Étude des disruptions métaboliques provoquées chez le modèle murin par l'ingestion d'Hypochoeris radicata (L.), plante toxique pour l'espèce équine

Céline Domange

▶ **To cite this version:**

Céline Domange. Étude des disruptions métaboliques provoquées chez le modèle murin par l'ingestion d'Hypochoeris radicata (L.), plante toxique pour l'espèce équine. Toxicologie. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2008. Français. ⟨NNT : 2008INPT017A⟩. ⟨tel-04467978⟩

HAL Id: tel-04467978

https://hal.science/tel-04467978v1

Submitted on 20 Feb 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

HAL Authorization

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *L'institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Pathologie, Toxicologie, Génétique & Nutrition*

Présentée et soutenue par *Céline DOMANGE*
Le *5 novembre 2008*

Titre : *Etude des disruptions métaboliques provoquées chez le modèle murin par l'ingestion d'Hypochoeris radicata (L.), plante toxique pour l'espèce équine. Validation de l'approche métabonomique par des études comportementales et par imagerie cérébrale.*

JURY

Dr. EZAN Eric	*Rapporteur*
Dr. SOULIMANI Rachid	*Rapporteur*
Dr. SEBEDIO Jean-Louis	*Examinateur*
Pr. MARTINO Myriam	*Examinateur*
Pr. KOLF-CLAUW Martine	*Examinateur*
Dr. PARIS Alain	*Directeur de thèse*
Dr. PRIYMENKO Nathalie	*Codirectrice de thèse*

Ecole doctorale : *SEVAB*
Unité de recherche : *UMR 1089 INRA/ENVT Xénobiotiques*
Directeur(s) de Thèse : *M. PARIS Alain et Mme. PRIYMENKO Nathalie*
Rapporteurs : *Dr. EZAN Eric et Dr. SOULIMANI Rachid*

"J'ai toujours pensé que la science était un dialogue avec la nature.
Comme dans tout dialogue véritable, les réponses sont souvent inattendues."

Ilya Prigogine ("La fin des certitudes")

REMERCIEMENTS

De prime abord, je tiens à remercier très chaleureusement le Docteur Nathalie **Priymenko,** Enseignante-chercheur en nutrition, botanique et toxicologie végétale à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse et le Docteur Alain **Paris,** Directeur de recherche en Physiologie, métabolisme et signatures biologiques au laboratoire des Xénobiotiques de l'INRA de Toulouse, sans qui cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance. Leur conception de la recherche comme un challenge sans avoir peur de délaisser pour un temps les approches trop conventionnelles a permis d'initier avec succès les premiers travaux expérimentaux sur le harper. Outre la rigueur indispensable à la recherche qu'ils ont su m'inculquer, leur appui intellectuel ainsi que leur soutien moral m'auront été très bénéfiques tout au long de ces trois années de thèse.

J'adresse aussi ma profonde gratitude à l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail :

Monsieur le Docteur Eric **Ezan,** Directeur de recherche au Laboratoire d'Etudes du Métabolisme et des Médicaments du Commissariat à l'Energie Atomique de Saclay,

Monsieur le Docteur Rachid **Soulimani**, Docteur en Phytopharmacologie et Neurosciences pharmacologiques de l'Université Henri Poincaré de Nancy I et de l'Université de Metz,

Madame le Professeur Myriam **Martino,** Professeur au Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie des Molécules d'Intérêt Biologique de l'Université Paul Sabatier de Toulouse,

Madame le Professeur Martine **Kolf-Clauw,** Professeur en Pharmacie-Toxicologie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Monsieur le Docteur Jean-Louis **Sébédio**, Directeur de recherche dans l'unité de Nutrition de l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix.

Je souhaiterais remercier aussi Messieurs Jacques **Tulliez** et Jean-Pierre **Cravedi** pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire des Xénobiotiques de l'INRA de Toulouse.

Je remercie également l'ensemble de mes collègues du laboratoire des Xénobiotiques pour leur aide précieuse, et plus précisément **Florence et Raymond** pour leur implication dans la réalisation des expérimentations *in vivo*, leur savoir-faire, leur disponibilité et leur bonne humeur ; **Jérôme, Cécile, Christiane, Estelle et Françoise** pour leur gentillesse et leur implication dans mes travaux ; **Delphine B.** pour nos encouragements réciproques et pour m'avoir supportée « dans son dos » pendant près de 3 ans ; **Raymonde** pour ses nombreuses discussions et son soutien permanent ; **Maysaloun, Raphaëlle, Adriana, Sabrina et Delphine A.** pour notre soutien mutuel.

C'est également avec grand plaisir que je remercie Monsieur le Docteur Henri **Schroeder** et toute son équipe à l'URAFPA de l'Université Henri-Poincaré de Nancy (INPL-UUP), INRA UC340 pour m'avoir acceptée et accueillie « moi et mes souris » durant les expérimentations en comportement et pour leur professionnalisme.

Je suis aussi très reconnaissante à Monsieur le Docteur Amidou **Traoré** et à son équipe, dont Guy **Bielicki** et Cécile **Keller**, pour le temps qu'ils ont su m'octroyer et pour la rigueur dont ils ont fait preuve durant mes séjours à Theix.

Je tiens à remercier le **Ministère de la Recherche** pour m'avoir financée durant ces trois années, ainsi que les membres de la **Société Française de Métabolomique et Fluxomique** pour leur confiance et la bourse qu'ils m'ont décernée afin de participer au Metabomeeting à Lyon en avril 2008.

Merci également à Mr Jean Christophe **Deloulme**, de l'équipe Physiopathologie du cytosquelette de l'Unité Inserm 836 IRTSV du CEA de Grenoble, pour avoir accepté de nous donner des spécimens de cerveaux pour les expérimentations préliminaires en imagerie et pour sa bonne humeur lors des formations en neurologie.

J'adresse également mes plus profonds remerciements aux Docteurs **Guillaume Collignon et Antoine Casteignau** pour leur implication, leur gentillesse et pour avoir, chacun à leur manière, contribué à enrichir nos connaissances sur le harper.

Un grand merci à **Madame et Monsieur Lascaux**, pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur persévérance et leur collaboration en tant que propriétaire de chevaux parmi les plus durement touchés par cette maladie.

Je tiens à remercier plus particulièrement toutes les personnes qui ont largement contribué à la collecte, au stockage et au tri du matériel végétal qui a servi à réaliser les 7 expérimentations animales : **ma mère, Nathalie, Irène, Jean et Philipe Degos**, travail de l'ombre, travail ingrat, mais travail indispensable à l'accomplissement de cette thèse.

Merci à **mon père** pour avoir en quelques heures si bien retraduit ce qu'une photo peine parfois à offrir ; précision et rigueur scientifiques, vision globale et esthétisme.

Enfin, je tiens à adresser tous mes remerciements et plus encore et dédie cette thèse au plaisir de faire de la Recherche, à tous ceux qui m'ont suivie, soutenue, encouragée, avant et durant cette thèse, mais surtout en deçà : à mes parents et mes frères, à Nathalie et Laurent, à Fanny, Anne, Maysaloun, Raphaëlle, Delphine, à mes Amis, à tous ceux que j'aime, qui, chacun à leur manière, sans forcément être présents, sans besoin de les nommer, se reconnaîtront et à qui je dois beaucoup.

Mille Mercis à vous tous.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

I. Chapitre I : Contexte et méthodes 1

Introduction 1

A. Contexte thématique 1

1. Harper australien ou Australian Stringhalt 2

1.1. Epidémiologie et historique 2

1.2. Symptomatologie clinique 6

1.3. Histopathologie 7

1.4. Diagnostic 13

1.5. Pronostic 15

1.6. Traitement 15

1.7. Etiologies : quelle est l'implication d'*Hypochœris radicata* L. ? 19

1.8. Prévention 23

2. *Hypochœris radicata* (L.) 24

2.1. Habitat 24

2.2. Etymologie 24

2.3. Description botanique et Biologie 24

B. Approches, techniques et systèmes biologiques 30

1. La métabonomique : une approche globale 30

1.1. Définition et généralités 30

1.2. Principales techniques employées pour générer des données 31

1.3. Principales techniques statistiques utilisées 43

1.4. Métabonomique, pharmacocinétique et maladies 44

1.5. Limites et adaptations de la méthode 45

2. Autres méthodes d'exploration cérébrale 47

2.1. Le cerveau, un « organe » atypique 47

2.2. Les différentes techniques d'approche 47

2.3. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) 48

2.4. Approche comportementale chez l'animal de laboratoire 56

II. Chapitre II : Données de métabonomique et d'imagerie 65

Introduction 65

Présentation et objectifs de l'étude 66

A. Matériel et Méthodes 68
1. Etudes métabonomiques 68
1.1. Réalisation des régimes alimentaires 68
1.2. Animaux 73
1.3. Obtention des données 76
1.4. Analyses statistiques 80
2. Approche par IRM 84
2.1. Expérimentations conduites 84
2.2. Préparation et monitoring de l'animal dans l'aimant 87

B. Résultats 90
1. Etudes métabonomiques 90
1.1. Expérimentation préliminaire sur rats : doses 1 et 3% 90
1.2. Expérimentation sur souris : variations métaboliques entre les doses 0, 3 et 9% 103
2. Approche par IRM 118
2.1. Etudes pilotes 118
2.2. Exploration par spectroscopie localisée des encéphales de souris *in vivo* après traitement par 9% d'*Hypochœris radicata* 122
3. Analyses canoniques IRM/métabonomique 124

C. Discussion 126

III. Chapitre III : Données de comportement 139

Introduction 139

A. Matériel et Méthodes 142
1. Animaux 142
2. Expérimentation 143
3. Exploration comportementale 144
3.1. Tests comportementaux révélant d'éventuels troubles locomoteurs 145
3.2. Tests comportementaux révélateurs de l'état d'anxiété et de dépression 148
3.3. Tests comportementaux sur la mémorisation spatiale et/ou temporelle 152
3.4. Tests d'interactions sociales 155
4. Dépouillement des vidéos des tests comportementaux 156
5. Analyses statistiques 156

B. Résultats 158
1. Poids des animaux 158
2. Tests comportementaux 158
2.1. Tests comportementaux pour révéler d'éventuels troubles locomoteurs et accéder au comportement exploratoire 158

2.2. Tests comportementaux attestant de l'état d'anxiété 160
2.3. Tests comportementaux sur la mémorisation spatiale et/ou temporelle..... 165
2.4. Test d'interaction sociale du résident/intrus 174
2.5. Résumé des différents tests..... 178

C. Discussion..... 179

IV. Chapitre IV : Explorations complémentaires..... 191

Introduction..... 191

A. Etude exploratoire du végétal 193
1. Etude des variations intrinsèques au végétal 193
1.1. Matériel et Méthodes 193
1.2. Résultats..... 197
1.3. Discussion..... 207
2. Etude métabonomique chez l'animal 215
2.1. Matériel et méthodes..... 215
2.2. Résultats..... 217
2.3. Discussion..... 224

B. Etude exploratoire de l'impact métabonomique de la taurine..... 226
1. Contexte scientifique..... 226
2. Expérimentation préliminaire sur rat..... 229
2.1. Matériel et méthodes..... 229
2.2. Résultats..... 230
3. Analyse des perturbations du métabolisme général et du métabolisme tissulaire (foie, cerveau) chez la souris soumise à l'ingestion d'un régime contenant Hypochœris radicata et/ou de la taurine……..... 236
3.1. Matériel et méthodes..... 236
3.2. Résultats..... 237
3.3. Discussion..... 245

V. Chapitre V : Discussion générale et conclusion..... 255

A. Les éléments de disruption métabolique analysés chez l'animal et les orientations toxiques : ces éléments permettent d'expliquer le mode d'action des molécules thérapeutiques utilisées chez le cheval..... 256

B. Les éléments recherchés chez le végétal à l'origine de disruptions métaboliques induites chez l'animal qui l'ingère..... 260

C. L'apport de l'exploration globale du métabolisme chez l'animal et le végétal, à la toxicologie…. 263

Références bibliographiques*..... *275

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : CONTEXTE ET METHODES

Figure I.1 : *Hyperflexion du membre postérieur gauche chez un cheval atteint de harper australien..... 2*

Figure I.2 : *Cheval atteint de harper. 6*

Figure I.3 : *Nerf périphérique, branche atteinte du nerf commun fibulaire : dégénérescence Wallerienne.. ..... 8*

Figure I.4 : *Nerf périphérique, branche atteinte du nerf fibulaire commun. 9*

Figure I.5 : *Nerf périphérique de gros diamètre, test à l'immunoperoxidase.. ..... 10*

Figure I.6 : *Muscle squelettique, dénervation avec des fibres rétrécies et atrophiées.. ..... 11*

Figure I.7 : *Photos de l'inflorescence et de l'appareil végétatif de l'espèce Malva parviflora 21*

Figure I.8 : *Photo d'une Gesse. 21*

Figure I.9 : *Photo de Taraxacum officinale (Weber) ou Pissenlit Dendelion.. ..... 22*

Figure I.10 : *Dessin (à gauche) et photo (à droite) d'Hypochœris radicata. 25*

Figure I.11 : *Photo d'inflorescences d'Hypochœris radicata à maturité.. ..... 26*

Figure I.12 : *Rosette basale de feuilles d'Hypochoeris radicata (à gauche) et feuille d'Hypochoeris radicata (à droite).. ..... 26*

Figure I.13 : *Schémas expliquant l'impact d'un champ magnétique uniforme B0 sur les spins des noyaux de valeur ½ 34*

Figure I.14 : *Schéma matérialisant les étapes générées par l'application d'un champ magnétique additionnel B1 ou onde de radiofréquence électromagnétique RF. 36*

Figure I.15 *: Schéma représentant les différentes phases permettant l'acquisition d'un signal en RMN 1D 38*

Figure I.16 *: imagerie métabolique avec la cartographie de la choline..... 53*

Figure I.17 *: Imagerie métabolique avec une image de référence avec spectres respectifs... 54*

CHAPITRE II : DONNEES DE METABONOMIQUE ET D'IMAGERIE

Figure II.1 : *Schéma d'obtention de la phase chloroformique ou lipophilique..... 77*

Figure II.2 : *Spectre RMN du ^{1}H, à 600 MHz (δ = 0-10 ppm) d'urine collectée à J_{31} chez un rat nourri avec un aliment contenant 3% d'Hypochœris radicata (Lot MH3). 90*

Figure II.3 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante selon le premier plan factoriel (1*2), réalisée sur les 124 premières variables sélectionnées après filtration sur toutes les urines collectées analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz.. ..... 91*

Figure II.4 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur 124 variables sélectionnées après filtration, sur toutes les urines collectées analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz, suivant le plan factoriel (1*3).. ..... 92*

Figure II.5 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur 20 variables filtrées en fonction des groupes, à partir des données urinaires de J_{31} analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz, suivant le premier plan factoriel (1*2).. ..... 93*

Figure II.6 : *Dendrogramme présentant la répartition des 80 premières variables sélectionnées à partir des spectres urinaires obtenus par RMN du ^{1}H, à 600 MHz..... 95*

Figure II.7 : *Evolutions de la moyenne des valeurs prises par la variable V55 (δ = 7,82 un des déplacements chimiques de l'hippurate) en fonction des groupes, au cours du temps, à partir des données urinaires analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz.. ..... 96*

Figure II.8 : *Evolution de la moyenne des valeurs prises par la variable V118 (scyllo-inositol) en fonction des groupes, au cours du temps, à partir des données urinaires analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz.. ..... 96*

Figure II.9 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur les 20 premières variables sélectionnées après filtration, à partir des données RMN du ^{1}H à 600 MHz d'extrait aqueux de foie selon le premier plan factoriel (1*2). 97*

Figure II.10 : *Moyenne et écart-type des valeurs prises par la variable V163 en fonction des groupes à partir des données d'extrait aqueux de foie. 98*

Figure II.11 : *Spectres RMN du ^{1}H à 600 MHz (agrandis entre les valeurs de 3,20 et 3,52 ppm) d'extraits hépatiques hydrosolubles de foie (a) chez un rat mâle recevant un régime contenant 3% d'Hypochœris radicata (Lot MH3) et (b) chez un rat mâle témoin (Lot MT)... 99*

Figure II.12 : *Représentations graphiques de l'analyse factorielle discriminante suivant le premier plan factoriel (1*2), réalisée à partir de 15 variables sélectionnées après filtration, sur les données RMN du^{1}H à 600 MHz des extraits hydrosolubles de cerveaux des 36 rats, en fonction des groupes d'animaux.. ..... 100*

Figure II.13 : *Dendrogramme obtenu à partir des 30 premières variables sélectionnées après filtration sur données analysés par RMN du ^{1}H à 600 MHz, des extraits de cerveau des 36 rats..... 101*

Figure II.14 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée à partir des données d'analyse RMN du ^{1}H, à 600 MHz, sur les urines des souris mâles et femelles, en fonction du facteur groupe (Date*Dose) (a) suivant le premier plan factoriel (1*2) et (b) suivant le second plan factoriel (2*3)..... 104*

Figure II.15 : *Comparaison entre des spectres issus d'échantillons urinaires analysés par RMN du ^{1}H, à 600 MHz d'une (a) souris témoin et d'une (b) souris recevant une dose de 9% d'Hypochœris radicata..... 108*

Figure II.16 : *Représentation graphique de la PLS-DA après correction OSC du facteur bloc et à partir des données RMN du ^{1}H à 600 MHz des extraits hydrosolubles hépatiques de souris. 110*

Figure II.17 : *Premier plan factoriel de l'analyse factorielle discriminante obtenue à partir des 20 premières variables sélectionnées à partir des données RMN du ^{1}H, à 600 MHz des extraits aqueux cérébraux de souris..... 111*

Figure II.18 : *Dendrogramme ou arbre de classification hiérarchique obtenu à partir des 34 premières variables sélectionnées sur données RMN du ^{1}H, à 600 MHz, des extraits aqueux de cerveaux des souris recevant le régime avec 9% d'Hypochœris radicata. 112*

Figure II.19 : *Evolutions respectives des rapports scyllo-inositol/créatine (à gauche) et myo-inositol/créatine (à droite) en fonction de la dose d'Hypochœris radicata ingérée par les animaux. 113*

Figure II.20 : *Spectre issu de l'analyse RMN 2D ^{1}H-^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) obtenu à partir d'un pool d'extraits hydrosolubles de cerveau provenant de 3 souris recevant le régime avec 9% d'Hypochœris radicata..... 114*

Figure II.21 : *Biplot réalisé sur les 2 premières composantes de la PLS2 entre les métabolomes des extraits hydrosolubles de cerveau et de foie..... 116*

Figure II.22 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée à partir des 15 premières variables issues de l'analyse RMN du ^{1}H à 600 MHz des plasmas des souris mâles..... 117*

Figure II.23 : *Images obtenues en spectroscopie localisée sur des cerveaux fixés ex vivo et analysés par la méthode TurboRARE T2 (coupes axiales). 118*

Figure II.24 : *Exemple de spectre obtenu (δ 0-10 ppm) par séquence PRESS sur cerveau fixé ex vivo..... 119*

Figure II.25 : *Paramètres d'acquisition de l'image et coupe axiale du cerveau permettant de visualiser les principales structures nerveuses telles le thalamus, le cortex, les ventricules, le corps calleux. 119*

Figure II.26 : *Localisation des voxels au niveau (a) du thalamus et (b) du cortex sur des coupes axiales d'encéphales de souris. 120*

Figure II.27 : *Spectres (δ 1,0-4,0 ppm) issus des voxels (3*3*3 mm) centrés sur la région cérébrale du thalamus a) chez une souris traitée avec 9% d'Hypochœris radicata et b) chez une souris témoin. 121*

Figure II.28 : *Comparaison de spectres issus de l'analyse de voxels (2*1,2*1,7 mm) localisés au sein du thalamus et du cortex chez un individu recevant une dose de 9% d'Hypochœris radicata dans l'aliment. 121*

Figure II.29 : *Images spectroscopiques de deux coupes consécutives sur un animal recevant un régime contenant 9% d'Hypochœris radicata, précisant la localisation des voxels centrés sur le thalamus et les spectres correspondants à chaque acquisition..... 122*

Figure II.30 : *Spectres obtenus sur des encéphales de souris ayant reçu un régime avec 9% d'Hypochœris radicata..... 123*

Figure II.31 : *Spectres obtenus sur des encéphales de souris témoins.. ..... 123*

Figure II.32 : *Spectres obtenus après avoir sommé la totalité des spectres des souris traitées (en rouge) ainsi que des souris témoins (en bleu)..... 124*

Figure II.33 : *Graphe de l'analyse de régression canonique basée sur une PLS2 entre le jeu de données des métabolites cérébraux obtenus en IRM et les signatures RMN du ^{1}H sur des extraits hydrosolubles de cerveau, les deux jeux de données provenant des 12 animaux observés en IRM.. ..... 125*

Figure II.34 : *Structures et nomenclature du myo et du scyllo-inositol. Vues en configuration « chaise »..... 129*

CHAPITRE III : DONNEES DE COMPORTEMENT

Figure III.1 : *Photo illustrant l'appareil Locotronic®, avec un rat.* *146*

Figure III.2 : *Dispositif d'openfield, vue de dessus..* *147*

Figure III.3 : *Labyrinthe en croix surélevé, vue de profil (à gauche) et vue de dessus (à droite)..* *148*

Figure III.4 : *Dispositif utilisé lors du test de Porsolt ou test de la nage forcée.* *150*

Figure III.5 : *Dispositif de la planche à trou.* *151*

Figure III.6 : *Photo du dispositif de la piscine de Morris ou labyrinthe aquatique de Morris.* *152*

Figure III.7 : *Photo du dispositif du labyrinthe en Y, vue de dessus.* *154*

Figure III.8 : *Pourcentage d'entrées dans les branches fermées du labyrinthe en croix surélevé.* *161*

Figure III.9 : *Pourcentage d'entrées dans les branches ouvertes du labyrinthe en croix surélevé.* *161*

Figure III.10 : *Durée de la latence de première résignation lors du test de Porsolt ou de la nage forcée, en fonction des groupes (en secondes).* *163*

Figure III.11 : *Nombre de trous visités en 5 minutes, au sein de la couronne intérieure dans le test de la planche à trous.* *164*

Figure III.12 : *Temps mis pour accéder à la plate forme lors des 5 premiers essais des individus témoins (*p≤ 0,05).* *166*

Figure III.13 : *Temps mis pour accéder à la plate forme lors les 5 premiers essais des individus traités (*p ≤ 0,05).* *167*

Figure III.14 : *Temps passé par les animaux dans le quart supérieur de la piscine en fonction du traitement.* *168*

Figure III.15 : *Nombre d'entrées des animaux dans le quart supérieur en fonction du traitement lors du dernier essai sans la plate-forme.* *169*

Figure III.16 : *Comparaison des pourcentages d'alternance entre les deux groupes.* *172*

Figure III.17 : *Nombre total de branches visitées en fonction du groupe d'individus.* *173*

Figure III.18 : *Pourcentages d'entrées dans les différentes branches du labyrinthe en fonction des groupes d'individus.* *173*

Figure III.19 : *Nombre d'entrées des animaux dans les branches entre la $7^{ème}$ et la $10^{ème}$ minute du test en fonction du traitement.* *174*

Figure III.20 : *Durée de latence avant le premier contact entre l'individu résident et l'individu intrus.* *175*

Figure III.21 : *Nombre de suivis de l'individu intrus par l'individu résident.* *176*

Figure III.22 : *Nombre d'attitudes de reniflement de l'individu intrus par l'individu résident.* *176*

Figure III.23 *: Nombre d'attitudes d'exploration de la litière de la part de l'individu résident, en présence de l'individu intrus.* *177*

Figure III.24 : *Durée totale correspondante aux phases d'exploration de la litière de la part de l'individu résident, en présence de l'individu intrus.* *177*

CHAPITRE IV : EXPLORATIONS COMPLEMENTAIRES

Figure IV.1 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*2, réalisée sur 20 variables filtrées à partir des données issues de l'analyse en spectrométrie de masse Py-Mab-Tof des 48 extraits végétaux obtenus par la première méthode d'extraction.* *198*

Figure IV.2 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*2, réalisée sur 21 variables filtrées à partir des données issues de l'analyse en spectrométrie de masse Py-Mab-Tof des 48 extraits végétaux, phase organique, obtenus par la seconde méthode d'extraction.* *199*

Figure IV.3 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, sur 15 variables filtrées à partir des données issues de l'analyse en RMN du ^{1}H des 48 extraits végétaux phase aqueuse, obtenus après la seconde méthode d'extraction en fonction du stade de développement.* *200*

Figure IV.4 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*3, sur 15 variables à partir des données issues de l'analyse en RMN du ^{1}H des 48 extraits végétaux, phase aqueuse, obtenus après la seconde méthode d'extraction en fonction du stade de développement.* *201*

Figure IV.5 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 2*3, sur 15 variables à partir des données issues de l'analyse en RMN du ^{1}H des 48 extraits végétaux, phase aqueuse, obtenus après la seconde méthode d'extraction en fonction du stade de développement.* *202*

Figure IV.6 : *Spectre RMN du ^{1}H à 600 MHz entre 0 et 5 ppm d'un extrait aqueux d'Hypochœris radicata au stade « Fleurs ouvertes ». Les métabolites compris entre 3 et 4 ppm, dont beaucoup s'apparentent à des sucres (sucrose, fructose, glucose, inositol), prédominent.* *204*

Figure IV.7 : *Spectre RMN du ^{1}H à 600 MHz entre 0 et 5 ppm d'un extrait aqueux d'Hypochœris radicata au stade « Fruits mâtures »* *204*

Figure IV.8 : *Spectre RMN 2D ^{1}H-^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) à 600 MHz, obtenu à partir d'un extrait aqueux d'Hypochoeris radicata au stade « Fleurs ouvertes».* *205*

Figure IV.9 : *Représentation graphique du premier plan factoriel (1*2) de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur 20 variables filtrées à partir des 48 échantillons floraux, phase aqueuse, analysés par spectrométrie de masse LC-ESI-MS en infusion positive.* *206*

Figure IV.10 : *Réaction catalysée par l'enzyme galactinol-raffinose galactosyltransférase, permettant la libération de myo-inositol à partir de galactinol..... 212*

Figure IV.11 : *Voies métaboliques montrant les flux de carbone, dans la cellule chlorophyllienne lors de stress et de déficit hydrique..... 213*

Figure IV.12 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*2, sur 150 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des échantillons urinaires des souris testant les différents stades de développement..... 218*

Figure IV.13 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*2, sur 180 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des échantillons urinaires des souris consommant les différents stades de développement d'Hypochœris radicata (HR), en fonction du facteur date*lot. 219*

Figure IV.14 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*2, sur 90 variables, à partir des données RMN du ^{1}H des échantillons urinaires des souris recevant la gamme étalon de pool moyen d'Hypochœris radicata (HR), en fonction du facteur date*lot..... 220*

Figure IV.15 : *Représentation graphique de l'Analyse Factorielle Discriminante suivant le plan factoriel 1*2, sur 8 variables filtrées, à partir des extraits aqueux de cerveaux des souris ayant consommé la gamme étalon de pool moyen d'HR à différentes doses..... 221*

Figure IV.16 : *Représentation graphique de la'analyse factorielle discriminante (premier plan factoriel : 1*2 sur 10 variables filtrées, à partir des extraits de cerveaux des souris en fonction des lots suivant les deux premiers axes (gamme étalon + différents stades de développement testés à 3 et 9%).. ..... 222*

Figure IV.17 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante (premier plan factoriel : 1*2) sur 9 variables filtrées à partir des extraits de cerveaux des souris en fonction des lots suivant les 2 premiers axes. 223*

Figure IV.18 : *Structure de la taurine ou acide 2-amino-éthane-sulfonique..... 226*

Figure IV.19 : *Voie de synthèse de la taurine..... 226*

Figure IV.20 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, sur 60 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des urines de rats en fonction du facteur (Date *Régime).. ..... 231*

Figure IV.21 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*3, réalisée sur 5 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des urines de rats à 21 jours, en fonction du régime reçu..... 232*

Figure IV.22 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, sur 15 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des extraits aqueux de cerveau des rats en fonction des lots.. ..... 233*

Figure IV.23 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*4, réalisée sur 14 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des extraits aqueux de foie de rats, en fonction des lots..... 234*

Figure IV.24 : *Représentation graphique de l'analyse en composantes principales réalisée sur données RMN du ^{1}H des échantillons d'urine des souris, en fonction des lots. R..... 238*

Figure IV.25 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, réalisée sur 60 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des échantillons d'urine en fonction des lots de souris..... 239*

Figure IV.26 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, réalisée sur 90 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H issues des échantillons urinaires en fonction du facteur date*lot. 240*

Figure IV.27 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*2, réalisée sur 15 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H, corrigées par OSC, des extraits hydrosolubles de foie en fonction du facteur lot. La projection des lots sur le premier axe est réalisée en fonction du facteur taurine, celle sur l'axe 2 en fonction de la dose d'Hypochœris radicata ingérée.. ..... 241*

Figure IV.28 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*3, obtenue sur 15 variables filtrées, à partir de données d'extraits hydrosolubles de foie de souris en fonction des lots. 242*

Figure IV.29 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*2, obtenue sur 15 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des extraits hydrosolubles de cerveaux. 243*

Figure IV.30 : *Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le second plan factoriel 2*3, obtenue sur 15 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des extraits hydrosolubles de cerveau..... 244*

Figure IV.31 : *Schéma explicitant l'utilité de la seconde expérimentation sur souris avec deux doses d'Hypochœris radicata. 246*

CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Figure V.1 : *Schéma synthétique des voies, des disruptions métaboliques cérébrales et des symptômes principaux relevés lors de harper chez le cheval et d'autres maladies ayant des symptômes en commun avec le harper.* *258*

Figure V.2 : *Schéma synthétique présentant les voies métaboliques pouvant être impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires, chez le végétal.* *262*

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : CONTEXTE ET METHODES

CHAPITRE II : DONNEES DE METABONOMIQUE ET D'IMAGERIE

Tableau II.1 : *Composition et méthodes d'analyse sur des inflorescences d'Hypochœris radicata lyophilisées et réduites en poudre..... 70*

Tableau II.2 : *a) Formulation et b) Composition nutritionnelle de l'aliment commercial standard pour rongeur UAR 210. ..... 70*

Tableau II.3 : *Composition chimique des différentes matières premières utilisées dans les régimes.. ..... 72*

Tableau II.4 : *Composition chimiques des différents régimes des souris utilisés dans les différentes expérimentations après réajustement nutritionnel. 72*

Tableau II.5 : *Formulation des différents régimes des souris durant les différentes expérimentations. 73*

Tableau II.6 : *Lots de souris (4 souris par lot) en fonction du régime, du sexe et de la date de sacrifice. 75*

Tableau II.7 : *Récapitulatif des différents paramètres d'acquisition pour la production des spectres d'intérêt.. ..... 88*

Tableau II.8 : *Métabolites urinaires mis en évidence lors de l'analyse des spectres issus de l'analyse en RMN du ^{1}H à 600 MHz et correspondance avec le nom des variables impliquées dans le facteur traitement..... 94*

Tableau II.9 : *Tableau présentant les variables les plus impliquées dans la construction de l'axe 1 de l'AFD, (sur les 15 variables sélectionnées après filtration, à partir des données RMN du ^{1}H, à 600 MHz, d'extraits hydrosolubles de cerveaux des 36 rats en utilisant un pas de 0,04 ppm), leur déplacement chimique et le nom des métabolites correspondants. 101*

Tableau II.10 : *Résumé des principaux métabolites urinaires impliqués dans la construction des axes de l'AFD, identifiés grâce à leur déplacement chimique du ^{1}H δ (ppm) par comparaison avec des tables d'identification de déplacements chimiques. 107*

Tableau II.11 : *Principaux métabolites impliqués dans la construction des 3 premiers axes de la PLS-DA issue des spectres des extraits aqueux de foie. 110*

Tableau II.12 : *Résumé des principaux métabolites, des extraits aqueux de cerveau, impliqués dans la construction des 3 premiers axes. 113*

CHAPITRE III : DONNEES DE COMPORTEMENT

Tableau III.1 : *Répartition des animaux au sein des lots en fonction du traitement : Témoin ou 9% d'Hypochœris radicata (HR), du numéro de cage (A-J), de l'appartenance à une série et donc à la date de passage..... 143*

Tableau III.2 : *Calendrier résumant les dates de passage des souris dans les différents tests en fonction des numéros de séries..... 144*

Tableau III.3 *: Performances des souris dans le Locotronic®..... 158*

Tableau III.4 : *Paramètres résumant l'indice d'activité dans le test de l'openfield 159*

Tableau III.5 : *Résultats du test du labyrinthe en croix surélevé 160*

Tableau III.6 : *Résultats du test de la nage forcée de Porsolt, en fonction des lots de souris. 162*

Tableau III.7 : *Performances comportementales relatives à l'anxiété avec le test de la planche à trous..... 164*

Tableau III.8 : *Temps mis par les souris témoins pour accéder à la plate forme immergée au cours des 5 essais (en secondes). 165*

Tableau III.9 : *Temps mis par les souris traitées pour accéder à la plate forme immergée au cours des 5 essais (en secondes). 166*

Tableau III.10 : *Comparaison du temps passé dans le quart supérieur de la piscine en fonction du traitement lors de l'essai sans plate-forme (en secondes). 167*

Tableau III.11 : *Nombre d'entrées dans le quart supérieur de la piscine en fonction du traitement. 168*

Tableau III.12 : *Nombre de sursauts comptabilisés au centre de la piscine en fonction du traitement reçu par les animaux..... 170*

Tableau III.13 : *Performances comportementales relatives à l'activité exploratrice et aux capacités mnésiques des souris, mesurées dans le test du labyrinthe en Y..... 171*

Tableau III.14 : *Paramètres comportementaux d'interaction sociale mesurés dans le test du résident-intrus. 175*

Tableau III.15 : *Résumé des performances comportementales chez les animaux traités avec 9% d'Hypochœris radicata. 178*

CHAPITRE IV : EXPLORATIONS COMPLEMENTAIRES

Tableau IV.1 : *Identification des 48 échantillons d'Hypochœris radicata, en fonction de la date (en 2005), du lieu de collecte et des stades d'inflorescence. 193*

Tableau IV.2 : *Gradient HPLC utilisé en spectrométrie de masse LC-ESI-MS. 197*

Tableau IV.3 : *Variables significatives obtenues après filtration des données des extraits végétaux analysés en RMN du ^{1}H et identification des métabolites correspondants..... 203*

Tableau IV.4 : *Répartition des souris en fonction de la dose d'Hypochœris radicata en pool moyen testé. 216*

Tableau IV.5 : *Répartition des souris en fonction du stade de développement testé et de la dose correspondante. 216*

Tableau IV.6 : *Répartition des rats en fonction du régime (Hypochœris radicata et taurine) et de la date d'abattage. 229*

Tableau IV.7 : *Répartition des animaux en fonction du régime reçu et codage des 6 lots... 236*

Tableau IV.8 : *Caractéristiques et résultats obtenus après traitement avec de la taurine à raison de 10 g/jour sur 6 chevaux atteints de harper. 250*

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP :	Analyse en Composantes Principales
AFD :	Analyse Factorielle Discriminante
ANOVA :	ANalysis Of Variance
BHT :	Butyl Hydroxy Toluène
CSI :	Chemical-Shift Imaging.
ESI :	ElectroSpray Ionisation
GMQ :	Gain Moyen Quotidien
HR :	*Hypochœris radicata* (L.)
IC :	Indice de Consommation
IRM :	Imagerie par Résonance Magnétique
LC :	Liquid Chromatography
LD :	Linear Discriminant
MAB :	Metastable Atom Bombardment
MS :	Mass spectrometry
NAA :	N-Acetyl-Aspartate
OSC :	Orthogonal Signal Correction
PLS :	Partial Least Square
PLS-DA :	Partial Least Square-Discriminant Analysis
PRESS :	Point-Resolved Spectroscopy.
Py :	Pyrolyse
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
TE :	Echo Time.
Tof :	Time Of Flight
TR :	Repetition Time.
VOI :	Volume Of Interest.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'étude toxicologique présentée ici, n'intervient pas au sein d'une thématique ou d'un projet de recherche précédemment exploré. C'est pourquoi cette étude constitue un **challenge** car, sans avoir en main au départ d'éléments scientifiques précis concernant la pathologie, les voies mécanistiques, les cibles tissulaires ou moléculaires caractéristiques d'une maladie, des renseignements complémentaires ont pu être collectés, rassemblés, associés entre eux pour progressivement circonscrire l'impact et les manifestations d'un toxique sur un organisme animal.

