., Schaefer, S., Vollstedt, S., Glatter, M., Abel, S., Recknagel, S., Schusser, G.F., Wensch-Dorendorf, M., Zeyner, A., 2015. Hypoglycin A content in blood and urine discriminates horses with atypical myopathy from clinically normal horses grazing on the same pasture. *PLoS One* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136785>.
- Bochnia, M., Scheidemann, W., Ziegler, J., Sander, J., Vollstedt, S., Glatter, M., Janzen, N., Terhardt, M., Zeyner, A., 2016a. Predictive value of hypoglycin A and methylenecyclopropylacetic acid conjugates in a horse with atypical myopathy in comparison to its cograzing partners. *Equine Vet. Educ.* 30, 24–28. <https://doi.org/10.1111/eve.12596>.
- Bochnia, M., Scheidemann, W., Ziegler, J., Sander, J., Vollstedt, S., Glatter, M., Janzen, N., Terhardt, M., Zeyner, A., 2016b. Predictive value of hypoglycin A and methylenecyclopropylacetic acid conjugates in a horse with atypical myopathy in comparison to its cograzing partners. *Equine Vet. Educ.* 30, 24–28. <https://doi.org/10.1111/eve.12596>.
- Bochnia, M., Sander, J., Ziegler, J., Terhardt, M., Sander, S., Janzen, N., Cavalleri, J.-M., Zuraw, A., Wensch-Dorendorf, M., Zeyner, A., 2019. Detection of MCPG metabolites in horses with atypical myopathy. *PLoS One* 14, e0211698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211698>.
- Boemer, F., Deberg, M., Schoos, R., Baise, E., Amory, H., Gault, G., Carlier, J., Gaillard, Y., Marcillaud-Pitel, C., Votion, D.-M., 2015. Quantification of hypoglycin A in serum using aTRAQ® assay. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 997, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.06.004>.
- Boemer, F., Detilleux, J., Cello, C., Amory, H., Marcillaud-Pitel, C., Richard, E., van Galen, G., van Loon, G., Lefere, L., Votion, D.-M., Lefere, L., Votion, D.-M., 2017. Acylcarnitines profile best predicts survival in horses with atypical myopathy. *PLoS One* 12, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182761>.
- Chace, D.H., Pons, R., Chiriboga, C.A., McMahon, D.J., Tein, I., Naylor, E.W., De Vivo, D. C., 2003. Neonatal Blood Carnitine Concentrations: Normative Data by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Pediatr. Res* 53, 823–829. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000059220.39578.3D>.
- Chong, I.-G., Jun, C.-H., 2005. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemom. Intell. Lab. Syst. J.* 78, 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2004.12.011>.
- van der Kolk, J.H., Boelens, R., Halkes, S.B.A., Wijnberg, I.D., de Sain-van der Velden, M. G.M., Ippel, J.H., 2013. Some notes on fatal acquired multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) in a two-year-old warmblood stallion and European tar spot (Rhytisma acerinum). *Vet. Q* 33, 47–51. <https://doi.org/10.1080/01652176.2012.758904>.
- Dunkel, B., Ryan, A., Haggett, E., Knowles, E.J., 2018. Atypical myopathy in the South-East of England: Clinicopathological data and outcome in hospitalised horses. *Equine Vet. Educ.* 1–6. <https://doi.org/10.1111/eve.12895>.
- van Galen, G., Marcillaud-Pitel, C., Saegerman, C., Patarin, F., Amory, H., Baily, J., Cassart, D., Gerber, V., Hahn, C., Harris, P., Keen, J.A., Kirschvink, N., Lefere, L., Mcgorum, B., Muller, J., Picavet, M., Piercy, R., Roscher, K., Sereteyn, D., Unger, L., Van der Kolk, J., Van Loon, G., Verwilghen, D., Westermann, C., Votion, D.-M., 2012a. European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006–2009): Spatiotemporal distribution, history and clinical features. *Equine Vet. J.* 44, 614–620. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00556.x>.
- van Galen, G., Saegerman, C., Marcillaud-Pitel, C., Patarin, F., Amory, H., Baily, J.D., Cassart, D., Gerber, V., Hahn, C., Harris, P., Keen, J., Kirschvink, N., Lefere, L., Mcgorum, B., Muller, J., Picavet, M., Piercy, R., Roscher, K., Sereteyn, D., Unger, L., Van der Kolk, J., Van Loon, G., Verwilghen, D., Westermann, C., Votion, D.-M., 2012b. European outbreaks of atypical myopathy in grazing horses (2006–2009): Determination of indicators for risk and prognostic factors. *Equine Vet. J.* 44, 621–625. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00555.x>.
- González-Medina, S., Ireland, J., Piercy, R., Newton, J., Votion, D.-M., 2017. Equine atypical myopathy in the UK: Epidemiological characteristics of cases reported from 2011 to 2015 and factors associated with survival. *Equine Vet. J.* 49, 746–752. <https://doi.org/10.1111/evj.12694>.
- González-Medina, S., Hyde, C., Lovera, I., Piercy, R.J., 2020. Detection of hypoglycin A and MCPA-carnitine in equine serum and muscle tissue: optimisation and validation of a LC-MS-based method without derivatisation. *Equine Vet. J.* 52, 13303. <https://doi.org/10.1111/evj.13303>.
- Gröndahl, G., Berglund, A., Skidell, J., Bondesson, U., Salomonsson, M., 2015. Detection of the Toxin Hypoglycin A in Pastured Horses and in the European Sycamore Maple Tree (*Acer pseudoplatanus*) During Two Outbreaks of Atypical Myopathy in Sweden, 22–22. *Equine Vet. J.* 47. <https://doi.org/10.1111/evj.12486>.
- Høffer, S., Votion, D.-M., Anderberg, M., Boemer, F., Nautrup, O., van Galen, G., 2016. Atypical Myopathy in Denmark Confirmed With the aTRAQ Assay. *J. Equine Vet. Sci.* 37, 77–79. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.010>.
- Isenberg, S., Carter, M., Graham, L., Mathews, T., Johnson, D., Thomas, J., Pirkle, J., Johnson, R., 2015. Quantification of Metabolites for Assessing Human Exposure to Soapberry Toxins Hypoglycin A and Methylenecyclopropylglycine. *Chem. Res. Toxicol.* <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00205>.
- Jahn, P., Dobešová, D., Brumarová, R., Tóthová, K., Kopecká, A., Friedecký, D., 2022. Dynamics of acylcarnitines, hypoglycin A, méthylenecyclopropylglycine and their

- metabolites in a Kladruher stallion with atypical myopathy. *Vet. Q.* 42, 183–191. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2126537>.
- Karlíková, R., Šírká, J., Jahn, P., Friedecký, D., Gardlo, A., Janečková, H., Hrdinová, F., Drábková, Z., Adam, T., 2016. Equine atypical myopathy: A metabolic study. *Vet. J.* 216, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.07.015>.
- Karlíková, R., Šírká, J., Mech, M., Friedecký, D., Janečková, H., Mádrová, L., Hrdinová, F., Drábková, Z., Dobesová, O., Adam, T., Jahn, P., 2018. Newborn foal with atypical myopathy. *J. Vet. Intern Med* 32, 1–5. <https://doi.org/10.1111/jvim.15236>.
- Kruse, C.-J., Dieu, M., Renaud, B., François, A.-C., Stern, D., Demazy, C., Burteau, S., Boemer, F., Art, T., Renard, P., Votion, D.-M., 2024. New Pathophysiological Insights from Serum Proteome Profiling in Equine Atypical Myopathy. *ACS Omega* 9, 6505–6526. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c06647>.
- Lemieux, H., Boemer, F., van Galen, G., Serteyn, D., Amory, H., Baise, E., Cassart, D., Van Loon, G., Marcillaud-Pitel, C., Votion, D.-M., 2016. Mitochondrial function is altered in horse atypical myopathy. *Mitochondrion* 30, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.06.005>.
- Motulsky, H.J., Brown, R.E., 2006. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinforma.* 7, 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-123>.
- Palermo, G., Piraino, P., Zucht, H.-D., 2009. Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry Performance of PLS regression coefficients in selecting variables for each response of a multivariate PLS for omics-type data. *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* 2, 57–70.
- Renaud, B., Kruse, C.-J., François, A.-C., Grund, L., Bunert, C., Brisson, L., Boemer, F., Gault, G., Ghislain, B., Petitjean, T., Gustin, P., Votion, D.-M., 2022. Acer pseudoplatanus: a potential risk of poisoning for several herbivore species. *Toxins (Basel)* 14, 512. <https://doi.org/10.3390/toxins14080512>.
- Rudolph, W., Remane, D., Wissenbach, D.K., Peters, F.T., 2018. Development and validation of an ultrahigh performance liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry assay for nine toxic alkaloids from endophyte-infected pasture grasses in horse serum. *J. Chromatogr. A* 1560, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.05.013>.
- Sander, J., Terhardt, M., Sander, S., Aboling, S., Janzen, N., 2019. A new method for quantifying causative and diagnostic markers of methylenecyclopropylglycine poisoning. *Toxicol. Rep.* 6, 803–808. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.08.002>.
- Sander, J., Terhardt, M., Janzen, N., 2020. Study on the Metabolic Effects of Repeated Consumption of Canned Acek. *J. Agric. Food Chem.* 68, 14603–14609. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06235>.
- Sander, J., Terhardt, M., Janzen, N., Renaud, B., Kruse, C.-J., François, A.-C., Wouters, C. P., Boemer, F., Votion, D.-M., 2023. Tissue Specific Distribution and Activation of Sapindaceae Toxins in Horses Suffering from Atypical Myopathy. *Anim. (Basel)* 13. <https://doi.org/10.3390/ani13152410>.
- Sponseller, B.T., Valberg, S., Schultz, N.E., Bedford, H., Wong, D.M., Kersh, K., Shelton, G.D., 2012. Equine Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MADD) Associated with Seasonal Pasture Myopathy in the Midwestern United States. *J. Vet. Intern Med* 26, 1012–1018. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00957.x>.
- Valberg, S., Sponseller, B., Hegeman, A., Earing, J., Bender, J., Martinson, K., Patterson, S., Sweetman, L., 2013. Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree. *Equine Vet. J.* 45, 419–426. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00684.x>.
- Von Holt, C., Chang, J., Von Holt, M., Böhm, H., 1964. Metabolism and metabolic effects of hypoglycin. *Biochim Biophys. Acta* 0, 611–613.
- Votion, D.-M., 2016. Analysing hypoglycin A, methylenecyclopropylacetic acid conjugates and acylcarnitines in blood to confirm the diagnosis and improve our understanding of atypical myopathy. *Equine Vet. Educ.* 30, 29–30. <https://doi.org/10.1111/eve.12617>.
- Votion, D.-M., Linden, A., Saegerman, C., Engels, P., Epicum, M., Thiry, E., Delguste, C., Rouxhet, S., Demoulin, V., Navet, R., Sluse, F., Serteyn, D., van Galen, G., Amory, H., 2007. History and Clinical Features of Atypical Myopathy in Horses in Belgium (2000–2005). *J. Vet. Intern Med* 21, 1380–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb01962.x>.
- Votion, D.-M., Linden, A., Delguste, C., Amory, H., Thiry, E., Engels, P., van Galen, G., Navet, R., Sluse, F., Serteyn, D., Saegerman, C., 2009. Atypical myopathy in grazing horses: A first exploratory data analysis. *Vet. J.* 180, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.01.016>.
- Votion, D.-M., van Galen, G., Sweetman, L., Boemer, F., de Tullio, P., Dopagne, C., Lefere, L., Mouthys-Mickalad, A., Patarin, F., Rouxhet, S., Van Loon, G., Serteyn, D., Sponseller, B.T., Valberg, S., 2014. Identification of methylenecyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Vet. J.* 46, 146–149. <https://doi.org/10.1111/evj.12117>.
- Votion, D.-M., François, A.-C., Kruse, C., Renaud, B., Farinelle, A., Bouquieaux, M.-C., Marcillaud-Pitel, C., Gustin, P., 2020. Answers to the Frequently Asked Questions Regarding Horse Feeding and Management Practices to Reduce the Risk of Atypical Myopathy. *Anim. (Basel)* 10. <https://doi.org/10.3390/ani10020365>.
- Westermann, C., de Sain-van der Velden, M., Van der Kolk, J., Berger, R., Wijnberg, I., Koeman, J., Wanders, R., Lenstra, J., Testerink, N., Vaandrager, A., Vianey-Saban, C., Acquaviva-Bourdain, C., Dorland, L., 2007. Equine biochemical multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) as a cause of rhabdomyolysis. *Mol. Genet. Metab.* 91, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.04.010>.
- Westermann, C., Dorland, L., Votion, D.-M., de Sain-van der Velden, M., Wijnberg, I., Wanders, R., Spliet, W., Testerink, N., Berger, R., Ruiter, J., van der Kolk, J., 2008. Acquired multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 10 horses with atypical myopathy. *Neuromuscul. Disord.* 18, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.02.007>.
- Wimmer-Scherr, C., Taminiau, B., Renaud, B., van Loon, G., Palmers, K., Votion, D., Amory, H., Daube, G., Cesarini, C., 2021. Comparison of Fecal Microbiota of Horses Suffering from Atypical Myopathy and Healthy Co-Grazers. *Animals* 11, 506. <https://doi.org/10.3390/ani11020506>.

Conclusion à l'article 1

Cette étude confirme la complexité du diagnostic de la MA et met en lumière les limites des biomarqueurs classiquement utilisés. Les concentrations sériques d'HGA et de MCPA-carnitine, bien qu'indicatrices d'une exposition aux toxines et de leur métabolisation, ne permettent pas à elles seules de distinguer les chevaux malades de leurs compagnons de pâturage cliniquement sains. En revanche, le profil des acylcarnitines sériques apparaît comme un indicateur diagnostique majeur, montrant des altérations marquées chez les chevaux atteints de MA et permettant de différencier ces derniers non seulement des témoins mais aussi des chevaux présentant des coliques abdominales ou une myopathie induite par l'exercice.

L'intérêt du profil des acylcarnitines dépasse le cadre diagnostique : certains marqueurs, en particulier la C5, se révèlent prometteurs comme outils pronostiques, susceptibles de fournir rapidement des informations essentielles sur l'évolution et les chances de survie des animaux atteints. La mise au point d'un test rapide basé sur ces observations pourrait constituer un progrès considérable pour la prise en charge clinique.

Enfin, cette étude apporte une contribution nouvelle en documentant l'existence d'intoxications subcliniques à l'HGA. Les altérations métaboliques détectées chez les chevaux apparemment sains, mais exposés aux érables sycomores, suggèrent que ces animaux doivent être considérés comme à risque. Ces résultats soulignent l'importance d'une gestion précoce et globale des troupeaux exposés, incluant non seulement les animaux malades, mais également leurs compagnons de pâture.

En conclusion, l'analyse du profil des acylcarnitines s'impose comme un outil central dans le diagnostic, le pronostic et la compréhension des formes subcliniques de MA. Elle ouvre la voie à des stratégies de gestion et de prévention plus adaptées, contribuant à réduire l'impact de cette intoxication grave et souvent fatale.

L. ARTICLE 2

Introduction à l'article 2

L'intoxication à l'HGA, responsable de la MA, a longtemps été considérée comme une problématique spécifique aux chevaux. Cependant, la détection de la toxine et de ses métabolites chez d'autres herbivores, tels que les cervidés ou les camélidés, a conduit à élargir la réflexion à un risque « toutes espèces ».

Les caractéristiques digestives propres aux différentes espèces pourraient moduler la sensibilité à l'intoxication. En particulier, les animaux à fermentation proximale, tels que les ruminants, pourraient bénéficier d'un effet protecteur lié au rôle du rumen dans la transformation des toxines. Néanmoins, l'observation de cas cliniques dans certaines espèces suggère que cette protection n'est pas absolue et que la diversité interspécifique doit être mieux documentée.

Dans ce contexte, l'étude présentée ici avait pour objectifs d'évaluer l'exposition à l'HGA chez des espèces herbivores variées, y compris des animaux de parcs zoologiques potentiellement exposés à l'érable sycomore. De plus, cette étude examine la pertinence du profil des acylcarnitines comme indicateur d'intoxication, y compris sous des formes subcliniques. Cette démarche visait à mieux cerner l'ampleur et la variabilité interspécifique du risque et à fournir des éléments utiles pour la gestion et la prévention dans un cadre élargi à d'autres espèces sensibles

Article

Acer pseudoplatanus: A Potential Risk of Poisoning for Several Herbivore Species

Benoît Renaud ^{1,*}, Caroline-Julia Kruse ², Anne-Christine François ¹, Lisa Grund ³, Carolin Bunert ⁴, Lucie Brisson ⁵, François Boemer ⁶, Gilbert Gault ⁷, Barbara Ghislain ⁸, Thierry Petitjean ⁹, Pascal Gustin ¹ and Dominique-Marie Votion ¹

- ¹ Department of Functional Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Pharmacology and Toxicology, Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), University of Liège, 4000 Liège, Belgium; acfrancois@uliege.be (A.-C.F.); p.gustin@uliege.be (P.G.); dominique.votion@uliege.be (D.-M.V.)
- ² Department of Functional Sciences, Physiology and Sport Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), University of Liège, 4000 Liège, Belgium; caroline.kruse@uliege.be
- ³ Der Grüne Zoo Wuppertal, 42117 Wuppertal, Germany; grund@zoo-wuppertal.de
- ⁴ Zoo Duisburg gGmbH, 47058 Duisburg, Germany; bunert@zoo-duisburg.de
- ⁵ Zoo de Beauval, 41110 St. Aignan, France; lucie.brisson@zoobeauval.com
- ⁶ Biochemical Genetics Laboratory, Human Genetics, CHU Sart Tilman, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; f.boemer@chuliege.be
- ⁷ USC 1233 & Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires (CNITV), 69280 Lyon, France; gilbert.gault@vetagro-sup.fr
- ⁸ Fourrages Mieux Asbl, 6900 Marloie, Belgium; barbara.ghislain@gmail.com
- ⁹ Arsia Asbl, 5590 Ciney, Belgium; thierry.petitjean@arsia.be
- * Correspondence: benoit.renaud@uliege.be

Citation: Renaud, B.; Kruse, C.-J.; François, A.-C.; Grund, L.; Bunert, C.; Brisson, L.; Boemer, F.; Gault, G.; Ghislain, B.; Petitjean, T.; et al. *Acer pseudoplatanus*: a Potential Risk of Poisoning for Several Herbivore Species. *Toxins* **2022**, *14*, 512. <https://doi.org/10.3390/toxins14080512>

Received: 29 June 2022

Accepted: 21 July 2022

Published: 26 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Acer pseudoplatanus* is a worldwide-distributed tree which contains toxins, among them hypoglycin A (HGA). This toxin is known to be responsible for poisoning in various species, including humans, equids, Père David's deer and two-humped camels. We hypothesized that any herbivore pasturing with *A. pseudoplatanus* in their vicinity may be at risk for HGA poisoning. To test this hypothesis, we surveyed the HGA exposure from *A. pseudoplatanus* in species not yet described as being at risk. Animals in zoological parks were the major focus, as they are at high probability to be exposed to *A. pseudoplatanus* in enclosures. We also searched for a toxic metabolite of HGA (i.e., methylenecyclopropylacetyl-carnitine; MCPA-carnitine) in blood and an alteration of the acylcarnitines profile in HGA-positive animals to document the potential risk of declaring clinical signs. We describe for the first instance cases of HGA poisoning in *Bovidae*. Two gnus (*Connochaetes taurinus taurinus*) exposed to *A. pseudoplatanus* in their enclosure presented severe clinical signs, serum HGA and MCPA-carnitine and a marked modification of the acylcarnitines profile. In this study, even though all herbivores were exposed to *A. pseudoplatanus*, proximal fermenters species seemed less susceptible to HGA poisoning. Therefore, a ruminal transformation of HGA is hypothesized. Additionally, we suggest a gradual alteration of the fatty acid metabolism in case of HGA poisoning and thus the existence of subclinical cases.

Keywords: hypoglycin A; methylenecyclopropylacetyl-carnitine; sycamore maple; toxin; poisoning; zoo; gnus; ruminants; equine atypical myopathy

Key Contribution: Clinical hypoglycin A poisoning occurs in *Bovidae*. Subclinical HGA poisoning cases may exist as the fatty acid metabolism alteration appears gradually.

1. Introduction

Originally from Central Europe, Caucasus and North of Asia Minor [1], the *Acer pseudoplatanus* (sycamore maple, *Sapindaceae*) is nowadays a worldwide-distributed tree. It has become naturalized in most of Europe and even in other countries and continents, such as North and South America, New Zealand, Australia and India [2]. Its rapid growth, high timber price [3], attractive appearance tolerance to pollution, salt, wind and low summer temperatures [4], make it economically interesting for silviculture and as an ornamental tree. However, despite all its apparent advantages, the seeds [5], the seedlings [6] and, to a lesser extent, the leaves [7] from *A. pseudoplatanus* contain toxins. Among them, hypoglycin A (HGA) is known to be responsible for poisoning in various species, including humans. Hypoglycin A poisoning was first confirmed in humans in the context of the Jamaican vomiting sickness [8,9] and more recently as taking part in outbreaks of encephalopathy [10–13]. Later on, HGA was the first toxin incriminated in equine atypical myopathy [5,14]. Numerous equids are already described as sensitive to HGA: saddle horses, draft horses, ponies, donkeys, zebras and Przewalski horses [15,16].

To exert its toxicity, HGA must be metabolized in liver cells into methylenecyclopropylacetyl-coenzyme A (MCPA-CoA) [17] which impairs lipid metabolism [18], resulting in an accumulation of acylcarnitines in blood [19–22]. In veterinary medicine, the detection of both HGA and methylenecyclopropylacetyl conjugated with carnitine (MCPA-carnitine) combined with a modified serum acylcarnitines profile is thought to confirm the diagnosis of HGA poisoning [21,23] but no toxicological standards for these biomarkers of effects have been determined so far. In Europe, *A. pseudoplatanus* poisoning is related to animals on pasture during autumn and spring, which are likely to ingest seeds and seedlings present on the ground in these seasons [5,6,24].

Laboratory research studies have shown that mice, rats, guinea pigs, rabbits, pigeons, dogs, cats and monkeys may be poisoned by HGA [9,25]. Very recently, HGA poisoning has been shown in two new species: Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) [26,27] and two-humped camels (*Camelus ferus bactrianus*) [22]. Thus, for the first time, HGA poisoning was described in foregut fermenters. Despite a variety of clinical signs between species, HGA poisoning can lead to death in all the above-cited ones [9,14,22,25,26]. In grazing equids, atypical myopathy displays the characteristics of an emerging disease [24] while domestic ruminants seem to be spared despite access to grazing land. However, although domestic ruminants may be exposed to a lesser extent (e.g., different pasturing times according to season, different pasture management, etc.) the question of a possible resistance and/or tolerance [28] to HGA poisoning remains unsolved.

In the context of an omnipresence of *A. pseudoplatanus* and its invasive character [2], we hypothesized that any herbivore pasturing with this tree in their vicinity may be at risk for HGA poisoning. To test this hypothesis, we surveyed serum HGA and MCPA-carnitine in animal species not yet described as being at risk. Animals in zoological parks were the major focus as they are mostly kept in enclosures containing/surrounded by trees and are therefore at high risk to be exposed to *A. pseudoplatanus*. We also searched for MCPA-carnitine in blood and an alteration of the acylcarnitines profile in HGA-positive animals in order to contribute to the characterization of the toxicological risks.

2. Materials and Methods

2.1. Origin of the Samples

All procedures performed in this study were in accordance with the national and international guidelines for animal welfare. Serum samples were selected from available banks of zoological parks which had been taken previously to establish a diagnosis in diseased animals or to prevent atypical myopathy. The remaining samples were collected in one alpaca farm (Aubel, Belgium) and at the farm of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège (Liège, Belgium).

The studied species include herbivorous mammals which are either foregut fermenters or hindgut fermenters. The foregut fermenters were classified according to the continuum of morphophysiological feeding type hypothesized by Hofmann and collaborators [29,30] and now confirmed *in vivo* [31]. Sample information, species details and effectives are presented in Table 1.

Table 1. Individuals included in this study.

Species	Effectives	Sample Number	Sampling Date (dd/mm/yyyy)	Origin	HGA (μmol/L)	MCPA-Carnitine (nmol/L)
Foregut fermenters—Ruminants—Grazers						
Cattle (<i>Bos taurus</i>)	7	S01	10/12/2018	Uliège farm	-	-
		S02	10/12/2018	Uliège farm	-	-
		S03	10/12/2018	Uliège farm	-	-
		S04	10/12/2018	Uliège farm	-	-
		S05	10/12/2018	Uliège farm	-	-
		S06	21/05/2021	Neunkirchen	-	-
		S07	21/05/2021	Neunkirchen	-	-
Gnu (<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>)	6	S08	14/04/2020	Beauval	-	-
		S09	04/03/2021	Beauval	-	-
		S10	16/03/2021	Beauval	-	-
		S11	01/04/2021	Beauval	0.16	-
		S12 *	29/04/2021	Beauval	0.28	0.30
		S13 *	29/04/2021	Beauval	0.67	4.67
Blackbuck (<i>Antilope cervicapra</i>)	1	S14	22/04/2016	Neunkirchen	-	-
Foregut fermenters—Ruminants—Intermediate feeders						
Sheep (<i>Ovis aries</i>)	15	S15	01/12/2016	Neunkirchen	-	-
		S16	17/05/2017	Neunkirchen	-	-
		S17	10/12/2018	Uliège farm	-	-
		S18	10/12/2018	Uliège farm	-	3.18
		S19	10/12/2018	Uliège farm	0.20	-
		S20	10/12/2018	Uliège farm	0.76	-
		S21	10/12/2018	Uliège farm	0.84	-
		S22	10/12/2018	Uliège farm	0.99	3.78
		S23	10/12/2018	Uliège farm	1.01	13.20
		S24	10/12/2018	Uliège farm	1.11	3.64
		S25	10/12/2018	Uliège farm	1.13	-
		S26	10/12/2018	Uliège farm	1.38	5.26
		S27	10/12/2018	Uliège farm	2.07	3.75
		S28	10/12/2018	Uliège farm	2.77	8.21
Goat (<i>Capra hircus</i>)	13	S29	29/10/2016	Wuppertal	-	0.14
		S30	08/11/2018	Wuppertal	-	-
		S31	27/04/2020	Duisburg	0.55	-
		S32	27/04/2020	Duisburg	0.82	1.15
		S33	27/04/2020	Duisburg	1.25	0.79
Timor deer (<i>Rusa timorensis</i>)	1	S34	01/10/2015	Neunkirchen	-	-
Foregut fermenters—Ruminants—Camelids						
Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	22	S35	29/05/2015	Neunkirchen	-	-
		S36–S54	12/10/2018	Alpaca farm	-	-

		S55	12/10/2018	Alpaca farm	-	0.32
		S56	12/10/2018	Alpaca farm	-	1.32
Camel (<i>Camelus bactrianus</i>)	5	S57	17/04/2006	Duisburg	0.38	-
		S58	24/09/2009	Duisburg	-	-
		S59	25/04/2012	Duisburg	-	-
		S60	02/04/2014	Duisburg	-	-
		S61	14/12/2018	Duisburg	-	-
Lama (<i>Lama glama glama</i>)	2	S62	01/12/2016	Neunkirchen	-	-
		S63	17/05/2017	Neunkirchen	-	-
Vicuna (<i>Vicugna vicugna</i>)	1	S64	27/04/2020	Wuppertal	0.16	1.71
Hindgut fermenters						
Elephant (<i>Loxodonta africa</i>)	6	S65	06/11/2014	Wuppertal	0.16	-
		S66	17/11/2016	Neunkirchen	-	-
		S67	17/11/2016	Neunkirchen	-	-
		S68	15/12/2016	Neunkirchen	0.21	-
		S69	28/11/2017	Wuppertal	-	0.18
		S70	08/11/2018	Wuppertal	0.12	-
Donkey (<i>Equus asinus</i>)	3	S71	16/12/2016	Neunkirchen	-	-
		S72	20/10/2017	Wuppertal	-	-
		S73	12/11/2018	Wuppertal	-	-
Zebra (<i>Equus quagga boehmi</i>)	2	S74	30/10/1999	Wuppertal	-	-
		S75	30/10/2007	Wuppertal	-	-

* Diseased animals. The “-” stands for below the limit of quantification.

To be included in this study, blood samples provided by zoological parks from their biobank (1) had to belong to grazing animals with *A. pseudoplatanus* in their close vicinity, (2) had to have been sampled during the highest risk periods as previously defined (i.e., in autumn, from October to December and during the following spring from March to May [24] and (3) in years with large outbreaks (i.e., more than 50 cases declared to the Atypical Myopathy Alert Group since 2006 [19]).

Thirteen blood samples were retrieved from the bank of serum from “Neunkircher Zoo” in Germany, ten from “Der Grüne Zoo Wuppertal” in Germany, eight from “Zoo Duisburg” in Germany and six from “ZooParc de Beauval” in France. The latest were collected in spring 2020 and spring 2021, from gnus (*Connochaetes taurinus taurinus*) with a tentative diagnosis of atypical myopathy.

From the samples taken by veterinary practitioners and sent to AMAG to assess the risk of atypical myopathy and/or to diagnose HGA poisoning, twenty-one blood samples came from an alpaca farm in which alpacas were exposed to *A. pseudoplatanus* seeds and leaves, eight from goats, five from cattle and thirteen from sheep. All animals were sampled during the years and seasons at risk as mentioned above.

2.2. Hypoglycin A Assay

Hypoglycin A assay was performed on serum using an aTRAQ® kit for amino acid analysis of physiological fluids as previously described [23,26,32]. Hypoglycin A contained in samples was derivatized using an isotopic tag (mass *m/z* 121), while a second labeling reagent (mass *m/z* 113) allowed absolute quantification. Derivatized samples were introduced into a TQ5500 tandem mass spectrometer (Sciex) using a Prominence AR HPLC system (Shimadzu). This method presents a lower limit of quantification of 0.090 µmol/L [32].

2.3. Methylenecyclopropylacetyl–Carnitine Determination Method

The MCPA-carnitine separation and determination were carried out by ultra-performance liquid chromatography combined with subsequent mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as reported by Valberg et al., in 2013. The corresponding limit of detection is approximately 0.001 nmol/L [14].

2.4. Acylcarnitines Determination Method

Free carnitine and twenty-one acylcarnitines (C2, C3, C3DC, C4, C5, C5-OH, C5DC, C6, C8, C8:1, C10, C10:1, C10:2, C12, C12:1, C14, C14:1, C16, C16:1, C18 and C18:1 -carnitine) [33] were quantified in serum by tandem mass spectrometry [34]. A methanol solution with labelled internal standards was used to precipitate serum proteins. Supernatants were evaporated under nitrogen stream and derivatized with butanolic-HCl. Samples were then analyzed with a TQ5500 mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA).

2.5. Statistical Analysis

Partial least squares regression (PLS) was used to compare acylcarnitines' profiles. This statistical model is particularly fitted as serum acylcarnitines profile correspond to numerous (21) correlated variables. The PLS visual outcome is a two-dimensional projection where each blood sample is represented as one point. Component 1 (*x*-axis) and component 2 (*y*-axis) are weighted combinations of the original variables.

Partial least squares regressions allow for both a discrimination of groups as well as a selection of relevant variables. The identification of relevant acylcarnitines to specify a group of animals was performed using two scores: (1) variable importance in the projection (VIP) and (2) center parameter estimates of the acylcarnitines of main interest with a VIP over 1 and an absolute value of the center parameter estimates over 0.15 [35,36].

Normality was assessed using a Shapiro–Wilk test. Data were log-transformed when necessary to compare different groups of animals (Mann–Whitney test or unpaired *t* test).

Statistical analyses and graphical representations were performed using SAS 9.4M7 (PLS regressions) and Graphpad Prism 7 (Mann–Whitney test).

3. Results

Based on serum values of HGA and MCPA-carnitine, three groups of animals were characterized: (1) animals negative for HGA and negative for MCPA-carnitine, (2) animals positive for HGA and negative for MCPA-carnitine and (3) animals positive for MCPA-carnitine. The first PLS regression compares serum acylcarnitines profile between the three groups (Figure 1 and Table 2). On the *x*-axis, the component 1 of the regression explains 72.51% of the differences between the three aforementioned groups.

For group 1, the component 1 is minor to 0 for 82% (40/49) of the animals and over 0 for 18% (9/49) of the animals. These nine last cited animals are non-diseased: four gnus (S08, S09, S10, S11), two camels (S59, S61), two cows (S05, S06) and one zebra (S74).

For group 2, the component 1 is minor to 0 for 30% (3/10) of three elephants S65, S68 and S70. Those three elephants are non-diseased animals and presented serum HGA concentrations below than the 20th percentile of the positive HGA observations.

For group 3, the component 1 is minor to 0 for 25% (4/16) of two alpacas (2/22) positive for MCPA-carnitine (S55, S56), the only elephant (1/6) positive for MCPA-carnitine (S69) and one goat (S29). The elephant S69 is a non-diseased animal and presented the lowest MCPA-carnitine serum value of the positive MCPA-carnitine observations.

The inclusion criteria did not incorporate a specific clinical status. Most of the animals were healthy in appearance (i.e., no clinical signs were observed during general observational examination). Of the 75 blood samples from 70 animals, two gnus (S12, S13) were diseased at the time of sample collection. Information about the diseased animals, clinical signs and complementary examination results are gathered in Table 3. The second PLS

regression compares serum acylcarnitines profile between two groups: (i) animals which presented clinical signs at the time of blood sampling, (ii) animals without clinical sign at that time (i.e., animals healthy in appearance; Figure 2)

On the x-axis, the component 1 of the regression explains 73% of the difference between clinically affected animals and non-diseased ones. According to this component: the acylcarnitines profile of the two diseased gnus (S12 and S13) deeply differ from animals healthy in appearance. The acylcarnitines profile of two of the five camels (S59 and S61) are distinct from the apparently healthy animals without being as extreme as the diseased gnus.

Table 2. Coefficients in selecting variables of main interest-PLS 1. Component 1 (Mean $\pm$ SDM) and serum concentration ($\mu\text{mol/L}$) for the 3 groups of animals-PLS 1.

	VIP	Center Parameter Estimates
C8:1-Carnitine	2.42	0.63
C10:2-Carnitine	1.25	−0.56
C14:1-Carnitine	1.05	0.26
C12:1-Carnitine	1.04	−0.22
C16:1-Carnitine	1.01	−0.16

Only the 5 acylcarnitines of main interest are presented in this table.

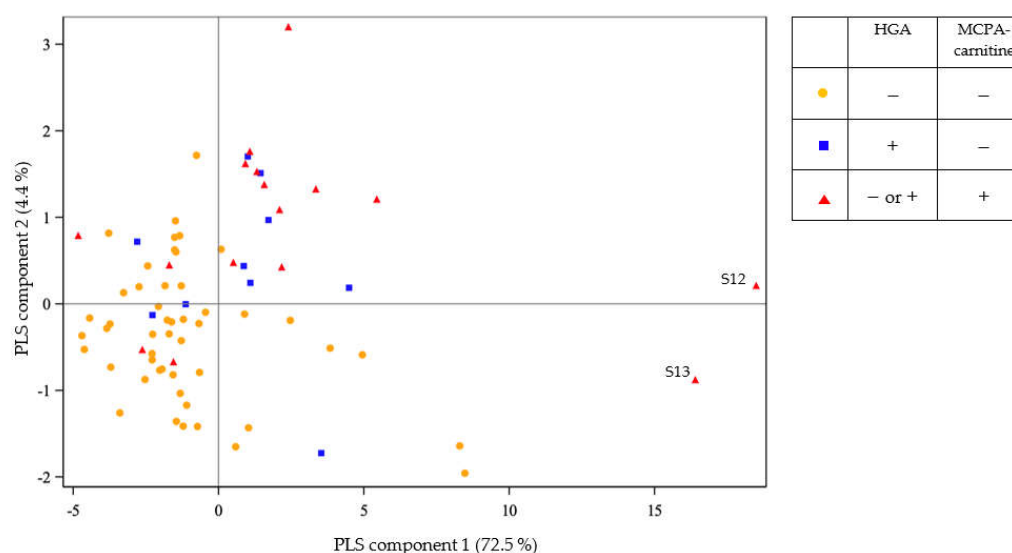


Figure 1. Partial least squares projection of the acylcarnitines profile comparing animals depending on serum hypoglycin A (HGA) and methylenecyclopropylacetyl conjugated with carnitine (MCPA-carnitine) status.

Table 3. Diseased animals' information.

Species	Sample Number	Clinical Signs	Complementary Exams	Outcome
Gnu (<i>Connochaetes taurinus taurinus</i>)	S12	Depression Tremors Decubitus	CK = 15,000 * IU/L LDH = 20,800 * IU/L AST = 10,688 * IU/L	Good evolution: clinical signs disappeared within 3 days after removing access to toxin plants

		ALT = 1621 * IU/L	
		CK = 16,800 * IU/L	
S13	Depression	LDH = 10,700 * IU/L	Good evolution: clinical signs disappeared
	Tremors	AST = 1000 * IU/L	within 3 days after removing access to toxin
	Decubitus	ALT = 375 * IU/L	plants

* Over the reference range. CK, serum activities of creatine kinase with the reference range of 58–502 IU/L. LDH, serum total lactate dehydrogenase activity with the reference range of 15–1591 IU/L. AST, serum aspartate aminotransferase activity with the reference range of 59–230 IU/L. ALT, serum alanine transaminase activity with the reference range of 18–64 IU/L.

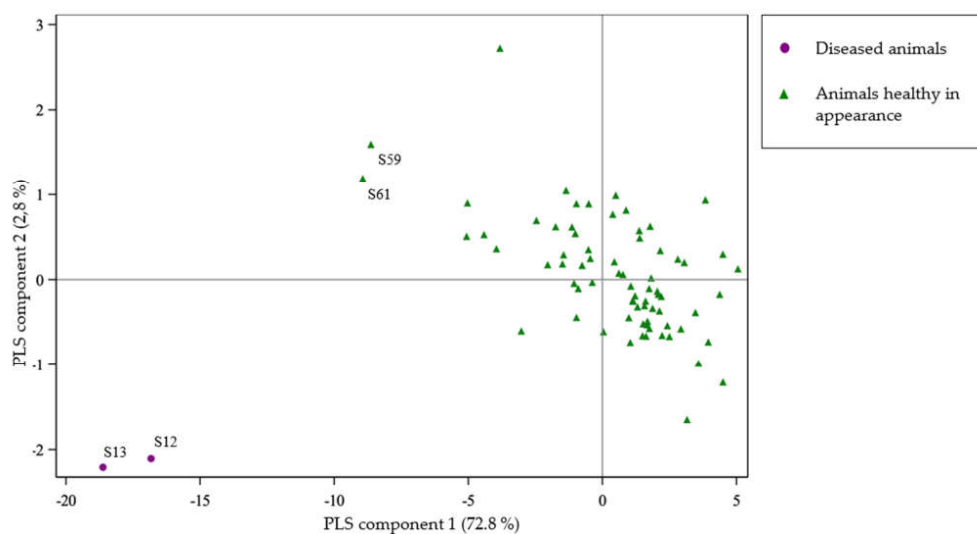


Figure 2. Partial least squares projection of the acylcarnitines profile comparing diseased animals versus apparently healthy ones.