Classiquement, les études toxicologiques s'attachent à tester *in vitro* et/ou *in vivo* un ou plusieurs toxiques dont les propriétés pharmacologiques et/ou toxiques sont connues. *In vivo*, elles se basent quasi exclusivement sur des modèles animaux aptes à présenter et reproduire les symptômes de la maladie comme chez l'espèce cible. Dans le cas de cette étude, la démarche utilisée est foncièrement différente car, d'une part, le contexte thématique et les études scientifiques disponibles ne permettent pas d'initier une étude toxicologique classique et, d'autre part, l'approche utilisée reconsidère et **redéfinit la conception même de modèle animal et de prospection toxicologique**.

Le contexte de cette étude prend naissance au sein d'une **problématique de médecine vétérinaire** d'actualité. Depuis quelques années, et notamment depuis l'été particulièrement chaud et sec ayant sévi en 2003, une recrudescence de cas cliniques de **harper australien ou Australian Stringhalt** a pu être recensée en France. Les données d'ordre épidémiologique, clinique, histopathologique de cette maladie restent encore méconnues à l'heure actuelle. Les quelques études épidémiologiques révèlent cependant, que la maladie n'affecte qu'une seule espèce, le **cheval**, chez lequel ont été mentionnés des troubles et désordres **neuro-musculaires** avec une atteinte du système nerveux périphérique. Elles ont pu montrer que l'incidence de cette maladie augmente de façon significative en **fin d'été**, d'autant plus si celui-ci tend à être particulièrement chaud et sec. Les observations faites de façon réitérées sur le terrain ont montré que les animaux atteints étaient, pour la majorité d'entre eux, des animaux pâturant sur des parcelles fortement envahies par une espèce végétale en particulier : la **porcelle enracinée ou *Hypochœris radicata* (L.)**. Cette plante semble être fortement incriminée dans l'étiologie de la maladie même si **aucune preuve directe** n'a pu être mise en

évidence à l'heure actuelle. De plus, le traitement d'une telle affection nécessitant de connaître les modalités d'action de ce toxique, **aucune thérapie médicamenteuse** spécifique n'a pu être proposée. Les conséquences économiques et éthiques liées à l'euthanasie de certains animaux, à la diminution des performances sportives et aux séquelles sont des facteurs essentiels expliquant l'intérêt d'une telle étude. De même, la reconsidération de la gestion des élevages équins, l'impuissance des acteurs de la filière équine face à un tel fléau, les conséquences environnementales à plus ou moins long terme représentent autant de raisons soulignant la nécessité urgente d'explorer cette maladie et de pouvoir l'enrayer rapidement.

Le contexte et la problématique sont donc clairs. Cependant, les **approches toxicologiques classiques** semblaient être **impuissantes** à pouvoir apporter des réponses et aucune étude clinique ne pouvait être menée sur le cheval pour des raisons éthiques et budgétaires. Enfin, aucun test ne pouvait être envisagé car aucune connaissance *a priori* n'existe sur le principe toxique potentiel contenu dans le végétal, sur les facteurs favorisants la synthèse de cet éventuel composé ou encore sur les voies métaboliques atteintes pouvant être responsables des signes cliniques chez le cheval.

L'étude présentée ici a pu être initiée en appliquant une approche prometteuse mais encore trop peu répandue, la métabonomique. Cette dernière permet de construire progressivement un réseau de réponses fiables, **sans aucun *a priori*,** en prenant en compte l'ensemble des éléments perturbateurs, des éléments perturbés et les différents facteurs environnementaux et intrinsèques à ces éléments. Nous avons fait le pari de **reconsidérer l'approche toxicologique** avec un œil neuf même si le toxique et les cibles sont inconnus, le but n'étant pas de reproduire la maladie et ses symptômes sur un animal modèle, mais d'utiliser ce dernier en tant que **révélateur ou « loupe » des perturbations ou disruptions[1] métaboliques** engendrées par l'application d'un stimulus, ici, l'ingestion d'une plante. Le raisonnement est simple mais la métabonomique, dans son approche, peut dérouter. En effet, l'exploration sans *a priori*, sans savoir ni où ni quoi chercher précisément et la manipulation de jeux de données conséquents restent inhabituels. De plus, la conception des protocoles expérimentaux doit être rigoureuse et précise afin de pouvoir appliquer des outils de statistiques multidimensionnelles et permettre d'accéder par la suite, à des éléments de réponse. Il ne s'agit pas de savoir quoi trouver à l'avance en se focalisant plus précisément sur

[1] Le terme de disruption est en fait un néologisme. Il n'existe pas de synonyme pour ce vocable.

un détail du système biologique mais plutôt de reconsidérer, sans *a priori*, ce système biologique de l'extérieur, sous toutes ses facettes, pour trouver la perturbation quelle que soit sa nature et quelle que soit la localisation tissulaire où elle intervient.

Ce travail s'est donc tout d'abord attaché à fournir la preuve d'un **lien** spécifique entre la plante potentiellement toxique et les troubles métaboliques générés chez un rongeur. Cette approche a permis de **circonscrire progressivement la zone et la nature de l'impact de ce toxique sur l'organisme animal**. Dans un second temps, à la suite des résultats issus de la métabonomique, d'autres voies d'approche complémentaires telles que **l'imagerie et le comportement** ont été utilisées pour, d'une part, conforter les premiers résultats et valider ceux-ci avec des approches plus « classiques » et, d'autre part, pour tenter de délimiter et préciser la pathologie de cette maladie.

Après avoir présenté l'état actuel des connaissances sur la maladie puis sur les outils et moyens d'exploration mis en œuvre dans ce travail, les résultats relatifs à ***l'approche métabonomique*** *seront exposés en parallèle avec les* ***données de l'imagerie****. Ces premiers résultats nous ayant orientés vers une prospection plus spécifique du système nerveux central, une* ***démarche neurocomportementale*** *viendra compléter les éléments de réponse concernant les mécanismes potentiellement impliqués dans la maladie. Enfin, certaines* ***prospections annexes*** *seront exposées, chacune d'entre elles apportant des éléments supplémentaires d'information.*

CHAPITRE I :
CONTEXTE ET METHODES

I. Chapitre I : Contexte et Méthodes

Introduction

Avant de présenter les différentes expérimentations qui ont été menées pour étudier l'impact de l'ingestion d'*Hypochœris radicata,* il convient de préciser tout d'abord le contexte de cette étude. Le chapitre qui suit dresse un récapitulatif des connaissances actuelles sur la maladie de harper.

Dans une première partie, les quelques données **épidémiologiques** disponibles concernant le harper seront présentées avec une description des **manifestations cliniques**, **histologiques**, les **essais de traitement et de prévention** ainsi que les **diagnostics différentiels** chez le cheval. Les preuves indirectes de l'implication de la plante ***Hypochœris radicata*** **dans l'étiologie** du harper seront également mentionnées. En seconde partie de chapitre, une présentation des intérêts, caractéristiques et applications des **différentes approches** sur lesquelles nous nous sommes basés sera exposée, accompagnée de données plus analytiques, relatives aux techniques auxquelles elles font appel.

A. Contexte thématique

Ce travail de thèse est né d'un problème de clinique vétérinaire équine : l'apparition en France de nombreux cas de **harper australien** ou **Australian Stringhalt**, maladie du **cheval** à prédominance **neuromusculaire**. Cette maladie est connue depuis fort longtemps. En effet, des observations de signes cliniques similaires ont été recensées pour la première fois en **Australie** en **1884** (*1*). Depuis, les cas de chevaux malades se sont succédés. Ce n'est donc pas tant la nouveauté de cette maladie qui en fait un sujet de recherche majeur actuellement en médecine vétérinaire, mais plus sa **recrudescence** conséquente et inquiétante, depuis une dizaine d'années, dans de nombreuses régions tempérées du globe, l'**absence** de **connaissances** suffisantes sur son **étiologie**, une ignorance totale de sa **physiopathologie**, **l'absence de traitement spécifique** et les limites en termes de prévention.

1. Harper australien ou Australian Stringhalt

1.1. Epidémiologie et historique

Le harper australien est une affection observée jusqu'à présent exclusivement chez le cheval. L'animal atteint présente, lors du mouvement, une **hyperflexion ou flexion exagérée, spasmodique et involontaire** d'un ou des deux membres **postérieurs** (*Figure I.1*). Ceci se traduit par une **démarche** tout à fait particulière et **caractéristique de l'animal,** dont la sévérité peut se décliner sur une échelle comprenant 5 degrés (*2*). Le cheval peut ainsi présenter un mouvement atypique pouvant aller d'une simple flexion peu exagérée à des atteintes sévères. Lors de ces dernières, les membres postérieurs peuvent cogner la surface ventrale de l'abdomen à chaque pas et le cheval ne se déplace plus que par sauts (Figure *I.2*). A ces troubles pathognomoniques peut venir s'ajouter une **amyotrophie** plus ou moins marquée **des membres postérieurs**.

Figure I.1 : Hyperflexion du membre postérieur gauche chez un cheval atteint de harper australien. L'observation de ce signe clinique apparaît plus spécifiquement lorsque l'animal recule ou reprend l'exercice après un repos prolongé. (Source : N. Priymenko).

Deux formes de harper sont actuellement recensées en fonction de leur étiologie :

- La **forme dite classique, sporadique** est le plus souvent d'origine **idiopathique** et n'affecte qu'un seul membre. Les symptômes sont alors persistants et la rémission spontanée n'existe pas. Bien que l'étiologie reste inconnue, il semble qu'une action **traumatique** appliquée sur les membres postérieurs soit impliquée, des traumas sur la face dorsale des métatarses étant le plus fréquemment rapportés.

- La **forme dite australienne, sporadique** mais pouvant également être **épizootique** (d'où la dénomination retenue certaines fois de « forme épizootique ») ou endémique, chez des animaux **au pré la plupart du temps**, après des **étés particulièrement chauds et secs,** mais toujours sur des zones géographiques bien délimitées. Ce sont les premiers recensements, effectués en Australie et Nouvelle-Zélande (*3-5*), qui sont à l'origine du qualificatif employé : Australian Stringhalt. A l'heure actuelle, des cas ont été recensés, outre dans ces deux pays, principalement dans toute la partie ouest des **Etats-Unis** ainsi qu'en **Europe** et, plus récemment au **Japon** (*6*). Les deux membres postérieurs du cheval sont touchés qualifiant ainsi l'atteinte de **bilatérale**. Des **rémissions spontanées** peuvent avoir lieu, contrairement à la forme classique où l'intervention chirurgicale est, en général, indispensable. Le tableau clinique peut comprendre également une **amyotrophie** se développant essentiellement au niveau des membres postérieurs et parfois un **cornage** qui signe une **hémiplégie laryngée** (*2*). Dans ce type de harper, des lésions **d'axonopathie distale ascendante** ont pu être révélées (*7,8*). L'origine semble être une intoxication alimentaire d'origine végétale car les **pâtures** où stationnent les chevaux sont des zones de **faible qualité fourragère** avec comme espèces majoritairement présentes : *Hypochoeris radicata (L.), Taraxacum officinale (Weber)* et *Malva parviflora (L.)*. Les observations que nous avons pu faire avant le début de ce travail de thèse ont montré que **tous les chevaux atteints étaient en contact avec *Hypochœris radicata***. C'est pour cette raison que notre étude s'est focalisée sur cette plante.

Ne désirant étudier que la forme dite australienne, le terme de harper sera employé par la suite sans forcément préciser la forme à laquelle il appartient.

Nos observations ont aussi permis de montrer qu'un certain nombre de **facteurs peuvent aggraver** ou tout du moins exagérer l'intensité des symptômes comme le froid, l'humidité, l'exercice prolongé, l'excitation, le recul, le fait de tourner brusquement et l'exercice après refroidissement (*4,9*).

Les résultats d'électromyographie obtenus par Huntington *et al.* (*2*) ont souligné, chez l'animal atteint de harper, une **activité tonique exceptionnellement importante au repos,** une **augmentation de l'activité électromyographique** dans le muscle long extenseur digital pouvant être maintenue plusieurs secondes et une diminution de la vitesse de **conduction** dans le nerf péroné profond lors de l'hyperflexion. Des électromyographies, enregistrées à la suite d'électrostimulations de fréquence 50 Hz, montrent qu'il existe, chez les animaux atteints, une **défaillance de conduction** soit dans les axones moteurs, soit dans le muscle, soit encore au sein de la transmission neuromusculaire.

Le plus souvent, le tableau clinique s'accompagne de **changements comportementaux marqués**, d'un état de **nervosité**, d'**agitation** ou au contraire d'un état **d'abattement** de l'animal, même si ces observations faites par les propriétaires restent « **non objectivées** ». En effet, il est difficile de dire si ces états psychologiques alliant anxiété, agitation ou abattement (tête basse, diminution des interactions avec les congénères, diminution des déplacements) sont des conséquences de l'animal en souffrance ou de véritables symptômes de la maladie. Pourtant Kerrigan, en 1917, indiquait déjà que les chevaux « ne sont pas tout à fait droit dans leur tête » (*4*) ! Cette remarque décrit bien une **composante psychologique** qui reste difficile et délicate à évaluer mais qui pourtant, signerait une atteinte centrale.

Cette forme de harper se caractérise la plupart du temps par des rémissions spontanées. Cependant, la **durée de récupération** répertoriée est assez **variable**, pouvant aller de quelques jours à plusieurs années, la moyenne pouvant être établie entre **6 et 12 mois**. De manière générale, cette durée est relativement longue et il n'est pas certain que la récupération des facultés motrices soit totale.

Les premières descriptions de harper australien ont été rapportées en **1884 en Australie**. Depuis, des cas similaires ont été mentionnés à nouveau en Australie (*10*), en **Nouvelle-Zélande** (*3-5,11,12*), en **Californie** (*13*), dans l'état de Washington (*14*), en Virginie (*15*), au Chili (*16*) et même au Japon (*6*).

En **France**, en **2003**, à la suite d'un été exceptionnellement chaud et sec pour la saison, 44 cas de harper sporadiques, ne présentant aucun lien entre eux, ont été recensés. Parmi ceux-ci, 29 ont été étudiés et ont donné lieu à la première étude épidémiologique française (*17*).

De façon générale, la **pluviométrie** des parcelles incriminées est toujours **faible** (*4*) avec des moyennes mensuelles de mai à août très faibles. Dans certains cas, elle devient nulle, comme dans de nombreuses régions françaises, lors de la canicule estivale de 2003.

L'analyse des sols, lorsqu'elle a pu être menée, a souligné une microflore fongique importante mais l'examen du matériel végétal n'a pas révélé de champignon connu pour produire des mycotoxines (*2*). L'analyse d'endophytes n'a pas été réalisée.

Après cette présentation rapide de l'expression clinique du harper, une description plus détaillée peut être exposée.

1.2. Symptomatologie clinique

La gravité des symptômes du harper a pu être échelonnée, suite aux travaux de Huntington *et al.* (*2*), grâce à une échelle de valeurs ou grades dont les caractéristiques sont présentées ci-dessous :

Grade I : hyperflexion lorsque le cheval recule, tourne ou est stressé.

Grade II : hyperflexion au démarrage, au pas ou au trot, accentuée lorsque le cheval recule, tourne ou quand on lui saisit un postérieur.

Grade III : hyperflexion modérée tout au long du pas ou du trot, plus marquée quand l'animal démarre ou s'arrête. Le cheval se désunit au petit galop. Le(s) postérieur(s) ne va (vont) pas toucher le ventre. Le recul et les virages sont un peu difficiles.

Grade IV : hyperflexion sévère. Le(s) postérieur(s) va (vont) toucher le ventre à toutes les allures, même à l'arrêt. Le trot, le recul et les virages sont difficiles.

Grade V : le cheval ne peut se déplacer qu'en sautillant, le(s) postérieur(s) reste(nt) hyperfléchi(s) plusieurs secondes de suite à l'arrêt (*Figure I.2*).

Figure I.2 : Cheval atteint de harper. L'animal ne peut se déplacer que par sauts, suite à une hyperflexion des deux membres postérieurs (Source : N. Priymenko).

1.3. Histopathologie

De manière générale, les muscles et les nerfs atteints répertoriés diffèrent en fonction des auteurs. Cependant, tous les animaux autopsiés présentent une **neuropathie périphérique** associée à une **atrophie neurogénique extensive des fibres musculaires et à de la fibrose diffuse**.

1.3.1. Lésions nerveuses

Les nerfs, les plus fréquemment et les plus sévèrement atteints, sont les **nerfs péronés profond et superficiel**, le **nerf tibial distal**, le nerf digital plantaire et **le nerf sciatique,** au niveau des membres postérieurs**,** ainsi que les **nerfs laryngés récurrents**. L'atteinte se caractérise par une dégénérescence **axonale** et plus précisément par une **dégénérescence Wallerienne** (*10*) (*Figure I.3*). Cette dernière entraine notamment une **perte des fibres myélinisées de large diamètre (***Figure I.4* et *Figure I.5*) accompagnée d'images de remyélinisation, d'une **prolifération des cellules de Schwann et de fibrose.** Les fibres individualisées présentent une démyélinisation segmentaire mais aucune anormalité concernant la distance internodale (*7*). La dégénérescence et la sévérité des lésions affectent préférentiellement les nerfs dans leur portion **distale**, préservant ainsi les zones proximales des axones.

Le harper peut donc se définir au niveau histopathologique comme étant proche d'une **axonopathie distale périphérique ascendante** (*7*).

Dans certains cas, l'étude histologique du système nerveux central a pu souligner la présence de **cavités** similaires à celles retrouvées dans les **leucoencéphalomalacies** (*10*). La substance blanche présente une **astrocytose** prononcée, un gonflement et un détachement des endothéliums associés à des œdèmes périvasculaires.

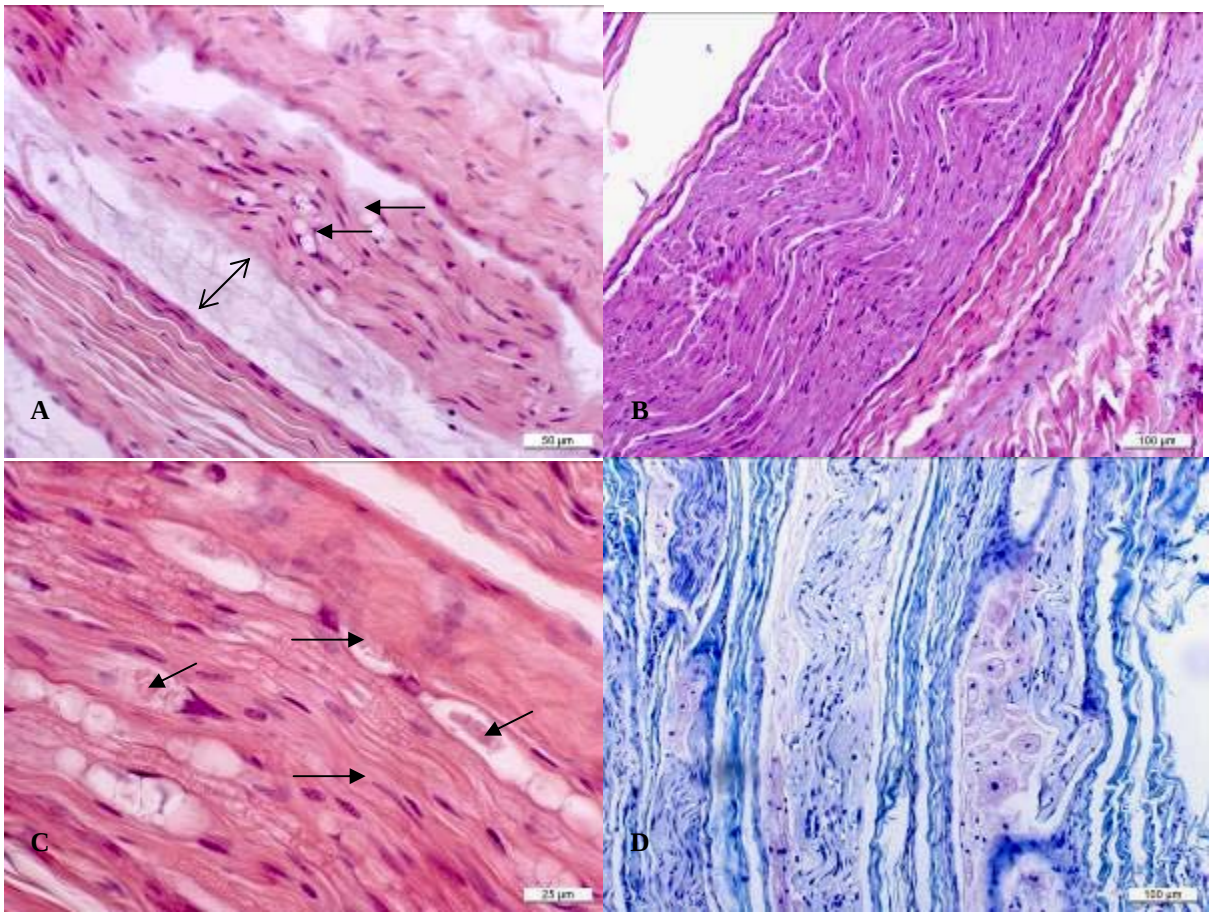


Figure I.3 : Nerf périphérique, branche atteinte du nerf commun fibulaire : dégénérescence Wallerienne. On peut noter les multiples chambres de digestion (A, flèches) et un élargissement du périneurium marqué (A, double flèches) comparé à un tissu sain (B). A plus fort grossissement, les chambres de digestion apparaissent comme contenant des débris de fragmentation axonale (C, flèches), coloration à l'Hémalun & Eosine. La perte globale de fibres nerveuses s'apprécie par l'élargissement du périneurium (D, double flèche) ainsi que par la prolifération des cellules de Schwann autour des fibres nerveuses (D, flèches), coloration au Luxol Fast Blue (D'après Casteignau *et al.*, non publié).

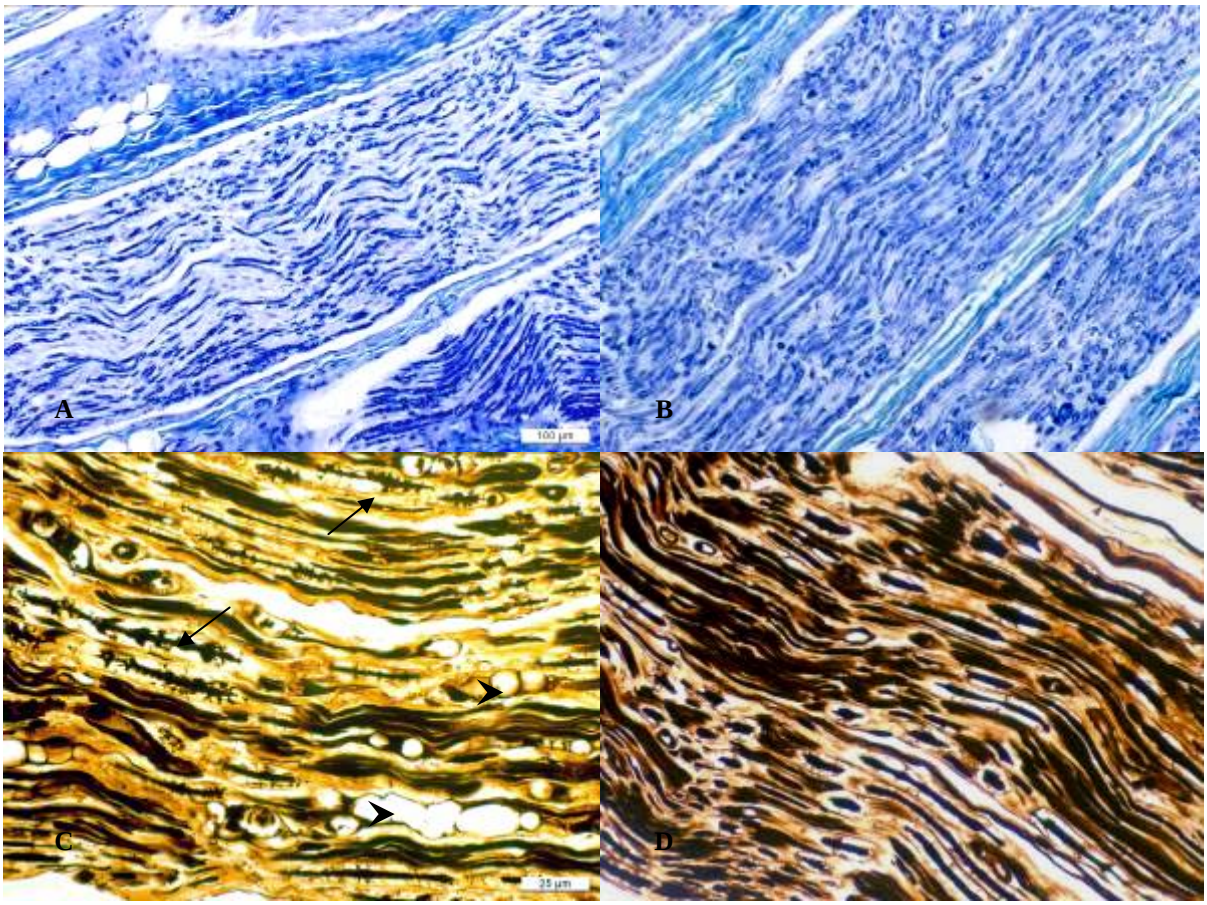


Figure I.4 : Nerf périphérique, branche atteinte du nerf fibulaire commun. Dans le haut de la figure, le luxol fast blue colore spécifiquement la gaine de myéline autour des axones en bleu foncé. On peut noter la perte globale de myéline (A) comparé au tissu sain (B). Dans le bas de la figure, la coloration de Bielchowsky colore les axones en brun foncé et la gaine de myéline en rouge doré. On peut noter la fragmentation axonale (C, flèches), associée à des chambres de digestion (C, têtes de flèche) comparé au tissu sain (D). Les axones sont irréguliers en taille et en forme et leur quantité totale est fortement réduite (D'après Casteignau *et al.*, non publié).

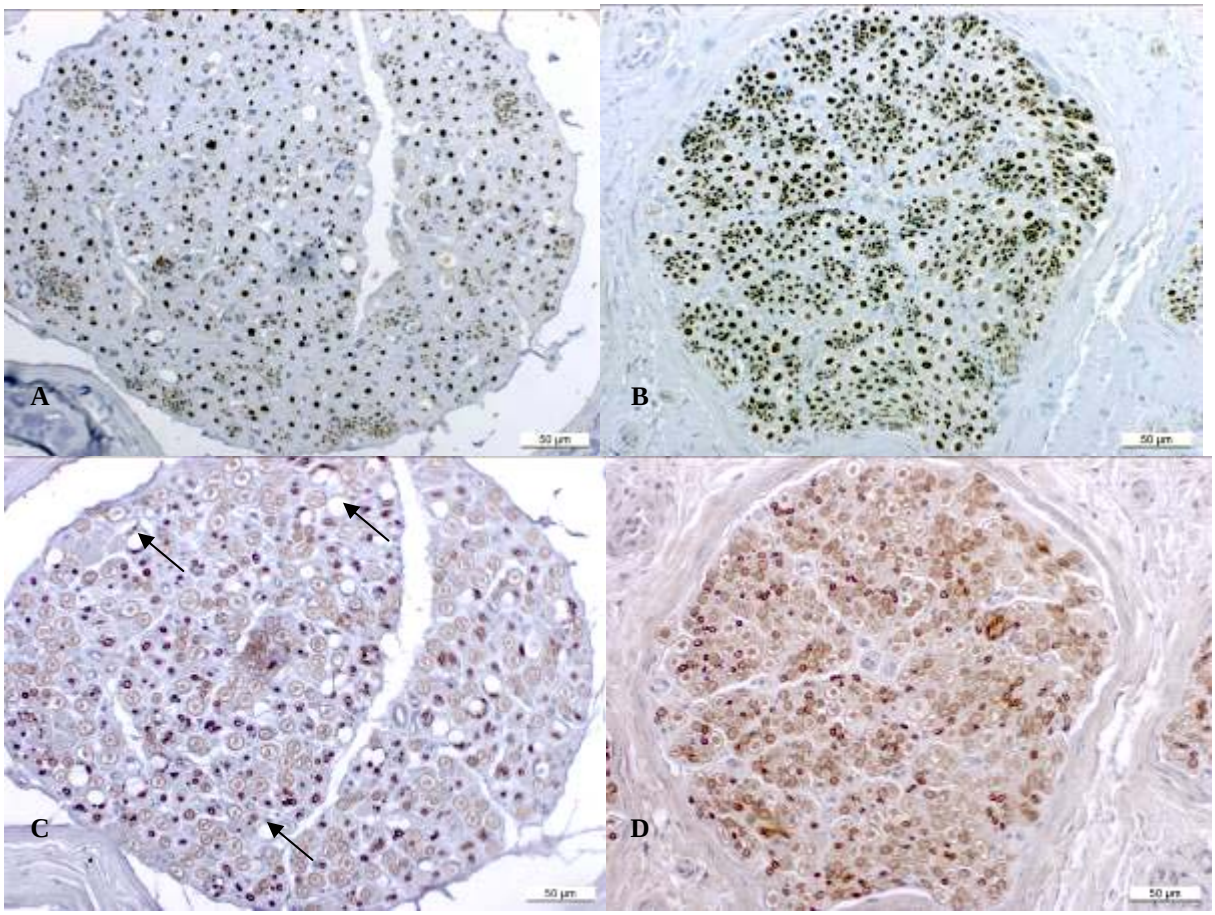


Figure I.5 : Nerf périphérique de gros diamètre, test à l'immunoperoxidase. Dans le haut de la figure, les anticorps anti-périphérine colorent les axones en brun, dans une section transversale de nerf atteint (A) et de nerf témoin (B). On peut noter la diminution sévère de la densité axonale par rapport au témoin. Dans le bas de la figure, les anticorps anti-protéine basique de myéline colorent la myéline en brun, dans des sections transversales de nerf atteint (C) et de nerf témoin (D). La perte de nombreuses fibres nerveuses peut être appréciée (flèches), associée à une diminution diffuse et modérée de l'intensité de coloration de la myéline par rapport au témoin (D) (D'après Casteignau *et al.*, non publié).

1.3.2. Lésions musculaires

Les lésions musculaires se localisent essentiellement sur les muscles **gastrocnémien**, tibial crânial, fléchisseur latéral profond des doigts, **extenseur latéral des doigts** (*10*), gracile, quadriceps, biceps fémoral, semi-membraneux, semi-tendineux et pectiné au niveau des membres postérieurs, triceps brachial et suprasupinateur au niveau des membres antérieurs et **cricoaryténoïdien latéral dorsal** au niveau du **larynx** (*7*). Les fibres musculaires ont une taille et une angulation variables et des **fibres hypertrophiées** sont présentes en faible nombre (*7*). Le tissu interstitiel élargi et la fibrose avec prolifération des fibres de collagène sont bien visibles (*Figure I.6*).