4. Discussion

The clinical poisoning associated with the ingestion of HGA from *A. pseudoplatanus* has been described in a few species. Initially, this environmental poisoning was reported in equids (i.e., horses, ponies, donkeys, Przewalski horses and zebras) as equine atypical myopathy [16,37]. The condition was first described in 1985 [38] but was only linked to the *A. pseudoplatanus* in 2014 [39]. More recently, clinical signs and death of camels and Père David's deer were connected to HGA poisoning through ingestion of *A. pseudoplatanus* seedlings [22,26].

We report here the presence of HGA and/or MCPA-carnitine in several species besides equids. The absence of HGA and MCPA-carnitine in serum from both donkeys and zebras suggests that the toxic material was not available in sufficient quantities in their enclosures when they were sampled.

In one sheep, one goat and two alpacas, MCPA-carnitine was detected while no HGA was present in the serum. This may be due to the involved toxicokinetic. It is plausible that HGA had already been eliminated from their blood while MCPA-carnitine was still present. This hypothesis is sustained by previous descriptions in the literature. Indeed, in one horse removed from the toxic environment, it was shown that MCPA-carnitine increased in the serum with time while HGA decreased [40]. Moreover, similar results were obtained in human poisoning with ackee fruits: after HGA maximal serum concentration was attained, its concentration decreased while MCPA-carnitine increased [41].

4.1. Subclinical Status

This study underlines the existence of yet undescribed subclinical HGA poisoning in species other than equids. Apparently healthy animals that tested positive for HGA presented a global increase of the serum acylcarnitines profile (component 1 comparison in Figure 1 and Table 4). This observation should be investigated further in equids, which represent most cases of *A. pseudoplatanus* poisoning. The apparently healthy animals with measurable serum HGA and/or MCPA-carnitine can be assimilated to healthy co-grazing horses in literature [42]. Co-grazing animals present no clinical signs but are exposed to *A. pseudoplatanus* as they pasture with horses suffering from atypical myopathy [6,44]. Apparently healthy animals with no detected HGA and MCPA-carnitine in serum can be assimilated to control horses [6,44]: they are healthy and not exposed to the toxin. In animals that were healthy in appearance but tested positive for MCPA-carnitine, the levels of free carnitine and acylcarnitines profile were higher compared to “controls” (i.e., non-exposed animals; Mann–Whitney test, $p = 0.0019$, Table 4), but lower compared to diseased animals (Mann–Whitney test, $p = 0.0062$).

Table 4. Component 1 (Mean $\pm$ SDM) and serum concentration ($\mu\text{mol/L}$) for the 3 groups of animals-PLS 1.

	HGA – MCPA – ($n = 49$)	HGA + MCPA – ($n = 10$)	HGA – or + MCPA + ($n = 16$)
Component 1	-1.087 ± 0.390 ^{a b}	0.818 ± 0.735 ^a	2.818 ± 1.557 ^b
C8:1-Carnitine	0.018 ± 0.001 ^{c d}	0.030 ± 0.005 ^c	0.068 ± 0.018 ^d
C10:2-Carnitine	0.007 ± 0.001 ^e	0.008 ± 0.001	0.014 ± 0.005 ^e
C14:1-Carnitine	0.020 ± 0.006 ^f	0.032 ± 0.011	0.219 ± 0.133 ^f
C12:1-Carnitine	0.038 ± 0.013	0.022 ± 0.008	0.049 ± 0.025
C16:1-Carnitine	0.045 ± 0.015 ^g	0.033 ± 0.009	0.649 ± 0.424 ^g

Only the 5 acylcarnitines of main interest are presented in this table. SDM stands for standard deviation mean. ^a Mann–Whitney test, $p = 0.0133$. ^b Mann–Whitney test, $p = 0.0019$. ^c Unpaired t test on log transformed data, $p = 0.0038$. ^d Unpaired t test on log transformed data, $p < 0.0001$. ^e Unpaired t test on log transformed data, $p = 0.0235$. ^f Unpaired t test on log transformed data, $p = 0.0395$. ^g Unpaired t test on log transformed data, $p = 0.0142$.

Regarding horses, the literature tends to describe *A. pseudoplatanus* poisoning like an on/off disease correlated with a multiple acyl-CoA dehydrogenases phenotype (MADD; [33,45]). It appears in this study that HGA poisoning might not be binary and probably results from a gradual fatty acid metabolism alteration.

4.2. Rumenal Hypoglycin A Metabolization

We describe for the first time HGA poisoning in *Bovidae*. Two gnus (*Connocchaetes taurinus taurinus*) exposed to *A. pseudoplatanus* in their enclosure presented severe clinical signs in the spring of 2021. In blood samples collected at that time, HGA and MCPA-carnitine were detected. This observation confirmed (i) exposition to HGA, (ii) HGA absorption and (iii) HGA metabolization into its active metabolite. Furthermore, in these two gnus (S12 and S13), a severe modification of the acylcarnitines profile was observed (Figure 2). The global increase of acylcarnitines has such a large amplitude that it masks the interspecies variation. This phenomenon reflects an alteration of the lipid catabolism, which is associated with the modified blood parameters, similar clinical signs as in equine atypical myopathy. Added to the exposition to *A. pseudoplatanus* during the risky season, there is a high probability that the two gnus were poisoned by toxins of this tree. Moreover, this poisoning seems to follow a similar pathophysiological pathway to the one described in atypical myopathy with equids.

Like equids, some foregut fermenters (Père David's deer, gnus) are now proven susceptible to this poisoning. This raises the question of the difference of sensitivity between species under a similar toxic pressure. Equids are, besides foregut fermenters, the species most subjected to *A. pseudoplatanus* poisoning.

Hypoglycin A is a small non-proteogenic amino acid. It is highly hydrophilic and soluble. Once ingested, HGA absorption takes place in the proximal small intestine [46]. The presence of a fermentation compartment proximal to the small intestine might be protective. Indeed, the toxic molecule may be transformed by rumen microbiota even more when the rumen retention time is long.

In equids, which have a fermenter compartment (i.e., caecum) distal to the HGA absorption area (i.e., small intestine), most of the ingested HGA is available for absorption. Serum HGA has been detected in mixed feeders (goats, sheep) [47]. In mixed feeders, HGA absorption could be explained by short rumen retention time and large salivary production coupled with a highly functional ventral groove [30,48]. Following initial chewing, the soluble amino acids, including HGA, bypass ruminal fermentation which leads HGA to be absorbed within the proximal small intestine.

Hypoglycin A ruminal transformation (and possibly degradation or metabolism) may explain why HGA was not observed in serum of cattle. The energetic strategy of these large grazers takes better advantages on fermentations with a big relative rumen size and a long rumen retention time. The rumen chyme is less liquid and the ventral groove less developed which both limit the rumen bypass [30,48]. It has to be noted that HGA has been detected in cow's milk [49]. In those cows, some HGA must have gotten through the rumen, which leads to the hypothesis that, under a high toxic pressure, even these grazers might be at risk of HGA poisoning.

The hypothesis that retention time of soluble molecules plays a role in the risk of HGA poisoning concurs with the observations in camelids. Indeed, camelids have previously been described as susceptible for clinical HGA poisoning [22], and despite having a relative rumen size and rumen microbiota close to the cattle [50,51], the camelids rumen retention time for liquids is short. The retention time is even shorter than in small ruminants [52–54] which makes ingested HGA likely to pass to the small intestine and to be absorbed. In a recent article, González-Medina and collaborators (2021) observed that HGA is not affected by a 2 h incubation time with ovine rumen fluid. This observation does not exclude a HGA rumen transformation as the ovine rumen retention time is 7–35 h for solutes and 10–50 h for dry matter [55,56].

Elephants, who are distal fermenters, might have, as equids, a high probability of HGA intestinal absorption when ingested. Four of the six sampled elephants were positive for HGA or MCPA-carnitine in their blood. Despite living on solid flooring with no possibility of directly eating *A. pseudoplatanus* seedlings, the elephants were still exposed to HGA from *A. pseudoplatanus* samaras, leaves and possibly contaminated hay or water. In these elephants, the concentrations of HGA were amongst the lowest of the observed and were not associated with a global increase of the serum acylcarnitines profile. This could be related to low quantities of serum HGA/MCPA-carnitine or to a different HGA impact on elephants' fatty acid catabolism.

If the morphophysiology of the gut is most probably linked to the risk of HGA poisoning, the feed intake might also play a part. This is especially relevant in animals kept in zoos, where the feeding supply and program can be challenging and divergent from natural ones. It must be mentioned that even though most atypical myopathy cases in equids are reported during autumn, the camels' and the gnus' occurrences took place during spring (i.e., resulting from seedlings ingestion). Our hypothesis at this point drifts from the discussion above. Spring feed might be waterier, especially when the HGA ingestion is linked to *A. pseudoplatanus* seedlings. This might be linked to the liquid chyme, which washes HGA through the rumen, decreasing the time the toxic molecule stays in the rumen. This way, most of the ingested HGA would avoid fermenter transformation and would favor its absorption.

As *A. pseudoplatanus* are largely distributed and since most of the herbivore species kept in zoos might be susceptible to HGA poisoning, measures should be taken to reduce exposure to the *A. pseudoplatanus* samaras and seedlings. Some of the protective measures described for sport or leisure equids [24] seem practically not implementable in zoos. Decreasing time on pasture, rotating meadows or seasonally moving to a low-risk enclosure would be unachievable in most cases. It appears necessary to assess the risk of exposition to *A. pseudoplatanus* before settling animals in a new enclosure. When the enclosures are exposed, the toxic pressure to the animals can be reduced by collecting the samaras or seedlings. Mowed vegetal material deserve a careful attention as it still represents a risk if left on the ground [57]. Other vegetal species associated with HGA poisoning should undergo the same preventative measures than *A. pseudoplatanus* [9]. This applies in particular to *Acer negundo* and *Acer palmatum* spp. commonly found as ornamental trees in zoological parks [58].

5. Conclusions

Acer pseudoplatanus is proven as responsible for clinical poisoning in camels, Père David's deer and now in gnus, with a similar pathophysiological pathway to the one described in equine atypical myopathy.

In this study, even though all examined herbivores were exposed to *A. pseudoplatanus*, proximal fermenters species seem to be less susceptible to HGA poisoning. Their gut morphophysiology may act as a protection as toxins may be transformed in the rumen. Indeed, the degree of protection against *A. pseudoplatanus* may be directly linked to the rumen retention time of soluble molecules.

Besides, we described a global increase of the serum acylcarnitines profile in apparently healthy animals which presented HGA or MCPA-carnitine in their blood. This new reported observation suggests a gradual fatty acid metabolism alteration in case of HGA poisoning and thus the existence of subclinical cases.

Author Contributions: Conceptualization, B.R., C.-J.K., A.-C.F., B.G. and D.-M.V.; methodology, B.R., C.-J.K., A.-C.F. and D.-M.V.; validation, F.B. and D.-M.V.; formal analysis, F.B.; investigation, B.R., C.-J.K. and B.G.; resources, L.G., C.B., L.B. and G.G.; data curation, B.R., C.-J.K., A.-C.F., D.-M.V., L.G., C.B. and L.B.; writing—original draft preparation, B.R., C.-J.K., A.-C.F. and D.-M.V.; writing—review and editing, B.R., C.-J.K., A.-C.F., L.G., C.B., L.B., F.B., G.G., B.G., T.P., P.G. and D.-M.V.; visualization, B.R.; supervision, D.-M.V. and P.G.; project administration, D.-M.V.; funding acquisition, D.-M.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by the la Wallonie agriculture SPW (Service public de Wallonie; Belgique) and by “Les Fonds Spéciaux pour la Recherche (FSR)” of Liege University (Liège, Belgium).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study. The whole procedure is part of routine veterinary practice to establish a diagnosis in case of disease.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article.

Acknowledgments: The authors thank David Stern, Claire Caron, Clovis Wouters and Benjamin Klein for their invaluable technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jager, E.; Rauschert, S.; Weinert, E.; Meusel, H. *Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. Bd 2*; Verlag, G.F., Ed.; Jena: Stuttgart, Germany, 1992.
2. Weidema, I.; Buchwald, E. *NOBANIS—Invasive Alien Species Fact Sheet—Acer pseudoplatanus*.—From: Online Database of the European Network on Invasive Alien Species—NOBANIS. Available online: <https://www.nobanis.org/> (accessed on 28 June 2022)
3. Hein, S.; Collet, C.; Ammer, C.; Goff, N.L.; Skovsgaard, J.P.; Savill, P. A review of growth and stand dynamics of *Acer pseudoplatanus* L. in Europe: Implications for silviculture. *Forestry* **2009**, *82*, 361–385. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpn043>.

4. Dixon, C.; Fyson, G.F.; Pasiecznik, N.; Praciak, A.; Rushforth, K.; Sassen, M.; Sheil, D.; Correia, C.S. *The CABI Encyclopedia of Forest Trees*; CABI: Wallingford, UK, 2013; ISBN 9781780642369.
5. Unger, L.; Nicholson, A.; Jewitt, E.M.; Gerber, V.; Hegeman, A.; Sweetman, L.; Valberg, S. Hypoglycin A Concentrations in Seeds of Acer Pseudoplatanus Trees Growing on Atypical Myopathy-Affected and Control Pastures. *J. Vet. Intern. Med.* **2014**, *28*, 1289–1293. <https://doi.org/10.1111/jvim.12367>.
6. Baise, E.; Habyarimana, J.A.; Amory, H.; Boemer, F.; Douny, C.; Gustin, P.; Marcillaud-Pitel, C.; Patarin, F.; Weber, M.; Votion, D.-M. Samaras and seedlings of Acer pseudoplatanus are potential sources of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy without necessarily inducing clinical signs. *Equine Vet. J.* **2016**, *48*, 414–417. <https://doi.org/10.1111/evj.12499>.
7. Westermann, C.; van Leeuwen, R.; van Raamsdonk, L.; Mol, H. Hypoglycin A Concentrations in Maple Tree Species in the Netherlands and the Occurrence of Atypical Myopathy in Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 880–884. <https://doi.org/10.1111/jvim.13927>.
8. Tanaka, K.; Kean, E.A.; Johnson, B. Jamaican Vomiting Sickness. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295*, 461–467. <https://doi.org/10.1056/NEJM197608262950901>.
9. Hassal, C.H.; Reyle, K. Hypoglycin A and B, two biologically active polypeptides from Blighia sapida. *Biochem. J.* **1954**, *60*, 334–339.
10. Mathew, J.L.; John, T.J.; Shrivastava, A.; Kumar, A.; Thomas, J.D.; Laserson, K.F.; Bhushan, G.; Carter, M.D. Exploration of association between litchi consumption and seasonal acute encephalopathy syndrome. *Indian Pediatr.* **2017**, *54*, 319–325. <https://doi.org/10.1007/s13312-017-1095-1>.
11. Shrivastava, A.; Kumar, A.; Thomas, J.D.; Laserson, K.F.; Bhushan, G.; Carter, M.D.; Chhabra, M.; Mittal, V.; Khare, S.; Sejvar, J.J.; et al. Association of acute toxic encephalopathy with litchi consumption in an outbreak in Muzaffarpur, India, 2014: A case-control study. *Lancet Glob. Heal.* **2017**, *5*, e458–e466. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30035-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30035-9).
12. Zhang, L.J.; Fontaine, R.E. Lychee-associated encephalopathy in China and its reduction since 2000. *Lancet Glob. Heal.* **2017**, *5*, e865. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30291-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30291-7).
13. Isenberg, S.L.; Carter, M.D.; Hayes, S.R.; Graham, L.A.; Mathews, T.P.; Harden, L.A.; Takeoka, G.R.R.; Thomas, J.D.D.; Pirkle, J.L.; Johnson, R.C.; et al. Quantification of Toxins in Soapberry (Sapindaceae) Arils: Hypoglycin A and Methylenecyclopropylglycine. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *64*, 5607–5613. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02478>. Quantification.
14. Valberg, S.; Sponseller, B.; Hegeman, A.; Earing, J.; Bender, J.; Martinson, K.; Patterson, S.; Sweetman, L. Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree. *Equine Vet. J.* **2013**, *45*, 419–426. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00684.x>.
15. van Galen, G.; Saegerman, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Patarin, F.; Amory, H.; Bailey, J.D.; Cassart, D.; Gerber, V.; Hahn, C.; Harris, P.; et al. European outbreaks of atypical myopathy in grazing horses (2006–2009): Determination of indicators for risk and prognostic factors. *Equine Vet. J.* **2012**, *44*, 621–625. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00555.x>.
16. Molenaar, F.; Piercy, R.; Dunkel, B.; Manning, N.; English, K.; Stidworthy, M.; Masters, N. Equine atypical myopathy associated with sycamore seed ingestion in a Przewalski foal. *J. Zoo Aquar. Res.* **2016**, *4*, 105–108.
17. Sherratt, H.S.A. Hypoglycin, the famous toxin of the unripe Jamaican ackee fruit. *Trends Pharmacol. Sci.* **1986**, *7*, 186–191. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(86\)90310-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(86)90310-X).
18. Melde, K.; Jackson, S.; Bartlett, K.; Stanley, H.; Sherratt, H.; Ghisla, S. Metabolic Consequences of Methylenecyclopropylglycine Poisoning in Rats. *Biochem. J.* **1991**, *274*, 395–400.
19. Hirz, M.; Gregersen, H.A.; Sander, J.; Votion, D.-M.; Schänzer, A.; Köhler, K.; Herden, C. Atypical myopathy in 2 Bactrian camels. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2021**, *33*, 961–965. <https://doi.org/10.1177/10406387211020721>.
20. Ikeda, Y.; Tanaka, K. Selective inactivation of various acyl-CoA dehydrogenases by (methylenecyclopropyl)acetyl-CoA. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1990**, *1038*, 216–221. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(90\)90208-W](https://doi.org/10.1016/0167-4838(90)90208-W).
21. Wenz, A.; Thorpe, C.; Ghisla, S. Inactivation of general acyl-CoA dehydrogenase from pig kidney by a metabolite of hypoglycin A. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 9809–9812.
22. Westermann, C.; Dorland, L.; Votion, D.-M.; de Sain-van der Velden, M.; Wijnberg, I.; Wanders, R.; Spliet, W.; Testerink, N.; Berger, R.; Ruiter, J.; et al. Acquired multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 10 horses with atypical myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **2008**, *18*, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.02.007>.
23. Votion, D.-M. Analysing hypoglycin A, methylenecyclopropylacetic acid conjugates and acylcarnitines in blood to confirm the diagnosis and improve our understanding of atypical myopathy. *Equine Vet. Educ.* **2016**, *11*, 1–2. <https://doi.org/10.1111/evj.12617>.
24. Votion, D.-M.; François, A.-C.; Kruse, C.; Renaud, B.; Farinelle, A.; Bouquieaux, M.-C.; Marcillaud-Pitel, C.; Gustin, P. Answers to the Frequently Asked Questions Regarding Horse Feeding and Management Practices to Reduce the Risk of Atypical Myopathy. *Anim. J.* **2020**, *10*, 365. <https://doi.org/10.3390/ani10020365>.
25. Chen, K.K.; Anderson, R.C.; McCowen, M.C.; Harris, P.N. Pharmacologic Action of Hypoglycin A and B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1957**, *121*, 272–285.
26. Bunert, C.; Langer, S.; Votion, D.-M.; Boemer, F.; Müller, A.; Ternes, K.; Liesegang, A. Atypical myopathy in Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) associated with ingestion of hypoglycin A. *J. Anim. Sci.* **2018**, *96*, 3537–3547. <https://doi.org/10.1093/jas/sky200>.