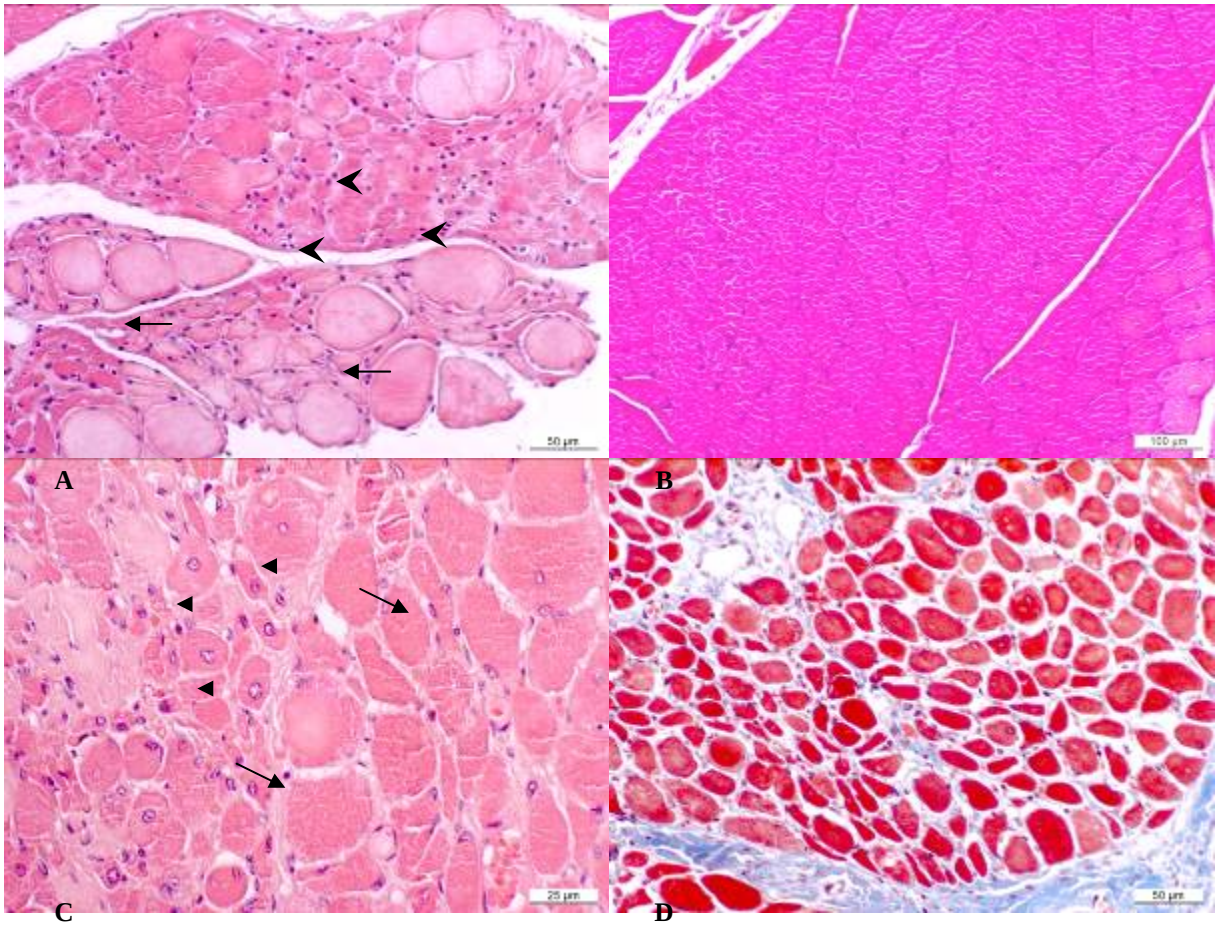


Figure I.6 : Muscle squelettique, dénervation avec des fibres rétrécies et atrophiées. Des fibres atrophiées sont réparties au hasard (A, têtes de flèches). Une pâleur et un élargissement interstitiel sont observés, comparé au tissu sain compact et dense (B). On peut noter la forme irrégulière ainsi que la pâleur et l'élargissement des fibres hypertrophiées (A, flèches) et les myotubes de régénération (C, têtes de flèche), coloration à l'Hémalun & Eosine. La dernière photo présente un œdème de l'endomysium et de la fibrose (D, flèches) : le collagène est coloré en bleu avec la coloration du Trichrome de Masson. (D'après Casteignau *et al.*, non publié).

L'atteinte essentiellement distale des fibres nerveuses myélinisées de gros diamètre qui innervent la majeure partie des fibres musculaires et la plupart des récepteurs sensoriels de ces mêmes muscles, la **perte de fibres musculaires de type II** (fortes activités ATPasique et forte activité NADH-Tr) et le pourcentage plus important de fibres de type I (faible activité myosine ATPasique et faible activité NADH-Tr) sont caractéristiques de la maladie (*7*). Cela suggère que l'Australian Stringhalt s'accompagne d'une **perte des motoneurones *α*,** ceci pouvant expliquer **l'atrophie musculaire d'origine neurogénique** (*Figure I.6*).

*En résumé, au niveau histopathologique, le harper, dans sa forme australienne, se traduit par une **dégénérescence axonale distale associée à une dégénérescence Wallérienne** dans lesquelles peuvent être observés un **gonflement** des axones, une **perte de la myéline** avec phagocytose et **vacuolisation** ou spongiose au niveau de la substance blanche. L'axoplasme est détruit par protéolyse. Le processus **débute en région distale** des fibres nerveuses et remonte en région proximale au cours du temps. Cette dégénérescence de type Wallérienne apparaissant au sein des nerfs périphériques s'accompagne d'une **atrophie musculaire neurogénique.***

1.4. Diagnostic

1.4.1. Diagnostic du type de harper

Dans les deux formes de harper, le tableau clinique est sensiblement similaire. Seul **l'examen histopathologique post-mortem est pathognomonique**.

Le recensement du couvert végétal avec **prédominance nette de l'espèce *Hypochœris radicata* (L.)** permet d'orienter le diagnostic vers un harper australien.

1.4.2. Diagnostic différentiel

Il existe de nombreuses autres affections caractérisées par des **axonopathies distales périphériques**.

On peut ainsi citer le **lathyrisme dans sa forme nerveuse ou neurolathyrisme**, dû à l'ingestion massive de graines du genre *Lathyrus sp*. (gesse) qui contiennent de fortes quantités d'acide *β*-N-oxalyl-*αβ*-diaminopropionique mais aussi d'autres pseudo acides-aminés. Cette affection se traduit cliniquement par une **faiblesse et une paralysie des membres postérieurs** avec des contractures, **une dyspnée, une sudation augmentée et un cornage,** le tout associé à un état de **dépression intense**. Au niveau histopathologique, une **dégénérescence des fibres nerveuses distales au sein des nerfs longs périphériques** peut être observée. Cette maladie est très proche du harper par son tableau clinique mais également par son origine végétale.

Peut être mentionnée également la **maladie du motoneurone**. L'étiologie de cette maladie équine est inconnue même si une **carence en vitamine E** (*18,19*) et plus largement une **déplétion en antioxydants** (*20*) **sont suspectées**. Les animaux atteints présentent une **faiblesse généralisée**, une **perte de poids** malgré un appétit normal, une **amyotrophie sévère neurogénique**, une **hyperesthésie** accompagnée de **fasciculations** musculaires au niveau des postérieurs et une inaptitude à rester immobile, matérialisée par un piétinement plus ou moins incessant. Les animaux ont une démarche caractéristique avec des **petits pas** et la **tête penchée**. Les chevaux sont peu attentifs et peu réceptifs à leur environnement. Le pronostic reste relativement sombre. Histologiquement, la **dégénérescence de type Wallérienne des motoneurones qui font de cette maladie une neuropathie périphérique** peut faire penser au harper australien mais la présence **d'inclusions éosinophiliques cytoplasmiques, de**

chromatolyse et de gonflement des neurones (*21*), sa localisation dans la **corne ventrale de la moelle épinière** ainsi que dans certains noyaux cérébraux est une différence essentielle (*22*,*23*). Ses caractéristiques cliniques et histologiques l'apparentent à la sclérose latérale amyotrophique chez l'homme.

La **dysautonomie** (ou « grass-sickness disease » ou maladie de l'herbe) correspond à une **polyneuropathie idiopathique** même si elle pourrait impliquer une **neurotoxine** affectant le système nerveux central et le système nerveux périphérique (dont la toxine botulinique (*24*)). Elle se caractérise par une **dégénérescence** spécifique des **neurones du système nerveux autonome** notamment les **neurones noradrénergiques** (*25*). Histologiquement, une perte centrale de la substance de Nissl caractéristique entraîne une décoloration ou chromatolyse, observable dans certains noyaux du tronc cérébral, dans la zone intermédio-latérale de la moelle épinière, dans les noyaux prévertébraux et paravertébraux et dans les plexi entourant l'intestin (*26*). Même si certains facteurs comme la saison ou les animaux au pré (*27*,*28*) et les cibles nerveuses peuvent laisser penser au harper, les symptômes diffèrent assez de ce dernier : les troubles locomoteurs ne sont pas visibles en permanence et se traduisent uniquement par une diminution du polygone de sustentation et des fasciculations musculaires. Des **troubles digestifs** (salivations, dysphagies, iléus, occlusions intestinales, exsudations partielles, ptoses) et de la tachycardie, engendrés par un dysfonctionnement du système nerveux autonome, sont aussi souvent observés (*29*).

Outre ces maladies nerveuses qui restent, elles aussi, très largement méconnues, certaines **affections ostéo-articulaires** du membre pelvien (accrochement de la rotule, éparvin) peuvent être également responsable d'un tableau clinique assez similaire au niveau des troubles locomoteurs.

1.5. Pronostic

Une **rémission** est possible dans le cas du harper australien, **entre 6 et 24 mois**. Cependant, il ne s'agit **que de rémission clinique apparente avec une récupération motrice.** En effet, aucune étude histologique n'a été réalisée. L'implication du potentiel de **régénération axonale** pourrait être prépondérante. En effet, les animaux après avoir été isolés des pâturages incriminés guérissent spontanément, sans traitement. En fonction du stade de leur maladie, leurs troubles locomoteurs s'atténuent et peuvent s'arrêter au bout de plusieurs mois. Cependant, la **rémission totale et complète est rare**, surtout dans le cas d'atteintes graves. L'amélioration de l'état de santé de l'animal peut ainsi à tout moment laisser place à une aggravation subite et à une reprise de troubles locomoteurs. En effet, certains stimuli comme la maladie, le stress, l'humidité sont autant de facteurs favorisants attestant de la **composante multifactorielle du harper** (*4*).

1.6. Traitement

1.6.1. Traitement palliatif

Tout d'abord, il est recommandé de **changer l'animal malade de pâture** pour éviter tout contact prolongé avec la plante.

1.6.2. Traitements médicaux

A l'heure actuelle, **aucun traitement spécifique** approprié n'a pu être recommandé. En effet, la maladie, les voies métaboliques impliquées lors du processus toxique ainsi que les principes actifs n'étant pas encore connus, aucune orientation thérapeutique ne peut donc être privilégiée. Cependant, certains conseils d'ordre pratique ainsi que certains principes actifs ont été testés.

a. Traitements médicaux allopathiques

En 1991, Huntington a testé sur 5 chevaux atteints un traitement de 15 mg/kg *per os* de **phénytoïne** une fois par jour durant 2 semaines et a pu ainsi démontrer une **amélioration des troubles locomoteurs**, un retour proche à la normale des examens électromyographiques ainsi qu'une **tranquillisation** des animaux (*30*).

Takahashi *et al.*, en 2000, ont également administré oralement ce traitement à la dose de 10 mg/kg deux fois par jour sur des chevaux atteints de grade I au grade III. Une amélioration des signes cliniques a été notée après 3 à 8 jours de traitement mais l'arrêt de celui-ci a entraîné une exacerbation des symptômes (*6*). En 2000 également, Wijnberg *et al.* ont pu montrer que l'effet thérapeutique était atteint avec une administration de 12 mg/kg deux fois par jour (*31*). Ce traitement avec de la phénytoïne à raison de 15 à 25 mg/kg *per os*, deux fois par jour, précédé ou non d'un traitement d'une semaine à base de thiamine ou vitamine B_1, a également été testé par Gardner *et al.* en 2005 (*15*) et est encore actuellement régulièrement prescrit sur des chevaux atteints. Les résultats d'un tel traitement sont variables pouvant aller d'une amélioration rapide mais limitée dans le temps à une absence totale de résultat. Dans le cas d'une amélioration clinique notable, il est indispensable de noter que l'arrêt du traitement ne doit pas être réalisé brutalement mais progressivement, au risque d'aggraver les symptômes.

La phénytoïne est un **antiépileptique à action centrale** : elle réduit les contractions musculaires tétaniques ainsi que les activités électriques des nerfs périphériques. Elle agit comme un **anticonvulsivant** en **bloquant les canaux Ca^{2+}.** De ce fait, elle abaisse les potentiels d'action et augmente le potentiel de seuil. Même si aucune lésion apparente du système nerveux central n'a pu être notée, apparentant ainsi cette maladie à une neuropathie périphérique, ce principe actif agirait en interférant avec la perception centrale de l'information proprioceptive. Les résultats positifs chez certains animaux pourraient également être dus au mode d'action **anxiolytique** de la phénytoïne permettant ainsi d'améliorer leur état psychique.

Certains auteurs ont pu rapporter des essais de traitement avec de la **méphénésine**, un **relaxant musculaire à action centrale**, partant du principe que des dysfonctionnements dans certaines régions du système nerveux central intervenaient pour partie dans la pathologie du harper (*9*). L'amélioration de **l'animal unique testé** ayant eu lieu tardivement (6 mois après le début du traitement), il n'est pas possible d'attribuer catégoriquement cette guérison à l'effet propre de la méphénésine ou à une guérison spontanée.

Des essais avec le baclofen ont également été menés (6,32). Le baclofen appartient aux familles des **antispasmodiques** et **relaxants musculaires** et constitue un traitement de choix pour les états de **spasticité** sévère ou mouvements involontaires des muscles à point de départ médullaire et/ou cérébral. L'animal atteint de harper australien présente en effet, une démarche anormale avec une composante spastique. Agoniste GABA, le baclofen agit sur le système nerveux central en mimant l'inhibition pré-synaptique dans la moelle épinière. En 1992, en Australie, Kannegleter *et al.* ont testé avec succès l'administration d'une dose de 1 mg/kg oralement 3 fois par jour sur 10 chevaux atteints (*32*). A l'inverse, en 2000, Takahashi *et al.* ont administré oralement à un cheval atteint de grade III, à la dose de 7,1 mg/kg deux fois par jour durant 1 jour puis le jour suivant à la dose de 10 mg/kg deux fois par jour puis à 10 mg/kg trois fois par jour durant 8 jours. Cependant, même après ces 10 jours de traitement, **aucune amélioration** n'a pu être notée (*6*).

Des essais sporadiques **d'α_2 agonistes** (romifidine : Sedivet®) ainsi que de **strychnine** ont également été tentés (*33*). La romifidine entraînerait une amélioration sensible, *a priori* expliquée par l'effet myorelaxant de ce tranquillisant. L'emploi de strychnine est trop anecdotique pour prétendre à tirer des enseignements fiables.

Enfin, des essais de **supplémentations vitaminiques en vitamine B1** (thiamine) dont la carence est connue pour entraîner des axonopathies distales et en **vitamine E** dont le déficit est à l'origine de la **maladie du motoneurone central** n'ont montré aucune amélioration notable.

b. Traitements médicaux homéopathiques

Des essais de traitements à partir de dilutions de teintures-mères de *strychnine, Hypochoeris radicata, Ignatia, Lathyrus* ont été tentés mais sans effet observé.

1.6.3. Traitement chirurgicaux

Le traitement chirurgical conseillé lors de harper consiste à réaliser une **myoténectomie du muscle extenseur latéral du doigt** ou une **ténectomie** du tendon de ce même muscle au niveau où il croise la surface latérale de l'articulation du jarret (*34*). Cette intervention nécessite de réaliser deux incisions verticales, proximalement et distalement à

l'articulation du jarret. Dans un premier temps, les tissus sous-jacents sont dilacérés pour atteindre distalement le tendon. Celui-ci est alors sectionné et, proximalement, le tendon est tiré afin de le faire sortir de sa gaine. Cette intervention entraîne une **nette amélioration** de la démarche des animaux (**70%** d'après Adams et Fessler), même si celle-ci n'apparaît pas immédiatement après la chirurgie mais plutôt quelques jours à quelques semaines plus tard (*34*). Cependant, la guérison n'est jamais totale et a tendance à laisser place à un **léger trainement des postérieurs**, manifestation peu recherchée sur un cheval de sport, comme le mentionne Collignon dans son étude épidémiologique (*33*). Comment expliciter de tels résultats, là même où les traitements médicaux restent inefficaces et où la forte présomption d'une maladie d'intoxication nutritionnelle et neurogénique reste prédominante ? En fait, même si le mécanisme d'action reste méconnu, les résultats positifs de cette intervention résideraient dans le fait que la **proprioception** et donc les **influx nerveux sensitifs** seraient **diminués**, le tout entraînant une diminution de la contraction nerveuse. Ainsi, il s'agirait plus d'une **interférence avec le mécanisme de proprioception** et non d'un traitement spécifique en soi.

Cependant, le traitement chirurgical reste à l'heure actuelle le traitement donnant les résultats cliniques les plus rapides et devient de plus en plus utilisé, comme a pu le souligner Collignon (*33*).

1.7. Etiologies : quelle est l'implication d'*Hypochœris radicata* L. ?

Historiquement, les hypothèses concernant l'étiologie de cette affection ont été très nombreuses et très variées.

Kendall en **1884** (*1*) rapportait déjà le fait que la maladie serait due à **l'ingestion de plantes de la famille des Composés** dont la pleine floraison se situe en été, parmi lesquelles la possible *Hypochœris radicata*. Cependant, des **expérimentations** menées en **1924** puis en **1926** (*35*) pour reproduire la maladie chez le cheval, en le faisant pâturer sur un paddock rempli de fleurs de cette espèce, durant 82 jours, se sont révélées **infructueuses**. Les quantités insuffisantes, les stades floraux non appropriés, l'absence de sensibilité du cheval testé ou encore l'absence de contrôle d'autres facteurs pourraient expliquer de tels résultats.

Par la suite, les hypothèses émises ont été très diverses. En **1950**, O'Connor pose l'hypothèse que d'éventuelles **lésions articulaires du jarret ou du grasset**, des lésions nerveuses non précisées, des affections plantaires, une contraction spasmodique des muscles seraient responsables du harper (*36*). Ces éléments restent très flous et forment plutôt une liste de structures tissulaires endommagées que de réelles possibilités étiologiques, mais cet auteur fait plus référence à des cas de harper dans sa forme classique, traumatique, que de cas de harper australien. En **1962**, Adams donne plus de précisions en rendant compte de l'implication majeure du système nerveux dans la pathologie, en rattachant l'origine de l'Australian Stringhalt à une **dégénérescence des nerfs sciatiques et/ou péronés** associée à des altérations de la moelle épinière (*37*).

En **1979**, Pemberton émet l'hypothèse que la cause du harper serait liée à un **hyperthyroïdisme** à cause de certaines similitudes cliniques avec la maladie chez l'homme. Cependant les dosages de thyroxine se révèlent non concluants (*38*).

En **1989**, Huntington, bien que mentionnant la possibilité **d'intoxication végétale**, émet aussi l'hypothèse d'une maladie liée à l'ingestion de **mycotoxines** (*2*).

Jusque là, les cas de harper ont été trop sporadiques et anecdotiques pour justifier des études plus poussées et les hypothèses n'ont pas été explorées plus avant. Or, depuis quelques dizaines d'années, une recrudescence de cas sporadiques ainsi que d'épidémies de harper chez les chevaux a pu être recensée tout autant en Amérique du Nord qu'en Australie, Chili, Nouvelle-Zélande et Europe. **En France**, à la suite de l'été caniculaire de **2003**, de nombreux cas sont recensés et permettent une communication plus poussée auprès des différents acteurs de la filière équine. L'intérêt et les questions concernant cette pathologie et son origine ont donc pu être posés et étudiés de façon plus approfondie.

La plupart des comptes rendus épidémiologiques sont restés, la plupart du temps, sans conclusion et, les étiologies soulevées se sont donc avérées très différentes les unes des autres, allant de l'ingestion possible de produits toxiques chimiques, de plantes toxiques, de mycotoxines, aux maladies génétiques et/ou aux pathologies métaboliques particulières (*2*) (*39*). En résumé, personne ne peut affirmer avec certitude, à l'heure actuelle, connaître l'origine de la maladie. Il est vrai que celle-ci se traduit par certains symptômes pouvant rappeler certaines autres maladies plus connues comme le **lathyrisme** dans sa forme nerveuse, ou comme la **carence en vitamine B_1**, ou encore l'intoxication à certains produits chimiques (organophosphorés ou acrylamide).

Cependant, la plupart des auteurs émettent **préférentiellement la possibilité d'intoxication végétale** et rapportent la présence systématique de certaines espèces végétales dans les parcelles pâturées. Parmi les espèces les plus souvent mentionnées se retrouvent le Ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.), le chiendent (*Cynodon dactylon* L.), l'oseille (*Rumex sp.*), les Chénopodes (*Chenopodium sp.*), les mauves (*Malva parviflora* L., *Figure I.7*), les gesses (*Lathyrus sp.*, *Figure I.8*), les pissenlits (*Taraxacum officinale* Weber, *Figure I.9*) et la porcelle enracinée (***Hypochœris radicata*** L., flatweed ou catsear en anglais, *Figure I.10*) (*10,13,39,40*).

Figure I.7 : Photos de l'inflorescence et de l'appareil végétatif de l'espèce Malva parviflora (Sources : http://professorpbrainsblog.blogspot.com/2007_06_01_archive.html et http://species.wikimedia.org/wiki/Malva_parviflora)

Figure I.8 : Photo d'une Gesse. Elle se distingue notamment par ses tiges ailées, ses feuilles paripennées à nombre de folioles réduits et à ses fleurs papilionacées (Source : B. Domange).

Il est important de noter que l'appellation « dandelion », qui en Europe fait référence à la dénomination latine du pissenlit (Figure *I.9*), correspond dans d'autres régions à la porcelle notamment en Australie (*35*), en Nouvelle-Zélande (*12*) ou au Chili. De plus, l'identification entre différentes espèces de la famille des Composées peut, pour des personnes profanes en botanique, être facilement sujette à confusion.

Figure I.9 : Photo de Taraxacum officinale (Weber) ou Pissenlit Dendelion. Le terme « dendelion » est utilisé de façon abusive dans certains pays anglo-saxon pour désigner la porcelle enracinée et non le pissenlit dendelion (Source : http://www.chirinka.com/catalog/index.php?cPath=23&main_page=index).

Progressivement, parmi toutes ces espèces, *Hypochœris rad*icata est devenue l'espèce la plus incriminée (*10,13-15,38,40*). En effet, hormis certains cas réfutant cette hypothèse, comme les cas recensées au Chili (*16*), les animaux atteints ont eu pour caractéristique commune d'avoir pâturé sur des parcelles pauvres, sèches, sur lesquelles cette espèce était présente en abondance.

En **1980**, Pemberton tente de reproduire la maladie sur animaux de laboratoire en leur injectant des extraits concentrés de plante mais sans succès (*40*).

En **1992**, Gay et son équipe incriminent directement la plante, après l'observation de cas d'Australian Stringhalt en Amérique du Nord (*14*) . En **2005**, la relation est directement soulignée par Gardner et son équipe lors de l'étude de cas en Virginie (*15*) ce qui est confirmé par les cas observés en France après l'été de **2003** (*17*).

1.8. Prévention

Le traitement spécifique du harper étant actuellement encore inconnu, les améliorations engendrées par la chirurgie et l'administration de phénytoïne étant incertaines et les guérisons spontanées étant longues et incomplètes, les **mesures de prévention restent indispensables** et incontournables pour les propriétaires de chevaux faisant pâturer leurs animaux à l'extérieur. Cette prévention peut s'effectuer suivant 3 modalités :

- Un **arrachage manuel** des plants d'*Hypochœris radicata,* action qui reste raisonnable uniquement si le nombre de plants est peu conséquent au sein de la parcelle. En effet, la puissance du système racinaire de cette plante limite un tel procédé (*Figure I.10*).

- Une **réfection de la prairie**, sachant que celle-ci doit se faire de façon régulière, la colonisation de la parcelle par *Hypochœris* étant très aisément réalisable par le vent. Elle consiste en un **désherbage** suivi d'un **labour** puis d'un **réensemencement** de la parcelle avec un mélange de Graminées.

- Un **désherbage sélectif** de la parcelle à l'aide de dérivés picoliniques, à base de clopyralid ou de triclopyr. Ces herbicides sont efficaces contre les Astéracées telles que *Hypochœris* mais restent très toxiques et dangereux pour la faune aquatique et sont donc susceptibles d'être néfastes à long terme sur l'environnement.

Après avoir décrit le tableau clinique relatif au harper, il demeure donc indispensable de donner quelques éléments supplémentaires d'information concernant le végétal le plus fortement incriminé à l'heure actuelle : Hypochœris radicata.

2. *Hypochœris radicata* (L.)

2.1. Habitat

***Hypochœris radicata* (L.)** ou **Porcelle enracinée** est une espèce de la famille des **Composées ou Astéracées**. La répartition géographique mondiale de cette espèce végétale rend compte de son **formidable potentiel d'adaptation** : elle s'étend ainsi sur de larges variations de latitudes et de longitudes. Initialement originaire d'Asie, d'Afrique du nord et d'Europe, on la retrouve, à l'heure actuelle, en Amérique du sud et du nord, en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Europe continentale et méditerranéenne ainsi qu'en Irlande et en Grande Bretagne.

Concernant son **biotope**, cette plante affectionne les **sols pauvres** qui sont en général **acides**. De ce fait, elle côtoie habituellement des indicateurs végétaux d'acidité tels le *Rumex sp.*, les *Setaria sp* ainsi que d'autres espèces indicatrices de sols pauvres telles les *Cynodon sp.*, les *Bromus mollis*, les *Hordeum sp*. Elle peut donc se retrouver sur les sols graveleux et sablonneux, les pelouses, les prairies et les terrains vagues. Il s'agit donc d'une plante **opportuniste**, facilement **adaptable et colonisatrice**.

2.2. Etymologie

Sa terminologie française « enracinée » rend compte de son profond ancrage dans le sol grâce à une **racine puissante et persistante**, ce qui entraîne une certaine difficulté à l'extraire mécaniquement (*Figure I.10*). Son nom de genre français « Porcelle » souligne son ancienne utilisation en tant qu'aliment **distribué aux porcs**, ce qui sous-entend donc une absence de risque toxique, tout du moins recensée chez cette espèce.

Ses racines grecques et latines soulignent, d'une part, de façon identique à la dénomination française, la présence d'une racine de taille imposante (lat *radix* : racine) et, d'autre part, son emploi ancestral en tant qu'aliment distribué aux jeunes porcs (gr *υπό*: sous, *χοίρίνό* : porc).

2.3. Description botanique et Biologie

Cette plante, de 20 à 40 cm de haut en moyenne (*Figure I.10*), présente des tiges pleines, dressées, glauques, ramifiées à l'apex desquelles s'ouvrent des **capitules jaune vif**

solitaires (*Figure I.10* et *Figure I.11*). Les seules feuilles forment une **rosette basale de feuilles** hispides, hérissées de poils raides, à bords irréguliers, oblongues, atténuées à la base et pennatifides (*Figure I.10* et *Figure I.12*). Les tiges à la coupe laissent poindre un **latex** colorant et irritant mais différent du suc laiteux et blanc de *Taraxacum officinale (L.),* appelé plus communément Pissenlit dendelion. La Porcelle enracinée est une **plante vivace** qui fleurit d'avril à septembre. Son système racinaire est profond, fibreux et puissant (*Figure I.10*), ce qui explique en partie sa résistance et la repousse rapide de son appareil végétatif aérien après la coupe.

Figure I.10 : Dessin (à gauche) et photo (à droite) d'Hypochœris radicata. La plante de 20 à 40 cm de haut, en moyenne, présente une rosette basale de feuilles hispides, hérissées de poils raides, à bords irréguliers, oblongues, atténuées à la base, pennatifides ainsi que des tiges pleines, dressées, glauques, peu ramifiées et à l'apex desquelles s'ouvrent des capitules jaunes vif solitaires. Son système racinaire est profond, fibreux et puissant, ce qui explique en partie sa résistance et la repousse rapide de son appareil végétatif aérien après la coupe (Sources : B. Domange et http://www.ruhr-uni-bochum.de/boga/html/Hypochoeris_radicata_Foto.html).

Figure I.11 : Photo d'inflorescences d'Hypochœris radicata à maturité. La plante présente des tiges pleines, dressées, glauques, peu ramifiées et à l'apex desquelles s'ouvrent des capitules jaunes vif solitaires. (Source : http://www.hear.org/starr/hiplants/images/hires/starr_080317_3615_hypochoeris_radicata.jpg).

Figure I.12 : Rosette basale de feuilles d'Hypochoeris radicata (à gauche) et feuille d'Hypochoeris radicata (à droite). On peut observer que les feuilles sont hérissées de poils raides présents sur les deux faces (Source : http://www.oardc.ohio-state.edu/weedguide/singlerecord.asp?id=910).

La Porcelle enracinée possède un **fort pouvoir colonisateur** :

En effet, elle se **développe très rapidement**, pouvant passer du stade germinatif au stade plante fleurie, en deux mois à peine.

Ses fruits rassemblent de nombreuses graines pourvues d'**aigrettes**, assurant ainsi une très bonne **dissémination anémophile** et une colonisation géographique très large.

Au pré, cette plante fait preuve d'une grande capacité de **concurrence** vis-à-vis d'autres végétaux, ce qui en fait une plante **opportuniste** par excellence. Le recouvrement des surfaces par ses rosettes de feuilles limite considérablement le développement d'autres espèces.

De plus, cette plante possède **un potentiel de résistance** tout à fait exceptionnel face à des périodes de **sécheresse** intense et prolongée, mais également face à l'utilisation de nombreux **herbicides**.

Toutes ces particularités biologiques rendent compte de l'observation récurrente de couverts végétaux composés quasi exclusivement par cette espèce végétale ainsi que de la colonisation de plus en plus fréquente au sein du territoire français, notamment à la suite vraisemblablement des variations climatiques et d'épisodes chauds et secs qui tendent à se multiplier de plus en plus.

Enfin, il est intéressant de noter que cette plante a pour caractéristique d'être très **appétante**, les animaux en étant friands. En Nouvelle-Zélande ou en Australie, les animaux domestiques pâturant sur les prairies, porcs, moutons ou même la faune sauvage privilégient cette espèce végétale aux autres.

Sa présence quasi exclusive à l'état de pleine maturité sur les parcelles en période estivale et son appétence vis à vis des animaux constituent les facteurs essentiels à prendre en compte dans l'apparition de cas de harper.

Le harper australien, ses manifestations, son contexte, son étiologie probable et l'implication d'Hypochœris radicata ont été présentés. Certaines lacunes persistent donc encore à l'heure actuelle et nécessitent d'être comblées en vue, si possible, de proposer un traitement spécifique.

Cette première partie nous a permis de présenter les données concernant les manifestations et les caractéristiques du harper australien chez le cheval. En résumé, cette ***maladie saisonnière*** *tend à se manifester en* ***fin d'été/début d'automne****, après une période exceptionnellement* ***chaude et surtout sèche****, sur des animaux pâturant la plupart du temps sur des* ***parcelles pauvres*** *sur lesquelles sont recensées de grandes quantités d'****Hypochœris radicata.*** *Les rares cas où les animaux ont présenté les symptômes, sans être au pré et/ou sans avoir été en contact avec la plante, semblent plus être des cas de harper dans sa forme classique ou des cas où les inventaires botaniques n'ont pas été réalisés de façon rigoureuse (3,6). La concomitance des facteurs sécheresse et Hypochœris radicata n'est pas anodine : la* ***sécheresse*** *entraîne la prédominance de quelques rares espèces végétales résistantes dont Hypochœris radicata et cette dernière, suite aux* ***stress hydrique et climatique****, est plus apte à synthétiser d'éventuels métabolites secondaires potentiellement toxiques.*

Histopathologiquement, cette maladie s'apparente à une ***axonopathie périphérique distale*** *affectant préférentiellement les* ***axones myélinisés de gros calibre*** *et les plus* ***longs*** *d'où l'atteinte initiale des membres postérieurs, des nerfs récurrents laryngés entrainant le cornage et la prédisposition possible de certaines races équines de grande taille (7). Structuralement, les axones subissent une* ***dégénérescence****, la privation d'innervation de certaines régions entraînant une* ***atrophie secondaire sélective des muscles*** *associés. Fonctionnellement, ceci se traduit par un* ***dysfonctionnement de la conduction nerveuse*** *associé à un* ***dysfonctionnement de la contraction musculaire****, le tout entraînant une* ***démarche mal coordonnée*** *aux* ***mouvements exacerbés****. La composante* ***nerveuse centrale*** *n'est pas à exclure du fait de l'aggravation lors de stress, d****'excitation ou d'anxiété*** *anormale des animaux et du fait des résultats positifs obtenus avec certaines drogues à action centrale.*

L'impossibilité à reproduire expérimentalement cette intoxication dans l'espèce cible et chez les animaux de laboratoire n'a pas permis à ce jour de faire progresser les connaissances sur cette maladie.

Les tests effectués sur chevaux pâturant sur des paddocks envahis n'ont rien révélé non plus, du fait du grand nombre de facteurs pouvant intervenir, de l'hétérogénéité du nombre d'animaux atteints et des degrés variables d'atteinte.

Peut-être les animaux de laboratoire ne sont ***pas aptes à reproduire la maladie*** *avec les méthodes classiquement employées en toxicologie et leur* ***sensibilité*** *n'est peut être pas suffisante pour développer des lésions ou symptômes.*

C'est cet ensemble de facteurs inconnus et cette dépendance qu'ont les méthodes classiques de prospection toxicologique à ne travailler que sur des modèles animaux réceptifs et sensibles, à n'étudier des toxiques qu'une fois les dommages tissulaires et fonctionnels mesurables, qui nous ont conduits à ***reconsidérer les méthodes d'approche employées****.*

Nous sommes ***incapables de reproduire la maladie*** *car le toxique, si il est présent, n'est pas apte à entraîner une réponse cliniquement observable, le point de rupture entre métabolisme physiologique et pathologique n'étant peut être pas atteint. Nous avons donc émis une* ***hypothèse basée sur le concept d'orthologie*** *: avant d'atteindre ce point de rupture, avant que les désordres et dysfonctionnements métaboliques ne soit patents, l'administration d'un toxique ou d'un agent inhabituel doit engendrer une empreinte, une marque visible dans le métabolisme de l'organisme. C'est cette marque que l'on désire révéler.*

La ***métabonomique*** *est l'approche adaptée ; elle sera employée en premier lieu afin de générer des données, sans a priori et en ayant une vision globale de l'organisme. En second lieu, d'autres approches moins globales seront utilisées afin de venir conforter et apporter des éléments de réponse supplémentaires.*

B. Approches, techniques et systèmes biologiques

Nous avons engagé cette thèse sans avoir **aucun *a priori*** sur la nature, la localisation, les cibles potentielles du ou des toxiques éventuels contenus dans la plante. Cependant, en considérant que l'espèce *Hypochæris radicata* était responsable de la maladie, nous avons émis **l'hypothèse d'orthologie** : les perturbations métaboliques faisant suite à l'ingestion de la porcelle enracinée doivent présenter certaines similitudes entre espèces. La seule approche capable d'étudier les désordres métaboliques sans *a priori* est la **métabonomique**.

1. La métabonomique : une approche globale

1.1. Définition et généralités

La métabonomique est une **méthode d'approche globale,** basée sur la mesure quantitative de réponses métaboliques multiparamétriques dynamiques de systèmes vivants aux modifications génétiques ou aux stimuli physiopathologiques et cela, grâce à des techniques non invasives le plus souvent (*41*).