27. Bochnia, M.; Ziemssen, E.; Sander, J.; Stief, B.; Zeyner, A. Methylenecyclopropylglycine and hypoglycin A intoxication in three Père David's Deers (*Elaphurus davidianus*) with atypical myopathy. *Vet. Med. Sci.* **2020**, *7*, 1–8. <https://doi.org/10.1002/vms3.406>.
28. Simms, E.L. Defining tolerance as a norm of reaction. *Evol. Ecol.* **2000**, *14*, 563–570. <https://doi.org/10.1023/A:1010956716539>.
29. Hofmann, R.R. East African monographs in biology. In *The Ruminant Stomach. Stomach Structure and Feeding Habits of East African Game Ruminants*; East African Literature Bureau: Nairobi, Kenya, 1973; Volume 2.
30. Hofmann, R.R. Comparative anatomical studies imply adaptive variations of ruminant digestive physiology. *Can. J. Anim. Sci.* **1984**, *64*, 203–205.
31. Rowell-Schäfer, A.; Lechner-Doll, M.; Hofmann, R.; Streich, W.; Güven, B.; Meyer, H.H. Metabolic evidence of a 'rumen bypass' or a 'ruminal escape' of nutrients in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2001**, *128*, 289–298. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(00\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(00)00305-6).
32. Boemer, F.; Deberg, M.; Schoos, R.; Baise, E.; Amory, H.; Gault, G.; Carlier, J.; Gaillard, Y.; Marcillaud-Pitel, C.; Votion, D.-M. Quantification of hypoglycin A in serum using aTRAQ® assay. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *997*, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.06.004>.
33. Boemer, F.; Detilleux, J.; Cello, C.; Amory, H.; Marcillaud-Pitel, C.; Richard, E.; van Galen, G.; Van Loon, G.; Lefere, L.; Votion, D.-M. Acylcarnitines profile best predicts survival in horses with atypical myopathy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182761>.
34. Chace, D.H.; Pons, R.; Chiriboga, C.A.; McMahon, D.J.; Tein, I.; Naylor, E.W.; De Vivo, D.C. Neonatal Blood Carnitine Concentrations: Normative Data by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Pediatr. Res.* **2003**, *53*, 823–829. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000059220.39578.3D>.
35. Chong, I.-G.; Jun, C.-H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2005**, *78*, 103–112. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOLAB.2004.12.011>.
36. Palermo, G.; Piraino, P.; Zucht, H.-D. Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry Performance of PLS regression coefficients in selecting variables for each response of a multivariate PLs for omics-type data. *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* **2009**, *2*, 57–70.
37. van Galen, G. Epidemiological and Pathophysiological Study of Atypical Myopathy in Grazing Horses. Ph.D. Thesis, University of Liege, Liège, Belgium, 2012.
38. Anonymous Atypical myoglobinuria: A new disease in horses? *Vet. Rec.* **1985**, *116*, 86–87.
39. Votion, D.-M.; van Galen, G.; Sweetman, L.; Boemer, F.; de Tullio, P.; Dopagne, C.; Lefere, L.; Mouithys-Mickalad, A.; Patarin, F.; Rouxhet, S.; et al. Identification of methylenecyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Vet. J.* **2014**, *46*, 146–149. <https://doi.org/10.1111/evj.12117>.
40. Bochnia, M.; Scheidemann, W.; Ziegler, J.; Sander, J.; Vollstedt, S.; Glatter, M.; Janzen, N.; Terhardt, M.; Zeyner, A. Predictive value of hypoglycin A and methylenecyclopropylacetic acid conjugates in a horse with atypical myopathy in comparison to its co-grazing partners. *Equine Vet. Educ.* **2018**, *30*, 24–28. <https://doi.org/10.1111/eve.12596>.
41. Sander, J.; Terhardt, M.; Janzen, N. Study on the Metabolic Effects of Repeated Consumption of Canned Ackee. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 14603–14609. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06235>.
42. Votion, D.-M.; Linden, A.; Saegerman, C.; Engels, P.; Ericpicum, M.; Thiry, E.; Delguste, C.; Rouxhet, S.; Demoulin, V.; Navet, R.; et al. History and Clinical Features of Atypical Myopathy in Horses in Belgium (2000–2005). *J. Vet. Intern. Med.* **2007**, *21*, 1380–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb01962.x>.
43. Votion, D.-M.; Linden, A.; Delguste, C.; Amory, H.; Thiry, E.; Engels, P.; van Galen, G.; Navet, R.; Sluse, F.; Serteyn, D.; et al. Atypical myopathy in grazing horses: A first exploratory data analysis. *Vet. J.* **2009**, *180*, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.01.016>.
44. Bochnia, M.; Ziegler, J.; Sander, J.; Uhlig, A.; Schaefer, S.; Vollstedt, S.; Glatter, M.; Abel, S.; Recknagel, S.; Schusser, G.F.; et al. Hypoglycin A content in blood and urine discriminates horses with atypical Myopathy from clinically normal horses grazing on the same pasture. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136785>.
45. Westermann, C.; Dorland, L.; van Diggelen, O.; Schoonderwoerd, K.; Bierau, J.; Waterham, H.; van der Kolk, J. Decreased oxidative phosphorylation and PGAM deficiency in horses suffering from atypical myopathy associated with acquired MADD. *Mol. Genet. Metab.* **2011**, *104*, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.07.022>.
46. Krägeloh, T.; Cavalleri, J.; Ziegler, J.; Sander, J.; Terhardt, M.; Breves, G.; Cihak, A. Identification of hypoglycin A binding adsorbents as potential preventive measures in co-grazers of atypical myopathy affected horses. *Equine Vet. J.* **2018**, *50*, 220–227. <https://doi.org/10.1111/evj.12723>.
47. González-Medina, S.; Bevin, W.; Alzola-Domingo, R.; Chang, Y.-M.; Piercy, R. Hypoglycin A absorption in sheep without concurrent clinical or biochemical evidence of disease. *J. Vet. Intern. Med.* **2021**, 1–7. <https://doi.org/10.1111/jvim.16077>.
48. Hofmann, R.R.; Streich, W.; Fickel, J.; Hummel, J.; Clauss, M. Convergent evolution in feeding types: Salivary gland differences in wild ruminant species. *J. Morphol.* **2008**, *269*, 240–257. <https://doi.org/10.1002/jmor.10580>.
49. Bochnia, M.; Ziegler, J.; Glatter, M.; Zeyner, A. Hypoglycin A in Cow's Milk—A Pilot Study. *Toxins* **2021**, *13*, 381. <https://doi.org/10.3390/toxins13060381>.
50. Williams, V.J. Rumen Function in the Camel. *Nature* **1963**, *197*, 1221–1221. <https://doi.org/10.1038/1971221a0>.

51. Ghosal, A.; Tanwar, R.; Dwaraknath, P. Note on rumen microorganisms and fermentation pattern in camel. *Ind. J. Anim. Sci.* **1981**, *51*, 1011–1012.
52. Maloiy, G. Comparative studies on digestion and fermentation rate in the fore-stomach of the one-humped camel and the Zebu steer. *Res. Vet. Sci.* **1972**, *13*, 476–481.
53. Farid, M.; Shaker, S.; Abdel-Rahman, M. *The Nutrition of Camels and Sheep Under Stress*; W. Ross Co.: Kansas City, MO, USA; Scandinavian Institute of African Studies: Stockholm, Sweden, 1984; ISBN 9171062289.
54. Kayouli, C.; Jouany, J.P.; Ben Amor, J. Comparison of microbial activity in the forestomachs of the dromedary and the sheep measured in vitro and in sacco on mediterranean roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1991**, *33*, 237–245. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(91\)90063-X](https://doi.org/10.1016/0377-8401(91)90063-X).
55. Pinares-Patiño, C.S.; Ebrahimi, S.H.; Mcewan, J.C.; Dodds, K.G.; Clark, H.; Luo, D. Is rumen retention time implicated in sheep differences in methane emission? In Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production 2011, Invercargill, New Zealand, 29 June–1 July 2011; Volume 71, pp. 219–222.
56. Clauss, J.; Hummel, J.; Streich, W.J. The dissociation of the fluid and particle phase in the forestomach as a physiological characteristic of large grazing ruminants: An evaluation of available, comparable ruminant passage data. *Eur. J. Wildl. Res.* **2006**, *52*, 88–98. <https://doi.org/10.1007/s10344-005-0024-0>.
57. González-Medina, S.; Montesso, F.; Chang, Y.-M.; Hyde, C.; Piercy, R.J. Atypical myopathy-associated hypoglycin A toxin remains in sycamore seedlings despite mowing, herbicidal spraying or storage in hay and silage. *Equine Vet. J.* **2019**, *51*, 701–704. <https://doi.org/10.1111/evj.13070>.
58. Fowden, L.; Pratt, H. Cyclopropylamino acids of the genus Acer: Distribution and biosynthesis. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1677–1681. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80387-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80387-5).

Conclusion à l'article 2

Cette étude élargit la compréhension de l'intoxication à l'HGA au-delà des équidés et montre que plusieurs espèces herbivores peuvent être exposées aux toxines de l'érable sycomore. Pour la première fois, des cas cliniques ont été décrits chez des bovidés, confirmant que cette intoxication ne se limite pas aux chevaux et aux cervidés.

Les résultats obtenus mettent également en évidence une variabilité de sensibilité entre espèces. Les animaux à fermentation proximale, tels que certains ruminants, semblent relativement protégés, probablement en raison de leur morpho-physiologie digestive qui favorise la transformation ou la dégradation des toxines dans le rumen. Cette protection n'est toutefois pas absolue, comme l'atteste la survenue de cas cliniques chez certaines espèces de ruminants sauvages.

En parallèle, l'analyse du profil des acylcarnitines révèle des modifications notables chez des animaux apparemment sains mais chez qui de l'HGA et/ou du MCPA-carnitine ont été détectés dans leur sang. Cette observation qui est couplée, pour certains individus, à une modification du profil des acylcarnitines, indique l'existence de formes subcliniques. Cette altération du métabolisme lipidique suggère le risque d'apparition de signes cliniques.

Ainsi, cette étude confirme que l'HGA constitue un risque « toutes espèces » pour les herbivores pâturant à proximité d'érables sycomores. Elle souligne l'importance de prendre en compte la diversité interspécifique dans l'évaluation des risques, en particulier pour les animaux de parcs zoologiques souvent exposés à ces arbres en Europe. Elle met également en avant la pertinence du profil des acylcarnitines comme outil d'exploration des intoxications subcliniques, ouvrant de nouvelles perspectives pour la prévention et la surveillance des intoxications liées à l'HGA.

M. ARTICLE 3

Introduction à l'article 3

Les recherches antérieures ont montré que la MA résulte de l'ingestion d'HGA contenue dans les samares et plantules d'érable sycomore. Depuis son apparition dans les années 2000 en Europe, cette intoxication constitue une cause fréquente de mortalité chez les chevaux au pâturage.

Si la voie d'exposition directe par ingestion de matériel végétal contenant les toxines est bien établie, plusieurs cas rapportés de poulains non sevrés atteints de MA ont conduit les chercheurs à s'interroger sur d'autres voies possibles. Deux hypothèses principales ont été envisagées : un transfert transplacentaire de la toxine ou une excrétion de l'HGA et/ou de ses métabolites dans le lait maternel.

L'objectif de cette étude a donc été de déterminer si l'HGA et/ou la MCPA-carnitine pouvaient être détectées dans le lait de juments exposées à des érables sycomores. Cette investigation visait à évaluer le risque d'exposition indirecte des poulains allaités, mais également à envisager d'éventuelles implications en matière de sécurité alimentaire, en particulier pour les consommateurs de lait cru ou de produits laitiers provenant d'animaux exposés.

Brief Report

Grazing Mares on Pasture with Sycamore Maples: A Potential Threat to Suckling Foals and Food Safety through Milk Contamination

Benoît Renaud ^{1,*}, Anne-Christine François ¹, François Boemer ², Caroline Kruse ³, David Stern ⁴, Amandine Piot ², Thierry Petitjean ⁵, Pascal Gustin ¹ and Dominique-Marie Votion ⁴

- ¹ Department of Functional Sciences, Pharmacology and Toxicology, Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; acfrancois@uliege.be (A.-C.F.); p.gustin@uliege.be (P.G.)
 - ² Biochemical Genetics Laboratory, CHU Sart Tilman, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; f.boemer@chuliege.be (F.B.); amandine.piot@chuliege.be (A.P.)
 - ³ Department of Functional Sciences, Physiology and Sport Medicine, Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; caroline.kruse@uliege.be
 - ⁴ Equine Pole, Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; d.stern@uliege.be (D.S.); dominique.votion@uliege.be (D.-M.V.)
 - ⁵ Association Régionale de Santé et d'Identification Animales (ARSIA—ASBL), Animal Health Department, 5590 Ciney, Belgium; thierry.petitjean@arsia.be
- * Correspondence: benoit.renaud@uliege.be



Citation: Renaud, B.; François, A.-C.; Boemer, F.; Kruse, C.; Stern, D.; Piot, A.; Petitjean, T.; Gustin, P.; Votion, D.-M. Grazing Mares on Pasture with Sycamore Maples: A Potential Threat to Suckling Foals and Food Safety through Milk Contamination. *Animals* **2021**, *11*, 87. <https://doi.org/10.3390/ani11010087>

Received: 9 December 2020
Accepted: 28 December 2020
Published: 5 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Equine atypical myopathy is seasonal poisoning resulting from the ingestion of seeds and seedlings of the sycamore maple that contains toxins. Literature mentions several cases of intoxication among gravid mares and in unweaned foals. The objective of this study was to determine whether the toxins responsible for atypical myopathy could pass to the foal via suckling. Four mares that were pasturing with sycamore in the vicinity were milked. Analysis revealed the presence of toxins in milk. This unprecedented observation could partially explain cases of unweaned foals suffering from atypical myopathy. However, a transplacental transfer of the toxin cannot be excluded for newborn cases. Besides being a source of contamination for offspring, milk contamination by toxins from fruits of trees of the *Sapindaceae* family might constitute a potential risk for food safety regarding other species' raw milk or dairy products.

Abstract: Equine atypical myopathy (AM) is seasonal intoxication resulting from the ingestion of seeds and seedlings of the sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) that contain toxins, among them, hypoglycin A (HGA). Literature mentions several cases of AM among gravid mares and in unweaned foals. The objective of this study was to determine whether HGA and/or its metabolite are present in milk from grazing mares exposed to sycamore maple trees as confirmed by detection of HGA and its metabolite in their blood. Four mare/foal couples were included in the study. Both HGA and its metabolite were detectable in all but one of the milk samples. To our knowledge, this is the first study describing transfer of HGA to the milk. This unprecedented observation could partially explain cases of unweaned foals suffering from AM. However, a transplacental transfer of the toxin cannot be excluded for newborn foals. Besides being a source of contamination for offspring, milk contamination by toxins from fruits of trees of the *Sapindaceae* family might constitute a potential risk for food safety regarding other species' raw milk or dairy products.

Keywords: equine atypical myopathy; *Acer* spp.; milk; toxins; environment

1. Introduction

Atypical myopathy (AM) is a non-exercise-induced rhabdomyolysis syndrome that strikes grazing equids on a seasonal rhythm. This condition has been initially described in the 1980s in the United Kingdom [1], but was later reported in about 15 European countries [2], in the US [3], and in New Zealand [4].

It was first discovered that AM occurs following ingestion of the toxin hypoglycin A (HGA) mainly present in seeds [5] and seedlings [6] of some species of the *Acer* genus. In Europe, the sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) is the main incriminated species [5,7]. However, in North America, the main threat is the box elder (*Acer negundo*) [3]. In 2019, a second toxin, methylenecyclopropylglycine (MCPG), has been described as playing a part in the ethiopathogenicity of AM [8]. This toxin is a structural analog of HGA, and is also present in sycamore maple seeds [9]. To our knowledge, MCPG has not been sought in seedlings but might also be present.

The active metabolites of HGA and MCPG that are, respectively, methylenecyclopropylacetyl-CoA (MCPA-CoA), and methylenecyclopropylformyl-CoA (MCPF-CoA), are potent inhibitors of enzymes participating in β -oxidation and thus energy production from lipid metabolism [10]. This results in severe energetic impairment in oxidative muscles such as postural, respiratory muscles, and the myocardium [11]. The metabolic disturbances induced by the toxins result in increased concentrations of blood acylcarnitines [12] to an extent that reflects the severity of the toxic process [13]. Both HGA and MCPG, as well as their toxic metabolites, conjugated to carnitine or glycine have been detected in the blood or urine of affected horses [8,14].

It has been previously published that HGA can be detected in the serum of unaffected co-grazing horses [6] while its metabolite, MCPA-carnitine, was found at either very low levels or below the detection limit [8] in the serum of these healthy co-grazers. This confirms the existence of subclinical cases [15].

Literature mentions several cases of AM among gravid mares and in unweaned foals [2]. In 2018, Karlíková et al. reported a newborn foal with signs of AM [16]. This case-report describes a foal born at full term from a mare which recovered from AM during the sixth month of pregnancy. The diagnosis of AM for the foal and the mare resulted from a combination of compatible clinical signs and results from analyses of the foal's blood with a severely increased activity of the serum creatine kinase (CK), presence of MCPA-carnitine and increased concentration of acylcarnitines. Neither the mare nor the foal was tested for HGA. Authors of this case-report suggest two hypotheses to explain that this newborn foal was affected by AM. The first hypothesis points to a possible excretion of HGA or its metabolites into the mare's milk and the second one to a transplacental toxin transfer.

The objective of this study was to determine whether HGA or MCPA-carnitine are present in milk from mares exposed to sycamore maple trees.

2. Materials and Methods

2.1. Animal Selection

From autumn 2018 to spring 2019, blood samples were collected at admission from every horse with a tentative diagnosis of AM at the referral equine hospital of the University of Liège (CVU-ULiège). Whenever possible, blood samples were taken from their equine co-grazers, at pasture, within 24 h of admission of the AM case. When unweaned foals were present, blood and milk from the mares were sampled too.

The Animal Ethics Committee of the University of Liège was consulted. All procedures of this study are in accordance with the national and international guidelines for animal welfare. Since the whole procedure is part of routine veterinary practice to establish a diagnosis or to prevent AM, an agreement number was not required. Owners gave informed consent for their horses' inclusion in the study.

Among the suspected cases of AM or healthy cograzers, four mare/foal pairs were included in the study. All of the pairs had been exposed to sycamore maple trees on pastures located in Belgium. For the selected cases, age, breed, gender and date of sampling were

collected (Table 1). Foals 1, 3, and 4 were referred to the CVU-ULiège with a suspicion of AM. Following a diagnostic algorithm for AM, that has been previously described and used in other [2], only foal 4 was confirmed as AM. Indeed, foal 4 was the only one presenting both pigmenturia and a serum creatine kinase activity over 10,000 UI/L (Table 2). The tentative diagnosis of AM has been corrected into enterocolitis for foals 1 and *Rhodococcus equi* infection for foal 3. Foal 2 and mare 2 were sampled on the field as healthy cograzers of a horse confirmed for AM at the CVU-ULiège.

Table 1. Breed and age of the selected cases.