Les termes de **métabolomique** et de **métabonomique** sont souvent utilisés sans distinction précise. Cependant, de façon plus exacte, la première approche s'attache plus à l'étude du métabolisme à l'échelle cellulaire, la seconde a pour ambition d'accéder à une échelle plus vaste, en englobant les voies métaboliques propres à l'organe, voire à l'organisme pris dans sa totalité. Dans ces deux cas, le concept général se fonde sur **l'analyse quantitative du métabolome** (métabolome : ensemble des métabolites issus des réactions biochimiques au sein d'un organisme ou d'un environnement cellulaire) et permet ainsi la **mesure de faibles variations de concentrations de métabolites** ou petites molécules au sein de matrices biologiques grâce à une approche analytique globale.

De très nombreux exemples existent dans la littérature sur les modifications métaboliques associées à différentes maladies comme : le cancer (*42-44*), le diabète (*45*), certaines maladies cardiovasculaires (*46,47*), des maladies affectant le système nerveux (*48-50*), les désordres métaboliques (*51*) et les maladies infectieuses (*52-54*).

Le fait de prendre en compte le **métabolisme de l'organisme dans sa globalité** a pour avantage de donner beaucoup plus d'informations et permet également de découvrir des variations de certains métabolites inconnus *a priori*. L'avantage non négligeable de l'approche métabonomique est sa capacité à pouvoir **étudier l'évolution des modifications ou disruptions métaboliques**, les réorientations de synthèse de molécules ou de voies métaboliques à la fois dans le temps et dans l'espace. Il s'agit d'une **méthode d'approche holistique,** infiniment **réaliste,** car tout déséquilibre doit être appréhendé et **interprété au sein de son environnement** et non de façon isolée.

1.2. Principales techniques employées pour générer des données

La métabonomique ou devrait-on dire plus correctement les métabonomiques, de par les techniques qui peuvent être adoptées, permettent d'obtenir une « **photo instantanée** » **de l'organisme à un temps t,** ce que l'on nomme **profil ou signature métabolique**.

Ces approches métabonomiques dépendent très étroitement de **plateformes spectroscopiques** avancées telles la **spectroscopie par résonance magnétique nucléaire** (RMN) ou la **spectrométrie de masse** (MS). Cependant, la technique la plus largement répandue à l'heure actuelle et utilisée dans les domaines de la toxicologie et de la pharmacocinétique est la spectrométrie RMN, ceci étant dû en majeure partie à l'essor et l'ampleur des travaux du Professeur Nicholson de l'Imperial College de Londres qui est, à l'heure actuelle, la personne essentielle et incontournable de la métabonomique sur la scène internationale.

Ces technologies génèrent des **données à haut débit** à partir d'échantillons biologiques. Elles composent alors un profil métabolique caractéristique pour de nombreux métabolites endogènes biologiquement importants (*55*) qui reflètent ainsi le statut physiologique ou pathologique d'un organisme. Les échantillons biologiques pouvant être analysés sont des **fluides biologiques** tels que les urines, le liquide cérébro-spinal ou céphalo-rachidien (LCR), le plasma ainsi que des **cellules ou tissus.** Pour un individu donné, la matrice biologique est « scannée », permettant ainsi de révéler un **profil métabolique (signature métabolique),** celui-ci étant obtenu par la mesure simultanée de centaines de composants ou métabolites. En effet, les réponses d'un organisme ou de cellules face à des stimuli peuvent se traduire par une modification de ces profils métaboliques.

Cette modification correspond plus précisément à un ajustement de l'environnement intra ou extracellulaire nécessaire pour maintenir un état d'équilibre dynamique ou **homéostasie**. Même si l'homéostasie permettant à l'organisme de ne pas présenter de troubles pathologiques est maintenue, les modifications métaboliques, aussi minimes et subtiles soient-elles (et pouvant ne pas être décelées pas d'autres voies d'approche plus conventionnelles) ayant participé à ce maintien, peuvent être décelées et exprimées par les altérations de composition des différentes matrices biologiques.

1.2.1. La spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire (RMN)

a. généralités

La spectroscopie par résonance magnétique est une technique extrêmement puissante pour déterminer la structure des molécules et pour identifier des molécules de faible poids moléculaire au sein d'une matrice. Elle se fonde sur les **propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique intense.**

La **présence ubiquitaire des atomes d'hydrogène** au sein des biomolécules, tout autant que sa distribution favorable comme isotope et sa sensibilité magnétique font de la RMN du ^{1}H la technique de choix utilisée pour obtenir des profils métaboliques.

b. Principes physiques

Notion de spin

Tous les atomes possèdent un noyau caractérisé par une charge électrique et une masse. Ceux, dont le nombre de masse ou le numéro atomique est impair tels que ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{31}P, possèdent une propriété nommée le **spin** telle que les **noyaux** de ces atomes sont caractérisés par un **moment magnétique μ**. De ce fait, ils peuvent être apparentés à de petits barreaux aimantés.

En absence de champ magnétique B_0, les spins des noyaux sont positionnés au hasard. En revanche, en **présence de champ magnétique B_0**, ces noyaux vont **s'orienter** et réaliser un mouvement autour de B_0, similaire à celui effectué par une toupie autour d'un axe de direction B_0 (*Figure I.13a*). Ce mouvement, appelé « **mouvement de précession** » par Larmor est défini par la relation :

$\omega_0 = \gamma B_0$ avec ω_0 : la vitesse angulaire et γ, le rapport gyromagnétique, caractéristique du noyau.

Ainsi, les noyaux caractérisés par un γ spécifique, en présence de champ magnétique B_0, vont avoir pour caractéristique de présenter un mouvement de précession à une fréquence caractéristique de B_0.

Les atomes tels que ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{31}P possèdent un **nombre quantique de spin égal à ½.** De ce fait, en présence de **champ magnétique externe**, ces atomes peuvent prendre **2I+1** positions possibles soit 2 orientations, sous forme de **cônes parallèles** ou **antiparallèles** au champ magnétique B_0 (*Figure I.13b*). Ces deux orientations correspondent à deux niveaux d'énergie. La différence d'énergie entre ces deux états est :

$\Delta E = h\gamma/2\pi\ B_0$ (avec h = 6.626 x 10^{-34} J s, constante de Planck).

Cette **différence d'énergie** dépend du champ magnétique appliqué B_0. Elle engendre la présence de deux populations de niveaux d'énergie : $\mathbf{E_{1/2}}$ **et** $\mathbf{E_{-1/2}}$**,** la première population étant légèrement supérieure à la seconde. De ce fait, la somme ou **résultante** de l'ensemble des moments magnétiques des noyaux correspond à un vecteur $\mathbf{\overrightarrow{M_0}}$ de même sens et même direction que B_0.

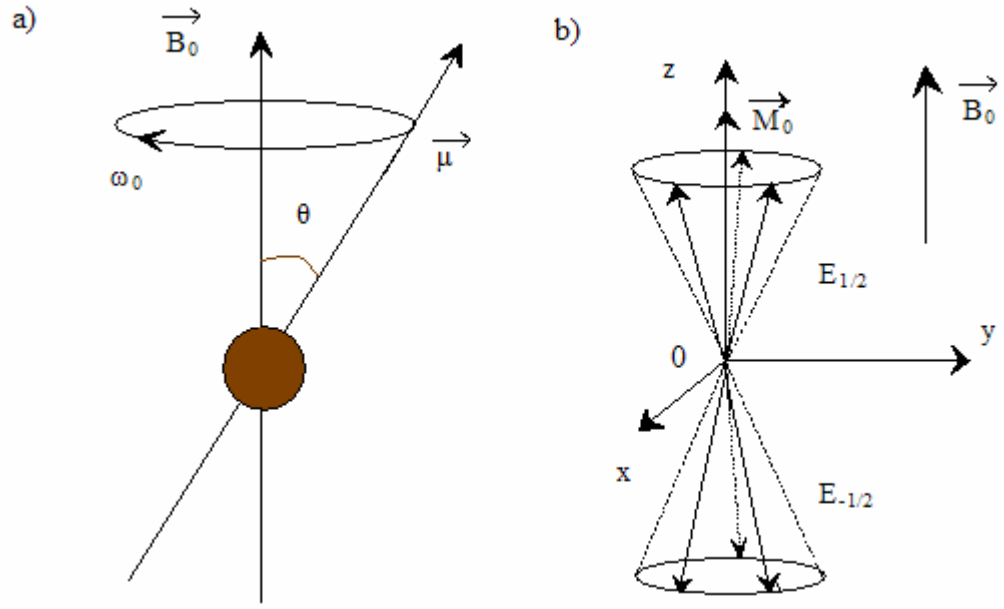


Figure I.13 **: Schémas expliquant l'impact d'un champ magnétique uniforme B_0 sur les spins des noyaux de valeur** ½ :a) mouvement de précession de Larmor de vitesse angulaire ω_0 des noyaux caractérisés par un moment magnétique μ autour d'un champ magnétique B_0, selon un angle θ. b) cônes décrits pas les deux populations de spin, caractérisées par deux niveaux énergétiques $E_{1/2}$ et $E_{-1/2}$. La résultante entre ces deux populations est un vecteur M_0 de même direction que B_0 (D'après Dumas, 2002).

Spin soumis à un champ électromagnétique additionnel B_1

Approche "énergétique" à l'échelle nucléaire en mécanique quantique

La **transition** appelée également **résonance** entre deux états de spin est réalisée lors de l'application d'un champ électromagnétique B_1. Cette transition est susceptible de s'accompagner de **l'absorption** ou de l'émission d'un **photon** ou quantum d'énergie, de valeur :

$\Delta E = h\nu$, (avec h = 6.626 x 10^{-34} J s, constante de Planck et ν la fréquence du photon absorbé).

Or **$\omega_0 = \gamma B_0$** et **$\Delta E = h\gamma/2\pi\ B_0$**, Soit : **$\nu = \omega_0/2\ \pi$**

En RMN ou IRM, cette fréquence **ν** est appelée fréquence de résonance ou **fréquence de Larmor**. Cette dernière correspond donc à la fréquence que doit posséder un photon pour induire une transition entre deux niveaux énergétiques.

Si un **champ magnétique additionnel B_1** est appliqué au système, les noyaux vont avoir tendance à rentrer en précession autour de B_1. Si les fréquences sont identiques, les systèmes rentrent en résonance. Le champ B_1 correspond alors à la composante magnétique du photon qui entraîne la **transition ou phénomène de résonance magnétique**.

Approche macroscopique dite "géométrique" en mécanique classique

La RMN, de manière générale, consiste à étudier les modifications d'aimantation des noyaux d'une substance sous l'action conjointe de deux champs magnétiques : un **champ magnétique principal statique, constant, permanent** et élevé (**B_0**), suivant l'axe Oz et un **champ électromagnétique tournant** ou onde de radiofréquence (**B_1 ou RF**) dans le plan xOy autour de Oz à la fréquence **ω_0**. B_1 est également appelé onde de radiofréquence car en général la transition se situe dans le domaine des **radiofréquences** (*Figure I.14*a).

L'application du champ B_1 constitue une **excitation** du système responsable du phénomène de transition énergétique décrit précédemment. La résultante magnétique **M_0** décrite précédemment et initialement colinéaire à Oz subit un **basculement** d'un angle i par rapport à Oz, tel que : **$I = \gamma\ B1\ \tau$**, où τ représente la durée de cette excitation.

Lors de ce basculement, deux composantes du vecteur M apparaissent ; une **composante longitudinale M_z** et une **composante transversale M_{xy}** (*Figure I.14*b). Après arrêt de cette excitation, le système revient progressivement à son état initial en réalisant une rotation dans le plan xOy durant laquelle la composante M_z augmente et la composante M_{xy} diminue. Cette phase est appelée **phase de relaxation** (*Figure I.14*c). Une **bobine** positionnée sur Ox permet de générer l'onde de radiofréquence RF ou B_1 et d'enregistrer le signal électrique généré par la rotation de M dans xOy. Ce signal, nommé « **signal de précession libre »** ou **FID** pour « Free induction decay » permet de renseigner sur :

- le **temps de relaxation longitudinale T1** par rapport à l'axe Oz, caractéristique du retour de la composante longitudinale M_z dans son état originel M_0.
- Le **temps de relaxation transversale T2** dans le plan xOy correspondant au retour de la composante transversale M_{xy} dans son état initial c'est-à-dire de valeur nulle.

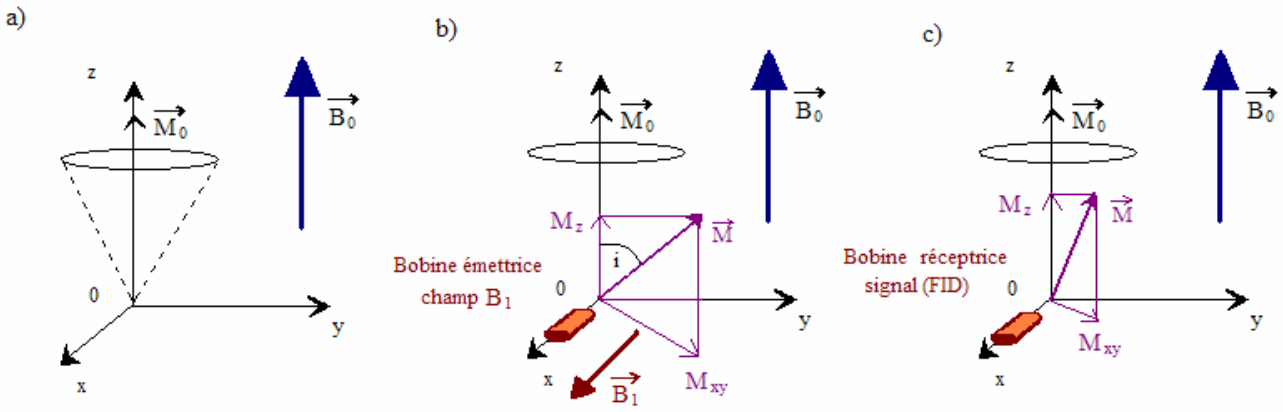


Figure I.14 : Schéma matérialisant les étapes générées par l'application d'un champ magnétique additionnel B1 ou onde de radiofréquence électromagnétique RF. a) En absence de B_1, les spins décrivent un cône de précession autour de Oz. b) Après application de B_1, la résultante magnétique M quitte son état initial M_0 en faisant un angle i avec Oz, générant ainsi 2 composantes M_z, la composante longitudinale suivant Oz et M_{xy}, la composante transversale dans le plan xOy. c) après arrêt de l'impulsion, le système est en phase de relaxation : la résultante magnétique M revient à son état initial M_0 en décrivant une rotation dans le plan xOy, rotation générant un signal appelé FID ou signal de précession libre détecté par la bobine (D'après Dumas, 2002).

*Cependant les noyaux ne sont jamais retrouvés isolément. De ce fait, la **fréquence** de Larmor ou de résonance décrite précédemment, outre le fait de **dépendre** du **type de noyau** étudié, dépend également de **l'environnement électronique** de celui-ci au sein même des molécules. L'environnement électronique est un facteur de modification du champ magnétique B_0.*

Notion de déplacement chimique

Chaque noyau perçoit un champ magnétique **B_0, plus ou moins atténué** par l'environnement, appelé **constante d'écran électronique**.

Un échantillon biologique est constitué de molécules elles-mêmes composées de plusieurs atomes. L'analyse en spectrométrie RMN du ^1H génère des spectres sur lesquels chaque type d'atome d'hydrogène est matérialisé par un pic. En fonction de leur environnement nucléaire, chaque proton ou noyau va se caractériser par une fréquence définie (ν). Ces fréquences sont repérées par rapport à la fréquence (ν_{ref}) d'une **référence interne** le trimethylsilane (**TMS ou TMSP**). On appelle **déplacement chimique (δ)**, la différence entre la valeur de champ de résonance du noyau mesuré et celle du TMS, le tout ramené à un nombre sans dimension (ν_0).

$\delta = (\nu-\nu_{ref}).10^6/\nu_0$, avec δ exprimé en ppm ou parties par million

En RMN du proton, l'échelle δ ne dépasse pas 15 ppm. Chaque pic est caractérisé par son déplacement chimique propre au noyau mais est influencé par l'environnement électronique des autres noyaux alentours constitutifs de la molécule étudiée. De ce fait, en ayant accès au déplacement chimique de chaque pic, on accède également à des informations concernant la structure de la molécule.

Environnement électronique et notion de couplage spin-spin

Pris isolément, un noyau génère un pic ou singulet à un déplacement chimique précis correspondant à la seule perturbation du champ magnétique B_0. En revanche, en présence d'un noyau entouré d'autres noyaux, comme au sein d'une molécule, une interférence peut avoir lieu générant ainsi des fragmentations des signaux initiaux en multiplets.

Au sein d'une molécule, ce phénomène est appelé le couplage spin-spin, caractérisé par une constante de couplage appelée J, indépendante du champ magnétique B_0 contrairement au déplacement chimique, mais sensible aux types de liaisons entre atomes et mesurée en Hz.

Obtention du signal RMN, RMN à 1 dimension

Après avoir généré le signal, celui-ci doit être traité avant de pouvoir être interprété.

Acquisition du signal

L'acquisition du signal RMN à 1 dimension nécessite trois phases (Figure *I.15*) : une phase de **préparation** permettant de faire revenir le système à un état initial, la phase **d'excitation ou d'impulsion** avec application d'une onde électromagnétique RF permettant de réaliser le phénomène de résonance puis une phase de **détection** permettant de capter le signal de précession libre.

Afin d'augmenter la sensibilité de l'acquisition, une répétition d'un certain nombre de « scans » ou expériences est réalisée, celles-ci étant sommées par la suite.

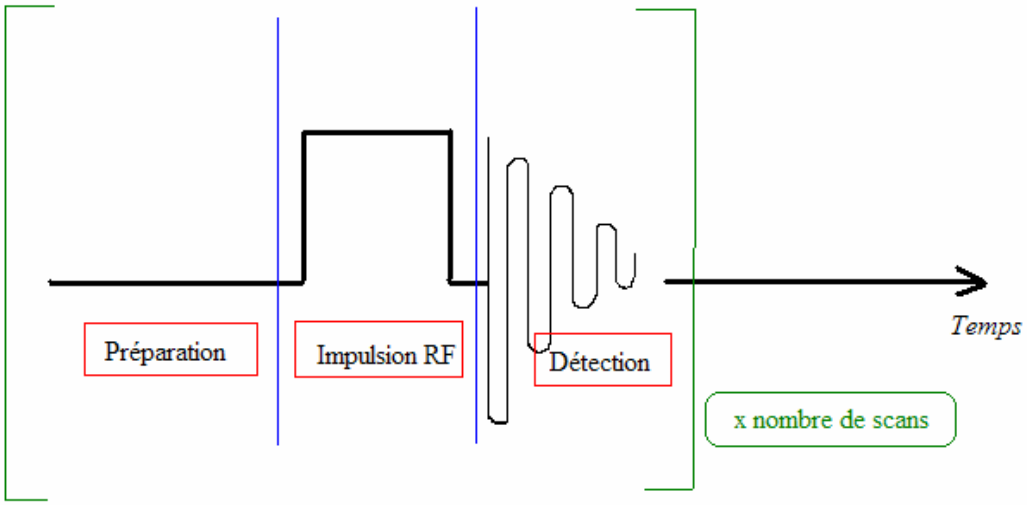


Figure I.15 : Schéma représentant les différentes phases permettant l'acquisition d'un signal en RMN 1D : préparation, impulsion RF et détection du signal de précession libre ou FID (D'après Dumas, 1992).

Traitement du signal

Ce traitement fait appel à une **transformation de Fourier** dont le but est de convertir le signal relatif au temps à un signal relatif à une fréquence.

c. Dispositifs

Le champ magnétique B_0 est produit par un **aimant qui se doit d'être homogène** et **stable** dans le temps pour obtenir des **résultats reproductibles**. De l'**intensité** de cet aimant (mesuré en Tesla) dépend la qualité du rapport signal sur bruit. La **résolution** spatiale est liée à l'intensité du champ magnétique ainsi qu'à la durée de l'acquisition.

L'aimant **supraconducteur** est à l'heure actuelle le type d'aimant le plus répandu. En jouant sur le fait que le métal, dans un environnement à très faible température, (assuré par la présence d'hélium liquide à -296°C) perd sa résistance, limitant au maximum les pertes de chaleur, cela permet **d'augmenter** d'autant plus **l'intensité** et donc **d'améliorer la résolution.**

Autour de cet aimant se trouvent **3 bobines X, Y et Z** dont le rôle est de faire varier le champ magnétique suivant des axes spécifiques, ceci permettant notamment de **sélectionner des plans de coupe**.

L'introduction d'un organisme ou échantillon dans l'aimant peut faire varier l'homogénéité du champ. Des **correcteurs ou « shims », plaques ferromagnétiques** ou **bobines supraconductrices** permettent de régler, grossièrement pour les premières, plus finement pour les secondes, l**'homogénéité** du champ.

Les **antennes** sont des dispositifs en bobine situées en périphérie, autour de l'organisme ou de l'échantillon à analyser. Elles permettent de produire ou **capter un signal** de radiofréquence et peuvent répondre à la fréquence de précession des protons c'est-à-dire leur changement de direction autour de l'axe.

d. Avantages et limites de la technique

La spectrométrie RMN constitue une **technique relativement robuste**, accessible financièrement une fois l'investissement de l'appareil réalisé. Elle permet de « scanner » des centaines d'échantillons en un temps relativement restreint. Cette capacité à **générer un**

grand nombre de renseignements sur une matrice biologique fait de la technique RMN, la technique choisie préférentiellement comme outil de « screening » dans le domaine de la toxicologie.

Un autre avantage non négligeable de la spectroscopie par RMN est son aptitude à **analyser des organes intacts**, donc sous forme solide, ceci grâce à la méthode à **HRMAS** (high-resolution magic angle spinning), ou **après extraction**, ce qui revient à analyser des échantillons sous forme liquide. Enfin, les problèmes d'ionisation ou de volatilisation différentielle, présents dans les analyses réalisées par spectrométrie de masse, n'existent pas avec la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire.

Cependant, sa **sensibilité** demeure **faible** en comparaison des techniques de spectrométrie de masse. De ce fait, elle ne détecte que les **métabolites présents à forte concentration** (de l'ordre de la µmole).

1.2.2. La spectrométrie de masse (MS)

a. Spectrométrie de masse : généralités

La spectrométrie de masse est une technique analytique fournissant des informations sur la nature, la composition et la structure des molécules présentes au sein d'un échantillon.

Le principe de ce type d'analyse réside sur la séparation de molécules chargées en fonction de leur **rapport m/z (masse/charge).** Les molécules sont ionisées dans une source d'ionisation. Suite à leur accélération, les ions formés sont soumis alors à un **champ électrique et/ou magnétique** permettant de les filtrer, un par un, suivant leur rapport masse/charge (m/z), l'abondance de chaque ion étant mesurée par un détecteur. Les résultats sont alors présentés sous forme de spectre de masse représentant l'abondance de chaque ion en fonction de son rapport m/z.

Le spectromètre de masse comprend donc un système d'introduction de l'échantillon, une source d'ionisation, un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions en fonction de leur rapport m/z, un détecteur qui capte, comptabilise et amplifie les signaux et enfin d'un système informatique permettant de traiter ces derniers.

Le **système d'introduction** de l'échantillon peut se faire en phase gazeuse, liquide, solide ou en association avec des méthodes séparatives (chromatographies en phase liquide ou en phase gazeuse).

La **source d'ionisation** a pour rôle de vaporiser et d'ioniser les molécules. Elle peut être utilisée suivant deux modes : **l'ionisation positive** permettant d'étudier les ions positifs et **l'ionisation négative** permettant d'étudier les ions négatifs. Il existe, de plus, différents **types de sources** en fonction du résultat que l'on désire obtenir : dans cette étude ont été utilisés le **bombardement par atomes métastables (MAB)** et **l'ionisation par électrospray (ESI).**

Les **analyseurs** permettent de **séparer les ions en fonction de leur rapport m/z.** Peuvent être distingués les analyseurs basse résolution (exemples : les quadripôles) et les analyseurs haute résolution, permettant de mesurer la masse exacte des ions (exemples, le FT-ICR, l'orbitrap, le **TOF** : temps de vol ou Time Of Flight). Certains analyseurs peuvent être couplés ensemble (exemple : MS/MS) assurant une première séparation des ions, une fragmentation de ceux-ci puis, une seconde séparation.

Enfin, le **détecteur** transforme les ions en signal et amplifie ce dernier afin qu'il puisse être traité.

b. Intérêts de la spectrométrie de masse

Parmi les principales utilisations de la spectrométrie de masse, peuvent être cités : **l'analyse structurale** et la **quantification des molécules, le séquençage de biomolécules telles que les protéines, les polysaccharides ou encore les oligonucléotides**.

c. Sources d'ionisation et type d'analyseurs utilisés dans cette étude

Spectrométrie de masse et ionisation par électrospray ou électronébulisation (ESI)

A pression atmosphérique, l'échantillon liquide est transformé en **gouttelettes** (spray) **chargées** sous l'effet d'un champ électrique. Les ions sont ensuite désolvatés à la suite d'une chaîne d'explosions coulombiennes des gouttelettes chargées.

L'ionisation par électronébulisation est dite « douce », permettant la formation **d'ions moléculaires**, c'est-à-dire sous forme de molécules non fragmentées. De plus, la source ESI est associable à de la **chromatographie en phase liquide**, d'où le terme de LC-ESI-MS.

Spectrométrie de masse Py-MAB-Tof

La technique d'ionisation par bombardement par atomes métastables ou « metastable atom bombardment » (MAB) (*56*) est couplée dans notre cas à la **pyrolyse**, comme système d'introduction des échantillons. Les ions sont produits selon un processus à énergie contrôlée par **bombardement d'atomes métastables** et analysés par un **analyseur de masse rapide de type** « temps de vol » **ToF (Py−MAB−ToF)**. Tout d'abord, un faisceau d'atomes métastables est produit par une décharge couronne dans un flux d'azote ou de gaz rare comme l'hélium, le néon, l'argon, le krypton ou le xénon. Dans notre étude, l'azote a été utilisé pour générer des atomes métastables. Puis, après réaction d'ionisation entre les atomes métastables et les molécules en phase gazeuse, l'analyseur « ToF » permet de recalculer le rapport m/z des ions en fonction des impacts différés sur le détecteur : de faibles m/z rentreront en contact plus rapidement avec ce dernier.

Cette technique permet un **haut débit d'analyses** grâce à la possibilité offerte par la pyrolyse d'introduire rapidement des échantillons complexes dans la source d'ionisation.

Cette source met en jeu des énergies d'ionisation discrètes et variables, en fonction du gaz utilisé pour générer des atomes métastables. Ainsi, il est possible de **contrôler précisément la fragmentation des ions ainsi que d'ioniser sélectivement certaines molécules de la matrice** ce qui réduit les interférences lors de l'analyse. Cependant, ce type d'analyse ne permet d'accéder qu'à des molécules pouvant être volatilisées par le pyrolyseur et pouvant être ionisées par le gaz utilisé.

d. Avantages et inconvénients de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse possède des atouts non négligeables pour l'étude des matrices complexes. En effet, cette technique est **extrêmement sensible**, d'autant plus lorsqu'elle est couplée à la chromatographie en phase liquide (**LC-MS**).

Par rapport à la RMN, la faiblesse de la spectrométrie de masse réside dans des problèmes relatifs de reproductibilité de séparation chromatographique et d'ionisation.

*L'utilisation de **techniques analytiques à haut débit**, telle que la spectrométrie par RMN, entraîne la production de spectres contenant des **milliers de signaux**, correspondant à autant de **centaines de molécules endogènes**. L'information latente relative au statut métabolique global d'un individu et encodant les réponses métaboliques à des facteurs génétiques ou environnementaux, comme l'alimentation, l'âge, le sexe, le stress, la maladie, peut être extraite des données contenues au sein des spectres en faisant appel à des **outils de modélisation mathématique**. De nombreuses stratégies de modélisation chimiométriques, statistiques et bioinformatiques peuvent être utilisées pour définir les limites métaboliques de maladies ou pour contrôler la progression de celle-ci, avec, ou sans traitement thérapeutique.*

1.3. Principales techniques statistiques utilisées

Cette complexité, associée à la présence de variations biologiques intrinsèques entre les individus et les échantillons, rendent donc nécessaire l'utilisation concomitante de **méthodes statistiques** permettant une **réduction des données** ainsi qu'une **représentation** de ces dernières facilitant l'accès à l'information biochimique sous-jacente. Ceci est particulièrement nécessaire dans les situations pour lesquelles la matrice de données est construite sur un nombre plus important de variables que d'échantillons. Après avoir **retiré les signaux redondants**, l'analyse des données initiales permet de représenter les échantillons en fonction de leur composition biochimique. Les échantillons provenant d'individus présentant un même état physiopathologique sont généralement similaires dans leur composition. Grâce aux **outils statistiques d'analyse multivariée** comme l'Analyse en Composantes Principales (**ACP**) ou l'Analyse Factorielle discriminante (**AFD**), on arrive à comparer ces ajustements de profils métaboliques entre individus témoins et individus traités et à définir ainsi un phénotype métabolique ou «**métabotype**» (*57*). Ces méthodes permettent de **réduire les dimensions** de bases de données complexes au moyen de procédures de **cartographies bi- ou tridimensionnelles**, facilitant ainsi la visualisation de la structure intrinsèque à la matrice. Le but est **d'identifier les métabolites les plus corrélés** à l'apparition d'une maladie ou d'un processus toxique.

Les **techniques statistiques non supervisées** incluant les **ACP** et les **classifications hiérarchiques** ne nécessitent pas de connaissance au préalable sur l'appartenance des individus à un groupe ou une classe et valorise toute la variance intrinsèque à un jeu de données afin de représenter graphiquement les individus au sein d'un espace multidimensionnel. En d'autres termes, l'ACP est une méthode factorielle linéaire qui a pour but de **réduire l'espace de représentation des données** pour une meilleure compréhension en **construisant des variables synthétiques,** appelées composantes principales, qui vont **résumer l'information**. Ces composantes principales sont des combinaisons linéaires des variables initiales dépendantes (dont le coefficient de corrélation est non nul) et sont ordonnées par ordre décroissant des valeurs prises par leur variance. En général, les 2 ou 3 premières composantes sont retenues car elles expliquent la majorité de l'information. Ainsi, l'utilisation d'ACP permet généralement de représenter les données sur 2 ou 3 dimensions.

Les **techniques statistiques supervisées** rapportent la variance des données à un facteur prédéfini, le but étant de **maximiser la variance intergroupe et de minimiser la variance intragroupe**. En d'autres termes, elles utilisent l'information d'appartenance à une classe pour maximiser la séparation entre les classes. Parmi ces dernières, nous pouvons citer l'**AFD** ou Analyse Factorielle Discriminante, la **PLS-DA** ou Partial Least Square ou analyse partielle des moindres carrés. Ces techniques peuvent servir à prédire la position d'individus inconnus en se fondant uniquement sur leurs propriétés spectrales en RMN du ^{1}H et, sont ainsi très utiles pour la mise en place de modèles de prédiction du potentiel toxique d'un xénobiotique, par exemple.

1.4. Métabonomique, pharmacocinétique et maladies

La métabonomique est donc un outil qui permet d'accéder aux voies métaboliques impliquées lors d'un processus toxicologique par exemple et cela, à différentes étapes du processus, ou d'identifier des marqueurs de maladies utiles lors des phases de diagnostic. En effet, en premier lieu, la capacité à générer un grand nombre de données en peu de temps constitue un avantage non négligeable dans l'étude des maladies au sein de la population humaine. Son caractère non invasif ainsi que la facilité d'obtention des échantillons biologiques (urine, plasma) constitue un bénéfice supplémentaire. De plus, comme il a pu être fait mention plus haut, le fait de ne pas avoir d'*a priori* concernant les voies métaboliques éventuellement impliquées dans une pathologie est un atout appréciable. Cette méthode est

donc une opportunité extraordinaire pour étudier les maladies pour lesquelles, jusqu'à présent, les méthodes d'approche classique sont restées vaines, du fait de l'absence de biomarqueurs fonctionnels fiables. La métabonomique permet enfin de pouvoir **corréler des paramètres obtenus par des voies et techniques d'approches différentes,** telles que des paramètres biochimiques (examens cliniques classiques), des paramètres métaboliques (analyses RMN des fluides biologiques), des paramètres d'ordre génomique (études transcriptomiques)…et constitue donc une voie d'approche pour la compréhension des processus pathologiques.

L'intérêt spécifique de cette méthode d'approche dans l'étude des maladies et de désordres nerveux a été présenté dans la littérature. De plus en plus d'exemples confortent l'importance, l'essor et les avantages futurs qu'elle peut apporter (*58*).

Enfin, la métabonomique est désormais reconnue comme un outil performant dans **l'évaluation de la toxicité** de composés potentiellement toxiques. De ce fait, elle a été très largement adoptée par de nombreuses firmes pharmaceutiques dans les protocoles de développement de leurs médicaments (*59*) : les méthodes d'analyse par spectroscopie RMN du ^{1}H, HRMAS de tissus sont de plus en plus utilisées en industrie pharmaceutique, par exemple, dans le but de mieux comprendre l'impact toxicologique de nouveaux composés. L'utilisation conjointe de différentes techniques d'analyse et de nouvelles méthodes chimiométriques permettent d'accéder directement aux effets physiologiques et pathologiques et ainsi de mieux gérer la sécurité de nouvelles molécules médicamenteuses dans les étapes de recherche clinique et préclinique (*60,61*). Ceci autorise le rattachement des données issues d'analyses de fluides biologiques et des données issues des études d'histopathologie et révèle les mécanismes de toxicité au niveau moléculaire.

1.5. Limites et adaptations de la méthode

Parmi les limites de la méthode, la possibilité de **générer des résultats faux-positifs** lors de situations dans lesquelles le composé d'intérêt est à l'origine de changements métaboliques significatifs mais sans toxicité associée est souvent évoquée.

Une autre limite à l'application de la méthode est de pouvoir disposer du matériel biologique approprié à l'étude de certaines maladies comme, par exemple, le liquide cérébro-spinal dans les neuropathies. Aussi, une façon de contourner ce problème est d'étudier directement l'organe concerné. La technique de spectroscopie ^{1}H NMR-MAS sur tissus

intacts permet d'accéder directement aux biomarqueurs tissulaires pouvant être en lien avec des lésions histologiques observées. Toutefois, des études ont montré que les résultats étaient plus complets avec une extraction de l'organe en phase aqueuse et en phase lipophile (*62*).

Enfin, l'obstacle majeur à l'heure actuelle au développement de la métabonomique ainsi qu'aux autres techniques s'intéressant à l'analyse du métabolome, est le **manque de banques de données** référençant les différents biomarqueurs dans diverses matrices biologiques, chez les animaux de laboratoire comme chez l'homme, sur patients malades comme sur animaux traités. Ces données nécessitent d'être répertoriées. En parallèle, cela requiert de façon concomitante d'établir une standardisation des protocoles, d'obtention et de production de données brutes.

Concernant nos travaux de recherche, la métabonomique a été adoptée afin d'explorer en première intention les phénomènes biologiques liés à l'ingestion d'Hypochœris radicata chez l'animal de laboratoire puis de circonscrire le périmètre de perturbations métaboliques engendrées par l'ingestion d'Hypochœris radicata. Une fois celui-ci cerné, ces premiers résultats ont été confortés et précisés. C'est dans cette optique qu'il a été fait appel aux approches plus spécifiquement adaptées à l'exploration du système nerveux central : l'imagerie par résonance magnétique nucléaire ainsi que l'approche comportementale.

2. Autres méthodes d'exploration cérébrale

2.1. Le cerveau, un « organe » atypique

La connaissance des paramètres biochimiques caractéristiques de la fonctionnalité des organes peut être accessible via l'étude des biofluides (sang, plasma, urines, …), contrairement au système nerveux central qui contrôle un grand nombre de fonctions.

Certes, le liquide céphalo-rachidien peut constituer un intermédiaire à son étude mais les moyens de prospection restent limités.

L'accès à l'intégrité du système nerveux central est donc difficile de par sa localisation et de par la multitude de fonctions qu'il régit.

Ceci nécessite donc de développer des techniques et moyens d'approche plus spécifiques et adaptés mais pouvant toujours constituer des outils pratiques et utilisables en recherche comme en clinique.

2.2. Les différentes techniques d'approche

Dans le cas de la **métabonomique**, des renseignements peuvent être obtenus sur le métabolisme cérébral et sur ses signatures métaboliques mais cette méthode reste **invasive** pour cette exploration spécifique et ne peut se faire qu'après sacrifice des animaux. Même si ces données peuvent permettre de remonter ensuite à des hypothèses de voies métaboliques impliquées, un certain nombre d'éléments font défaut. En effet, des voies métaboliques similaires peuvent appartenir à des aires cérébrales différentes dont le fonctionnement régit un comportement ou une fonction cognitive complexe mais précise. En d'autres termes, concernant l'encéphale, l'accès à ces **voies métaboliques** renseigne donc sur des **processus élémentaires** mais pas sur les aires précises où se localisent celles-ci et ne donne donc aucun élément concernant la fonction pouvant être affectée.

L'imagerie *in vivo* possède les avantages de la métabonomique réalisée *in vitro* sur extraits cérébraux mais également le bénéfice de pouvoir **repérer** les perturbations parfois plus précisément dans une **aire ou région** plus spécifique du cerveau et de réaliser **un suivi au cours du temps** de ces modifications. Cette technique peut donc être un moyen d'accéder à des fonctions cérébrales. Par contre, le facteur limitant est, comme cela a pu être mentionné

précédemment, que les concentrations en métabolites soient en quantité suffisante pour permettre d'être quantifiées et donc révélées sur des cartographies cérébrales (en IRM fonctionnelle) ou même en spectrométrie par résonance magnétique nucléaire.

Dans le cas de notre étude, où un métabolite d'intérêt et les modifications engendrées restent assez minimes et tenues, ou dans le cas où l'on désire conforter une autre approche et ses résultats, il peut être intéressant d'accéder à ces grandes fonctions par une autre méthode, c'est le rôle des **études comportementales**. Rappelons à ce niveau que de telles études servent, le plus souvent, d'approches complémentaires apportant des éléments supplémentaires d'information ou confortant une observation ou résultat précédemment obtenu mais doivent être maniées avec prudence lorsqu'elles sont utilisées de façon isolée.

2.3. L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Le but n'est pas de présenter de manière exhaustive cette technique d'imagerie mais de préciser certaines données permettant de mieux comprendre les expérimentations qui ont pu être conduites et les multiples potentialités que peut offrir l'imagerie.

2.3.1. Définition ; généralités

L'imagerie par résonance magnétique ou IRM est une méthode d'imagerie, née dès le début des années 70, en parallèle avec le développement de la numérisation. Initialement utilisée par les physiciens et les chimistes, l'IRM a vite été adoptée par les biologistes qui ont vite compris les avantages que pouvait revêtir une telle technique. En effet, le principe physique sur lequelle elle repose, conceptualisé par Bloch et Purcell, en 1946, sont similaires à ceux utilisés dans la technique **RMN** *in vitro*. Les atouts supplémentaires de l'IRM résident dans la possibilité d'étudier des organismes ***in vivo*** et dans celle des reconstitutions d'images. Au cours des 20 dernières années, l'IRM s'est perfectionnée et diversifiée offrant ainsi des domaines d'application supplémentaires comme l'imagerie **morphologique** et anatomique, l'imagerie **fonctionnelle** (perfusion tissulaire (*63*), volume sanguin cérébral), angiographique, **métabolique** ou encore l'application en génie des matériaux (imagerie du mouvement, des flux, de la perfusion ou même de la composition chimique).

En pratique, l'IRM constitue un véritable atout de part son **innocuité**, sa **précision des images** fournies, sa mesure d'un nombre toujours plus conséquent de paramètres physico-

chimiques.

Ainsi, tout comme la technique RMN utilisée en métabolomique, l'IRM trouve ses fondements dans les propriétés de la spectroscopie par résonance magnétique.

L'IRM(N) comme la RMN reposent toutes deux sur les **propriétés magnétiques des atomes** et plus précisément de leur **noyau**, étudiés grâce à un champ magnétique et une onde de radiofréquence. Contrairement à la RMN, le terme IRM omet volontairement le qualificatif « nucléaire », principalement en vue de ne pas effrayer les patients, le qualificatif étant associé, de façon non raisonnée, aux rayonnements ionisants et aux sources radioactives.

2.3.2. Particularités et application de la résonance magnétique nucléaire à l'imagerie

Le proton ou atome d'hydrogène est largement prépondérant dans l'organisme, surtout grâce à sa présence au sein de la molécule d'eau. La **RMN et l'IRM du proton** utilisent la propriété des protons de l'organisme, et donc en particulier **ceux de l'eau**, d'émettre des signaux lorsqu'ils retournent à leur état d'équilibre après avoir été stimulés par un champ magnétique. En IRM, l'utilisation de ce signal permet de **reformer les images** correspondant aux **éléments anatomiques**.

Nous avons déjà vu précédemment que l'application d'un gradient directionnel sur le champ magnétique B_0 modifie le champ, la localisation et relaxation des protons. Les protons vont réémettre l'énergie envoyée sous forme d'impulsions de radiofréquence formant une onde électromagnétique ou **signal de précession libre**. La fréquence de cette onde dépend, d'une part, de l'intensité du champ magnétique et, d'autre part, de l'environnement moléculaire du proton.

Suite à l'impulsion ou excitation, le système revient progressivement à l'équilibre : il s'agit de la phase de relaxation. Celle-ci peut être **progressive** suivant la composante **longitudinale (M_z)** : on parle de **relaxation T1**, soit plus **rapide**, suivant la composante **transversale (M_{xy})**, on parle alors de **relaxation T2**.

En modifiant les **paramètres d'acquisition** IRM, c'est-à-dire en jouant sur le temps de répétition entre deux excitations (**TR** : temps de répétition) et le temps entre le signal d'excitation et la réception de l'écho de ce signal (**TE** : temps d'écho), l'utilisateur peut ainsi

modifier la pondération de l'image, c'est-à-dire faire apparaître des différences entre les tissus car ces derniers ont des temps de relaxation T1 et T2 différents liés à des différences dans leur richesse respective en proton et des environnements différents. De ce fait, ils peuvent renvoyer des signaux différents et être distinguables, assurant un contraste final suffisant pour la matérialisation de l'image.

Les paramètres de pondération TR et TE sont donc différents en fonction du type de pondération T1 ou T2 retenu.

En conservant un **TE court** de 10 à 20 ms et un TR de 400 à 600 ms, on neutralise les différences de temps T2 et on obtient ainsi un **contraste d'image pondéré en T1**, dite « **anatomique** ». Dans le cerveau, ces séquences permettent de distinguer la substance blanche de la substance grise et d'utiliser des produits de contraste.

En conservant un **TE long** > 80 ms et un TR > 2000 ms, on neutralise les différences de temps T1 et on obtient ainsi un **contraste d'image pondérée en T2**, dite « **tissulaire** ». Ces séquences permettent ainsi de mettre en évidence l'eau et les œdèmes.

2.3.3. Applications

De façon générale, l'IRM permet de bien identifier les lipides et l'eau. Certaines applications sont plus spécifiques et constituent des sous-domaines d'application. Les **éléments anatomiques pouvant être visualisés et étudiés** par IRM sont, de ce fait, multiples. A titre d'exemple, peuvent être cités :

- l'encéphale avec **l'IRM fonctionnelle** se base exclusivement sur les propriétés des deux formes de l'hémoglobine. L'oxyhémoglobine dans sa forme oxydée est non active en IRM, sa forme réduite ou désoxyhémoglobine, l'est en revanche, car fortement paramagnétique. Il est dès lors possible de visualiser et de suivre les **afflux de sang** au sein de l'encéphale et donc les **zones dont l'activité augmente** ; c'est ce qui est nommé signal BOLD (*64,65*).

- la moelle épinière, les muscles, les organes viscéraux,
- le cœur (**IRM cardiaque**) dans le diagnostic de cardiomyopathies, myocardites (*66*),
- les gros vaisseaux tels les artères (**angio-IRM**) pour visualiser sténoses, anévrismes

et artérites (*67*), les articulations des membres et les vertèbres.

2.3.4. Spectroscopie par résonance magnétique

a. Définition

La spectroscopie par résonance magnétique du proton (SRM-^{1}H) est une méthode d'exploration **non invasive** et ***in vivo*** de la composition moléculaire des tissus au cours d'un examen conventionnel par IRM. Elle permet d'identifier les **métabolites** impliqués dans des processus physiologiques ou pathologiques.

Dans les études que nous avons réalisées en IRM, nous nous sommes limités à la spectroscopie **du proton**, tout comme les analyses faites en métabonomique, technique la plus fréquemment réalisée en IRM clinique.

Si l'IRM repose sur la détection du signal RMN des molécules d'eau, en revanche le principe de la SRM-^{1}H est de supprimer ce signal afin d'étudier celui des molécules mobiles à courte chaîne carbonée et de réaliser une caractérisation biochimique du tissu exploré.

Les molécules ayant des protons observables **en spectroscopie par résonance magnétique cérébrale** sont relativement limitées (*68*). Ceci dépend du temps d'écho pratiqué et donc du type d'acquisition.

Un **TE long** (135 ms), permet de collecter les signaux des molécules ayant un T2 suffisamment long, c'est-à-dire le N-acétyl-aspartate, la créatine, la choline et le lactate.

Un **TE cou**rt (15-40 ms), rend possible l'identification du *myo*-inositol, du complexe Glutamine/Glutamate/GABA et des lipides libres. Ces différentes molécules ont chacune une signification biologique précise :

- Le **N-acétyl-aspartate** résonant à 2,02 ppm, constitue un marqueur de la densité et viabilité neuronale. Sa teneur diminue lors de souffrance neuronale.

- La **créatine/phosphocréatine** résonant à 3,02 ppm est le métabolite de prédilection rattaché au métabolisme énergétique. Il est souvent utilisé comme pic de référence et pour quantifier.

- Les **composés contenant de la choline** résonant à 3,2 ppm, sont les marqueurs de synthèse ou de dégradation des membranes cellulaires. Leur teneur augmente lors de tumeurs (synthèse) ou inflammation (dégradation).

- Le ***myo*-inositol** résonant à 3,5 ppm est un métabolite uniquement présent dans le tissu glial. Sa concentration augmente en général lors de prolifération des cellules de la glie et diminue lors d'atteinte de ces mêmes cellules.

- Le **complexe glutamine-glutamate-GABA,** présent sous forme de raie large entre 2,1 et 2,5 ppm, renseigne sur les neurotransmetteurs de type GABAergiques.

- Le **lactate** sous forme de doublet à 1,35 ppm est un métabolite rattaché au métabolisme anaérobie.

- Les **lipides libres**, dont la résonance est large et double à 1,3 et 0,9 ppm rendent compte en général d'une nécrose cellulaire.

b. Acquisition

L'acquisition en spectroscopie comporte différentes étapes :

- La **région d'intérêt est repérée** sur la séquence de repérage.

- Les bobines de **shim sont réglées** afin d'obtenir un champ le plus homogène possible.

- Le **signal de l'eau est supprimé** : la quantité de noyaux d'hydrogène de molécules d'eau est telle dans l'organisme humain que le pic de l'eau à 4,7 ppm « noie » et masque le signal spectroscopique des autres métabolites. Il est donc indispensable de supprimer le pic de l'eau pour observer les métabolites d'intérêt.

- La **séquence est répétée** un certain nombre de fois, en pratique de 64 à 196 fois, de telle sorte à optimiser le rapport signal/bruit.

c. Choix de la séquence

En général, en imagerie, deux grands types de spectroscopie peuvent être utilisés, en

utilisant le même spectromètre. Le choix de la séquence à utiliser est fonction du but recherché :

- La **spectroscopie par résonance magnétique monovoxel** :

L'avantage est la rapidité d'acquisition. L'inconvénient est que le signal recueilli ne correspond qu'à un petit volume de parenchyme cérébral, sur un seul niveau de coupe.

- **L'imagerie métabolique** ou **CSI** (Chemical Shif Imaging) :

Dans ce cas, l'acquisition du signal s'effectue sur plusieurs plans de coupe, ce qui enrichit d'autant plus la quantité d'information obtenue. Cependant, l'acquisition est d'autant plus longue et le traitement des données plus délicat. En effet, ce n'est pas un mais plusieurs spectres qui sont alors obtenus, correspondant à chaque sous-voxel. En général, une console de traitement permet de reprendre la totalité des spectres. Soit, elle aide à reformer une image sur laquelle apparaît grâce à des codes de couleur la « cartographie » (*Figure I.16*) des concentrations (plus précisément, un rapport de concentration) en un métabolite donné, soit une image de référence sur laquelle les spectres respectifs obtenus peuvent être observés (*Figure I.17*).

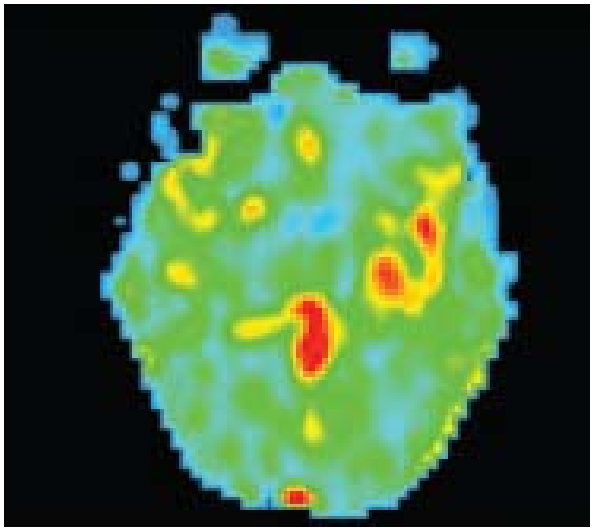


Figure I.16 : imagerie métabolique avec la cartographie de la choline

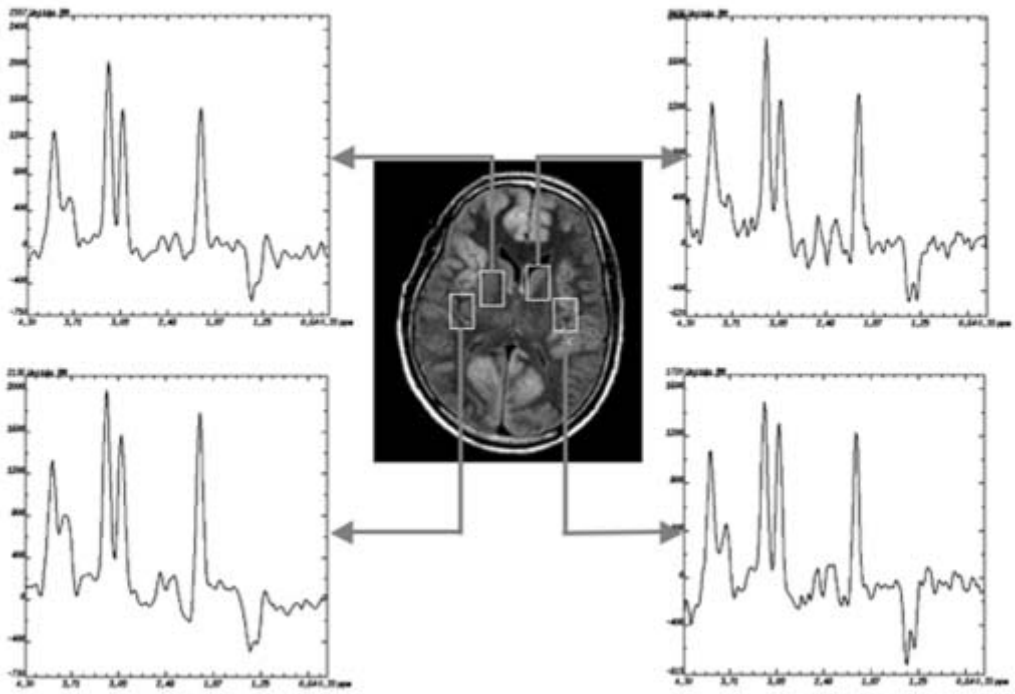


Figure I.17 : Imagerie métabolique avec une image de référence avec spectres respectifs

Concernant la spectroscopie monovoxel, l'acquisition peut être réalisée suivant 2 types de séquences dites **PRESS** pour Point-RESolved Spectroscopy et **STEAM** pour STimulated Echo Acquisition Mode. La technique PRESS offre ainsi un meilleur rapport signal/bruit que STEAM.

d. Quantification des métabolites

Quantification relative

Les résultats de la spectroscopie par résonance magnétique sont le plus souvent exprimés en **rapports de concentrations.** Le **pic de créatine** ou la **comparaison par rapport à la zone saine** contrôlable servent souvent de **valeurs de référence**. C'est cette technique qui sera utilisée ici.

Quantification absolue

La mesure de la **concentration réelle** des métabolites par spectroscopie par résonance magnétique se heurte à de nombreuses difficultés techniques : l'aire des pics doit être déterminée précisément puis être convertie en concentration après calibrage.

e. Facteurs de variations physiologiques des métabolites

De nombreux paramètres intrinsèques à l'animal influencent la concentration relative des métabolites, notamment l'âge et plus exactement la **maturation cérébrale**, le **vieillissement cérébral** ainsi que la **région cérébrale** sur laquelle on travaille. Cependant, ces facteurs n'interviennent pas chez les animaux de laboratoire étudiés ici.

f. Facteurs de variations de la qualité de l'acquisition

Afin d'obtenir un spectre de qualité, il est nécessaire de respecter les conditions suivantes :

- la **taille** du voxel ne doit pas être inférieure à 1,5 x 1,5 x 1,5 cm.
- le **nombre d'acquisitions** doit être compris habituellement entre 64 et 196.
- la **position** du voxel : il est conseillé d'éviter les extrémités temporales ainsi que les faces inférieures des lobes frontaux et temporaux.

En résumé, la qualité finale du spectre dépend, d'une part, du **rapport signal/bruit** qui transparaît par la hauteur des pics de métabolites, et d'autre part, de la **résolution** c'est-à-dire de leur bonne séparation.

g. Applications

Avec les progrès obtenus en termes de faisabilité dans le cadre d'une pratique clinique, les indications de la spectroscopie par résonance magnétique sont de plus en plus nombreuses.

La **spectroscopie par résonance magnétique cérébrale** permet de repérer la présence et d'étudier l'évolution des concentrations de certains métabolites (*68,69*). De ce fait, elle peut apporter des informations diagnostiques dans :

- les **pathologies tumorales** (*70,71*) et **masses cérébrales** avec plus précisément la choline et le *myo*-inositol dans les gliomes (*72*), les lipides libres dans les tumeurs nécrotiques, les glioblastomes (*63,73*), les métastases, les méningiomes (*74*), le lactate

dans les lymphomes (*75*),

- les **pathologies** inflammatoires **démyélinisantes** (*76*), avec le *myo*-inositol dans la sclérose en plaques (*77*),
- les **pathologies infectieuses** (*78*),
- les **pathologies métaboliques** avec le *myo*-inositol et le complexe glutamine/glutamate dans l'encéphalopathie hépatique (*79*), le lactate et la **souffrance cérébrale diffuse**,
- l'**épilepsie** (*80*),
- la **maturation cérébrale** (*81*),
- les **maladies dégénératives**.

2.4. Approche comportementale chez l'animal de laboratoire

L'approche comportementale est une manière d'accéder à **l'intégrité des grandes fonctions contrôlées par le système nerveux central**. Certaines fonctions végétatives ne peuvent pas donner lieu à ce type d'approche. En effet, même si elles sont elles-aussi régies par le système nerveux central, elles peuvent être évaluées soit directement sur les organes en question soit par dosage, le tout générant respectivement, des données cliniques et biochimiques.

Certes, les tests comportementaux sur animaux de laboratoire ne peuvent prétendre tester que des fonctions communes avec l'homme. D'où une certaine prudence à conserver afin de ne **pas extrapoler trop hâtivement entre espèces**.

2.4.1. Tests comportementaux

Afin d'appréhender de manière objective l'intégrité des fonctions les plus facilement distinguables, elles-mêmes pouvant signer une localisation d'atteinte préférentielle, des tests non invasifs ont donc été développés. Parmi les grandes **fonctions** pouvant être testées, les tests permettant de détecter des **déficiences motrices** affectant **l'activité locomotrice globale** (Openfield) ou la **coordination motrice plus fine** (Locotronic®), des altérations des **centres de la mémoire spatiale et/ou temporelle,** matérialisées chez les rongeurs uniquement par des altérations des **processus d'Apprentissage** (Labyrinthe aquatique de Morris, Labyrinthe en Y).

D'autres tests permettent de tester, non plus des fonctions en tant que telles, mais plutôt des **manifestations** pouvant elles-mêmes signer des altérations fonctionnelles, comme les tests évaluant les **niveaux d'anxiété** (Test du labyrinthe en croix surélevé, Planche à trous) ou **le niveau de dépression** (Test de la nage forcée ou Porsolt) des animaux.

Enfin, certains tests tentent de mettre en évidence des altérations du **comportement social** (Test du Résident/intrus), mais sont plus complexes à dépouiller et les résultats sont également plus délicats à interpréter.

2.4.2. Facteurs de variation

Ces tests et ces approches permettent de donner des éléments d'information mais doivent toujours être **interprétés avec prudence**. En effet, les résultats peuvent être très facilement **influencés par différents facteurs,** tels l'utilisation des **souches génétiques** animales différentes (transgéniques, sauvages) (*82*), leur origine (laboratoire, élevage, fournisseurs), le sexe (*83*) et les cycles hormonaux (*84*), l'âge, les facteurs **environnementaux** différents (luminosité, matériaux utilisés pour la construction des tests, éléments aversifs ou au contraire attractifs, enrichissement du milieu), le type d'**administration** du composé éventuel à tester (gavage, *per os*, intraveineuse, intrapéritonéale, intracérébral, …), l'environnement social, la période d'essai (impact de tests effectués précédemment). D'où la nécessité d'être particulièrement rigoureux lors de la mise en place et lors de l'interprétation de ces tests afin de ne pas extrapoler trop rapidement et de façon abusive les résultats obtenus, d'autant plus que l'on ne peut pas mesurer ni leur répétabilité ni leur reproductibilité.

2.4.3. Applications, Intérêts

Ces tests comportementaux sont le plus souvent utilisés en vue de i) **tester une molécule** chimique, pharmacologique, molécule naturelle végétale (*85,86*) drogue ou toxique (*87*) ou contaminant alimentaire ou environnemental (*88*), ii) évaluer la **résultante de la modification d'un gène** par utilisation le plus souvent de **souches transgéniques** chez lesquelles un gène en particulier a été modifié, ceci permettant parfois de révéler des **modèles animaux de maladies** (*89*), iii) évaluer de **grandes fonctions** comme la **douleur** (*90*). Dans tous les cas, les tests comportementaux viennent apporter un surplus d'information par rapport à d'autres données obtenues par des approches complémentaires.

Dans notre étude, les tests comportementaux ont eu pour but de venir tester un extrait d'origine végétale, administré per os mais par ingestion spontanée, à la dose de 9%, sur souris mâles, afin de rendre compte de la présence éventuelle de fonctions nerveuses centrales atteintes.

Références :

(1) Kendall, W.T., (1884) The diseases of Australian Horses. *Cameron Laing and Co., Melbourne*, 183-185.
(2) Huntington, P.J., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., Luff, A.R., Finkelstein, D.I., and Flynn, R.J., (1989) Australian Stringhalt-epidemiological, clinical and neurological investigations. *Equine Vet. J., 21*, 266-273.
(3) Barry, W.C., (1956) The incidence of Australian Stringhalt in horses in New Zealand. *N. Z. Vet. J., 4*, 26-27.
(4) Kerrigan, J., (1917) So-called Australian Stringhalt of horses. *New Zealand Journal of Agriculture*, *15*, 20-23.
(5) Reakes, C.J., (1916) Notes on a form of nerve derangement in horses. *New Zealand Journal of Agriculture*, *12*, 364-368.
(6) Takahashi, T., Kitamura, M., Endo, Y, Eto, D., Aoki, O., Kusunose, R., Yoshihara, T., Kai, M., (2002) An outbreak of stringhalt resembling Australian stringhalt in Japan. *J. Equine Vet. Sci., 13*, 93-100.
(7) Slocombe, R.F., Huntington, P.J., Friend, S.C., Jeffcott, L.B., Luff, A.R., and Finkelstein, D.K., (1992) Pathological aspects of Australian Stringhalt. *Equine Vet. J., 24*, 174-183.
(8) Cahill, J.I., Goulden, B.E., and Jolly, R.D., (1986) Stringhalt in horses: a distal axonopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol., 12*, 459-475.
(9) Dixon, R.T. and Stewart, G.A., (1969) Clinical and pharmacological observations in a case of equine stringhalt. *Aust. Vet. J., 45*, 127-130.
(10) Robertson-Smith, R.G., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., and Badcoe, L.M., (1985) An unusual incidence of neurological disease affecting horses during a drought. *Aust. Vet. J., 62*, 6-12.
(11) Cahill, J.I., Goulden, B.E., and Pearce, H.G., (1985) A review and some observations on stringhalt. *N. Z. Vet. J., 33*, 101-104.
(12) Read, D.J.a.K., J., (1983) Outbreak of Stringhalt. *An. Health Div. N Z Surv., 10*, 22-23.
(13) Galey, F.D., Hullinger, P.J., and McCaskill, J., (1991) Outbreaks of stringhalt in northern California. *Vet. Hum. Toxicol., 33*, 176-177.
(14) Gay, C.C., Fransen, S., Richards, J., and Holler, S., (1993) *Hypochoeris*-associated stringhalt in North America. *Equine Vet. J., 25*, 456-457.
(15) Gardner, S.Y., Cook, A.G., Jortner, B.S., Troan, B.V., Sharp, N.J.H., Campbell, N.B., and Brownie, C.F., (2005) Stringhalt associated with a pasture infested with *Hypochoeris radicata*. *Equine vet. Educ., 17*, 118-122.
(16) Araya, O., Krause, A., and Solis de Ovando, M., (1998) Outbreaks of stringhalt in southern Chile. *Vet. Rec., 142*, 462-463.
(17) Gouy, I., Egron, G., Leblond, A., and Cadoré, J.L., (2005) Etude de cas de harper australien après sa recrudescence dans la région lyonnaise. *Prat. Vét. Equine*, *37*, 53-60.
(18) Mohammed, H.O., Divers, T.J., Summers, B.A., and de Lahunta, A., (2007) Vitamin E deficiency and risk of equine motor neuron disease. *Acta Vet. Scand., 49*, 17.
(19) Moore, A., Collatos, C., Ortenburger, A., Illanes, O., and Ikede, B., (1994) Motor neuron disease in a horse. *Can. Vet. J., 35*, 522.
(20) Delguste, C., de Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Amory, H., and Lekeux, P., (2007) Change in blood antioxidant status of

horses moved from a stable following diagnosis of equine motor neuron disease. *Can. Vet. J.*, *48*, 1165-1167.
(21) Lofstedt, J. and Ikede, B.O., (1994) Motor neuron disease in a quarter horse from Nova Scotia. *Can. Vet. J.*, *35*, 507-509.
(22) Furuoka, H., Hasegawa, M., Kobayashi, Y., and Matsui, T., (1999) Peripheral nerve lesions in a case of equine motor neuron disease. *J. Vet. Med. Sci.*, *61*, 557-560.
(23) Sasaki, N., Yamada, M., Morita, Y., Furuoka, H., Itoh, M., Satoh, M., and Yamada, H., (2006) A case of equine motor neuron disease (EMND). *J. Vet. Med. Sci.*, *68*, 1367-1369.
(24) Poxton, I.R., Hunter, L., Lough, H., and Miller, K., (1999) Is Equine Grass Sickness (Mal Seco?) a Form of Botulism? *Anaerobe*, *5*, 291-293.
(25) John, H.A., Marrs, J., and Laffling, A.J., (2000) Investigation of the susceptibility of equine autonomic neuronal cell lines, clonally derived from the same paravertebral ganglion, to toxic plasma from equine dysautonomia (grass sickness) cases. *Toxicol. in Vitro*, *14*, 459-465.
(26) Hudson, N., Mayhew, I., and Pearson, G., (2002) Presence of in vitro electrical activity in the ileum of horses with enteric nervous system pathology: equine dysautonomia (grass sickness). *Auton. Neurosci.*, *99*, 119-126.
(27) Wood, J.L.N., Milne, E.M., and Doxey, D.L., (1998) A case-control study of grass sickness (equine dysautonomia) in the United Kingdom. *Vet. J.*, *156*, 7-14.
(28) Timoney, P.J. and Wernery, U., (2003) International Conference on Equine Grass Sickness, Dubai, United Arab Emirates September 22-23, 2001. *Vet. J.*, *165*, 7-10.
(29) Pirie, R.S., (2006) Grass Sickness. *Clin. Tech. Equine Pract.*, *5*, 30-36.
(30) Huntington, P.J., Seneque, S., Slocombe, R.F., Jeffcott, L.B., McLean, A., and Luff, A.R., (1991) Use of phenytoin to treat horses with Australian stringhalt. *Aust. Vet. J.*, *68*, 221-224.
(31) Wijnberg, I.D., Back, W., and van der Kolk, J.H., (2000) The use of electromyographic examination as a diagnostic tool and phenytoin sodium as treatment in a case of classic springhalt in a Dutch warmblood horse. *Tijdschr Diergeneeskd*, *125*, 743-747.
(32) Kannegieter, N.J., Malik, R., (1992) The use of baclofen in the treatment of stringhalt. *Aust. Equine Vet.*, *10*, 90.
(33) Collignon, G., (2007) Contribution à l'étude épidémiologique de l'enzootie de harper australien en France depuis 2003 chez le cheval. *Thèse Vétérinaire-Toul 3-4071*.
(34) Adams, S.B. and Fessler, J.F., (2000) Atlas of equine surgery, Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia (USA). 381-383.
(35) Seddon, H.R. and Belschner, H.G., (1926) Stringhalt in horses. *Agr. Gaz. New S. Wales*, *37*, 381-382.
(36) O'Connor, J.J., (1950) Dollar's Veterinary surgery. *Bailliere, Tindall and Cox; 4th ed., London*.
(37) Adams, O.R., (1966) Lameness in Horses. *Lea and Febiger, Philadelphia*, 313-316.
(38) Pemberton, D.H.a.C., I.W., (1979) Investigation of a recent outbreak of stringhalt in horses in East Gippsland. *Vic. Vet. Proc.*, *16*, 16.
(39) Cahill, J.I. and Goulden, B.E., (1992) Stringhalt-current thoughts on aetiology and pathogenesis. *Equine Vet. J.*, *24*, 161-162.
(40) Pemberton, D.H. and Caple, I.W., (1980) Australian Stringhalt in horses. *Vet. Annu.*, *20*, 167-171.
(41) Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E., (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, *29*, 1181-1189.

(42) Yang, J., Xu, G., Zheng, Y., Kong, H., Pang, T., Lv, S., and Yang, Q., (2004) Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, *813*, 59-65.

(43) Odunsi, K., Wollman, R.M., Ambrosone, C.B., Hutson, A., McCann, S.E., Tammela, J., Geisler, J.P., Miller, G., Sellers, T., Cliby, W., Qian, F., Keitz, B., Intengan, M., Lele, S., and Alderfer, J.L., (2005) Detection of epithelial ovarian cancer using ^{1}H-NMR-based metabonomics. *Int. J. Cancer*, *113*, 782-788.

(44) Griffiths, J.R. and Stubbs, M., (2003) Opportunities for studying cancer by metabolomics: preliminary observations on tumors deficient in hypoxia-inducible factor 1. *Adv. Enzyme Regul.*, *43*, 67-76.

(45) Yang, J., Xu, G., Hong, Q., Liebich, H.M., Lutz, K., Schmulling, R.M., and Wahl, H.G., (2004) Discrimination of Type 2 diabetic patients from healthy controls by using metabonomics method based on their serum fatty acid profiles. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, *813*, 53-58.

(46) Brindle, J.T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J.K., Bethell, H.W., Clarke, S., Schofield, P.M., McKilligin, E., Mosedale, D.E., and Grainger, D.J., (2002) Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^{1}H-NMR-based metabonomics. *Nat. Med.*, *8*, 1439-1444.

(47) Sabatine, M.S., Liu, E., Morrow, D.A., Heller, E., McCarroll, R., Wiegand, R., Berriz, G.F., Roth, F.P., and Gerszten, R.E., (2005) Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation*, *112*, 3868-3875.

(48) Griffin, J.L., Cemal, C.K., and Pook, M.A., (2004) Defining a metabolic phenotype in the brain of a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia 3. *Physiol. Genomics*, *16*, 334-340.

(49) Dunckley, T., Coon, K.D., and Stephan, D.A., (2005) Discovery and development of biomarkers of neurological disease. *Drug Discov. Today*, *10*, 326-334.