	Animals	Breed	Sex	Age	Diagnosis
1	Foal 1	Paint Horse	male	58 days	Enterocolitis
	Mare 1	Paint Horse	female	8 years	Healthy cograzer
2	Foal 2	Franches-Montagnes	male	128 days	Healthy cograzer
	Mare 2	Franches-Montagnes	female	18 years	Healthy cograzer
3	Foal 3	Quarter Horse	female	37 days	<i>R. equi</i> infection
	Mare 3	Quarter Horse	female	10 years	Healthy cograzer
4	Foal 4	Zangersheide	male	171 days	Atypical myopathy
	Mare 4	Zangersheide	female	22 years	Healthy cograzer

Table 2. HGA and MCPA-carnitine concentration in blood and milk.

	Animals	Sample Type	Sampling Date	HGA (μmol/L)	MCPA-Carnitine (nmol/L)	Creatine Kinase Activity (UI/L)
1	Foal 1	blood	24 May 2019	0.12	1.39	<20
	Mare 1	blood	28 May 2019	nd	0.35	/
		milk	28 May 2019	0.01 *	2.03	/
2	Foal 2	blood	11 November 2018	0.89	0.66	155
	Mare 2	blood	11 November 2018	0.80	0.52	/
		milk	12 November 2018	nd	0.00	/
3	Foal 3	blood	28 May 2019	0.27	0.75	<20
	Mare 3	blood	28 May 2019	0.29	8.16	/
		milk	28 May 2019	0.06 *	4.85	/
4	Foal 4	blood	19 October 2018	1.60	39.80	27,712
	Mare 4	blood	20 October 2018	0.59	2.82	/
		milk	20 October 2018	0.02 *	9.47	/

nd: not determined, * modified protocol.

2.2. Blood and Milk Sampling

Whole blood was collected by jugular venipuncture and from each mare, 3 to 5 mL of milk were obtained by hand milking. Collected blood and milk were kept at 4 °C before to be aliquoted within the hour and stored at −80 °C up to analysis.

It is of note that for reasons beyond our control, milk and blood sampling in mare 1 was performed four days after the mare returned to the stable and not during admission with its foal.

2.3. Hypoglycin A Assay

HGA in serum was performed according to a previously described protocol [17]. Quantification of HGA was carried out using a TRAQ[®] kit for amino acid analysis of physiological fluids (Sciex, Farmingham, MA, USA). Samples' HGA was derivatized using an isotopic tag (mass *m/z* 121), while a second labeling reagent (mass *m/z* 113) allowed absolute quantification. Derivatized samples were introduced into a TQ5500

tandem mass spectrometer (Sciex, Farmingham, MA, USA) using a Prominence AR HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan). This method presented a lower limit of quantification of 0.090 $\mu\text{mol/L}$ [17].

To improve method sensitivity on milk's sample, milk's HGA was assessed using a slightly modified protocol. Briefly, we increased the initial sample volume ($40 > 80 \mu\text{L}$) and the injection volume into the analytical system ($10 > 25 \mu\text{L}$).

2.4. MCPA-Carnitine Determination Method

MCPA-carnitine separation and determination were carried out by ultra-performance liquid chromatography combined with subsequent mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as reported by Valberg et al. in 2013. The corresponding limit of detection is approximately 0.001 nmol/L [3].

3. Results

The selected cases were from various breeds: paint horse, quarter horse, Zangersheide, and light draft horse. The foals were 1 to 5-months old, which implies that none of them was exclusively milk-fed at the time of sampling (Table 1).

Hypoglycin A was detectable in milk samples of mares 1, 3 and 4. In all but one milk sample (mare 2), MCPA-carnitine was found at a concentration above 2 nmol/L (Table 2).

Mares 2, 3, and 4 had a measurable amount of HGA in their blood (Table 2). This observation fits with their exposure to sycamore maple. No HGA was detected in the blood of mare 1. Despite none of the mares showing clinical signs, all mares presented MCPA-carnitine in their blood. The detected concentrations of MCPA-carnitine ranged from 0.35 nmol/L to 8.16 nmol/L.

All four foals had HGA and MCPA-carnitine in their blood but foal 4 presented a serum MCPA-carnitine concentration several times higher than the others.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to describe HGA and MCPA-carnitine transfer to the milk from mares that are exposed to seedlings or samaras of the sycamore maples.

On the one hand, HGA concentrations measured in milk (mean $\pm$ SD = $2.90 \times 10^{-2} \pm 2.57 \times 10^{-2} \mu\text{mol/kg}$, $n = 3$) are far smaller than the HGA concentration in autumnal sycamore maple seeds in Europe as reported by the literature [6]. Nevertheless, the question of foals' sensitivity to HGA is unknown. In 2006, Blake and collaborators described a maximum tolerated dose (MTD) of HGA for rats. Using a repeated dosing toxicity over 30 days, the MTD in feed was 1.50 mg HGA/kg/day [18]. Above this dose, rats presented appreciable organ dysfunction, reduction in life span or at least 10% retardation of body weight gain in growing animals. Extrapolation of this dose to a 40 kg foal, without allometric scaling, yields a maximum tolerated HGA dose of 60 mg/foal/day. This hypothetical MTD would correspond to the unlikely quantity of more than 14,000 L of milk per foal and per day. These figures are highly speculative: foals may be impacted by HGA toxicity very different levels from rats or adult horses. Also, while being an acute disorder, AM appears following several days of exposure to the toxins [19] suggesting an accumulation of toxins before the onset of clinical signs. Therefore, the MTD based on the daily consumption of milk may not reflect the actual risk of intoxication. On the other hand, the MCPA-carnitine concentrations measured in milk (0.00 to 9.47 nmol/L) are close to the minimal observation of 0.96 nmol/L quantified in serum of a horse affected by AM [7].

In this study, all four foals were unweaned but too old to be exclusively milk-fed. The majority of the HGA detected in the blood most likely originates from ingested sycamore samaras/seedlings. However, HGA milk contamination takes part in the toxic pressure. Both HGA and MCPA-carnitine transfer through milk could contribute to cases of unweaned foals suffering from AM. This brings out a new risk factor associated with grazing lactating mares and/or milk banking. Besides, in newborn foals, a transplacental transfer of the toxins could contribute to the risk of AM.

It should be noted that the second incriminated toxin MCPG and its metabolite (i.e., MCPF) might transfer to milk too.

Other toxins present in feed are incriminated in milk contamination in various species, including horses. Multiple publications exist about mycotoxins in milk [20]. Aflatoxins B1, G1, and M1 are reported in milk from lactating animals that ingest contaminated feed [21]. As it can be expected for HGA, aflatoxin concentration in milk changes during the year, following the seasonal pattern of the mother intakes [22]. In addition to raw milk, aflatoxins were found in milk products like cheese and yogurts. One of the toxin responsible for AM—i.e., HGA—was described as heat resistant in aqueous solution for half an hour at 60 °C [23] and stable over time in dry vegetal matrix [24]. Therefore, HGA could also represent a threat to food safety.

Even if in western Europe, horse and donkey milk consumption is currently expanding due to their supposed health-enhancing properties [25], HGA contaminated mare's milk seems unlikely to trigger an acute intoxication. However, low-dose and long-term exposure to HGA has never been investigated. Unpublished data also reveals that HGA and MCPA-carnitine can be found in blood from multiple ruminant species. Therefore, contamination of raw milk and milk products from other milk-producing species such as cows, sheep, and goats may be problematic. The search for toxins in milk from small and large ruminants exposed to sycamore maples is required to evaluate the potential risk.

Human exposure to HGA and MCPG is already related to worldwide illness-outbreaks through the ingestion of fruits from the *Sapindaceae* family [26,27]. It should be noted that sycamore maple belongs to the same family. Two diseases are reported, each of them with a different symptomatology. The first one, the Jamaican vomiting sickness, is associated with the consumption of unripe akee fruit [26]. The second one is an acute toxic encephalopathy which is linked to litchi fruit [28]. In regions where these diseases are endemic, ingestion of fruits from trees of the *Sapindaceae* family and/or raw milk and dairy products from grazing animals exposed to above-mentioned fruits could result in HGA contamination of mother's breast milk. This increases risks for children, which are already the most vulnerable to HGA toxicity.

5. Conclusions

Grazing mares in pasture exposed to seedlings and samaras of sycamore maple present in their milk HGA and MCPA-carnitine. This unprecedented information reveals a new route of exposure of foals that could explain reported cases of AM in unweaned foals.

Contamination with HGA could represent a risk for suckling foals and to food safety by consumption of mare's milk or potentially raw milk or dairy product from others species' milk. This should be further investigated as in temperate European regions seasonal pasture management could decrease the risk.

Author Contributions: Data curation, D.S.; Funding acquisition, D.-M.V.; Investigation, D.-M.V. and B.R.; Resources, B.R. and D.S.; Laboratory analyses: F.B., A.P.; Supervision, D.-M.V. and P.G.; Writing—original draft, B.R.; Writing—review and editing, A.-C.F., F.B., D.-M.V., T.P., A.P., P.G., and C.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was supported by the la Wallonie agriculture SPW (Service public de Wallonie; Belgique), l'Institut français du cheval et de l'équitation of France and by "Les Fonds Spéciaux pour la Recherche (FSR)" of Liege University (Belgium).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study the whole procedure is part of routine veterinary practice to establish a diagnosis or to prevent atypical myopathy.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from the owners of animals involved in the study.

Data Availability Statement: Restrictions apply to the availability of these data. Data was obtained from owners of horses and are available from the authors with the permission of owners of the animal involved.

Acknowledgments: The authors thank all communicating veterinarians and owners of affected horses for their collaboration.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hosie, B.; Gould, P.; Hunter, A.; Low, J.; Munro, R.; Wilson, H. Acute myopathy on horses at grass on east and south east Scotland. *Vet. Rec.* **1986**, *118*, 444–449. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Van Galen, G.; Pitel, C.M.; Saegerman, C.; Patarin, F.; Amory, H.; Baily, J.D.; Cassart, D.; Gerber, V.; Hahn, C.; Harris, P.; et al. European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006–2009): Spatiotemporal distribution, history and clinical features. *Equine Vet. J.* **2012**, *44*, 614–620. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Valberg, S.; Sponseller, B.; Hegeman, A.; Earing, J.; Bender, J.; Martinson, K.; Patterson, S.; Sweetman, L. Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree. *Equine Vet. J.* **2013**, *45*, 419–426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- McKenzie, R.K.; Hill, F.I.; Habyarimana, J.A.; Boemer, F.; Votion, D.-M. Detection of hypoglycin A in the seeds of sycamore (*Acer pseudoplatanus*) and box elder (*A. negundo*) in New Zealand; the toxin associated with cases of equine atypical myopathy. *N. Z. Vet. J.* **2016**, *64*, 182–187. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Unger, L.; Nicholson, A.; Jewitt, E.M.; Gerber, V.; Hegeman, A.; Sweetman, L.; Valberg, S. Hypoglycin A Concentrations in Seeds of *Acer Pseudoplatanus* Trees Growing on Atypical Myopathy-Affected and Control Pastures. *J. Vet. Intern. Med.* **2014**, *28*, 1289–1293. [\[CrossRef\]](#)
- Baise, E.; Habyarimana, J.A.; Amory, H.; Boemer, F.; Douny, C.; Gustin, P.; Marcillaud-Pitel, C.; Patarin, F.; Weber, M.; Votion, D.-M. Samaras and seedlings of *Acer pseudoplatanus* are potential sources of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy without necessarily inducing clinical signs. *Equine Vet. J.* **2016**, *48*, 414–417. [\[CrossRef\]](#)
- Votion, D.-M.; van Galen, G.; Sweetman, L.; Boemer, F.; de Tullio, P.; Dopagne, C.; Lefere, L.; Mouithys-Mickalad, A.; Patarin, F.; Rouxhet, S.; et al. Identification of methylenecyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Vet. J.* **2014**, *46*, 146–149. [\[CrossRef\]](#)
- Bochnia, M.; Sander, J.; Ziegler, J.; Terhardt, M.; Sander, S.; Janzen, N.; Cavalleri, J.-M.; Zuraw, A.; Wensch-Dorendorf, M.; Zeyner, A. Detection of MCPG metabolites in horses with atypical myopathy. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211698. [\[CrossRef\]](#)
- Fowden, L.; Pratt, H. Cyclopropylamino acids of the genus *Acer*: Distribution and biosynthesis. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 1677–1681. [\[CrossRef\]](#)
- Melde, K.; Jackson, S.; Bartlett, K.; Sherratt, H.S.A.; Ghisla, S.; Stanley, H. *Metabolic Consequences of Methylenecyclopropylglycine Poisoning in Rats*; Portland Press: London, UK, 1991; Volume 274, pp. 395–400. [\[CrossRef\]](#)
- Cassart, D.; Baise, E.; Cherel, Y.; Delguste, C.; Antoine, N.; Votion, D.-M.; Amory, H.; Rollin, F.; Linden, A.; Coignoul, F.; et al. Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy. *Equine Vet. J.* **2007**, *39*, 26–32. [\[CrossRef\]](#)
- Westermann, C.; Dorland, L.; Votion, D.-M.; de Sain-van der Velden, M.; Wijnberg, I.; Wanders, R.; Spliet, W.; Testerink, N.; Berger, R.; Ruiter, J.; et al. Acquired multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 10 horses with atypical myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **2008**, *18*, 355–364. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Boemer, F.; Detilleux, J.; Cello, C.; Amory, H.; Marcillaud-Pitel, C.; Richard, E.; van Galen, G.; van Loon, G.; Lefere, L.; Votion, D.-M. Acylcarnitines profile best predicts survival in horses with atypical myopathy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182761. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Van Galen, G.; Votion, D.-M. Gestion des cas, traitement et prévention chez les compagnons de pâture lors de myopathie atypique. *Prat. Vét. Équine* **2014**, *46*, 16–21. (In French)
- Votion, D.-M.; Linden, A.; Saegerman, C.; Engels, P.; Erpicum, M.; Thiry, E.; Delguste, C.; Rouxhet, S.; Demoulin, V.; Navet, R.; et al. History and Clinical Features of Atypical Myopathy in Horses in Belgium (2000–2005). *J. Vet. Intern. Med.* **2007**, *21*, 1380–1391. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Karlíková, R.; Šírká, J.; Mech, M.; Friedecký, D.; Janečková, H.; Mádrová, L.; Hrdinová, F.; Drábková, Z.; Dobešová, O.; Adam, T.; et al. Newborn foal with atypical myopathy. *J. Vet. Intern. Med.* **2018**, *32*, 1–5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Boemer, F.; Deberg, M.; Schoos, R.; Baise, E.; Amory, H.; Gault, G.; Carlier, J.; Gaillard, Y.; Marcillaud-Pitel, C.; Votion, D.-M. Quantification of hypoglycin A in serum using aTRAQ® assay. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *997*, 75–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Blake, O.A.; Bennink, M.R.; Jackson, J.C. Ackee (*Blighia sapida*) hypoglycin A toxicity: Dose response assessment in laboratory rats. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 207–213. [\[CrossRef\]](#)
- Van Galen, G.; Saegerman, C.; Marcillaud-Pitel, C.; Patarin, F.; Amory, H.; Baily, J.D.; Cassart, D.; Gerber, V.; Hahn, C.; Harris, P.; et al. European outbreaks of atypical myopathy in grazing horses (2006–2009): Determination of indicators for risk and prognostic factors. *Equine Vet. J.* **2012**, *44*, 621–625. [\[CrossRef\]](#)
- Fakhri, Y.; Ghorbani, R.; Taghavi, M.; Keramati, H.; Amanidaz, N.; Moradi, B.; Nazari, S.H.; Shariatifar, N.; Khaneghah, A.M. Concentration and prevalence of aflatoxin M1 in human breast milk in Iran: Systematic review, meta-analysis, and carcinogenic risk assessment: A review. *J. Food Prot.* **2019**, *82*, 785–795. [\[CrossRef\]](#)
- Murphy, P.A.; Hendrich, S.; Landgren, C.; Bryant, C.M. Food Mycotoxins: An Update. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, R51–R65. [\[CrossRef\]](#)

22. Fallah, A.A.; Rahnama, M.; Jafari, T.; Saei-Dehkordi, S.S. Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control* **2011**, *22*, 1653–1656. [\[CrossRef\]](#)
23. Isenberg, S.; Carter, M.D.; Hayes, S.R.; Graham, L.A.; Johnson, D.; Mathews, T.P.; Harden, L.A.; Takeoka, G.R.; Thomas, J.D.; Pirkle, J.L.; et al. Quantification of Toxins in Soapberry (Sapindaceae) Arils: Hypoglycin A and Methylene cyclopropylglycine. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 5607–5613. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. González-Medina, S.; Hyde, C.; Lovera, I.; Piercy, R. Detection of equine atypical myopathy-associated hypoglycin a in plant material: Optimisation and validation of a novel lc-ms based method without derivatisation. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199521. [\[CrossRef\]](#)
25. Van der Burg, L.J.; Muller, I.; van Oldruitenborgh-Oosterbaan, S.M.M. Horse milking industry in The Netherlands and Flanders. *Tijdschr. Diergeneesk.* **2011**, *136*, 257–261.
26. Tanaka, K.; Kean, E.A.; Johnson, B. Jamaican Vomiting Sickness. *N. Engl. J. Med.* **1976**, *295*, 461–467. [\[CrossRef\]](#)
27. Dinesh, D.S.; Pandey, K.; Das, V.N.R.; Topno, R.K.; Kesari, S.; Kumar, V.; Ranjan, A.; Sinha, P.K.; Das, P. Possible factors causing Acute Encephalitis Syndrome outbreak in Bihar, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2013**, *2*, 531–538.
28. Nath, V.; Sharma, S.; Barman, K. Acute Encephalitis Syndrome and its alleged litchi (*Litchi chinensis*) connection—A review and status. *Indian J. Agric. Sci.* **2016**, *86*, 283–290.

Conclusion à l'article 3

Cette étude met en évidence, pour la première fois, le transfert de l'HGA et de son métabolite, la MCPA-carnitine, dans le lait de juments exposées aux samares et aux plantules d'érable sycomore. Cette observation révèle une nouvelle voie d'exposition aux toxines responsables de la MA, en particulier pour les poulains allaités. Elle apporte ainsi une explication possible aux cas rapportés chez des poulains non sevrés, jusque-là attribués principalement à une ingestion directe de matériel végétal contaminé ou à un transfert transplacentaire.

Au-delà du risque individuel pour les poulains, la contamination du lait par l'HGA soulève des questions de sécurité alimentaire. En effet, si la consommation de lait de jument demeure marginale, l'expansion de filières utilisant le lait de juments, d'ânesses ou d'autres espèces laitières exposées à des érables sycomores impose de considérer le risque d'intoxication lié à l'ingestion de lait cru ou de produits laitiers contaminés.

Ces résultats invitent à élargir les stratégies de prévention de la MA. La gestion des pâturages, déjà essentielle pour limiter l'exposition directe des équidés aux samares et aux plantules, doit également tenir compte du risque pour les poulains nourris au lait maternel. De futures investigations devront préciser l'ampleur de ce risque en fonction des niveaux d'exposition, des espèces concernées et des modes de consommation du lait.

En conclusion, la démonstration de la présence d'HGA et de MCPA-carnitine dans le lait maternel représente un élément déterminant dans la compréhension de l'épidémiologie de la MA. Elle ouvre également un champ de recherche inédit en matière de sécurité alimentaire et appelle à une vigilance accrue et à des travaux complémentaires, afin de mieux évaluer les conséquences sanitaires de cette contamination.