(50) Prabakaran, S., Swatton, J.E., Ryan, M.M., Huffaker, S.J., Huang, J.T., Griffin, J.L., Wayland, M., Freeman, T., Dudbridge, F., Lilley, K.S., Karp, N.A., Hester, S., Tkachev, D., Mimmack, M.L., Yolken, R.H., Webster, M.J., Torrey, E.F., and Bahn, S., (2004) Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol. Psychiatry*, *9*, 684-97, 643.

(51) Barshop, B.A., (2004) Metabolomic approaches to mitochondrial disease: correlation of urine organic acids. *Mitochondrion*, *4*, 521-527.

(52) Wang, Y., Holmes, E., Nicholson, J.K., Cloarec, O., Chollet, J., Tanner, M., Singer, B.H., and Utzinger, J., (2004) Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *101*, 12676-12681.

(53) Braun, K.P., Gooskens, R.H., Vandertop, W.P., Tulleken, C.A., and van der Grond, J., (2003) ^{1}H magnetic resonance spectroscopy in human hydrocephalus. *J. Magn. Reson. Imaging*, *17*, 291-299.

(54) Coen, M., O'Sullivan, M., Bubb, W.A., Kuchel, P.W., and Sorrell, T., (2005) Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis. *Clin. Infect. Dis.*, *41*, 1582-1590.

(55) Nicholson, J.K., Connelly, J., Lindon, J.C., and Holmes, E., (2002) Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov.*, *1*, 153-161.

(56) Faubert, D., Paul, G.J.C., Giroux, J., and Bertrand, M.J., (1993) Selective fragmentation and ionization of organic compounds using an energy-tunable rare-gas metastable beam source. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, *124*, 69-77.

(57) Nicholls, A.W., Mortishire-Smith, R.J., and Nicholson, J.K., (2003) NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats. *Chem. Res. Toxicol., 16*, 1395-1404.
(58) Holmes, E., Tsang, T.M., and Tabrizi, S.J., (2006) The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. *NeuroRx, 3*, 358-372.
(59) Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K., (2007) Metabonomics in pharmaceutical R&D. *FEBS J., 274*, 1140-1151.
(60) Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K., (2006) Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm. Res., 23*, 1075-1088.
(61) Vangala, S. and Tonelli, A., (2007) Biomarkers, metabonomics, and drug development: can inborn errors of metabolism help in understanding drug toxicity? *AAPS J., 9*, E284-297.
(62) Waters, N.J., Holmes, E., Waterfield, C.J., Farrant, R.D., and Nicholson, J.K., (2002) NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with [alpha]-naphthylisothiocyanate. *Biochem. Pharmacol., 64*, 67-77.
(63) Pivawer, G., Law, M., and Zagzag, D., (2007) Perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging in differentiating necrotizing cerebritis from glioblastoma multiforme. *Magn. Reson. Imaging, 25*, 238-243.
(64) Perlbarg, V. and Marrelec, G., (2008) Contribution of Exploratory Methods to the Investigation of Extended Large-Scale Brain Networks in Functional MRI: Methodologies, Results, and Challenges. *Int. J. Biomed. Imaging, 2008*, 218519.
(65) Xie, J., Chen, X.Z., Jiang, T., Li, S.W., Li, Z.X., Zhang, Z., Dai, J.P., and Wang, Z.C., (2008) Preoperative blood oxygen level-dependent functional magnetic resonance imaging in patients with gliomas involving the motor cortical areas. *Chin. Med. J., 121*, 631-635.
(66) Zagrosek, A., Wassmuth, R., Abdel-Aty, H., Rudolph, A., Dietz, R., and Schulz-Menger, J., (2008) Relation between myocardial edema and myocardial mass during the acute and convalescent phase of myocarditis-a CMR study. *J. Cardiovasc. Magn. Reson., 10*, 19.
(67) Hayashi, Y., Shima, H., Miyashita, K., Kinoshita, M., Nakada, M., Kida, S., and Hamada, J., (2008) Unusual angiographic changes in an internal carotid artery pseudoaneurysm after infection in the deep neck space. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo), 48*, 216-219.
(68) Galanaud, D., Nicoli, F., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Dormont, D., Girard, N., Ranjeva, J., and Cozzone, P., (2007) Brain magnetic resonance spectroscopy. *J. Radiol., 88*, 483-496.
(69) Galanaud, D., Nicoli, F., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Ranjeva, J.P., Viola, A., Girard, N., and Cozzone, P.J., (2007) Indications for cerebral MR proton spectroscopy in 2007. *Rev. Neurol. (Paris), 163*, 287-303.
(70) Hollingworth, W., Medina, L.S., Lenkinski, R.E., Shibata, D.K., Bernal, B., Zurakowski, D., Comstock, B., and Jarvik, J.G., (2006) A systematic literature review of magnetic resonance spectroscopy for the characterization of brain tumors. *AJNR Am. J. Neuroradiol., 27*, 1404-1411.
(71) Burtscher, I.M., Skagerberg, G., Geijer, B., Englund, E., Stahlberg, F., and Holtas, S., (2000) Proton MR spectroscopy and preoperative diagnostic accuracy: an evaluation of intracranial mass lesions characterized by stereotactic biopsy findings. *AJNR Am. J. Neuroradiol., 21*, 84-93.
(72) Hattingen, E., Raab, P., Franz, K., Lanfermann, H., Setzer, M., Gerlach, R., Zanella, F.E., and Pilatus, U., (2008) Prognostic value of choline and creatine in WHO grade II gliomas. *Neuroradiology*.

(73) Mattos, J.P., Marenco, H.A., Campos, J.M., Faria, A.V., Queiroz, L.S., Borges, G., and Oliveira, E., (2006) Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult. *Arq. Neuropsiquiatr., 64,* 132-135.

(74) Khanna, P.C., Godinho, S., Patkar, D.P., Pungavkar, S.A., and Lawande, M.A., (2006) MR spectroscopy-aided differentiation: "giant" extra-axial tuberculoma masquerading as meningioma. *AJNR Am. J. Neuroradiol., 27,* 1438-1440.

(75) Raizer, J.J., Koutcher, J.A., Abrey, L.E., Panageas, K.S., DeAngelis, L.M., Lis, E., Xu, S., and Zakian, K.L., (2005) Proton magnetic resonance spectroscopy in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma. *J. Neurooncol., 71,* 173-180.

(76) Tourbah, A., Stievenart, J.L., Edan, G., Abanou, A., Dormont, D., and Lyon-Caen, O., (2005) Acute demyelination: an insight into the effect of mitoxantrone on CNS lesions. *J. Neuroradiol., 32,* 63-66.

(77) Fernando, K.T., McLean, M.A., Chard, D.T., MacManus, D.G., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., Gordon, R.M., Plant, G.T., Thompson, A.J., and Miller, D.H., (2004) Elevated white matter *myo*-inositol in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Brain, 127,* 1361-1369.

(78) Kastrup, O., Wanke, I., and Maschke, M., (2005) Neuroimaging of infections. *NeuroRx, 2,* 324-332.

(79) Grover, V.P., Dresner, M.A., Forton, D.M., Counsell, S., Larkman, D.J., Patel, N., Thomas, H.C., and Taylor-Robinson, S.D., (2006) Current and future applications of magnetic resonance imaging and spectroscopy of the brain in hepatic encephalopathy. *World J. Gastroenterol., 12,* 2969-2978.

(80) Lundbom, J.O., Vuori, K.E., Gaily, E.K., Granstrom, R.I., Blomstedt, G.C., Hakkinen, A.M., Heikkinen, S.M., and Lundbom, N.M., (2005) Metabolite phantom correction of the nonuniform volume-selection profiles in MR spectroscopic imaging: application to temporal lobe epilepsy. *AJNR Am. J. Neuroradiol., 26,* 1072-1077.

(81) Miller, S.P., McQuillen, P.S., Hamrick, S., Xu, D., Glidden, D.V., Charlton, N., Karl, T., Azakie, A., Ferriero, D.M., Barkovich, A.J., and Vigneron, D.B., (2007) Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. *N. Engl. J. Med., 357,* 1928-1938.

(82) McCutcheon, J.E., Fisher, A.S., Guzdar, E., Wood, S.A., Lightman, S.L., and Hunt, S.P., (2008) Genetic background influences the behavioural and molecular consequences of neurokinin-1 receptor knockout. *Eur. J. Neurosci., 27,* 683-690.

(83) Arters, J., Hohmann, C.F., Mills, J., Olaghere, O., and Berger-Sweeney, J., (1998) Sexually dimorphic responses to neonatal basal forebrain lesions in mice: I. Behavior and neurochemistry. *J. Neurobiol., 37,* 582-94.

(84) Mora, S., Dussaubat, N., and Diaz-Veliz, G., (1996) Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology, 21,* 609-620.

(85) Xu, Q., Pan, Y., Yi, L.T., Li, Y.C., Mo, S.F., Jiang, F.X., Qiao, C.F., Xu, H.X., Lu, X.B., Kong, L.D., and Kung, H.F., (2008) Antidepressant-like effects of psoralen isolated from the seeds of Psoralea corylifolia in the mouse forced swimming test. *Biol. Pharm. Bull., 31,* 1109-1114.

(86) Uchida, S., Hirai, K., Hatanaka, J., Hanato, J., Umegaki, K., and Yamada, S., (2008) Antinociceptive effects of St. John's wort, *Harpagophytum procumbens* extract and Grape seed proanthocyanidins extract in mice. *Biol. Pharm. Bull., 31,* 240-245.

(87) Manhaes, A.C., Guthierrez, M.C., Filgueiras, C.C., and Abreu-Villaca, Y., (2008) Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.*

(88) Farag, A.T., Goda, N.F., Shaaban, N.A., and Mansee, A.H., (2007) Effects of oral exposure of synthetic pyrethroid, cypermethrin on the behavior of F1-progeny in mice. *Reprod. Toxicol.*, *23*, 560-567.
(89) Galvan, V., Zhang, J., Gorostiza, O.F., Banwait, S., Huang, W., Ataie, M., Tang, H., and Bredesen, D.E., (2008) Long-term prevention of Alzheimer's disease-like behavioral deficits in PDAPP mice carrying a mutation in Asp664. *Behav. Brain Res.*, *191*, 246-255.
(90) Rudick, C.N., Bryce, P.J., Guichelaar, L.A., Berry, R.E., and Klumpp, D.J., (2008) Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain. *PLoS ONE*, *3*, e2096.

CHAPITRE II :
DONNEES DE METABONOMIQUE
ET D'IMAGERIE

II. Chapitre II : Données de métabonomique et d'imagerie

Introduction

Le chapitre I a retracé les connaissances, certes limitées, d'ordre épidémiologique et clinique dont nous disposons à l'heure actuelle concernant le **harper chez le cheval**. Il apparaît très clairement que de **nombreux facteurs limitent l'exploration d'une telle affection**. En effet, en premier lieu, le seul animal cible connu à l'heure actuelle est le cheval sur lequel, pour des raisons d'ordre éthique mais également budgétaire et simplement pratique, des études classiques de toxicologie ne sont pas possibles. De plus, le principe toxique, les doses, les voies métaboliques impliquées dans le processus de la maladie, les organes préférentiellement affectés, les facteurs prédisposants sont encore méconnus voire inconnus. Enfin, les connaissances concernant l'influence des facteurs environnementaux sur une éventuelle synthèse de métabolites secondaires potentiellement toxiques dans l'espèce végétale incriminée restent limitées.

Comment étudier un toxique sans travailler sur une espèce sensible ? Comment peut-on prendre en compte un tel nombre de facteurs et comment, à partir de si peu de données étiologiques, initier une étude toxicologique ? En fait, vouloir raisonner et répondre à une telle interrogation en termes d'étude toxicologique au sens classique n'a pas de sens. Trop de facteurs sont à prendre en considération, que ce soit concernant le toxique que concernant la cible. Il est donc nécessaire et incontournable d'englober tous ces facteurs, de **définir progressivement le périmètre d'impact toxique** et la **signature spécifique de cet impact** au sein de l'organisme animal, qu'il soit ou non sensible, c'est-à-dire susceptible ou non de manifester certains signes cliniques et/ou lésionnels.

La **métabonomique** est une **méthode d'approche globale** permettant de reconsidérer la conception des problématiques toxicologiques. En effet, elle recèle de nombreux atouts dont celui de pouvoir **prendre en compte de multiples facteurs simultanément**. Elle permet de caractériser **quantitativement la progression des disruptions métaboliques** et donc de mettre en évidence un **changement de statut physiopathologique** d'un organisme à la suite d'une perturbation toxique, nutritionnelle, génétique ou physiopathologique (*1*). Cette

méthode d'approche se fonde en fait sur des considérations d'ordre thermodynamique, concept novateur dans les études de toxicologie classique et permet donc de travailler sur un **système vivant dynamique**, siège d'interactions multiples, sans écarter l'impact de son environnement. Ceci **redéfinit** en quelque sorte le **concept même de modèle** (*1,2*) : celui-ci n'est plus un intermédiaire pour visualiser les perturbations toxiques en termes de symptômes cliniques ou lésionnels mais en termes de modifications métaboliques, aussi infimes soient-elles. Considérant que cette approche était la seule approche possible dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse qu'un toxique engendre des disruptions ou des modifications de certaines voies métaboliques, ceci de façon « orthologue ». Ce terme rend compte de la similarité de ces changements entre les espèces, même s'ils n'aboutissent pas à une maladie, chez l'animal de laboratoire testé, telle qu'on la définit actuellement, c'est-à-dire englobant un certain nombre de signes cliniques et/ou lésionnels. Ce **concept d'orthologie**, emprunté au domaine de la génétique, pose l'hypothèse qu'il existe un **degré de similarité** entre deux objets biologiques (gènes, fonctions). Nous sommes partis du principe que si la Porcelle enracinée engendrait des modifications métaboliques au sein d'un organisme animal, celles-ci partageraient certaines analogies et correspondances, que l'on travaille chez l'espèce équine sensible ou chez une espèce de laboratoire. Dans certains cas, ces altérations des réseaux métaboliques aboutissent à un stade ultime de « rupture » et donc aux signes cliniques et lésionnels : c'est le stade de toxicité visible dans l'espèce cible. Dans d'autres cas, on notera seulement un état de « subtoxicité » qui peut ne jamais aboutir à un stade toxique pour peu que l'individu ne soit pas sensible. Néanmoins, l'animal de laboratoire est apte à révéler des perturbations de processus métaboliques à la suite de stimuli lui étant appliqués.

Présentation et objectifs de l'étude

Dans un premier temps, n'étant pas en mesure d'identifier un ou d'éventuel(s) principe(s) toxique(s) chez le végétal et ne sachant pas sur quel type cellulaire ou tissulaire il(s) pourrai(en)t agir, nous avons décidé d'observer les **manifestations métaboliques** induites par l'ingestion de la plante chez une espèce de laboratoire. Etant donné que les perturbations métaboliques consécutives à l'ingestion d'un toxique engendrent certaines réponses communes entre deux espèces différentes en ce qui concerne les tissus affectés ou les métabolites impliqués, l'exploration du harper équin a été volontairement menée sur **rongeurs de laboratoire, rats et souris**. La seconde espèce de rongeur a été utilisée afin de reproduire les résultats obtenus sur le rat tout en permettant de tester des doses plus fortes

avec une quantité de végétal moindre. Cette démarche n'ayant pas été précédemment utilisée, cette exploration *in vivo* entre deux espèces animales était nécessaire.

Les **urines et le foie** ont été étudiés afin d'accéder au **métabolisme général**. N'étant pas en mesure d'accéder au système nerveux périphérique, d'approche trop délicate mais *a priori* impliqué dans l'affection (*3-5*), l'analyse des **encéphales** a constitué un moyen alternatif **d'exploration nerveuse.** De plus, ne connaissant pas les facteurs environnementaux pouvant influencer une éventuelle synthèse de métabolites secondaires dans le végétal, même si certains facteurs tels que les stress hydriques, physiques ou thermiques sont soupçonnés, nous avons utilisés un **pool homogène de matériel végétal.** En choisissant ce dernier, nous avons jugé que la variabilité intrinsèque aux plantes serait masquée mais que le potentiel toxique serait conservé et suffisant pour dévoiler d'éventuels désordres métaboliques. Les doses de végétal ont été de 0, 1, 3% durant 32 jours pour les rats et de 0, 3 et 9% durant 8, 15 et 21 jours pour les souris.

Dans un second temps, les premiers travaux ayant souligné le rôle majeur du système nerveux central, nous avons utilisé une **approche complémentaire** afin de venir conforter et préciser les résultats issus de métabonomique. **L'Imagerie par Résonance Magnétique** (IRM) avec son sous-domaine d'application, la spectroscopie par résonance magnétique, semblait être l'approche adéquate (*6-8*) pour étudier le métabolisme cérébral *in vivo*. Les études ont été menées sur 12 souris *in vivo* nourries durant 15 jours avec de fortes doses (9%) d'*Hypochœris radicata*.

Enfin, une **analyse canonique** a été réalisée sur ces 12 dernières souris afin de confronter les deux jeux de données issus de l'analyse par métabonomique et de l'étude par imagerie. Le but était de venir conforter et préciser certains **biomarqueurs**, cette étape finale étant là encore nécessaire afin de venir **valider** les résultats obtenus.

A. Matériel et Méthodes

Certaines démarches expérimentales décrites ci-dessous étant réalisées de façon identique dans d'autres chapitres, certaines données ne seront exploitées que dans les chapitres suivants et l'auteur se permet de renvoyer le lecteur ultérieurement à ce même paragraphe.

1. Etudes métabonomiques

1.1. Réalisation des régimes alimentaires

1.1.1. Obtention et préparation du matériel végétal

Des **inflorescences** d'*Hypochœris radicata* ont été collectées entre **août et novembre 2005** sur **8 parcelles** colonisées par cette espèce dans le sud de la France (départements des Pyrénées-Atlantiques et Haute-Garonne) et près de Paris (Yvelines). Seules les inflorescences ont été récoltées suite aux observations faites sur le terrain qui ont montré que les chevaux ne consommaient que la partie distale des plantes. Après collecte, ces fleurs ont été stockées le plus rapidement possible à -20°C, **lyophilisées** (Laboratoire des Xénobiotiques, Toulouse et entreprise Lyophal, ZA La Gandonne-6 Rue du Remoulaïre-13300 Salon-de-Provence) puis **triées** par stade d'inflorescence. Six stades ont été retenus car aisément identifiables : boutons fermés, boutons ouverts, fleurs ouvertes, fleurs fanées, fleurs en début de fructification, fruits matures. Au total, **48 échantillons** différents ont été obtenus correspondant à 8 lieux de collecte et 6 stades de développement pour chaque lieu. Les stades ont ensuite été réduits en poudre (Broyeur à café SEB®), placés séparément dans des récipients opaques et étanches puis stockés à -20°C.

Cette étape de préparation du matériel végétal, lourde pratiquement et relativement ingrate, qui peut paraître mineure, n'en est pas moins cruciale. En effet, ce pool végétal a nécessité du personnel et demandé de longs mois de récolte et de préparation (lyophilisation et tri) avant d'être utilisable.

De plus, la matrice végétale utilisée lors de toutes les expérimentations (métabonomique, IRM, comportement, exploration du végétal) a été identique, provenant du même pool originel. Cette prise en compte devait assurer un continuum, une traçabilité et permettre une comparaison entre les différents résultats quelles que soient les approches empruntées.

Outre le fait d'assurer une composition connue et maîtrisée de la matrice végétale utilisée pour les expérimentations in vivo, ce tri en fonction des stades de développement est aussi nécessaire à l'exploration propre du végétal. Ceci sera développé plus en avant dans le chapitre IV concernant l'exploration intrinsèque au végétal.

La **composition moyenne des nutriments** apportés par les fleurs d'*Hypochœris radicata* lyophilisées et réduites en poudre a été réalisée grâce à un microdosage effectué au laboratoire Lara Europe Analyses (Toulouse, France). Ceci a nécessité de sacrifier un échantillon de 50 g du mélange homogène obtenu pour les expérimentations (*Tableau II.2*), quantité non négligeable de matériel végétal. Un dosage, grâce à la méthode **de WEENDE** (*9, 10*), correspondant à une hydrolyse acide suivie d'une hydrolyse alcaline (norme AFNOR NF V03-040, 1993) a permis d'obtenir la teneur en **cellulose brute**. La méthode analytique de **Kjeldhal** (*11*) qui correspond à une minéralisation de l'azote (norme AFNOR NE V18-100, NF ISO 5983-1, 1977) a permis d'obtenir la teneur en **protéines**. La teneur en humidité en g/100 g a été calculée après pesée et passage à l'étuve, la teneur en cendres en g/100 g après passage au four, la teneur en lipides en g/100 g après hydrolyse et extraction et la teneur en glucides en g/100 g après calcul. La valeur énergétique et la valeur calorique ont été calculées respectivement en kJ/100g (protéines et glucides : 17 kJ/g et lipides : 37 kJ/g) et en kcal/100g (protéines et glucides : 4 kcal/g et lipides : 9 kcal/g). La teneur en **méthionine totale** a été obtenue après analyse en HPLC-UV. La détermination des valeurs énergétiques et des teneurs en lipide, protéine et méthionine était indispensable pour **réajuster les régimes** des animaux afin de ne pas entraîner de confusion de facteurs pour les études statistiques ultérieures. En effet, l'administration de doses à 3 mais surtout à 9% de fleurs constituait un facteur de variation important au niveau de l'équilibre nutritionnel du régime.

1.1.2. Préparation des aliments et régimes pour les animaux

Les aliments de base utilisés lors des expérimentations sont tous des aliments commerciaux standards en poudre pour rongeurs AIN 93 ou UAR 210 (SAFE, Route de Saint-Bris F-89290 AUGY, France). Un mélange standard des poudres des différents stades d'inflorescence obtenus précédemment a été réalisé et incorporé dans cet aliment de base à hauteur de 0,5 ; 1 ; 3 ; 6 et/ou 9% en fonction des expérimentations qui ont suivi. Dans le but de ne pas introduire de biais liés à des variations de la teneur en certains nutriments dans les régimes, des dosages de l'aliment (*Tableau II.2*) ont été réalisés puis des **réajustements** ont été effectués. Ces derniers ont concerné les **doses de 3 et 9% d'*Hypochœris radicata***,

prenant en compte la composition de la poudre de fleurs afin de correspondre le plus parfaitement aux besoins nutritionnels des animaux. En effet, à cette dose, les variations de la teneur en certains nutriments peuvent être responsables de troubles nutritionnels, et doivent être prises en compte. Ces réajustements ont été effectués en utilisant de la **caséine** pour rectifier l'apport protéique et de **l'huile de colza** pour réajuster l'apport lipidique (*Tableau II.3*). La composition nutritionnelle ainsi que la formulation des différents régimes sont exposées dans les *Tableau II.3*, *Tableau II.4* et *Tableau II.5*. Une fois confectionnés, ces régimes ont été mis en sachets et stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Les expérimentations sur animaux, qu'elles aient eu lieu à Toulouse, Theix ou Nancy, ont toutes été menées à partir d'un aliment composé de façon rigoureusement identique. Cependant, la procédure ne sera exposée que dans ce chapitre.

Tableau II.1 : Composition et méthodes d'analyse sur des inflorescences d'Hypochœris radicata lyophilisées et réduites en poudre.

Analyse	Abréviations	Méthode analytique	Résultats (% MB)
Humidité en g/100g		Pesée, étuve	6,90%
Matière sèche dont :	MS		93,10%
• Cendres ou matière minérale en g/100g	Mm	Four à 550°C	7,50%
• Lipides totaux ou Matière grasse en g/100g	MG	Hydrolyse- extraction	7,20%
• Protides en g/100g (N*6,25) ou Matière azotée totale dont :	MAT	Kjeldahl*-Titration	12,80%
- Méthionine totale		*HPLC-UV*	*1475 mg/kg*
• Glucides totaux en g/100g dont :		Calcul	65,60%
- Cellulose brute	*CB*	*De Weende***	*16,30%*
- Extractif non azoté	*ENA*	*Calcul : ENA = MS – Mm – MAT – MG - CB*	*49,90%*
Total :			100%
Valeur énergétique en kJ/100g		Calcul (PX17, LX37, GX17)	1600 kj/100g
Valeur calorique en kcal/100g		Calcul (PX4, LX9, GX4)	380 kcal/100g

Avec : **ENA** : Extractif Non Azoté ; **MS** : Matière Sèche ; **Mm** : Matière minérale ; **MAT** : Matière Azotée Totale ; **MG** : Matière Grasse ; **CB** : Cellulose Brute, *norme AFNOR NE V18-100, NF ISO 5983-1, 1977, **norme AFNOR NF V03-040, 1993

Tableau II.2 : a) Formulation et b) Composition nutritionnelle de l'aliment commercial standard pour rongeur UAR 210.

a)

Nom du produit	Quantité (kg)	%
Amidon de maïs (4,5% humidité)	4,000	20,00
Caséine acide (88% protéines)	4,600	23,00
Cellulose (3% humidité)	1,200	6,00
Saindoux	0,600	3,00
CM 205 b*	1,400	7,00
Huile de maïs	0,200	1,00
Dextrose (0% humidité)	7,600	38,00
Huile de Colza	0,200	1,00
Vit 200**	0,200	1,00
Total :	**20,000**	**100,00**

b)

Composition chimique	% MB
Humidité	3,84
Matière sèche	96,16
• Protéines	20,24
Méthionine	*3*
• Glucides	62,92
***CB** de Weende (10)*	*68,6*
***TDF** de Lee et al. (12)*	*98,8*
***NDF** de Van Soest and Wine (13)* ***ADF** de Van Soest (14)* ***ADL** de Van Soest (14)*	*98,8* *84,7* *< 0,5*
• Lipides	5,00
• Minéraux et vitamines	8,00
Total :	100,00

Avec :
CB de Weende (*10*): Cellulose Brute de Weende : sous estime la cellulose vraie
TDF de Lee *et al.* (*12*): Total Dietary Fiber : correspond aux glucides non digestibles des végétaux
NDF de Van Soest et Wine (*13*): Neutral Dietary Fiber : Glucides pariétaux - pectines
ADF de Van Soest (*14*) : Acid Dietary Fiber : Glucides pariétaux – (pectines + hémicellulose)
ADL de Van Soest (*14*) : Acid Dietary Lignin : Glucides pariétaux – (pectines + hémicellulose + cellulose)
*Composition du mélange minéral **UAR 205b** (par kg de mélange minéral) :
Phosphore (7750 mg/kg), Calcium (10000 mg/kg), Potassium (6000 mg/kg), Sodium (4000 mg/kg), Magnésium (1000 mg/kg), Manganèse (80 mg/kg), Fer (300 mg/kg), Cuivre (12,5 mg/kg), Zinc (45 mg/kg), Cobalt (0,09 mg/kg), Iode (0,49 mg/kg).
Composition du mélange vitaminique **UAR 200 (par kg de mélange vitaminique) :
Vitamine A (19800 UI/kg), Vitamine D (2500 UI/kg), Vitamine B1 ou thiamine (20 mg/kg), Vitamine B2 ou riboflavine (15 mg/kg), Vitamine B5 ou acide pantothénique (70 mg/kg), Vitamine B6 ou pyridoxine (10 mg/kg), Vitamine B8 ou biotine (0,3 mg/kg), Vitamine B9 ou acide folique (5 mg/kg), Vitamine B12 ou cobalamine (0,05 mg/kg), Vitamine C (800 mg/kg), Vitamine E (170 mg/kg), Vitamine K (40 mg/kg), Vitamine PP ou nicotinamide (100 mg/kg), Choline (1360 mg/kg), Inositol (150 mg/kg).

Tableau II.3 : Composition chimique des différentes matières premières utilisées dans les régimes. Tous les poids sont exprimés en % par rapport à la matière brute.

	HR	UAR 210	Taurine	Caséine	Huile de Colza
MS	93,1	96,16	99	97	100
Eau	6,9	3,84	1	3	0
PB	12,8	20,24	70	88	0
MG	7,2	5	0	0	100
Cellulose brute	16,3	6,86	0	0	0
Cendres	7,5	8	0	0	0
ENA	49,3	56,06	29	9	0
Energie (kcal/kg)	**3132**	**3502**	**3960**	**3880**	**9000**

Tableau II.4 : Composition chimiques des différents régimes des souris utilisés dans les différentes expérimentations après réajustement nutritionnel. Tous les poids sont exprimés en % par rapport à la matière brute.

	9 HR + 89,5 UAR +1,1 caséine + 0,4 huile	3 HR + 96,7 UAR + 0.3 Caséine	1 HR + 98,9 UAR + 0,1 caséine	0,5 HR + 99,5 UAR	6 HR + 92,7 UAR + 0,9 Caséine + 0,4 huile
Régimes	9% HR	3% HR	1% HR	0,5% HR	6% HR
MS	95,9092	96,07072	96,13024	96,1447	95,99932
Eau	4,0908	3,92928	3,86976	3,8553	4,00068
PB	20,2348	20,22008	20,23336	20,2028	20,32248
MG	5,523	5,051	5,017	5,011	5,467
Cellulose brute	7,6067	7,12262	6,94754	6,9072	7,33722
Cendres	7,835	7,961	7,987	7,9975	7,866
ENA	54,7097	55,71602	55,94534	56,0262	55,00662
Energie (kcal/kg)	**3494,85**	**3492,034**	**3498,678**	**3500,15**	**3505,194**

Tableau II.5 : Formulation des différents régimes des souris durant les différentes expérimentations. Tous les poids sont exprimés en g de matière brute.

Régimes	Poids total	UAR 210	HR	Caséine	Huile	Taurine
	1940					
témoin	1940	1940				
3% HR	1940	1876	58	6		
9% HR	1940	1736	175	21	8	
Total	5820	5552	233	27	8	0

1.2. Animaux

Toutes les expérimentations menées ont été réalisées suivant la directive 86/609/CEE du 24/11/1986 de l'Union européenne pour l'**utilisation et la protection des petits animaux de laboratoire**, traduit en droit français par les décrets n°87-848 du 19/10/1097 et n°2001-464 du 29/05/2001 et de façon spécifique par l'Arrêté du 19/04/1988, tous ces textes ayant été **approuvés par des Comités d'Ethique**.

Les **rats** utilisés étaient de souche **Wistar**, provenant de l'élevage Charles River, âgés de 5 semaines et pesant environ 120 g en début d'expérimentation (18 mâles et 18 femelles).

Les **souris**, de souche **C57BL/6J** (Jackson Lab, Janvier, Le Genest Saint Isle, France), 36 mâles et 36 femelles et pesaient environ 15 à 20 g en début d'expérimentation.

L'hébergement des animaux et toutes les expérimentations de métabonomique ont été réalisées sur le site de l'INRA, au sein du laboratoire des Xénobiotiques (UMR 1089 INRA/ENVT, 181 chemin de Tournefeuille BP3, 31931 TOULOUSE Cedex 9), dans une pièce ventilée à une température de 21 ± 2°C et à une humidité relative de 50 ± 10% avec un cycle luminosité/obscurité 12 h/12 h.

1.2.1. Protocole de sacrifice

Chaque animal à sacrifier a été pesé puis a été rendu inconscient après assommage (ou inhalation de CO_2 en ce qui concerne les rats). Après section des artères carotides, le **sang** a été **collecté** (au minimum 1 mL pour les rats, 200 µL pour les souris) dans un tube hépariné et centrifugé à 5500 g durant 4 minutes afin d'obtenir les plasmas correspondants. Le sang restant a été éliminé en positionnant l'animal sur le ventre.

Après euthanasie, le **cerveau et la moelle épinière cervicale** ont été **prélevés** immédiatement : une découpe cutanée en arc de cercle en arrière du crâne a été effectuée, face dorsale. Le plan cutané a été récliné par-dessus la tête et les yeux. La partie osseuse interorbitale a été fendue, puis le crâne découpé, à l'aide de ciseaux, dans sa partie médiane, entre les hémisphères cérébraux (en s'arrêtant rostralement au cervelet). Les os du crâne, écartés grâce à la paire de ciseaux ont été fendus latéralement de part et d'autre du cervelet, du tronc cérébral puis de la moelle spinale cervicale. Les nerfs optiques sectionnés ainsi que les autres racines nerveuses, l'encéphale et la moelle spinale cervicale ont pu être ainsi libérés. Les hémisphères cérébraux ont été pesés, placés dans des sachets plastiques identifiés et plongés immédiatement dans l'azote liquide. Après prélèvement du système nerveux central, les animaux ont été retournés sur le dos, le **foie** a été **prélevé** en totalité, pesé et placé immédiatement dans l'azote liquide puis stocké au congélateur à -80°C.

1.2.2. Réalisation des expérimentations

a. Expérimentation sur rats : doses à 1 et 3% Hypochœris radicata

Les **36 rats** (18 mâles et 18 femelles) ont subi une période d'adaptation de 5 jours durant laquelle ils ont été nourris avec de l'aliment semi synthétique **AIN 93** puis placés, dès $J_{0,}$ en **cages à métabolisme** (un animal par cage) et répartis au hasard en 6 lots de 6 animaux en fonction du régime qu'ils ont reçu et du sexe (**FT** : femelles témoins, **MT** : mâles témoins, **FH1** : femelles recevant 1% d'*Hypochœris radicata* dans leur ration, **MH1** : mâles recevant 1% d'*Hypochœris radicata* dans leur ration, **FH3** : femelles recevant 3% d'*Hypochœris radicata* dans leur ration, **MH3** : mâles recevant 3% d'*Hypochœris radicata* dans leur ration). Les animaux ont eu libre accès à l'aliment (20 g/jour/animal) et à l'eau.

L'expérimentation a duré **32 jours**. Des échantillons d'urine ont été collectés deux fois par semaine et les volumes émis sur 24 h ont été mesurés. Après collecte et pesée, les urines ont été réparties en aliquotes de 1 mL et placées à -20°C en attendant les analyses en RMN du ^{1}H. Les **prélèvements d'urine** ont été mesurés deux fois par semaine à J_0, J_1, J_4, J_8, J_{11}, J_{15}, J_{18}, J_{22}, J_{25}, J_{29} et $J_{31,}$ en même temps que les refus alimentaires. Les calculs des **consommations alimentaires individuelles** ont été conduits sur toute la période. Les rats ont été **pesés** de façon hebdomadaire à J_0, J_7, J_{14}, J_{21}, J_{28} et J_{31}, afin de pouvoir déterminer les **gains moyens quotidiens** (GMQ en g/j) ainsi que les **indices de consommation** qui en découlent (IC en g d'aliment/g GMQ). Au bout des trente deux jours (J_{31}), les 36 rats ont été sacrifiés.

b. Expérimentation sur souris : doses à 3 et 9% d'*Hypochœris radicata*

Les **72 souris** (36 mâles et 36 femelles), après une période d'adaptation de 5 jours durant laquelle elles ont été nourries avec de l'aliment semi synthétique **UAR 210**, ont été réparties aléatoirement en 18 lots de 4 souris comme présenté dans le *Tableau II.6* ci-dessous :

Tableau II.6 : Lots de souris (4 souris par lot) en fonction du régime, du sexe et de la date de sacrifice.

Sexe	Femelles			Mâles		
Date de sacrifice	*8j*	*15j*	*21j*	*8j*	*15j*	*21j*
Témoin	FTa	FTb	FTc	MTa	MTb	MTc
3% HR	FH3a	FH3b	FH3c	MH3a	MH3b	MH3c
9% HR	FH9a	FH9b	FH9c	MH9a	MH9b	MH9c

Régimes : T : Témoins, HR : *Hypochœris radicata*
Dates de sacrifice : a : 8 jours ; b : 15 jours ; c : 21 jours

L'expérimentation a duré **21 jours**. Les animaux ont été placés dans des cages collectives, par lot de 4 animaux. Au sein de chaque cage, chaque animal a été identifié par un code de points et de trait : 0, 1, 2 points ou 1 trait, réalisé au marqueur indélébile et retracé chaque semaine. Les **urines** ont été recueillies lors de **mictions provoquées**, en appliquant de légères pressions sur la vessie des animaux au dessus d'un film de paraffine, collectées grâce à une pipette puis transvasées dans des tubes eppendorf. Les prélèvements d'urine ont été

réalisés sur un intervalle allant du jour n au jour (n+1) et cela 2 fois dans la semaine, dans la mesure du possible. Les animaux ont été **pesés** une fois par semaine, à jour fixe, jusqu'à leur euthanasie, au bout de 8, 15 ou 21 jours.

1.3. Obtention des données

Les solvants utilisés, de qualité analytique, ont été achetés à la société Scharlau Chimie SA (Barcelone, Espagne). Le Butyl Hydroxy Toluène (BHT) provient de chez Sigma Aldrich Chimie SA (St Quentin Fallavier, France). L'eau utilisée est de l'eau ultrapure du système Millipore (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France). L'oxyde de deutérium (D_2O), le chloroforme deutéré ($CDCL_3$) et le TMSP proviennent de Euriso-Top, CE Saclay (Gif-sur-Yvette, France).

1.3.1. Protocole d'extraction des phases aqueuses et lipophiles sur organe

La méthode d'extraction des organes utilisée provient de la procédure de Folch (*15*) et permet l'obtention **d'extraits lipophiliques et aqueux**. Elle a été adaptée de la méthode décrite par Waters et al. (*16*). Des échantillons de foie ou de cerveau, ces derniers étant prélevés de par et d'autre de l'hypothalamus, ont subi la procédure qui suit :

Composition des solutions de solvants d'extraction :

- Solution à 50% d'acétonitrile et 0,1% de Butyl Hydroxy Toluène (BHT) :

0,1 g de BHT + 50 mL d'acétonitrile (CH_3CN), pour HPLC + 50 mL d'H_2O milli Q

- Solution à 75% de chloroforme et 25% de méthanol et 0,1% de Butyl Hydroxy Toluène (BHT) :

0,1 g de BHT + 75 mL de chloroforme ($CHCl_3$), pour HPLC + 25 mL de méthanol(CH_3OH), pour HPLC

Après un prélèvement et une pesée d'approximativement **100 mg de tissu**, chaque échantillon a été homogénéisé dans 2 mL d'acétonitrile/eau (50/50 v/v) dans un bain d'eau et de glace, durant 30 secondes, à l'aide de l'homogénéisateur Polytron Kinematica AG puis centrifugé à 3000 g durant 10 min à 4°C. Le surnageant (extrait aqueux) a été prélevé et lyophilisé avant d'être reconstitué dans 600 µL de D_2O puis d'être congelé à -20°C jusqu'à analyse RMN. Le culot a été traité avec 2 mL de chloroforme/méthanol (75/25, v/v), homogénéisé durant 30 secondes avec le Polytron Kinematica AG puis centrifugé à 3000 g à 4°C durant 15 min (Centri Sigma 4K10).

Après chaque homogénéisation, la tige du Polytron a été rincée entre chaque échantillon pour éliminer les dépôts de tissus.

La phase chloroformique (ou lipophilique), récupérée grâce à une petite pipette Pasteur (*Figure II.1*) a été évaporé sous jet d'azote et reconstitué dans 800 µL de $CDCL_3$ et finalement conservé à -20°C jusqu'à analyse RMN. Tout au long de la procédure d'extraction, les échantillons ont été maintenus dans un bain d'eau et de glace.

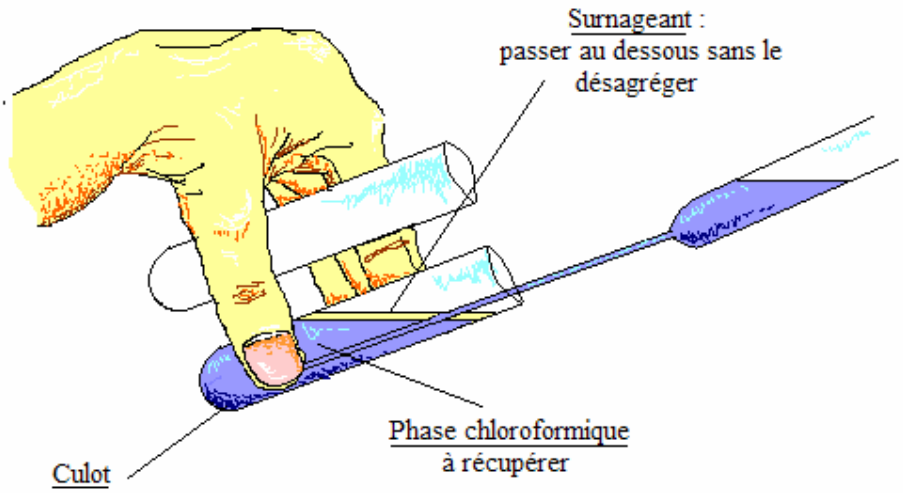


Figure II.1 : Schéma d'obtention de la phase chloroformique ou lipophilique. En inclinant légèrement les tubes, la pipette Pasteur peut être introduite plus aisément sous le surnageant solide sans le désagréger, permettant d'accéder ainsi à la phase chloroformique.

1.3.2. Analyse spectroscopique RMN du ^1H des échantillons urinaires et plasmatiques

a. Préparation de la solution de tampon phosphate pour urines

La solution tampon a été réalisée en mélangeant 2,42 g d'hydrogénophosphate de sodium anhydre (Na_2HPO_4, min 99%), 0,85 g de dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4, min 99%) et 0,07 g de sodium 3-(trimethylsilyl) propionate-2,2,3,3-d_4 (TMSP, 98% D) puis en ajoutant 100 mL de D_2O (99,80% D). Le pH a été mesuré et ajusté à 7.40.

b. Préparation des échantillons

Les échantillons d'**urines** ont été préparés en mélangeant 50-100 µL, en fonction des collectes d'urine des souris (ou 500 µL pour les rats) avec 600-650 µL (ou 200 µL pour les rats) de solution tampon phosphate (pH 7.4 ; 0.2 M), préparé dans du D_2O et 0.05% de TMSP (standard interne, déplacement chimique du ^1H à δ = 0,0 ppm) comme référence de déplacement chimique. Les échantillons d'urines tamponnés ont alors été centrifugés à 13000 g durant 10 minutes afin d'éliminer les précipités et 600 µL ont été transférés dans des tubes de 5 mm de diamètre pour analyse RMN. Les plasmas ont été préparés en mélangeant 100 µL de plasma avec 600 µL de D_2O et 600 µL ont été transvasés dans les tubes RMN.

Les prélèvements **plasmatiques** (100 µL pour les souris, 500 µL pour les rats) ont simplement été additionnés de D_2O (600 µL pour les souris, 100 µL pour les rats) avant d'être analysés en RMN.

c. Protocoles d'analyse en RMN du ^1H

Tous les spectres ont été obtenus sur un **spectromètre Avance RMN Bruker DRX-600** à 300 K et à 600,13 MHz pour la fréquence de résonance du proton, en utilisant une **cryosonde** ^1H-^{13}C-^{15}N à détection inversée de 5 mm rattachée à une plateforme cryogénique (unité de refroidissement). L'utilisation d'une cryosonde permet d'**améliorer** nettement la **sensibilité** des analyses. La séquence « **Improved Watergate** » à une dimension a été utilisée pour la suppression de la résonance de l'eau. Pour chaque échantillon, **128 scans** ont été accumulés sur 32 k points-mémoire sur une largeur spectrale de 12 ppm. Après **Transformée de Fourier**, les spectres ont été phasés et calibrés.

1.3.3. Analyse spectroscopique RMN du ^1H des extraits tissulaires

a. Préparation des échantillons

Les extraits aqueux d'organe ont été transvasés dans des tubes eppendorf avec 200 µL de D_2O supplémentaire, centrifugés à 5500 g durant 10 minutes et 600 µL ont été transférés dans des tubes RMN de 5 mm. Les extraits lipophiliques ont été directement transvasés dans les tubes sans centrifugation.

b. Protocoles d'analyse en RMN du ^{1}H

Les spectres RMN du ^{1}H d'extraits tissulaires de foie ou de cerveau ont été obtenus sur un spectromètre Bruker DRX-600 Avance à 600,13 MHz et 300 K. Une séquence 1D ^{1}H « Improved Watergate » a été utilisée afin d'obtenir une suppression du signal de l'eau satisfaisante au sein des extraits aqueux. En ce qui concerne les extraits lipophiles, une séquence standard du ^{1}H a été retenue. Pour chaque échantillon, **128 scans** ont été enregistrés sur 32 k points-mémoires, sur une largeur spectrale de 12 ppm et un temps de relaxation de 2 secondes a été utilisé. Après **Transformée de Fourier**, les spectres ont été phasés, calibrés et la ligne de base corrigée.

1.3.4. Réduction des données

Préalablement aux analyses statistiques, les spectres d'urines, de plasma et d'extraits d'organe ont subi **une réduction de données** à l'aide du programme **AMIX** de Bruker (Analysis of Mixtures, version 3.6.4, Bruker Analytische Messtechnik, Karlsruhe, Germany). La région spectrale englobant les déplacements chimiques (δ) de 0,5 à 10 ppm a été segmentée en régions consécutives et non-chevauchantes ou **buckets de 0,01 ppm** (souris) et de **0,04 ppm** (rats), en fonction des expérimentations. Ces buckets ont été intégrés puis **normalisés par rapport à** l'intensité totale, donnant ainsi un total de 751 régions intégrées pour les spectres RMN d'urine de souris (189 pour le pas à 0,04 ppm, chez les rats) et 901 régions intégrées pour les spectres d'extraits aqueux de cerveau ou de foie dans le cas d'un pas de 0,01 ppm, 224 dans le cas d'un pas de 0,04 ppm.

La région du spectre urinaire incluant le **signal de l'eau** (δ 4,5-6,5 ppm) a été **éliminée** de l'analyse pour supprimer les artéfacts des résonances de l'eau résiduelle et de l'urée. Concernant les spectres des extraits aqueux, la région spectrale (δ 4,5-5,0 ppm) incluant la résonance de l'eau ainsi que la région contenant le **signal résiduel de l'acétonitrile** (δ 2,0-2,1 ppm) ont été également retirées du spectre. Concernant les extraits lipophiles, ce sont les régions contenant les **signaux résiduels du méthanol** (δ 3,3-3,4 ppm) et du **chloroforme** (δ 6,5-7,5 ppm) qui ont été retirées.

Les analyses RMN sur les extraits chloroformiques ou lipophiles de foie donnent des informations principalement sur des lipides tels que les triglycérides, les phospholipides, le cholestérol, alors que les extraits hydrosolubles renseignent essentiellement sur des constituants tels que les acides aminés, les sucres et les autres molécules hydrophiles. Les empreintes analytiques ont été obtenues à partir des extraits liposolubles et hydrosolubles.

1.4. Analyses statistiques

1.4.1. Logiciels statistiques utilisés

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant les logiciels **SPlus 2000** (v2.0, Matsoft Inc., Seattle, WA, USA), **SIMCA-P 11.0** (Umea, Sweden) et **SAS Institute** (v8.01, Inc, Cary, NC, USA).

SPlus 2000 v2.0 (Insightful Corp., Seattle, WA)

Ce logiciel a permis de réaliser les premières analyses statistiques et de préparer les jeux de données (transformation logarithmique) ainsi que la formatation des jeux de données et des matrices pour des analyses supplémentaires sur d'autres logiciels.

Grâce à l'utilisation de la bibliothèque **multidim** (www.lsp.ups-tlse.fr/Carlier/Logiciel.html), SPlus a servi plus particulièrement à réaliser les **ANOVA** avec la fonction *aov ()*, les **ACP** avec les fonctions *acp ()*, avec la représentation graphique des individus et des variables grâce à la fonction *indiso ()*, la **double filtration** avec la fonction *filtre ()*, les **AFD** avec la fonction *afdsel2 ()* et les **dendrogrammes** avec la fonction *varclass*() .

SAS Institute (v8.01, Inc, Cary, NC) :

Ce logiciel a permis d'enrichir certaines sorties d'AFD obtenues avec SPlus 2000 notamment avec la **contribution des variables** dans les différents axes, la **significativité des axes** et la procédure CANDISC permettant d'étudier **les distances de Mahalanobis**.

SIMCA-P 11.0 (Umea, Sweden) (Soft Independant Modelling of Class Analogy) :

Ce logiciel a servi à réaliser des **régressions PLS** : PLS-DA et PLS2 à partir de données importées de SPlus avec les procédures de validation croisée ainsi que des **corrections** de données par la méthode de **filtration OSC** ou Orthogonal Signal Correction.

1.4.2. Méthodes statistiques utilisées

a. Prétraitement des données

La transformation des données initiales en données **logarithmiques** est un des prétraitements qui a été systématiquement réalisé sur tous les jeux de données multidimensionnelles permettant de **stabiliser la variance**, de corriger une distribution trop dissymétrique et de réduire l'influence des grandes valeurs.

b. Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ACP est une méthode factorielle linéaire permettant de représenter géométriquement les individus et les variables d'un jeu de données. Le but de cette méthode est de **réduire l'espace de représentation des données** pour une meilleure compréhension en construisant des **variables synthétiques appelées composantes principales** qui vont **résumer l'information.** Ces composantes principales sont des **combinaisons linéaires** des variables initiales dépendantes (variables ayant leur coefficient de corrélation non nul) et sont ordonnées par valeurs décroissantes de leur variance. En général, les 2 ou 3 premières composantes sont retenues car ce sont elles qui expliquent la plus grande part de l'information, les autres étant négligées car considérées comme du bruit. La réalisation d'ACP a permis de mieux visualiser la répartition des individus et donc de mieux mettre en avant d'éventuels individus « particuliers » qui peuvent alors être retirés du jeu de données ainsi que d'identifier la présence éventuelle de groupes. L'ACP fait partie des méthodes d'analyse statistique dites « **non supervisées** » : l'appartenance à un groupe est inconnue.

c. Analyse Factorielle Discriminante (AFD)

L'AFD est une **méthode descriptive et explicative** permettant de **réduire le nombre de dimensions des données** en recherchant des fonctions discriminantes, à partir d'une variable de groupement existante qui attribue chaque individu à une classe. Ces fonctions discriminantes sont les vecteurs propres sur lesquels seront projetés les points. L'AFD permet ainsi de **différencier les groupes existants** et de **modéliser l'appartenance à un groupe** d'individus en fonction des valeurs prises par plusieurs variables. La **variance intergroupe** est donc **maximisée** et la **variance intragroupe** est **minimisée**, ceci assurant une représentation graphique afin de **visualiser des groupements, des oppositions et des tendances** impossibles à discerner sur un jeu de données numériques. Pour sélectionner les variables discriminantes, une **double filtration** est effectuée. Celle-ci comporte une **ANOVA,** qui permet une sélection des variables au seuil de 5% en fonction d'un facteur, suivie d'une ***méthode de sélection pas-à-pas,*** méthode itérative qui réalise une sélection des variables en fonction du coefficient de corrélation partiel le plus élevé avec la variable des classes. L'AFD fait partie des méthodes d'analyse statistique dites « **supervisées** » : l'appartenance à un groupe est connue.

d. Double filtration : ANOVA et méthode de sélection pas-à-pas

- L'ANOVA ou ANalysis Of Variance

Cette méthode statistique a pour but de **comparer les moyennes de deux populations ou plus**. Cependant, cette comparaison ne se base pas sur le **caractère significatif ou non** des mesures des moyennes mais sur celui **des mesures de variance**, d'où son nom. L'hypothèse nulle initiale H0 peut se résumer ainsi : « les moyennes des différents groupes sont égales ». L'ANOVA étudie ainsi l'impact de chaque facteur sur les variables quantitatives pour sélectionner les variables significatives avec un seuil ou « *p*-value » fixé à 5% ou 1% en fonction du nombre de variables initiales.

- La méthode de sélection pas-à-pas

Cette méthode est basée sur un **algorithme d'introduction itérative** des variables « **pas-à-pas** » développé par Carlier (*17*) . Cette méthode permet de sélectionner les variables les plus discriminantes dans un ensemble de variables explicatives « candidates ».

e. La régression PLS

La régression PLS ou Partial Least Square est une méthode permettant de construire des **variables latentes**, **orthogonales deux à deux**, qui sont en fait des combinaisons linéaires des variables d'origine, sur la maximisation des critères de covariance. Cette méthode s'utilise lorsque le nombre de variables explicatives est supérieur à celui des observations.

La PLS-DA

La PLS-DA correspond à l'AFD sous S-plus mais elle reste plus fidèle à la réalité que ne l'est l'AFD.

La PLS2

La régression PLS2 consiste en une **projection simultanée de X variables explicatives et de Y variables à expliquer** sur deux hyperplans ne contenant que 2 dimensions résumant respectivement les vecteurs X et Y. Elle se rapproche en cela de l'analyse canonique.

f. La correction OSC

La correction OSC ou Orthogonal Signal Correction est une **méthode de filtration** spectrale itérative qui a pour but **d'éliminer dans X les variations orthogonales à la variable réponse Y** qui perturbe son ajustement.

g. Analyse des données zootechniques

$$Y_{i,j,k} = \mu + Sexe_i + Dose_j + (Sexe_i * Dose_j) + \varepsilon_{i,j,k}$$

Ce modèle d'analyse de variance a été utilisé pour étudier le poids des animaux, le gain moyen quotidien (GMQ) des animaux (g/j), les indices de consommation (IC = Consommation totale/GMQ total), les poids des organes ainsi que les poids relatifs des organes (poids des organes/poids des animaux).

2. Approche par IRM

Ces travaux ont été effectués au sein du laboratoire INRA Unité QuaPA - Plateau technique RMN, Équipe "Structures Tissulaires et Interactions Moléculaires (STIM)"(Centre de recherche de Clermont-Ferrand/Theix, 63122 St Genès Champanelle), en collaboration avec l'équipe du Dr Amidou Traoré dont Mr Guy Bielicki et Mme Cécile Keller.

Ces expérimentations IRM ont été réalisées dans le but de venir **explorer la sphère cérébrale** de façon complémentaire à la métabonomique. Pour des raisons pratiques, les analyses n'ont été effectuées que sur souris.

2.1. Expérimentations conduites

2.1.1. Etude pilote

Cette étude pilote, d'objectif plus méthodologique, a été réalisée en vue de :

- déterminer les **zones cérébrales d'intérêt** où positionner les voxels,
- définir la **séquence la plus adaptée** et mettre en place ses paramètres,
- définir la **faisabilité** d'une telle exploration

2.1.2. Analyse ex vivo des encéphales de souris fixés après perfusion au paraformaldéhyde

Afin de mettre en place les différents paramètres d'acquisition et dans le but de ne pas être gêné par les contraintes inhérentes à l'utilisation d'animaux vivants, des analyses préliminaires ont été effectuées sur des **cerveaux murins fixés après perfusion** des animaux par du **paraformaldéhyde**. Ces analyses avaient pour objectif de déterminer si des analyses ultérieures pouvaient être menées sur cerveau de souris, sans travailler sur animal vivant. En effet, en supprimant les contraintes de maintien des grandes fonctions vitales de l'animal, l'acquisition des données devient plus simple à réaliser.

Ces cerveaux fixés *ex vivo* ont été gracieusement fournis par Mr Deloulme Jean Christophe de l'équipe Physiopathologie du cytosquelette de l'Unité Inserm 836 IRTSV du CEA de Grenoble, cette équipe étant habituée à réaliser de telles conservations d'encéphales et possédant tout le matériel requis.

2.1.3. Etude pilote in vivo

Douze souris mâles de souche C57BL/6J (Jackson Lab), âgées d'au minimum cinq semaines et pesant 20 g environ en début d'expérimentation ont été utilisées. Elles ont subi une période d'adaptation de 4 jours durant laquelle elles ont été nourries avec l'aliment commercial conventionnel pour rongeur UAR 210 seul, puis elles ont été séparées en deux lots :

- un lot de 6 souris témoins, nourries durant toute la durée d'expérimentation avec l'aliment UAR 210 seul.

- un lot de 6 souris nourries avec de l'aliment UAR 210 dans lequel a été préalablement incorporée une dose de 9% *d'Hypochœris radicata* en poudre.

Les souris ont été mises en cage par groupe de 3 et identifiées par un système de code de points : 1 point, 2 points ou absence de marque, le tout ayant été réalisé au feutre indélébile noir sur la partie proximale de la queue.

L'administration des aliments contenant *Hypochœris radicata* a duré **15 jours**, puis l'analyse des souris par IRM s'est déroulée sur une semaine. En effet, la préparation des animaux et l'acquisition des données ont limité l'étude à deux souris par jour, une souris nourrie avec *Hypochœris radicata* et une souris témoin. Cependant, dans le but d'obtenir un total de **7 jours d'administration** de la plante pour chaque animal, les administrations et les passages en IRM ont été échelonnés sur 1 semaine. Un total de 15 g d'aliment a été pesé quotidiennement et distribué dans des gamelles pour chaque lot, chaque souris recevant ainsi par voie orale 5 g d'aliment par jour, le tout à heure régulière.

2.1.4. Exploration par spectroscopie localisée des encéphales de souris in vivo après traitement par 9% d'Hypochœris radicata

a. Animaux

12 souris mâles de souche C57BL/6J, âgées d'au minimum 5 semaines et pesant 20 g environ en début d'expérimentation ont été utilisées. Elles ont subi une période d'adaptation de 7 jours durant lesquels elles ont été nourries avec l'aliment conventionnel UAR 210 seul puis ont été séparées en 2 lots :

- un lot de 6 souris témoins, nourries durant toute la durée d'expérimentation avec l'aliment UAR 210 seul, réparties dans 2 cages collectives de 3 souris chacune. Dans chaque cage, les souris ont été identifiées par des bagues métalliques aux oreilles.

- un lot de 6 souris nourries pendant une durée de **12 jours** avec de l'aliment UAR 210 dans lequel une dose de 9% d'*Hypochœris radicata* en poudre a été incorporée. Durant la période d'acclimatation et après le traitement, ces 6 souris ont été nourries avec de l'aliment UAR 210 seul. Dans ce cas-ci, les animaux ont été séparés dans 6 petites cages individuelles du fait de l'échelonnement de leur traitement.

L'administration de l'aliment contenant une dose de 9% d'*Hypochœris radicata* a été réalisée de façon échelonnée afin de pouvoir étudier une des souris recevant ce régime par jour.

b. Expérimentation

L'administration des différents régimes a duré **12 jours**. Chaque jour, une souris recevant le régime témoin et une souris recevant le régime à base de fleurs ont été étudiées, la totalité des analyses s'étalant sur 2 semaines.

Après chaque passage dans l'aimant, l'animal a été rendu inconscient par inhalation d'**isoflurane** puis a subi immédiatement une **exsanguination** au niveau des carotides. Les **cerveaux** ont été **prélevés** comme mentionné dans le paragraphe II.3, plongés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C avant extraction et analyse des extraits en RMN du ^{1}H.

L'hébergement des animaux et les expérimentations d'Imagerie par Résonance Magnétique ont été réalisées sur le site de l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix dans l'Unité expérimentale de nutrition comparée, dans une animalerie ventilée à une température de 21 ± 2°C et à une humidité relative de 50 ± 10% avec un cycle luminosité/obscurité 12 h/12 h.

2.2. Préparation et monitoring de l'animal dans l'aimant

2.2.1. Anesthésie

L'anesthésie a été réalisée avec de l'**isoflurane** (véhiculé par 300 mL d'air) utilisant une unité d'anesthésie Univentor 400 (Univentor, Malte). La phase d'induction a été obtenue avec 3% d'isoflurane.

2.2.2. Positionnement de l'animal dans l'aimant

Les conditions expérimentales (diamètre de l'aimant et taille de l'antenne) utilisées dans cette étude limitent la taille des souris susceptibles d'être incorporées dans l'étude. En effet, seules les souris pesant au maximum 28 g peuvent être utilisées.

L'induction anesthésique s'est faite à l'aide d'un **masque**. Une fois l'induction réalisée, le pourcentage d'isoflurane a été abaissé à 2,6-2,5%. Chaque animal a été ensuite précautionneusement positionné dans un système de contention pour souris équipé d'une antenne birdcage (AHS/RF Bruker) de 20 mm de diamètre utilisées pour l'excitation et la réception des signaux. La tête a été centrée dans l'antenne.

Le dispositif est positionné dans l'aimant de telle sorte que le cerveau de la souris au centre de l'antenne soit au centre magnétique. La teneur en isoflurane a été abaissée de nouveau pour atteindre 2,4-2,3%. La température corporelle de l'animal est contrôlée au moyen d'un positionnée dans l'orifice anal, tandis que la température environnant l'animal est maintenue à 39°C grâce à un **système de chauffage** compatible avec l'environnement magnétique. Cette température est régulée à l'aide d'un autre thermocouple fixée sur les parois de tube autour de la souris. Les animaux ont été laissés en **respiration spontanée** durant la préparation et l'acquisition des données (1 h environ) durant lesquelles leur fréquence respiratoire a été monitorée à l'aide d'une unité ECG Trigger Unit (Rapid Biomedical), dans le but d'ajuster au besoin les concentrations d'anesthésique.

a. Réglage des paramètres - Choix de la séquence

Les mesures *in vivo* de spectroscopie localisée RMN du ^{1}H ont été réalisées à **9,4 tesla** (un aimant vertical wide-bore) sur un spectromètre **Bruker Avance DRX 400** (Bruker, Ettlingen, Germany) équipé d'un système de micro imagerie (un système de gradient micro 2.5).

Les signaux ont été acquis en utilisant une **séquence PRESS** dont les principaux paramètres sont résumés dans le *Tableau II.7*. Dans un premier temps, des images pondérées T2 ont été acquises avec une séquence RARE (TE = 36 ms , TR= 4200 ms), dans la direction transverse (coupes axiales) de manière à positionner le volume d'intérêt (VOI) ou voxel de **18 µL** $(3x3x2mm)^3$ sur **le thalamus et le cortex** pour les études pilotes, sur le thalamus uniquement pour le reste des analyses (*Figure II.25* et *Figure II.26*). L'homogénéité du champ magnétique a été optimisé pour le VOI en ajustant manuellement les shims sur du pic de l'eau jusqu'à l'obtention d'une largeur spectrale à mi-hauteur inférieure à 20 Hz. Après ajustement des différents paramètres de la séquence d'acquisition (notamment l'activation du module de suppression du pic de l'eau), des spectres étaient acquis. Chaque spectre a représenté une moyenne de 1024 scans pour un total de temps d'acquisition de 17 minutes.

Tableau II.7 : Récapitulatif des différents paramètres d'acquisition pour la production des spectres d'intérêt. Les mesures en RMN du ^1H ont été réalisées à 9,4 tesla sur un spectromètre Bruker Avance DRX 400 avec un système de micro imagerie permettant de réaliser les mesures in vivo, un aimant vertical de large calibre ainsi qu'un système de micro gradient à 2,5 (Bruker, Ettlingen, Germany).

Measuring Method	PRESS
Repetition Time	2000.000 ms
Echo Time	8.844 ms
Number of Averages	512
Number of Dummy Scans	4
Trigger Module	Off
Estimated Total Scan Time	0h17m12s0ms
Press	expand
Spectroscopy	expand
Voxel_Geometry	expand
Suppression	expand
OVS	Off
Decoupling	Off
NOE	Off
Optimize	expand
Preemphasis	expand

b. Quantification des métabolites

Tous les spectres ont été analysés dans le domaine spectral en utilisant le logiciel d'intégration **PeakFit®** (Systat Software Inc., San Jose, CA). La contribution relative de chaque métabolite a été obtenue en réalisant une intégration de l'aire sous chaque pic. Le modèle mathématique utilisé pour l'intégration du signal RMN était la somme des aires de Gauss et Lorentz. Les résultats des **intégrations** ont été exprimés en **pourcentage relatif** sur le total des métabolites sélectionnés. Les différences de concentration relative de métabolite entre souris témoins et souris recevant le régime à base d'*Hypochœris radicata* ont été analysées en réalisant une ANOVA à un facteur suivie par un test de Tukey pour obtenir une comparaison multiple des moyennes.

B. Résultats

1. Etudes métabonomiques

1.1. Expérimentation préliminaire sur rats : doses 1 et 3%

1.1.1. Analyse des données zootechniques, cliniques et post-mortem

Les ANOVA des GMQ moyens, IC moyens et poids des animaux mesurés durant le traitement et ceux des organes mesurés à l'abattage n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les lots.

1.1.2. Analyse des urines

Un exemple de spectre RMN du proton sur un échantillon d'urine collectée chez un rat mâle recevant une dose de 3% d'*Hypochœris radicata* (MH3) est présenté en *Figure II.2*.

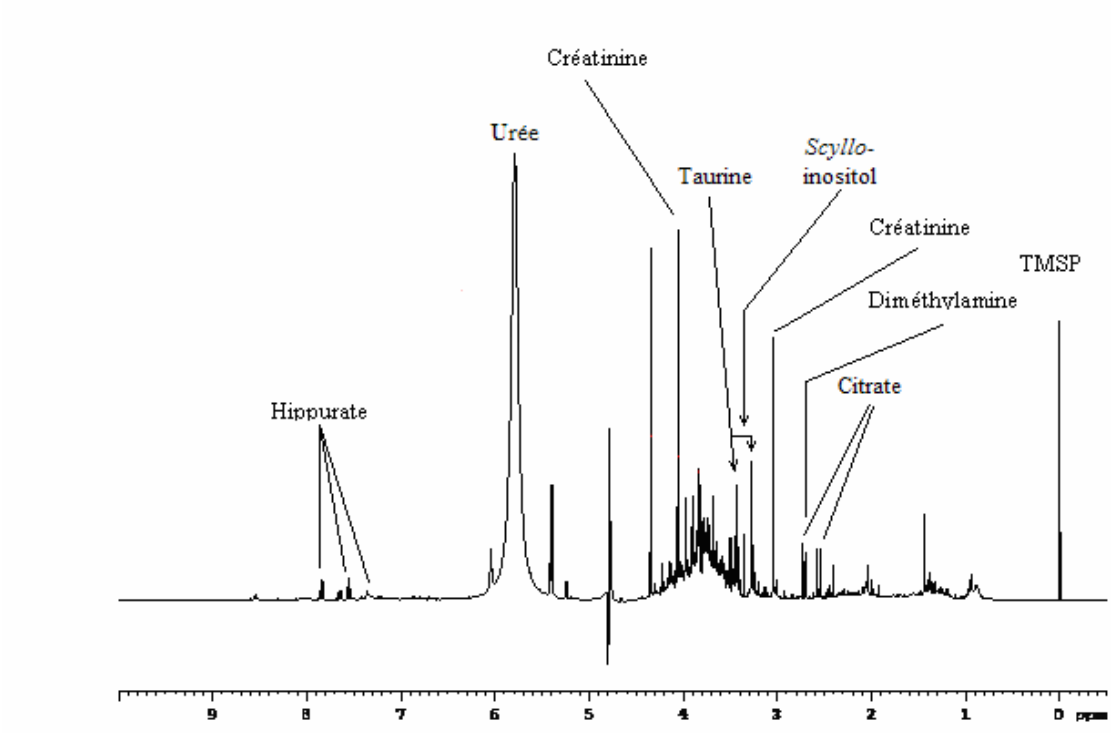


Figure II.2 : Spectre RMN du ^{1}H, à 600 MHz (δ = 0-10 ppm) d'urine collectée à J_{31} chez un rat nourri avec un aliment contenant 3% d'Hypochœris radicata (Lot MH3).

L'observation des spectres a permis de révéler des différences dans la composition des urines des rats recevant le régime témoin et des rats recevant le régime à base *d'Hypochœris radicata*, notamment concernant les concentrations en **hippurate**, ces dernières étant **plus fortes** chez les animaux recevant *Hypochœris radicata*. Une analyse statistique multivariée a été réalisée pour déceler des variables significativement affectées par l'ingestion d'*Hypochœris radicata*. En utilisant un pas de **0,04 ppm**, les 189 variables issues de l'intégration du spectre ont été analysées par statistiques multidimensionnelles. Les ACP réalisées sur les 124 variables filtrées n'ont pas permis d'individualiser des groupes (résultats non montrés).