N. DISCUSSION

1. Confirmation de l'intérêt des profils d'acylcarnitines comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques dans la myopathie atypique

1.1. Validation diagnostique

Alors que l'intérêt diagnostique du profil sérique en acylcarnitines dans la MA avait déjà été publié (Baise et al. 2016; Boemer et al. 2017), les travaux menés dans le cadre de cette thèse en confirment la pertinence sur la base de la plus vaste cohorte étudiée à ce jour ($n = 263$ chevaux), dépassant largement les effectifs des études précédentes (généralement ≤ 50 chevaux) (Valberg et al. 2013; Karlíková et al. 2018). La force de ces travaux réside non seulement dans la taille de l'échantillon, mais également dans la sélection rigoureuse des cas, reposant simultanément sur des critères épidémiologiques, cliniques et analytiques (dosages de l'HGA, de la MCPA-carnitine et profils d'acylcarnitines sériques).

Pour la première fois, le profil des acylcarnitines de chevaux atteints de MA a été comparé à celui d'animaux souffrant d'autres pathologies (coliques, $n = 19$) et de chevaux témoins sains ($n = 76$), ainsi qu'à des copâturants cliniquement sains mais exposés ($n = 73$) (Article 1). L'inclusion d'un cas de myopathie induite par l'exercice a permis d'élargir la comparaison à un modèle non toxique de rhabdomyolyse. Il ressort de ces analyses que l'altération du profil sérique en acylcarnitines est spécifique à la MA et diffère significativement de celle observée dans d'autres affections musculaires ou métaboliques.

L'analyse statistique multivariée a mis en évidence une augmentation significative et globale des acylcarnitines sériques, qu'elles soient à chaîne courte (C2–C5), moyenne (C6–C12) ou longue (C14–C18), chez les chevaux atteints de MA par rapport aux autres groupes (Article 1). Ces modifications reflètent l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale consécutive à la formation des métabolites toxiques de l'HGA et du MCPPrG (Valberg et al. 2013; Bochnia et al. 2019).

Parmi ces altérations, l'accumulation de l'isovalérylcarnitine / 2-méthylbutyrylcarnitine (C5) s'est révélée être le marqueur le plus discriminant pour différencier les chevaux malades des copâturants et des témoins, tout en présentant une valeur pronostique quant à la survie : les chevaux présentant les taux les plus élevés de C5 avaient une probabilité de survie significativement réduite (Article 1). Ces résultats confortent l'intégration du profil d'acylcarnitines sériques comme outil diagnostique robuste et comme aide au pronostic vital dans la MA.

Limites et perspectives

Certaines limites doivent toutefois être soulignées. La comparaison avec d'autres affections musculaires repose sur un seul cas de myopathie induite par l'exercice, ce qui constitue un niveau de preuve très limité. Si ce résultat isolé va déjà dans le sens des conclusions obtenues pour la spécificité du profil en acylcarnitines dans la MA, il invite à étendre l'échantillonnage à un plus grand nombre de chevaux

présentant des myosites non liées à l'HGA. Un tel élargissement permettrait de confirmer la spécificité des altérations observées et de consolider l'usage du profil en acylcarnitines comme outil différentiel entre la MA et d'autres causes de rhabdomyolyse.

1.2. Association avec les autres biomarqueurs

La combinaison du dosage direct de l'HGA et de son métabolite MCPA-carnitine, avec l'évaluation du profil des acylcarnitines sériques, améliore significativement la sensibilité diagnostique. Jusqu'à récemment, il était admis que le diagnostic de MA reposait sur la mise en évidence simultanée d'HGA et de MCPA-carnitine dans le sang des animaux malades (Valberg et al. 2013; Bochnia et al. 2015; Karlíková et al. 2018). Les résultats de la présente thèse confirment toutefois que la détection de l'HGA seule doit être considérée comme un marqueur d'exposition, sans valeur diagnostique en soi (Baise et al. 2016). En revanche, la présence conjointe d'HGA et de MCPA-carnitine dans le sérum, associée à un profil sérique en acylcarnitines profondément altéré, constitue le critère de confirmation du diagnostic d'intoxication à l'HGA. Enfin, les modifications quantitatives et qualitatives du profil en acylcarnitines semble refléter directement l'ampleur de l'inhibition de la β -oxydation mitochondriale et fournissent ainsi un indicateur indirect de la sévérité de l'atteinte musculaire.

1.3. Valeur pour le dépistage précoce

Chez les chevaux atteints de myopathie atypique, l'analyse du profil sérique en acylcarnitines met en évidence des altérations métaboliques dès les premiers stades de la maladie. Cette hétérogénéité suggère l'existence d'un continuum d'atteinte métabolique, reflétant l'intensité du blocage de la β -oxydation mitochondriale.

Il convient de souligner que, pour les animaux inclus dans ces travaux, le prélèvement sanguin a été réalisé le plus précocement possible dans l'évolution clinique. Dans ce contexte, le profil en acylcarnitines apparaît comme un biomarqueur sensible des perturbations métaboliques induites par l'intoxication, détectables dès l'admission. Ainsi, au-delà de son intérêt diagnostique, l'évaluation des acylcarnitines permet d'identifier précocement les animaux présentant une atteinte métabolique marquée, y compris avant l'installation complète du tableau clinique.

1.4. Valeur pronostique des acylcarnitines dans la myopathie atypique

Parmi les chevaux atteints de myopathie atypique, la quantification des altérations du profil en acylcarnitines met en évidence des différences significatives entre les individus qui survivent et ceux qui succombent à la maladie, en accord avec les observations précédentes (Boemer et al., 2017).

Comme indiqué ci-dessus, les prélèvements ont été réalisés le plus précocement possible après l'admission, permettant une évaluation pronostique dès les premières heures.

Ainsi, au-delà de leur rôle diagnostique, les acylcarnitines sériques constituent un outil pertinent pour l'évaluation précoce du pronostic vital, permettant d'estimer les chances de survie des animaux atteints et d'éclairer la prise en charge clinique.

2. Meilleure définition des chevaux copâturants

2.1. Notion de copâturants et importance clinique

Les données présentées dans ce travail soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'intoxication à l'hypoglycine A s'inscrit dans un continuum physiopathologique, allant de l'exposition asymptomatique à la forme clinique sévère, plutôt que dans un modèle strictement binaire, les profils d'acylcarnitines reflétant l'intensité du blocage métabolique. Dans le contexte de la MA, on désigne comme copâturants les chevaux partageant la même pâture qu'un animal malade et donc exposés à la même pression toxique. Ces animaux ne présentent pas de signes cliniques mais peuvent avoir été exposés de manière significative. L'intérêt de cette catégorie réside dans le fait qu'elle permet d'identifier des individus à risque, chez lesquels un dépistage précoce et une surveillance rapprochée peuvent prévenir l'évolution vers une forme clinique grave.

2.2. Mise en évidence d'expositions subcliniques à l'hypoglycine A

Les analyses montrent qu'un nombre important de copâturants présentent, en l'absence de tout signe clinique, des concentrations détectables d'HGA (71/73 ; 97 %) et de MCPA-carnitine (66/73 ; 90 %). Cette observation contraste avec les données antérieures, dans lesquelles la présence conjointe d'HGA et de MCPA-carnitine était considérée comme un critère diagnostique de MA (Valberg et al. 2013; Boemer et al. 2017).

L'originalité de ce travail repose sur l'échantillonnage rapide de 73 copâturants, directement sur pâture et dans les 48 heures suivant la confirmation d'un cas clinique, alors que ces animaux n'avaient pas encore été retirés de l'exposition. Cette synchronisation avec l'apparition des signes cliniques et cette taille d'échantillon nettement supérieure à celles des études précédentes renforcent la robustesse des conclusions.

L'analyse des profils sériques d'acylcarnitines révèle chez ces copâturants des altérations intermédiaires entre celles des chevaux malades et celles des témoins sains, appuyant l'hypothèse d'un continuum physiopathologique allant de l'exposition silencieuse aux formes cliniques létales. Ces résultats confirment que les copâturants ne doivent pas être considérés comme de simples compagnons de pâture indemnes, mais comme des cas subcliniques d'intoxication à l'HGA, susceptibles d'évoluer vers une expression clinique selon les facteurs individuels et environnementaux.

2.3. Implications pour le diagnostic et la gestion

L'identification de copâturants présentant des marqueurs biologiques d'exposition et d'atteinte métabolique impose une vigilance accrue. Sur le plan diagnostique, ces résultats soutiennent l'utilisation combinée des dosages d'HGA, de MCPA-carnitine ainsi que du profil d'acylcarnitines pour détecter précocement les animaux à risque. Sur le plan pratique, la reconnaissance d'expositions subcliniques justifie la mise en œuvre de mesures de gestion immédiates, telles que le retrait des animaux de la pâture à risque, la surveillance clinique rapprochée et le suivi analytique répété pour détecter une éventuelle progression vers une forme clinique.

Ces résultats ont également des implications directes en termes de gestion des pâtures et de prévention. L'identification de chevaux exposés mais asymptomatiques justifie la mise en place de mesures prophylactiques renforcées : limitation de l'accès aux zones à risque, surveillance clinique rapprochée, et recours à des stratégies de prévention collective adaptées. L'approche métabolique par acylcarnitines pourrait ainsi s'intégrer comme un outil de gestion raisonnée des troupeaux exposés, réduisant le risque de mortalité massive lors des épisodes de MA.

3. Mise en perspective avec les facteurs de risque épidémiologiques

3.1. Âge

L'âge a été rapidement identifié comme un facteur majeur dans la MA. Les premières études épidémiologiques rapportaient une prévalence accrue chez les chevaux de moins de trois ans, suggérant une susceptibilité liée à une immaturité métabolique ou à une moindre expérience d'exposition aux toxines (Votion et al. 2009). Cependant, l'accumulation des données au fil des ans montre un élargissement de la distribution d'âge des cas cliniques, remettant en question l'existence d'un seuil strict de vulnérabilité (Votion et al. 2020). Dans notre étude, comme dans d'autres travaux récents, l'âge plus élevé apparaît néanmoins comme un facteur protecteur vis-à-vis du développement de la maladie après exposition, renforçant l'hypothèse d'une résistance acquise avec l'âge (Article 2). Enfin, la description de cas chez des poulains non sevrés et des juments gestantes confirme que les très jeunes classes d'âge ne sont pas épargnées (Article 1).

3.2. Sexe et statut reproducteur

Une incidence plus élevée chez les mâles entiers avait été suggérée dans les premières études (Votion et al. 2007), mais cette observation a été nuancée par l'identification d'un effet de confusion lié à l'âge : les jeunes mâles, souvent non castrés, sont surreprésentés en pâture (Votion et al. 2009). Une fois ce biais pris en compte, aucune prédisposition intrinsèque liée au sexe n'a été mise en évidence. Dans notre

série, aucune corrélation significative entre le sexe et la survenue de la MA n'a été observée, confirmant que l'âge reste le principal facteur démographique à considérer. Le statut hongre, en revanche, semble émerger comme protecteur, observation en accord avec les dernières données collectées (Article 2).

4. Extension aux autres espèces et implications comparatives

4.1. Espèces concernées et premiers cas documentés

Si l'HGA a été principalement étudiée chez les équidés dans le contexte de la MA, nos travaux ont contribué à documenter son impact dans d'autres espèces herbivores. En particulier, nous avons rapporté pour la première fois des cas d'intoxication confirmée chez des bovidés (gnous), avec mise en évidence d'HGA et de MCPA-carnitine circulantes ainsi que d'altérations marquées du profil d'acylcarnitines (Article 3). Par ailleurs, nos données confirment et étendent des observations déjà publiées chez des espèces à fermentation gastrique proximale telles que le cerf du Père David et le chameau de Bactriane (Bunert et al. 2018; Hirz et al. 2021). Ces résultats montrent que, bien que les équidés demeurent les plus sévèrement et fréquemment touchés, l'exposition et la toxicité de l'HGA concernent un spectre plus large de mammifères herbivores.

4.2. Différences physiologiques et hypothèse de transformation ruminale

Alors que les prairies sont exposées aux végétaux toxiques, à ce jour, aucun cas d'intoxication clinique à l'HGA n'a été rapporté chez les ruminants domestiques (bovins, ovins, caprins). Cette différence de sensibilité par rapport aux équidés pourrait refléter des différences physiologiques liées à la digestion. En effet, une transformation partielle de l'HGA dans le rumen avant absorption systémique a été proposée comme mécanisme protecteur (González Medina et al. 2021). Nos résultats (Article 3) soutiennent cette hypothèse : bien que des intoxications cliniques soient possibles chez les espèces à fermentation gastrique proximale, elles semblent moins fréquentes et souvent associées à des conditions particulières d'exposition. L'analyse comparative des profils d'acylcarnitines entre monogastriques et ruminants illustre cette différence de sensibilité et ouvre des perspectives pour mieux comprendre les voies de métabolisation et de détoxification de l'HGA selon les espèces. Enfin, une publication postérieure à nos recherches a conforté nos observations : Engel et al. (2025) ont confirmé, dans un système d'incubation *in vitro* de fluide ruminal ovin, une diminution significative des concentrations en HGA après 48 h (Engel et al. 2025).

Les données actuellement disponibles concernant le passage lacté de l'hypoglycine A et de ses métabolites chez différentes espèces sont résumées en figure 4.

Les différences de susceptibilité observées entre espèces herbivores pourraient en partie être modulées par la physiologie digestive, et notamment par les cinétiques de fermentation et de passage ruminal. À cet égard, Robbins et al. (1995) ont montré que les distinctions classiquement admises entre ruminants

« brouteurs » et « pâtureurs », notamment en termes de vitesse de passage ruminal et d'efficacité digestive, sont moins tranchées qu'initialement supposé, suggérant que la transformation ruminale de composés végétaux toxiques pourrait être plus variable et espèce-dépendante que strictement déterminée par l'anatomie.

5. Perspectives comparatives et santé publique

5.1. Contamination des denrées alimentaires

Au-delà des considérations cliniques, nos travaux s'intègrent dans une réflexion plus large sur la sécurité alimentaire. La présence d'HGA ou de ses métabolites dans les denrées alimentaires d'origine animal représente une question émergente de santé publique.

Chez les équidés, nous avons montré que la toxine pouvait être excrétée dans le lait, confirmant ainsi que les poulains allaités constituent une population particulièrement vulnérable mais aussi que l'homme pourrait être contaminé par la consommation de ce même lait de jument (Article 1). Ces résultats démontrent que l'HGA franchit les barrières physiologiques et peut être transférée par cette voie d'exposition secondaire.

Des observations similaires ont été rapportées chez les bovins : l'HGA a été détectée dans le lait de vache (Bochnia et al. 2021). Bien que les concentrations mesurées soient faibles et probablement sans conséquence si elles sont la seule source de toxine, elles établissent néanmoins la possibilité d'un passage de la toxine dans la chaîne alimentaire.

Plus largement, la consommation de denrées d'origine animale provenant d'espèces exposées à l'HGA ou à ses analogues pourrait représenter une voie d'exposition indirecte, qu'il s'agisse de lait, de viande ou de produits transformés. Si aucune donnée ne permet aujourd'hui de confirmer un risque significatif pour l'homme, l'existence de ce transfert invite à la vigilance. Dans ce contexte, les profils d'acylcarnitines pourraient être envisagés comme des outils de surveillance indirecte, permettant d'identifier une exposition subclinique dans les cheptels destinés à la production alimentaire.

5.2. Perspectives de transposition vers la médecine humaine

Les similitudes observées entre les profils d'acylcarnitines équin et ceux décrits lors d'intoxications humaines par le litchi ou l'ackée (Joskow et al. 2006; Shrivastava et al. 2017) ouvrent une perspective translationnelle. Dans ces intoxications, tout comme dans la MA, l'HGA et ses analogues inhibent la β -oxydation mitochondriale, entraînant une accumulation caractéristique d'acylcarnitines.

Ainsi, l'étude des équidés intoxiqués constitue un modèle expérimental pertinent pour mieux comprendre la physiopathologie des intoxications humaines par les sapindacées. Les approches développées dans le cadre vétérinaire, en particulier l'utilisation de profils d'acylcarnitines comme

biomarqueurs dynamiques, pourraient inspirer de nouvelles stratégies diagnostiques ou pronostiques en médecine humaine.

6. Conclusion intégrative de la discussion

En définitive, nos trois articles apportent des éléments complémentaires qui, pris ensemble, permettent d'atteindre les objectifs de cette thèse. Le premier démontre l'intérêt diagnostique et pronostique des profils acylcarnitines chez le cheval malade et explore les différences entre malades et copâturants, ouvrant la voie à une gestion plus fine du risque en prairie ; le deuxième élargit la réflexion aux autres espèces et met en lumière le rôle protecteur potentiel du rumen. L'ensemble de ces résultats contribue à une meilleure compréhension des mécanismes métaboliques impliqués dans l'intoxication à l'HGA et souligne l'importance des acylcarnitines comme outils de recherche, de diagnostic et de prévention qui dépasse le seul cadre de la médecine vétérinaire équine.

Figure 4 : Données publiées sur le passage lacté de l'hypoglycine A et de ses métabolites chez les équidés et les bovins.

Cette figure synthétise les principales études ayant investigué la présence de l'hypoglycine A (HGA), de la méthylèncyclopropylglycine (MCPrG) et de leurs métabolites toxiques (conjugués de la MCPA et de la MCPF à la glycine ou à la carnitine) dans différentes matrices biologiques, incluant le lait, le sérum maternel et le sérum du poulain.

Chez les équidés, ces travaux mettent en évidence le passage lacté de l'HGA et/ou de ses métabolites, ainsi que l'absorption chez le poulain, soutenant l'hypothèse d'une transmission verticale secondaire. Chez les bovins, les données indiquent une présence très limitée de l'HGA dans le lait, le plus souvent à l'état de traces, contrastant avec une détection plus constante des métabolites, suggérant une métabolisation efficace avant ou après le passage lacté.

L'ensemble de ces résultats souligne des différences inter-espèces marquées et contribue à la compréhension des voies d'exposition secondaires à l'hypoglycine A.

Étude (année)	Espèce	Effectif (n)	Matrices analysées	Toxines	Métabolite	Message clé / Limites
Karliková et al., 2018	Équins	1 couple jument/poulain	Sérum poulain	Non évaluées	✓ MCPA-carn	Cas de transmission suspectée ; lait non analysé ; hypothèse lactée indirecte
Sander et al., 2021	Équins	1 jument + 6 laits commerciaux	Lait	✓ HGA, ✗ MCPrG < LOD	✓ MCPA-carn/gly ✓ MCPF-carn/gly	Preuve du passage lacté ; pas de données sériques concomitantes ; effectif très limité
Renaud et al., 2021	Équins	4 couples Jument/poulain	Lait, sérum mère, sérum poulain	✓ HGA	✓ MCPA-carn	La plus grande cohorte Analyse concomitante des trois matrices permettant d'établir un continuum exposition maternelle / passage lacté / absorption du poulain (transmission verticale)
Bochnia et al., 2021	Bovins	4 lait de tank	Lait	✓ HGA	Non évalués	Détection d'HGA dans le lait bovin ; absence d'analyse métabolites et sérum
Engel et al., 2023	Bovins	5 vaches	Lait	✓ HGA (traces) ✗ MCPrG < LOD	✓ MCPA-carn/gly ✓ MCPF-carn/gly	Passage lacté des métabolites, HGA uniquement détectée à l'état de traces

O. PERSPECTIVES ET CONCLUSION

1. Ouvertures pour la recherche future

L'un des prolongements les plus prometteurs de ce travail réside dans le développement d'outils diagnostiques rapides, utilisables directement en pratique vétérinaire. Les résultats obtenus dans cette thèse suggèrent en effet qu'un dosage ciblé, voire limité à un seul biomarqueur comme la C5, pourrait constituer une approche suffisamment fiable pour confirmer la MA et établir rapidement le pronostic vital. Une telle information est déterminante pour décider de la mise en place ou non d'un traitement lourd et coûteux. La mise au point d'un test rapide, applicable potentiellement dès la prairie, représenterait donc un progrès considérable en permettant d'identifier précocement les animaux atteints, de préciser leur chance de survie et d'orienter les décisions thérapeutiques.

Au-delà du diagnostic et du pronostic, la généralisation de tests simplifiés sur les acylcarnitines ouvrirait également la voie à un véritable monitoring métabolique des chevaux exposés. Un tel suivi, incluant aussi bien les animaux symptomatiques que les copâturants asymptomatiques, permettrait de détecter plus tôt les situations à risque et d'adapter les mesures de prévention en conséquence.

Cette perspective ne se limite pas aux équidés domestiques. Dans le cas des animaux sauvages ou de grande valeur hébergés en parcs zoologiques, souvent exposés à des arbres d'ornement producteurs d'HGA et dont le régime alimentaire est modifié par la captivité, la disponibilité d'outils de surveillance métabolique simples et peu invasifs constituerait une avancée importante. À cet égard, une étude expérimentale préliminaire a déjà montré l'intérêt de recourir à des insectes hématophages (*i.e.* kissing bugs *Dipetalogaster maximus*), pour obtenir des échantillons sanguins sans manipulation directe de l'animal. Ce type d'approche innovante pourrait faciliter la mise en place d'un monitoring métabolique régulier dans un contexte de conservation ou de gestion zoologique.

Il convient également de ne pas perdre de vue le rôle des ruminants domestiques, largement intégrés dans la production de denrées alimentaires pour l'homme. Même si ces espèces présentent une sensibilité clinique plus faible, un monitoring métabolique ciblé des troupeaux exposés pourrait contribuer non seulement à la santé animale, mais aussi à la sécurité alimentaire, en limitant le risque d'introduction de toxines dans la chaîne de consommation humaine.

Enfin, les similitudes entre les profils d'acylcarnitines observés chez le cheval et ceux décrits lors de certaines intoxications humaines par les sapindacées suggèrent des parallèles intéressants, sans toutefois constituer l'objet direct de cette thèse

2. Conclusion générale

Cette thèse apporte une contribution à la compréhension des mécanismes métaboliques de l'intoxication à l'HGA. En s'appuyant sur l'analyse des profils d'acylcarnitines, elle démontre la pertinence d'un biomarqueur à la fois diagnostique, pronostique, comparatif et translationnel. Elle souligne également l'importance d'une approche intégrée, reliant biochimie, clinique et médecine comparée, pour mieux prévenir et gérer ces intoxications à fort impact clinique mais également à risque sanitaire.

P. BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal A, Bolisetty S (2013) Adaptive responses to tissue injury: role of heme oxygenase-1. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 124, 111–22.
- Baise E, Habyarimana JA, Amory H, et al. (2016) Samaras and seedlings of *Acer pseudoplatanus* are potential sources of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy without necessarily inducing clinical signs. *Equine Vet J* 48, 414–417. <https://doi.org/10.1111/evj.12499>
- Barceloux DG (2009) Akee Fruit and Jamaican Vomiting Sickness (*Blighia sapida* Koenig). *Dis Mon* 55, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2009.03.002>
- Barłowska J, Polak G, Janczarek I, Tkaczyk E (2023) The Influence of Selected Factors on the Nutritional Value of the Milk of Cold-Blooded Mares: The Example of the Sokółski Breed. *Animals* 13, 1152. <https://doi.org/10.3390/ani13071152>
- Bentler K, Zhai S, Elsbecker SA, Arnold GL, Burton BK, Vockley J, Cameron CA, Hiner SJ, Edick MJ, Berry SA, et al. (2016) 221 newborn-screened neonates with medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: Findings from the Inborn Errors of Metabolism Collaborative. *Mol Genet Metab* 119, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.07.002>
- Bernardi P., Di Lisa F. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 78, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.023>
- Billington D, Sherratt H (1981) Hypoglycin and metabolically related inhibitors. *Methods Enzymol* 72, 610–6. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)72051-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)72051-2)
- Blake O, Bennink M, Jackson J (2006) Ackee (*Blighia sapida*) hypoglycin A toxicity: Dose response assessment in laboratory rats. *Food Chem Toxicol* 44, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.07.002>
- Blake O, Jackson J, Jackson M, Gordon C (2004) Assessment of dietary exposure to the natural toxin hypoglycin in ackee (*Blighia sapida*) by Jamaican consumers. *Food Res Int* 37, 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.05.003>
- Bochnia M, Sander J, Ziegler J, et al. (2019) Detection of MCPG metabolites in horses with atypical myopathy. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211698>

- Bochnia M, Ziegler J, Glatter M, Zeyner A (2021) Hypoglycin a in cow's milk—a pilot study. *Toxins* (Basel) 13. <https://doi.org/10.3390/toxins13060381>
- Bochnia M, Ziegler J, Sander J, et al. (2015) Hypoglycin A content in blood and urine discriminates horses with atypical Myopathy from clinically normal horses grazing on the same pasture. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136785>
- Boemer F, Deberg M, Schoos R, et al. (2015) Quantification of hypoglycin A in serum using aTRAQ® assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 997, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.06.004>
- Boemer F, Detilleux J, Cello C, et al. (2017) Acylcarnitines profile best predicts survival in horses with atypical myopathy. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182761>
- Böhmer C, Bröer A, Munzinger M, et al. (2005) Characterization of mouse amino acid transporter B0AT1 (slc6a19). *Biochem J* 389, 745–51. <https://doi.org/10.1042/BJ20050083>
- Bonfils J, Faure M, Gibrat J-F, Glomot F, Papet I (2000) Sheep cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase: cDNA cloning, primary structure and molecular modelling and its unique expression in muscles. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Expr* 1494, 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00227-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00227-X)
- Boranbayeva T, Dossimova Z, Zhalelov D, Zhunisbek A, Bolat A, Toishimanov M (2025) Influence of Lactation, Age and Foaling Factors on the Quality Composition, Fatty and Amino Acid Profile of Mare's Milk Under Pasture Conditions. *Foods* 14, 2880. <https://doi.org/10.3390/foods14162880>
- Bowen-Forbes C, Minott D (2011) Tracking hypoglycins A and B over different maturity stages: Implications for detoxification of ackee (*Blighia sapida* K.D. Koenig) fruits. *J Agric Food Chem* 59, 3869–3875. <https://doi.org/10.1021/jf104623c>
- Bowrey J (1887) No title . *Jamaica Gaz* 10.
- Bowrey JJ (1887), Note on ackee (*Blighia sapida*) poisoning. *Jamaica Gaz* 10,
- Brandt K, Hinrichs U, Glitz F, Landes E, Schulze C, Deegen E (1997) Atypische myoglobulinurie der weidepferd. *Pferdeheilkunde* 13, 27–34.
- Bressler R, Corredor C, Brendel K (1969) Hypoglycine and hypoglycin-like compounds. *Pharmacol Rev* 21, 105–130.
- Bröer A, Klingel K, Kowalczyk S, Rasko JEJ, Cavanaugh J, Bröer S (2004) Molecular cloning of mouse amino acid transport system B0, a neutral amino acid transporter related to Hartnup disorder. *J Biol Chem* 279, 24467–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400904200>
- Bröer A, Tietze N, Kowalczyk S, et al. (2006) The orphan transporter v7-3 (slc6a15) is a Na⁺-dependent neutral amino acid transporter (B0AT2). *Biochem J* 393, 421–30. <https://doi.org/10.1042/BJ20051273>
- Bröer S (2008) Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol Rev* 88, 249–286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2006>
- Brosnan J, Brosnan M (2006) Branched-Chain Amino Acids: Enzyme and Substrate Regulation, *J Nutr* 136, 207S–211S. <https://doi.org/10.1093/JN/136.1.207S>
- Brown M, Bates RP, McGowan C, Brown IM, Cornell JA (1992) Influence of fruit maturity on the hypoglycin A level in ackee (*Blighia sapida*). *J Food Saf* 12, 167–177. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1991.tb00075.x>
- Bunert C, Langer S, Votion DM, et al. (2018) Atypical myopathy in Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) associated with ingestion of hypoglycin A. *J Anim Sci* 96, 3537–3547. <https://doi.org/10.1093/jas/sky200>

- Cabral B, Edding S, Portocarrero J, Lerma E (2020) Rhabdomyolysis. *Disease-a-Month* 66, 101015.
<https://doi.org/10.1016/J.DISAMONTH.2020.101015>
- Camargo S, Makrides V, Virkki L, Forster I, Verrey F (2005) Steady-state kinetic characterization of the mouse B0AT1 sodium-dependent neutral amino acid transporter. *Pflugers Arch* 451, 338–348.
<https://doi.org/10.1007/s00424-005-1455-x>
- Cassart D, Baise E, Cherel Y, et al. (2007) Morphological alterations in oxidative muscles and mitochondrial structure associated with equine atypical myopathy. *Equine Vet J* 39, 26–32.
<https://doi.org/10.2746/042516407X157765>
- Cassart D, Desmecht D (2008) Revue morphopathologique des myopathies équinées. *Ann Méd Vét* 152, 1–16.
- Chen, K., Anderson, R., McCowen, M., & Harris, P. (1957). Pharmacologic action of hypoglycin A and B. *J of Pharmacol and Exp Th*, 120, 272–285.
- Chen X, Gao H, Chen Z, et al. (2021) Metabolic variations in the pulp of four litchi cultivars during pulp breakdown. *Food Research International* 140, 110080. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110080>
- Chowdhury M, Islam S, Narayanan L, et al. (2024) An insight into the role of branched-chain α -keto acid dehydrogenase (BKD) complex in branched-chain fatty acid biosynthesis and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 206, e0003324. <https://doi.org/10.1128/jb.00033-24>
- Delgado R, Abad-Guaman R, De La Mata E, et al. (2017) Effect of dietary supplementation with arginine and glutamine on the performance of rabbit does and their litters during the first three lactations. *Anim Feed Sci Technol* 227.
- Delguste C, Cassart D, Baise E, et al. (2002) Myopathies atypiques chez les chevaux au pré: Une série de cas en Belgique. *Ann Med Vet* 146, 235–247. [https://doi.org/10.1016/S0024-3208\(02\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3208(02)00008-0)
- Dickinson J, Harrison S, Hewlins M (1998) An Investigation of the Metabolism of Valine to Isobutyl Alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 25751–25756. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.40.25751>
- Doyle F, McGivan J (1992) The bovine renal epithelial cell line NBL-1 expresses a broad specificity Na⁺-dependent neutral amino acid transport system (System B^o) similar to that in bovine renal brush border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta (BBA) - Biomembranes* 1104, 55–62.
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90131-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90131-5)
- Dunkel B, Ryan A, Haggett E, Knowles EJ (2020) Atypical myopathy in the South-East of England: Clinicopathological data and outcome in hospitalised horses. *Equine Vet Educ* 32, 90–95.
<https://doi.org/10.1111/eve.12895>
- El-Ashker M (2011) Acute kidney injury mediated by oxidative stress in Egyptian horses with exertional rhabdomyolysis. *Vet Res Commun* 35, 311–320. <https://doi.org/10.1007/s11259-011-9475-9>
- El-Khatib A, Engel A, Weigel S (2022) Co-Occurrence of Hypoglycin A and Hypoglycin B in Sycamore and Box Elder Maple Proved by LC-MS/MS and LC-HR-MS. *Toxins (Basel)* 14.
<https://doi.org/10.3390/toxins14090608>
- Engel A, El-Khatib A, Klevenhusen F, et al. (2023) Detection of Hypoglycin A and MCPrg Metabolites in the Milk and Urine of Pasture Dairy Cows after Intake of Sycamore Seedlings. *J Agric Food Chem* 71, 10751–10760. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01248>

- Engel AM, El-Khatib AH, Bachmann M, et al. (2025) Release of Hypoglycin A from Hypoglycin B and Decrease of Hypoglycin A and Methylene Cyclopropyl Glycine Concentrations in Ruminal Fluid Batch Cultures. *Toxins* (Basel) 17, 46. <https://doi.org/10.3390/toxins17020046>
- Evans K, Arnold L (1938) Experimental studies of poisoning with ackee (*Blighia sapida*). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 32, 355–362. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(38\)90050-1](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(38)90050-1)
- Farrell S, Vogel JL, Bieber LL (1986) Entry of acetyl-L-carnitine into biosynthetic pathways. *Biochim Biophys Acta* 876, 175–177. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90332-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90332-2)
- Feng P, Kean E (1955) Influence of Diet on the Acute Toxicity of Hypoglycin-A in Rats. *Brit J of Nutri* 9, 368–373. <https://doi.org/10.1079/bjn19550052>
- Feng P, Patrick S (1958) Studies of the action of hypoglycin-A, an hypoglycaemic substance. *Br J Pharmacol Chemother* 13, 125–30. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1958.tb00206.x>
- Feno S., Butera G., Vecellio Reane D., Rizzuto R., Raffaello A. (2019). Crosstalk between calcium and ROS in pathophysiological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, Article ID 9324018. <https://doi.org/10.1155/2019/9324018>
- Finno C, Valberg S, Wünschmann A, Murphy M (2006) Seasonal pasture myopathy in horses in the midwestern United States: 14 cases (1998–2005). *J Am Vet Med Assoc* 229, 1134–1141. <https://doi.org/10.2460/javma.229.7.1134>
- Fowden L, Pratt H (1973) Cyclopropylamino acids of the genus *Acer*: distribution and biosynthesis. *Phytochemistry* 12, 267. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80387-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80387-5)
- Fujiki Y, Ito M, Itoh T, Nishida I, Watanabe A (2002) Activation of the Promoters of Arabidopsis Genes for the Branched-Chain α -Keto Acid Dehydrogenase Complex in Transgenic Tobacco BY-2 Cells under Sugar Starvation. *Plant Cell Physiol* 43, 275–280. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf032>
- van Galen G, Amory H, Busschers E, et al. (2010) European outbreak of atypical myopathy in the autumn 2009. *J Vet Emerg Crit Care* 20, 528–532. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2010.00574.x>
- van Galen G, Marcillaud Pitel C, Saegerman C, et al. (2012a) European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006–2009): spatiotemporal distribution, history and clinical features. *Equine Vet J* 44, 614–20. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00556.x>
- van Galen G, Saegerman C, Marcillaud Pitel C, et al. (2012b) European outbreaks of atypical myopathy in grazing horses (2006–2009): Determination of indicators for risk and prognostic factors. *Equine Vet J* 44, 621–625. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00555.x>
- Galluzzi L., Vitale I., Aaronson S.A., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25, 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gao F, Wang C, Wei C, Li Y (2009) A branched-chain aminotransferase may regulate hormone levels by affecting KNOX genes in plants. *Planta* 230, 611–623. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0973-8>
- Giannoglou G, Chatzizisis Y, Misirli G (2007) The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med* 18, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2006.09.020>
- Giorgi C., Romagnoli A., Pinton P., Rizzuto R. (2008). Ca^{2+} signaling, mitochondria and cell death. *Current Molecular Medicine*, 8(2), 119–130. <https://doi.org/10.2174/156652408783565568>

- González Medina S, Bevin W, Alzola-Domingo R, Chang YM, Piercy RJ (2021) Hypoglycin A absorption in sheep without concurrent clinical or biochemical evidence of disease. *J Vet Intern Med* 35, 1170–1176. <https://doi.org/10.1111/jvim.16077>
- Gray D, Fowden L (1962) Alpha-(Methylenecyclopropyl)glycine from Litchi Seeds. *Biochem J* 82, 385.
- Hall T, Wallin R, Reinhart G, Hutson S (1993) Branched chain aminotransferase isoenzymes. Purification and characterization of the rat brain isoenzyme. *J Biol Chem* 268, 3092–3098. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53663-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53663-2)
- Hassall C, Reyke K, Feng P (1954) Hypoglycin A,B: Biologically Active Polypeptides from *Blighia sapida*. *Nature* 173, 356–357. <https://doi.org/10.1038/173356b0>
- Hassall C, Reyle K (1955a) Hypoglycin A and B , two biologically active polypeptides from *Blighia sapida*. *Biochem J* 60, 334–339. <https://doi.org/10.1042/bj0600334>
- Hassall C, Reyle K (1955b) The toxicity of the ackee (*Blighia sapida*) and it relationship to the vomiting sickness of Jamaica; a review. *West Indian Med J* 4, 83–90.
- Hebert J, Burfeind K, Malinoski D, Hutchens M (2023) Molecular Mechanisms of Rhabdomyolysis-Induced Kidney Injury: From Bench to Bedside. *Kidney Int Rep* 8, 17–29. <https://doi.org/10.1016/J.EKIR.2022.09.026>
- Hein S, Collet C, Ammer C, Goff N Le, Skovsgaard JP, Savill P (2009) A review of growth and stand dynamics of *Acer pseudoplatanus* L. in Europe: Implications for silviculture. *Forestry* 82, 361–385. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpn043>
- Hirz M, Gregersen HA, Sander J, et al. (2021) Atypical myopathy in 2 Bactrian camels. *J Vet Diagn Invest* 33, 961–965. <https://doi.org/10.1177/10406387211020721>
- von Holt C (1966) Methylenecyclopropaneacetic acid, a metabolite of hypoglycin. *Biochim Biophys Acta* 125, 1–10.
- von Holt L, von Holt C (1959) Biochemie des Hypoglycins A. *Biochemische Zeitschrift* 331, 422–429.
- Holt S, Moore K (2000) Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin. *Exp Nephrol* 8, 72–6. <https://doi.org/10.1159/000020651>
- Huerta-Alardín A, Varon J, Marik P (2004) Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis – an overview for clinicians. *Crit Care* 9, 158. <https://doi.org/10.1186/cc2978>
- Hutson S (2001) Structure and function of branched chain aminotransferases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 70, 175–206. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(01\)70017-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(01)70017-7)
- Hutson S, Fenstermacher D, Mahar C (1988) Role of mitochondrial transamination in branched chain amino acid metabolism. *J Biol Chem* 263, 3618–3625. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)68969-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)68969-0)
- Hwu W-L, Chien Y-H, Lee N-C, et al. (2012) Newborn screening for metabolic disorders in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci* 28, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2011.08.011>
- Ikeda Y, Tanaka K (1990) Selective inactivation of various acyl-CoA dehydrogenases by (methylenecyclopropyl)acetyl-CoA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol* 1038, 216–221. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(90\)90208-W](https://doi.org/10.1016/0167-4838(90)90208-W)
- Isenberg S, Carter M, Graham L, et al. (2015) Quantification of metabolites for assessing human exposure to soapberry toxins hypoglycin A and methylenecyclopropylglycine. *Chem Res Toxicol* 28, 1753–9. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00205>

- Isenberg S, Carter M, Hayes S, et al. (2016) Quantification of Toxins in Soapberry (Sapindaceae) Arils: Hypoglycin A and Methylenecyclopropylglycine. *J Agric Food Chem* 64, 5607–5613. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02478>
- Jager E, Rauschert S, Weinert E, Meusel H (1992) Vergleichende Chorologie der Zentraleuropäischen Flora. Bd 2 (Jena), Gustav Fischer Verlag (ed), Stuttgart, Germany
- Jahn P, Dobešová D, Brumarová R, Tóthová K, Kopecká A, Friedecký D (2022) Dynamics of acylcarnitines, hypoglycin A, methylenecyclopropylglycine and their metabolites in a Kladruher stallion with atypical myopathy. *Vet Q* 42, 183–191. <https://doi.org/10.1080/01652176.2022.2126537>
- Jordan E, Burrows W (1937) The vomiting sickness of Jamaica, B. W. I. and its relation to ackee poisoning. *Am J Epidemiol* 25, 520–545. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118321>
- Joskow R, Belson M, Vesper H, Backer L, Rubin C (2006) Ackee fruit poisoning: An outbreak investigation in Haiti 2000–2001, and review of the literature. *Clin Toxicol* 44, 267–273. <https://doi.org/10.1080/15563650600584410>
- Karlíková R, Šírká J, Jahn P, et al. (2016) Equine atypical myopathy: A metabolic study. *Vet J* 216, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.07.015>
- Karlíková R, Šírká J, Mech M, et al. (2018) Newborn foal with atypical myopathy. *J Vet Intern Med* 32, 1768–1772. <https://doi.org/10.1111/jvim.15236>
- Kean E (1974) Improved method for isolation of hypoglycins A and B from fruit of *Blighia sapida*. *J Pharm Pharmacol* 26, 639–640.
- Kean E, Hare E (1980) γ -Glutamyl transpeptidase of the ackee plant. *Phytochemistry* 19, 199–203. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81960-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81960-3)
- Kim J, Hickner R, Cortright R, Dohm G, Houmard J. (2002) Skeletal muscle fiber type and obesity: influence on muscle malonyl-CoA levels and sensitivity to contraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(6):E1191-E1196. doi:10.1152/ajpendo.00322.2001
- Kispal G, Steiner H, Court DA, Rolinski B, Lill R (1996) Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *J Biol Chem* 271, 24458–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24458>
- Kleta R, Romeo E, Ristic Z, et al. (2004) Mutations in SLC6A19, encoding B0AT1, cause Hartnup disorder. *Nat Genet* 36, 999–1002. <https://doi.org/10.1038/ng1405>
- van der Kolk JH, Boelens R, Halkes SBA, Wijnberg ID, de Sain-van der Velden MGM, Ippel JH (2013) Some notes on fatal acquired multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) in a two-year-old warmblood stallion and European tar spot (*Rhytisma acerinum*). *Vet Q* 33, 47–51. <https://doi.org/10.1080/01652176.2012.758904>
- Koper K, Han S-W, Pastor DC, Yoshikuni Y, Maeda HA (2022) Evolutionary origin and functional diversification of aminotransferases. *J Biol Chem* 298, 102122. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102122>
- Koracin V, Kocova M, Kobal J, et al. (2021) Expanded newborn screening in Southeastern Europe — current status and challenges. *Int J Neonatal Screen* 7, 27. <https://doi.org/10.3390/ijns7020027>
- Krägeloh T, Cavalleri JMV, Ziegler J, et al. (2018) Identification of hypoglycin A binding adsorbents as potential preventive measures in co-grazers of atypical myopathy affected horses. *Equine Vet J* 50, 220–227. <https://doi.org/10.1111/evj.12723>

- Kruse C-J, Stern D, Mouithys-Mickalad A, et al. (2021) In Vitro Assays for the Assessment of Impaired Mitochondrial Bioenergetics in Equine Atypical Myopathy. *Life* 11, 719. <https://doi.org/10.3390/life11070719>
- Lei J, Feng D, Zhang Y, et al. (2012) Nutritional and regulatory role of branched-chain amino acids in lactation. *Frontiers in Bioscience* 17, 2725. <https://doi.org/10.2741/4082>
- Lemieux H, Boemer F, van Galen G, et al. (2016) Mitochondrial function is altered in horse atypical myopathy. *Mitochondrion* 30, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.06.005>
- Leppla X, von Holt C (1956) Hypoglycemic peptides from *Blighia sapida*. Naunyn Schmiedeberg's *Arch Exp Pathol Pharmacol* 228, 166–167.
- Li P, Knabe D, Kim S, Lynch C, Hutson S, Wu G (2009) Lactating Porcine Mammary Tissue Catabolizes Branched-Chain Amino Acids for Glutamine and Aspartate Synthesis, *J Nutr* 139, 1502–1509. <https://doi.org/10.3945/JN.109.105957>
- Lligoña-Trulla L, et al. (1997) Acetyl-L-carnitine flux to lipids in cells estimated using [1-14C]acetyl-L-carnitine. *J Lipid Res* 38, 2063–2068. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37427-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37427-7)
- Loeber JG, Platis D, Zetterström R, Almashanu S, Boemer F, Bonham J, et al. (2012) Neonatal screening in Europe revisited: an ISNS perspective on the current state and developments. *J Inherit Metab Dis* 35, 603–615. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9504-9>
- Mazhitova AT, Kulmyrzaev AA (2016) Determination of amino acid profile of mare milk produced in the highlands of the Kyrgyz Republic during the milking season. *J Dairy Sci* 99, 2480–2487. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-9717>
- Meda HA, Diallo B, Buchet J-P, et al. (1999) Epidemic of fatal encephalopathy in preschool children in Burkina Faso and consumption of unripe ackee (*Blighia sapida*) fruit. *The Lancet* 353, 536–540. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)01088-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)01088-0)
- de Meijere A (1979) Bonding properties of cyclopropane and their chemical consequences. *Angewandte Chemie* 18, 809–826.
- Melde, K., Böttner, H., Boschert, W., Wolf, H. P. O., & Ghisla, S. (1989). Mechanism of hypoglycaemic action of methylenecyclopropylglycine. *Biochemical Journal*, 259, 921-924.
- Melde, K., Jackson, S., Bartlett, K., Sherratt, H. S. A., & Ghisla, S. (1991). Metabolic consequences of methylenecyclopropylglycine poisoning in rats. *Biochemical Journal*, 274, 395-400.
- Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR (1990) Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 13, 321–324. <https://doi.org/10.1007/BF01799566>
- Minakata H, Komura H, Tamura SY, Ohfuné Y, Nakanishi K, Kada T (1985) Antimutagenic unusual amino acids from plants. *Experientia* 41, 1622–1623. <https://doi.org/10.1007/BF01964840>
- Munck BG (1985) Transport of neutral and cationic amino acids across the brush-border membrane of the rabbit ileum. *J Membr Biol* 83, 1–13. <https://doi.org/10.1007/BF01868733>
- Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, Ilkayeva OR, Stevens RD, Kheterpal I, Zhang J, Covington JD, Bajpeyi S, Ravussin E, Kraus W, Koves TR, Mynatt RL (2012) Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab* 15, 764-777. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.005>

- Nath, V., Sharma, S., & Barman, K. (2016). Acute encephalitis syndrome and its alleged litchi (*Litchi chinensis*) connection—A review and status. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 86(3), 283–290.
- Nelson D, Cox M (2012) *Lehninger Principles of Biochemistry* (8th ed) New York, W.H. Freeman. Chapter 17, p635-637
- Novotná T, Jahn P, Šamonilová E, Kabešová M, Pospíšilová S, Maršálek P (2023) Hypoglycin A in *Acer* genus plants. *Toxicon* 234. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107271>
- Osmundsen, H., Billington, D., Taylor, J. R., & Sherratt, H. S. A. (1978). The effects of hypoglycin on glucose metabolism in the rat: A kinetic study in vivo with [U-14C,2-3H]glucose. *Biochemical Journal*, 170, 337–342
- Osmundsen H, Sherratt HSA (1975) A Novel mechanism for inhibition of β -oxidation by methylenecyclopropylacetyl-CoA, a metabolite of hypoglycin. *FEBS Lett* 55, 38–41. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80951-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80951-3)
- Palencia P, Rivero J-L (2007) Atypical myopathy in two grazing horses in northern Spain. *Vet Rec* 161, 346–348. <https://doi.org/10.1136/vr.161.10.346>
- Pineda M, Fernández E, Torrents D, et al. (1999) Identification of a Membrane Protein, LAT-2, That Co-expresses with 4F2 Heavy Chain, an L-type Amino Acid Transport Activity with Broad Specificity for Small and Large Zwitterionic Amino Acids. *J of Biol Chem* 274, 19738–19744. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19738>
- Rashford J (1996) Ackee poisoning and the evolutionary biology of Jamaica's ackee motif. <https://doi.org/10.22004/AG.ECON.257046>
- Reitnour C, Baker J, Mitchell G, Little C (1969) Nitrogen digestion in different segments of the equine digestive tract. *J Anim Sci* 29, 332–4. <https://doi.org/10.2527/jas1969.292332x>
- Reitnour C, Salsbury R (1972) Digestion and utilization of cecally infused protein by the equine. *J Anim Sci* 35, 1190–3. <https://doi.org/10.2527/jas1972.3561190x>
- Ren X, Xue Y, Shen Z, et al. (2025) Effects of BCAA supplementation on plasma and mare's milk amino acid contents in Yili mares and growth performance of suckling foals. *Front Vet Sci* 12, 1602363. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1602363>
- Rimessi A., Giorgi C., Pinton P., Rizzuto R. (2008). The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochimica et Biophysica Acta (Bioenergetics)*, 1777(7–8), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.008>
- Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, et al. (2003) Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* 22, 8619–8627. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207105>
- Robbins CT, Spalinger DE, Van Hoven W. Adaptation of ruminants to browse and grass diets: are anatomical-based browser–grazer interpretations valid? *Oecologia*. 1995;103:208–213.
- Rodríguez-Capote K, Balion CM, Hill SA, Cleve R, Yang L, El Sharif A (2009) Utility of Urine Myoglobin for the Prediction of Acute Renal Failure in Patients with Suspected Rhabdomyolysis: A Systematic Review. *Clin Chem* 55, 2190–2197. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.128546>
- Rojas-Valverde D, Sánchez-Ureña B, Crowe J, Timón R, Olcina GJ (2021) Exertional rhabdomyolysis and acute kidney injury in endurance sports: A systematic review. *Eur J Sport Sci* 21, 261–274. <https://doi.org/10.1080/17461391.2020.1746837>

- Romeo E, Dave MH, Bacic D, et al. (2006) Luminal kidney and intestine SLC6 amino acid transporters of B0AT-cluster and their tissue distribution in *Mus musculus*. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F376–F383. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00286.2005>
- Safari S, Yousefifard M, Hashemi B, et al. (2016) The value of serum creatine kinase in predicting the risk of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Nephrol* 20, 153–161. <https://doi.org/10.1007/s10157-015-1204-1>
- Salloum R, Duckworth D, Madison J, Souba W (1993) Characteristics of L-glutamine transport in equine jejunal brush border membrane vesicles. *Am J Vet Res* 54, 152–157. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1993.54.01.152>
- Sander J, Cavalleri JMV, Terhardt M, et al. (2016) Rapid diagnosis of hypoglycin A intoxication in atypical myopathy of horses. *J of Vet Diag Invest* 28, 98–104. <https://doi.org/10.1177/1040638715624736>
- Sander J, Terhardt M, Janzen N (2021) Detection of maple toxins in mare's milk. *J Vet Intern Med* 35, 606–609. <https://doi.org/10.1111/jvim.16004>
- Sander J, Terhardt M, Janzen N (2020) Study on the Metabolic Effects of Repeated Consumption of Canned Ackee. *J Agric Food Chem* 68, 14603–14609. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06235>
- Sander J, Terhardt M, Janzen N, et al. (2023) Tissue Specific Distribution and Activation of Sapindaceae Toxins in Horses Suffering from Atypical Myopathy. *Animals* 13. <https://doi.org/10.3390/ani13152410>
- Sanford AA, Isenberg SL, Carter MD, et al. (2018) Quantification of hypoglycin A and methylenecyclopropylglycine in human plasma by HPLC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1095, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.017>
- Scharman E, Troutman W (2013) Prevention of Kidney Injury Following Rhabdomyolysis: A Systematic Review. *Ann of Pharmacoth* 47, 90–105. <https://doi.org/10.1345/aph.1R215>
- Schultz S, Curran P (1970) Coupled transport of sodium and organic solutes. *Physiol Rev* 50, 637–718. <https://doi.org/10.1152/physrev.1970.50.4.637>
- Schuster J, Binder S (2005) The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 57, 241–254. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-7533-1>
- Scott H, Lond M, Hons D (1916) On the 'vomiting sickness' of Jamaica. *Ann Trop Med Parasitol* 10, 1–78.
- Seidelin H (1913) On 'Vomiting Sickness' in Jamaica. *Ann Trop Med Parasitol* 7, 377–478. <https://doi.org/10.1080/00034983.1913.11687620>
- Seow H, Bröer S, Bröer A, et al. (2004) Hartnup disorder is caused by mutations in the gene encoding the neutral amino acid transporter SLC6A19. *Nat Genet* 36, 1003–1007. <https://doi.org/10.1038/ng1406>
- Sherratt H (1986) Hypoglycin, the famous toxin of the unripe Jamaican ackee fruit. *Trends Pharmacol Sci* 7, 186–191. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(86\)90310-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(86)90310-X)
- Shrivastava A, Kumar A, Thomas JD, et al. (2017) Association of acute toxic encephalopathy with litchi consumption in an outbreak in Muzaffarpur, India, 2014: a case-control study. *Lancet Glob Health* 5, e458–e466. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30035-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30035-9)
- Slade L, Bishop R, Morris J, Robinson D (1971) Digestion and absorption of ¹⁵N-labelled microbial protein in the large intestine of the horse. *Br Vet J* 127, 11–3. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)37583-8](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)37583-8)

- Sloan J, Mager S (1999) Cloning and functional expression of a human Na⁺ and Cl⁻ dependent neutral and cationic amino acid transporter B0⁺. *J Biol Chem* 274, 23740–23745.
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.34.23740>
- Sponseller B, Evans T (2024) Plants Causing Toxic Myopathies. *Vet Clin North Am Equine Pract* 40, 45–59.
<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2023.11.001>
- Sponseller B, Valberg S, Schultz N, et al. (2012) Equine Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MADD) Associated with Seasonal Pasture Myopathy in the Midwestern United States. *J Vet Intern Med* 26, 1012–1018. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00957.x>
- Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM (1998) A molecular model of human branched-chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 68, 72–81.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/68.1.72>
- Sweatt A, Wood M, Suryawan A, Wallin R, Willingham M, Hutson S (2004) Branched-chain amino acid catabolism: unique segregation of pathway enzymes in organ systems and peripheral nerves. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E64–E76. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00276.2003>
- Takanaga H, Mackenzie B, Peng J-B, Hediger MA (2005) Characterization of a branched-chain amino-acid transporter SBAT1 (SLC6A15) that is expressed in human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 892–900. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2005.09.128>
- Tanaka, K., Miller, E. M., & Isselbacher, K. J. (1971). Hypoglycin A: A specific inhibitor of isovaleryl-CoA dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(1), 20–24.
- Terada T, Shimada Y, Pan X, et al. (2005) Expression profiles of various transporters for oligopeptides, amino acids and organic ions along the human digestive tract. *Biochem Pharmacol* 70, 1756–1763.
<https://doi.org/10.1016/J.BCP.2005.09.027>
- Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, et al. (2024) Newborn screening: global status, challenges, and future directions. *Mol Genet Metab* 142, 107720. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2023.107720>
- Unger L, Nicholson A, Jewitt E, et al. (2014) Hypoglycin A Concentrations in Seeds of Acer Pseudoplatanus Trees Growing on Atypical Myopathy-Affected and Control Pastures. *J Vet Intern Med* 28, 1289–1293.
<https://doi.org/10.1111/jvim.12367>
- Valberg S, Sponseller B, Hegeman A, et al. (2013) Seasonal pasture myopathy/atypical myopathy in North America associated with ingestion of hypoglycin A within seeds of the box elder tree. *Equine Vet J* 45, 419–426. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2012.00684.x>
- Verheyen T, Declodt A, de Clercq D, van Loon G (2012) Cardiac Changes in Horses with Atypical Myopathy. *J Vet Intern Med* 26, 1019–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00945.x>
- Verma V, Gupta R, Goel M (2015) Phylogenetic and evolutionary analysis of functional divergence among Gamma glutamyl transpeptidase (GGT) subfamilies. *Biol Direct* 10, 49. <https://doi.org/10.1186/s13062-015-0080-7>
- Votion D-M (2012) The Story of Equine Atypical Myopathy: A Review from the Beginning to a Possible End. *ISRN Vet Sci* 2012, 1–14. <https://doi.org/10.5402/2012/281018>
- Votion D-M, François A-C, Kruse C, et al. (2020) Answers to the frequently asked questions regarding horse feeding and management practices to reduce the risk of atypical myopathy. *Animals* 10.
<https://doi.org/10.3390/ani10020365>

- Votion D-M, van Galen G, Sweetman L, et al. (2014) Identification of methylenecyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Vet J* 46, 146–149.
<https://doi.org/10.1111/evj.12117>
- Votion D-M, Linden A, Delguste C, et al. (2009) Atypical myopathy in grazing horses: A first exploratory data analysis. *Vet J* 180, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.01.016>
- Votion D-M, Linden A, Saegerman C, et al. (2007) History and Clinical Features of Atypical Myopathy in Horses in Belgium (2000-2005). *J Vet Intern Med* 21, 1380–1391.
- Ward D, Ross R, van der Weijden C, Snoep J, Claiborne A (1999) Catabolism of branched-chain alpha-keto acids in *Enterococcus faecalis*: the bkd gene cluster, enzymes, and metabolic route. *J Bacteriol* 181, 5433–42. <https://doi.org/10.1128/JB.181.17.5433-5442.1999>
- Webber W, Brown J, Pitts R (1961) Interactions of amino acids in renal tubular transport. *American Journal of Physiology* 200, 380–386. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1961.200.2.380>
- Weidema, I., & Buchwald, E. (2010). *NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet: Acer pseudoplatanus*. European Network on Invasive Alien Species (NOBANIS). Retrieved [2024-03-03], from www.nobanis.org
- Wenz A, Thorpe C, Ghisla S (1981) Inactivation of general acyl-CoA dehydrogenase from pig kidney by a metabolite of hypoglycin A. *J Biol Chem* 256, 9809–9812. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)68697-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)68697-7)
- Westermann C, Dorland L, Votion D, et al. (2008) Acquired multiple Acyl-CoA dehydrogenase deficiency in 10 horses with atypical myopathy. *Neuro Disord* 18, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.02.007>
- Westermann C, van Leeuwen R, van Raamsdonk L, Mol H (2016) Hypoglycin A Concentrations in Maple Tree Species in the Netherlands and the Occurrence of Atypical Myopathy in Horses. *J Vet Intern Med* 30, 880–884. <https://doi.org/10.1111/jvim.13927>
- Westermann C, de Sain-van der Velden M, van der Kolk J, et al. (2007) Equine biochemical multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MADD) as a cause of rhabdomyolysis. *Mol Genet Metab* 91, 362–369. <https://doi.org/10.1016/J.YMGME.2007.04.010>
- Whitwell K, Harris P, Farrington P (1988) Atypical myoglobinuria : an acute myopathy in grazing horses. *Equine Vet J* 20, 357–363.
- Woodward A, Holcombe S, Steibel J, Staniar W, Colvin C, Trottier N (2010) Cationic and neutral amino acid transporter transcript abundances are differentially expressed in the equine intestinal tract. *J Anim Sci* 88, 1028–1033. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2406>
- Xu W, Kenéz Á, Mann S, et al. (2022) Effects of dietary branched-chain amino acid supplementation on serum and milk metabolome profiles in dairy cows during early lactation. *J Dairy Sci* 105, 8497–8508. <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-21892>
- Zhang L, Fontaine R (2017) Lychee-associated encephalopathy in China and its reduction since 2000. *Lancet Glob Health* 5, e865. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30291-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30291-7)
- Zhang M-H (2012) Rhabdomyolysis and its pathogenesis. *World J Emerg Med* 3, 11–5. <https://doi.org/10.5847/wjem.j.issn.1920-8642.2012.01.002>