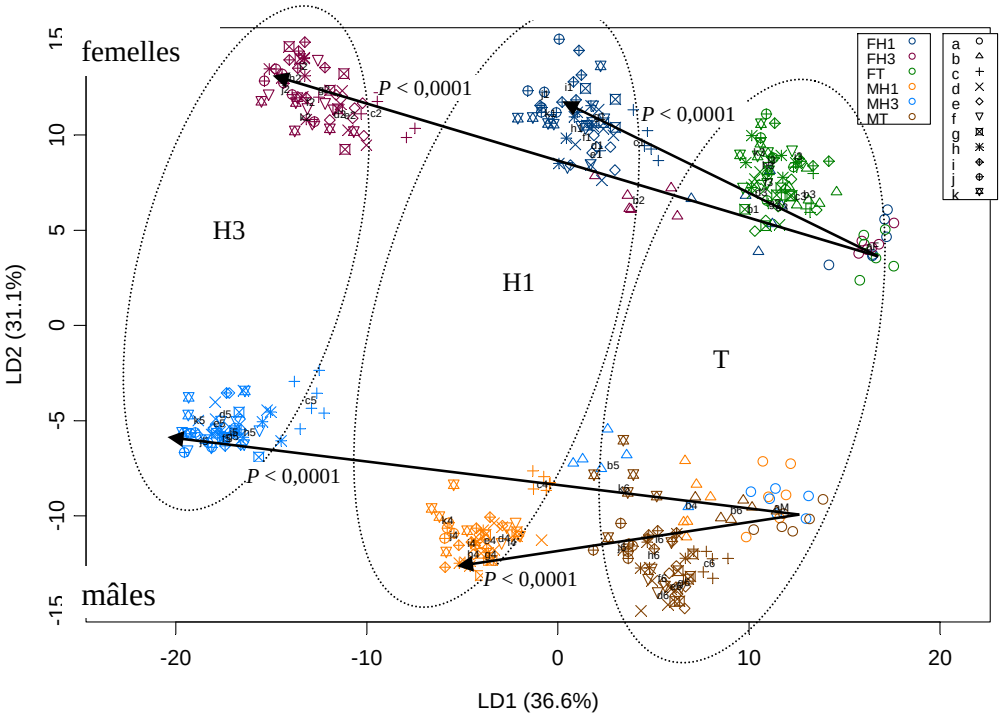


Figure II.3 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante selon le premier plan factoriel (1*2), réalisée sur les 124 premières variables sélectionnées après filtration sur toutes les urines collectées analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz. L'axe 1 qui permet d'expliquer 36,6% de la variabilité entre les groupes, sépare ceux-ci en fonction des régimes, l'axe 2 qui permet d'expliquer 31,1% de la variabilité entre les groupes, sépare les groupes en fonction du sexe. Les prélèvements d'urine ont été effectués à J_0 (a), J_1 (b), J_3 (c), J_8 (d), J_{11} (e), J_{15} (f), J_{18} (g), J_{22} (h), J_{25} (i), J_{29} (j), J_{31} (k). La représentation graphique permet de visualiser la mise en place progressive de l'intoxication au cours du temps durant les 3 premiers jours et la séparation nette entre les groupes à partir de J_3 : les probabilités des distances de Mahalanobis sont significatives ($p < 0,0001$) entre af et c1, af et c2, am et c4, am et c5. FH1: femelles nourries avec un aliment contenant 1% d'*Hypochœris radicata*, FH3: femelles nourries avec un aliment contenant 3% d'*Hypochœris radicata*, FT: femelles témoins, MH1: mâles nourris avec un aliment contenant 1% d'*Hypochœris radicata*, MH3: mâles nourris avec un aliment contenant 3% d'*Hypochœris radicata*, MT: mâles témoins.

En revanche, les AFD (*Figure II.3* et *Figure II.4*) font apparaître certains points très intéressants à analyser. Tout d'abord, les rats répondent de façon similaire à l'ingestion *d'Hypochœris radicata*, quel que soit le sexe. De plus, la répartition des groupes en fonction de la dose est bien identifiable dans le premier plan factoriel (*Figure II.3*), l'**adaptation** durant les 3 premiers jours (périodes a, b, c) laissant place à une **individualisation** de chacun des groupes à partir de $\mathbf{J_3}$ (période c) avec des distances de Mahalanobis significatives entre ceux ci. Cette mise en place de l'intoxication potentielle est d'ailleurs plus visible sur le second plan factoriel (*Figure II.4*) où les groupes subissent, tout d'abord, un **ajustement de leur métabolisme** entre J_1 et J_3, proportionnel à la dose d'*Hypochœris radicata* ingérée, suivi d'une **orientation parallèle** entre chaque groupe correspondant à la **phase de croissance**, similaire pour tous les animaux.

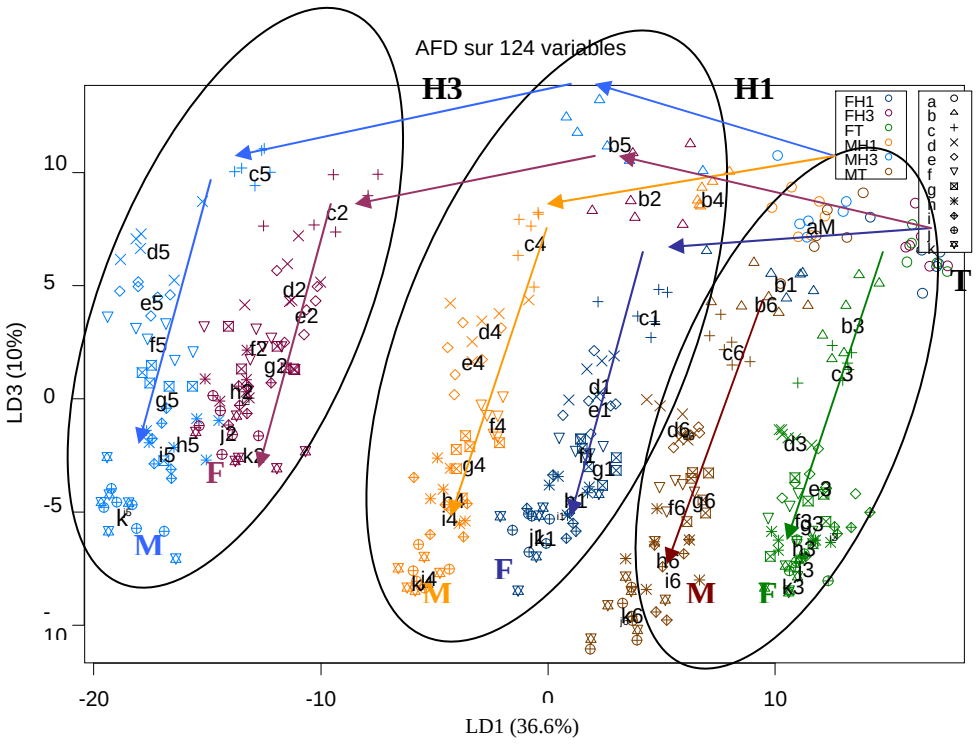


Figure II.4 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur 124 variables sélectionnées après filtration, sur toutes les urines collectées analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz, suivant le plan factoriel (1*3). La projection sur l'axe 3 permet de séparer les groupes en fonction du temps, la projection sur l'axe 1 en fonction du régime. On retrouve la séparation entre les groupes avec un parallélisme net entre les sexes ainsi qu'une démarcation pour les groupes nourris avec le régime contenant 3% d'*Hypochœris radicata*. La mise en place progressive de l'intoxication est visualisable durant les 3 premiers jours. La définition des groupes est rappelée dans la *Figure II.3*. Les prélèvements d'urine ont été effectués à J_0 (a), J_1 (b), J_3 (c), J_8 (d), J_{11} (e), J_{15} (f), J_{18} (g), J_{22} (h), J_{25} (i), J_{29} (j), J_{31} (k).

Les analyses de variance sur les variables synthétiques que constituent les axes 1 (régimes) et 3 (temps) ont montré que, sur l'axe 1, la projection des individus confirmait le regroupement des animaux traités à une même dose dès J_3. La projection des individus sur l'axe 3 montre la **mise en place progressive de l'« intoxication » jusqu'à J_3** (résultats non montrés), suivie par une ségrégation nette de ceux-ci en fonction de la dose jusqu'à J_{31} (*Figure II.5*).

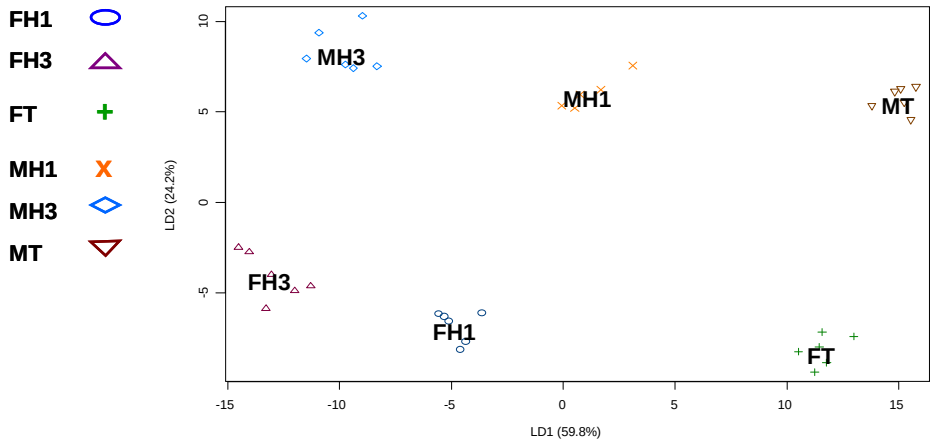


Figure II.5 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur 20 variables filtrées en fonction des groupes, à partir des données urinaires de J_{31} analysées par RMN du ^1H à 600 MHz, suivant le premier plan factoriel (1*2). Les groupes sont discriminés en fonction de la dose par projection sur le premier axe factoriel et en fonction du sexe par projection sur l'axe 2. La définition des groupes est rappelée dans la *Figure II.3*.

Les **métabolites urinaires** correspondant aux variables les plus impliquées dans le facteur régime c'est-à-dire dont la contribution était la plus importante dans la construction de l'axe 1 étaient l'**hippurate**, le ***scyllo*-inositol**, l'acide 4-hydroxyphénylpropionique (**4-HPPA**), la **méthylguanidine**, l'**isobutyrate** (*Tableau II.8*).

Tableau II.8 : Métabolites urinaires mis en évidence lors de l'analyse des spectres issus de l'analyse en RMN du ^{1}H à 600 MHz et correspondance avec le nom des variables impliquées dans le facteur traitement.

Nom de la variable	Déplacement chimique (δ en ppm)	Contribution dans les axes			Métabolite	Sens de variation
		Axe 1	Axe 2	Axe 3		
V62	7,54	0,92	0,298	-0,092	Hippurate	↑
V118	3,34	0,928	0,187	0,08	*Scyllo*-inositol	↑
V55	7,82	0,953	0,182	-0,07	Hippurate	↑
V102	3,98	0,87	0,09	-0,305	Hippurate	↑
V131	2,82	0,705	-0,401	0,002	Pas de pic	↑
V131	2,82	0,705	-0,401	0,002	Pas de pic	↑
V61	7,58	0,82	0,461	-0,132	Hippurate	↑
V139	2,5	0,771	-0,433	0,022	Pas de pic	↑
V37	8,54	0,779	0,264	-0,192	?	↑
V175	1,06	0,868	-0,005	0,271	?	↑
V135	2,66	0,522	0,032	0,422	Pas de pic	↑
V136	2,62	0,578	-0,441	0,381	Pas de pic	↑

L'hippurate et le *scyllo*-inositol, les deux principaux métabolites urinaires, sont les plus fortement impliqués dans les disruptions métaboliques des animaux suite à l'ingestion *d'Hypochœris radicata* (*Tableau II.8*). La réalisation du dendrogramme a montré que certaines variables leur correspondant, V55, V102 (hippurate) et V118 (*scyllo*-inositol) étaient regroupées dans **le même sous-cluster** soulignant ainsi une évolution dans le même sens (*Figure II.6*).

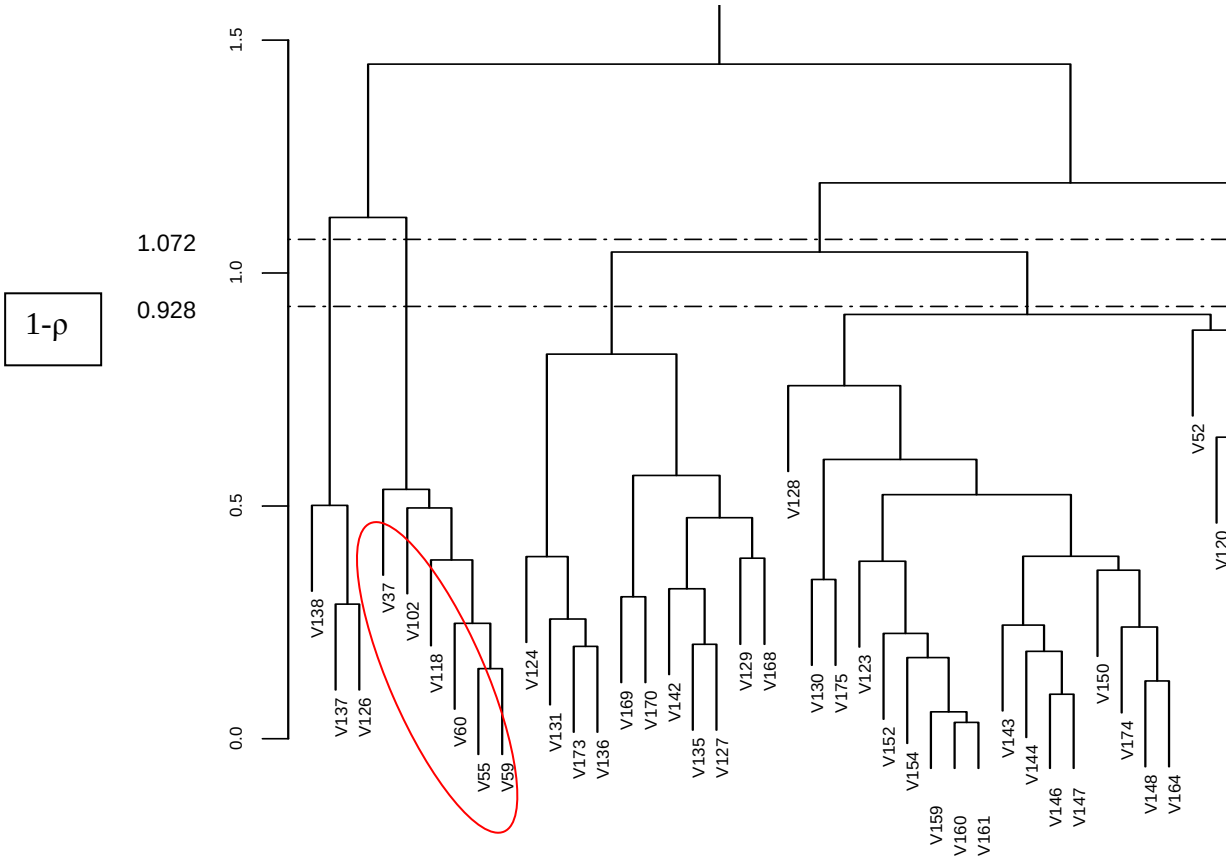


Figure II.6 : Dendrogramme présentant la répartition des 80 premières variables sélectionnées à partir des spectres urinaires obtenus par RMN du ^{1}H, à 600 MHz. *Les variables V55 et V*102 (hippurate) et *V118 (scyllo-inositol)* s'isolent bien des autres variables et évoluent dans le même sens.

Les analyses de variance réalisées sur les variables relatives à l'hippurate, c'est-à-dire celles dont les déplacements chimiques sont $\delta = 7{,}54$, $\delta = 7{,}82$ et $\delta = 3{,}98$, ont montré que les groupes recevant *Hypochœris radicata* présentaient une augmentation de la concentration de ce métabolite durant les 3 premiers jours puis une stabilisation en fonction de la dose d'*Hypochœris radicata*. La *Figure II.7* présente l'exemple de la variable V55 ($\delta = 7{,}82$), avec un effet significatif ($p < 0{,}001$) de la dose d'*Hypochœris radicata*.

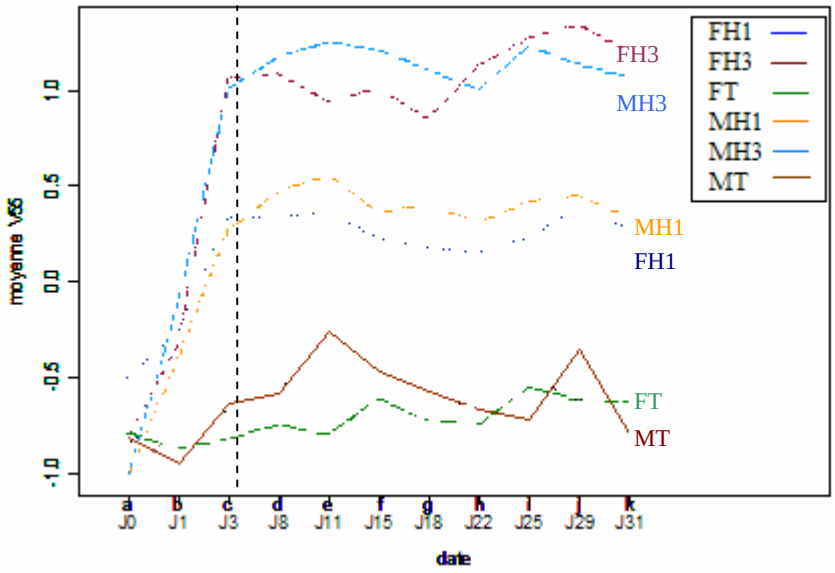


Figure II.7 : Evolutions de la moyenne des valeurs prises par la variable V55 (δ = 7,82 un des déplacements chimiques de l'hippurate) en fonction des groupes, au cours du temps, à partir des données urinaires analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz. La définition des groupes est donnée dans la *Figure II.3.*

L'analyse de variance réalisée sur les valeurs prises par la variable relative au ***scyllo*-inositol** montre que le **facteur régime e**st aussi **très significatif** ($p < 0{,}001$). Le graphe réalisé à partir de ces données (*Figure II.8*) permet de souligner une **nette individualisation** entre les 3 régimes administrés, quel que soit le sexe, et la **mise en place progressive de la perturbation métabolique durant les 3 premiers jours** (a, b, c) avec une stabilisation des valeurs à partir de J_3 (période c).

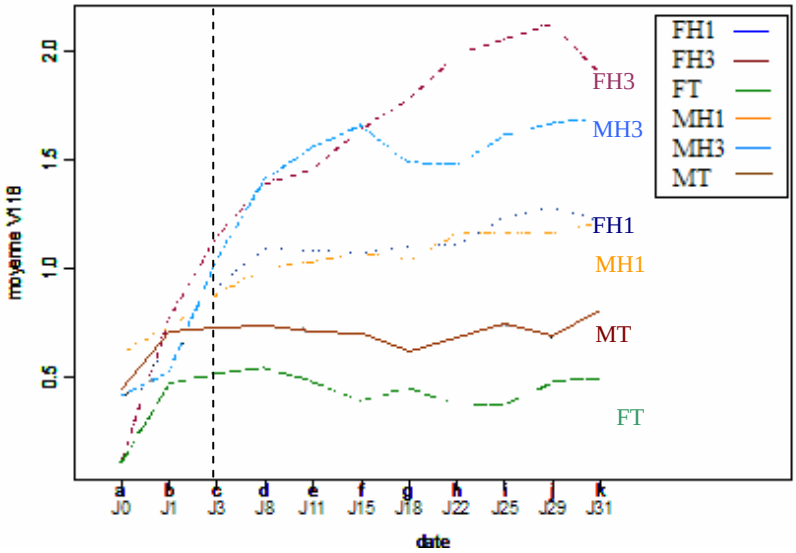


Figure II.8 : Evolution de la moyenne des valeurs prises par la variable V118 (scyllo-inositol) en fonction des groupes, au cours du temps, à partir des données urinaires analysées par RMN du ^{1}H à 600 MHz. La définition des groupes est donnée dans la *Figure II.3.*

1.1.3. Analyse des extraits hépatiques

Afin d'observer une correspondance éventuelle avec les signatures produites dans l'organe où se situe la plus **grande majorité des processus de métabolisation et de détoxification,** la **signature métabonomique hépatique** a été étudiée.

a. Extraits chloroformiques

Les analyses factorielles discriminantes réalisées sur les matrices lipophiliques n'ont pas permis de révéler de construction ni d'individualisation des groupes. De ce fait, les analyses n'ont été approfondies que sur les matrices hydrosolubles.

b. Extraits aqueux

La représentation de l'analyse en composantes principales, réalisée sur les variables log-transformées des extraits hépatiques hydrosolubles, n'a pas permis de visualiser de groupes distincts. En revanche, la représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante (*Figure II.9*) montre qu'il existe une **hiérarchisation** et une progression des groupes en **fonction du régime**, de façon similaire à ce qui avait pu être observé sur les urines à J_{31}, avec une plus grande part de la variance interprétée par l'axe 1, relative au facteur sexe (68,8%).

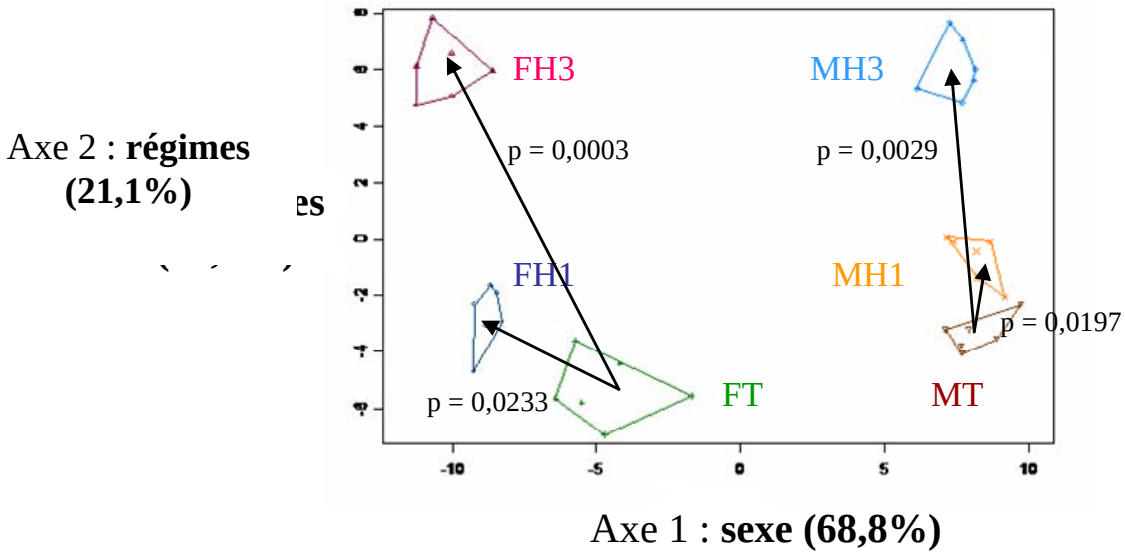


Figure II.9 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur les 20 premières variables sélectionnées après filtration, à partir des données RMN du ^{1}H à 600 MHz d'extrait aqueux de foie selon le premier plan factoriel (1*2). La projection des groupes sur l'axe 1 permet de les séparer en fonction du facteur sexe, prédominant. La projection sur l'axe 2 se fait en fonction du régime ingéré. La définition des groupes est donnée dans la *Figure II.3*.

Après avoir réalisé l'ANOVA des 20 variables sélectionnées, **seule une variable** est apparue comme étant **très fortement significative** ($p < 1{,}459 \times \mathbf{10^{-10}}$) pour le **facteur régime** : la variable **V163** à δ = 3,34 ppm (*Figure II.10*).

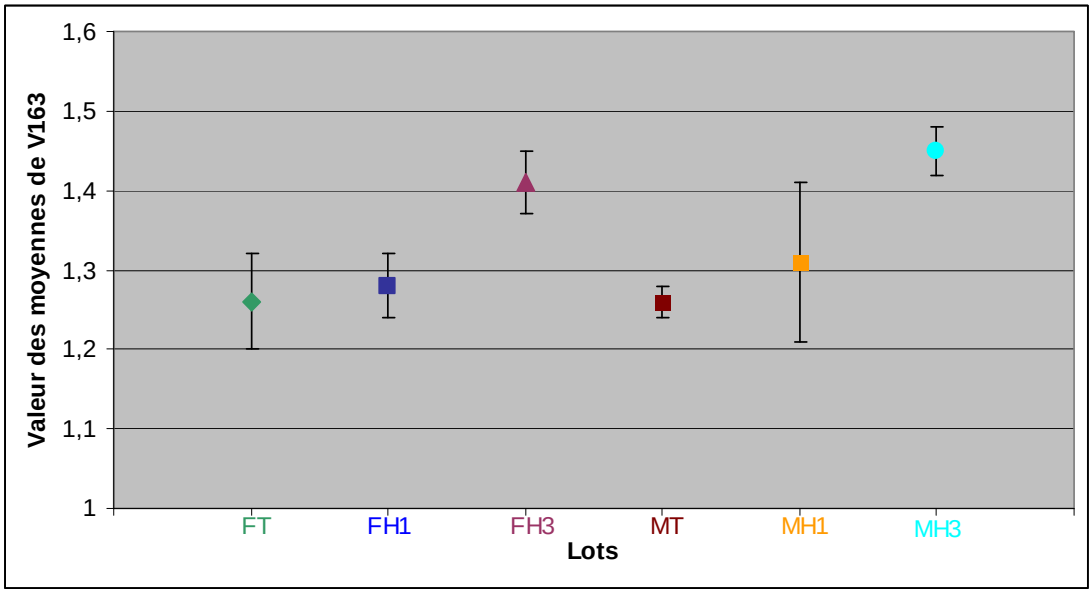


Figure II.10 : Moyenne et écart-type des valeurs prises par la variable V163 en fonction des groupes à partir des données d'extrait aqueux de foie. La variable V163 est la seule variable impliquée de façon très significative ($p < 10^{-9}$) dans la construction de l'axe 2 qui correspond à la réponse des animaux suite au régime. Le graphe montre que la moyenne augmente avec la dose d'*Hypochœris radicata* ingérée, chez les mâles comme chez les femelles. La définition des groupes est donnée dans la *Figure II.3*.

Sur des agrandissements des spectres RMN du ^{1}H, réalisés entre 3,20 et 3,52 ppm, le pic à δ = 3,35 ppm, matérialisant la présence de ***scyllo*-inositol** est bien individualisable chez les rats ingérant *Hypochœris radicata* contrairement aux rats témoins (*Figure II.11*). La hauteur et la surface de ce pic est proportionnelle à la dose de plante incorporé dans l'aliment, ce qui conforte les résultats obtenus lors de l'analyse des urines.

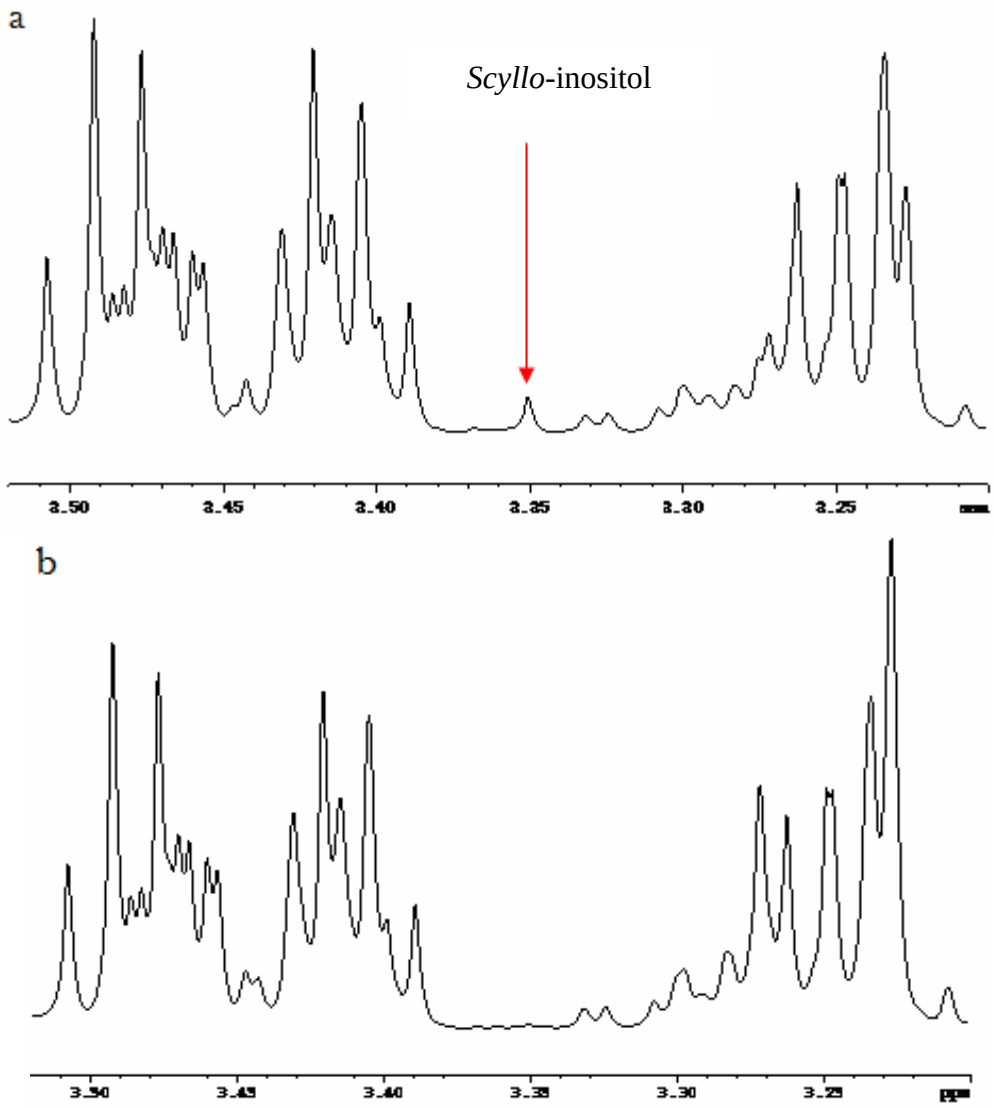


Figure II.11 : Spectres RMN du ^{1}H à 600 MHz (agrandis entre les valeurs de 3,20 et 3,52 ppm) d'extraits hépatiques hydrosolubles de foie (a) chez un rat mâle recevant un régime contenant 3% d'Hypochœris radicata (Lot MH3) et (b) chez un rat mâle témoin (Lot MT). Un pic à δ = 3,35 ppm, correspondant à la variable V163 identifiée comme étant le *scyllo*-inositol, est identifiable sur le spectre (a) mais non sur le spectre (b).

1.1.4. Analyse des extraits cérébraux

a. Extraits aqueux

Afin d'accéder au métabolisme du **système nerveux central**, les cerveaux prélevés ont été analysés après extraction. Tout comme les échantillons hépatiques, les extraits liposolubles n'ont pas permis de révéler de structure spécifique entre les groupes. En revanche, les extraits hydrosolubles ont, non seulement rendu compte d'une orientation similaire des groupes, mais également d'une **réponse exacerbée dans l'encéphale**. En effet,

la représentation graphique de l'AFD réalisée sur les 15 variables sélectionnées a montré une ségrégation des groupes en fonction du régime et plus précisément de la dose, par projection sur l'axe 1, ce dernier expliquant 87,5% de la variance intergroupe (*Figure II.12*). Ce pourcentage n'était que de 21,1% pour l'analyse des extraits hépatiques hydrosolubles. Cette réponse parallèle et univoque, quel que soit le sexe, a confirmé les résultats obtenus sur les autres matrice tissulaire et fluide biologique.

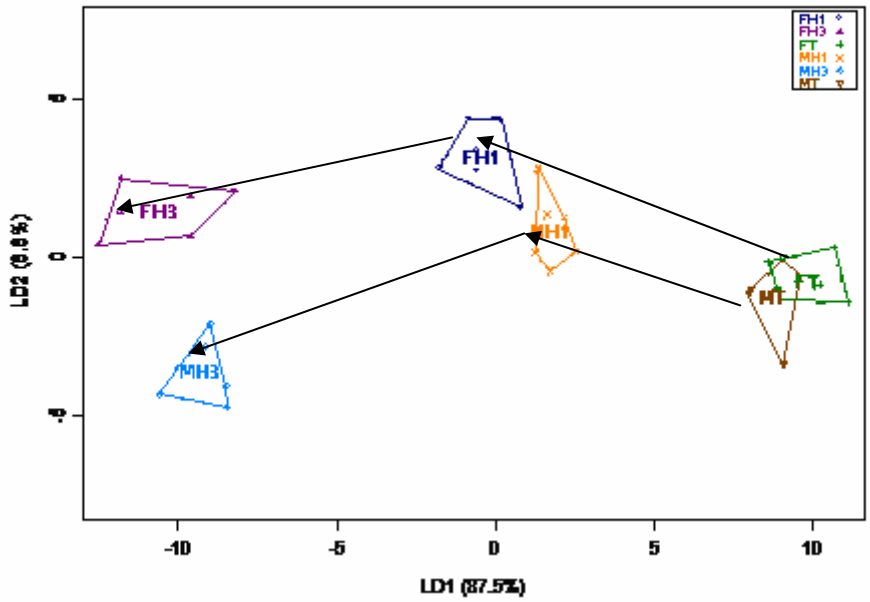


Figure II.12 : Représentations graphiques de l'analyse factorielle discriminante suivant le premier plan factoriel (1*2), réalisée à partir de 15 variables sélectionnées après filtration, sur les données RMN du ^{1}H à 600 MHz des extraits hydrosolubles de cerveaux des 36 rats, en fonction des groupes d'animaux. L'axe 1, qui permet d'expliquer 87,5 % de l'inertie, ségrége les lots en fonction du régime et plus précisément de la dose. Les 2 métabolites impliqués majoritairement dans la construction de cet axe sont le *scyllo*-inositol et le *myo*-inositol. L'axe 2, qui explique 6,6 % de l'inertie, sépare les lots en fonction du sexe.

Les variables majoritairement impliquées dans la construction de l'axe 1 sont d'une part, le ***scyllo*-inositol** (V153 = 3,34 ppm), déjà observé dans les urines et le foie et d'autre part le ***myo*-inositol** (V152 = 3,38 ppm ; V155 = 3,26 ppm ; V146 = 3,62 ppm et V148 = 3,54 ppm), ces deux molécules étant **anti-corrélées** (*Tableau II.9*). La correspondance entre les variables et les métabolites ainsi que leur « anti-corrélation » ont été confirmées par le dendrogramme réalisé sur les 30 variables sélectionnées par la méthode pas à pas (*Figure II.13*).

Tableau II.9 : Tableau présentant les variables les plus impliquées dans la construction de l'axe 1 de l'AFD, (sur les 15 variables sélectionnées après filtration, à partir des données RMN du ^{1}H, à 600 MHz, d'extraits hydrosolubles de cerveaux des 36 rats en utilisant un pas de 0,04 ppm), leur déplacement chimique et le nom des métabolites correspondants. Le *scyllo*-inositol (δ 3,34 ppm) apparaît anti-corrélé avec le *myo*-inositol (δ 3,26, 3,54, 3,62 et 4,06 ppm).

Nom des variables	Contribution dans la construction de l'axe 1	Déplacement chimique δ (ppm)	Métabolite
V153	+ 0,986	3,34	*Scyllo*-inositol
V152	- 0,955	3,38	?
V146	- 0,940	3,62	*Myo*-inositol
V155	- 0,868	3,26	*Myo*-inositol
V148	- 0,815	3,54	*Myo*-inositol
V135	- 0,814	4,06	*Myo*-inositol

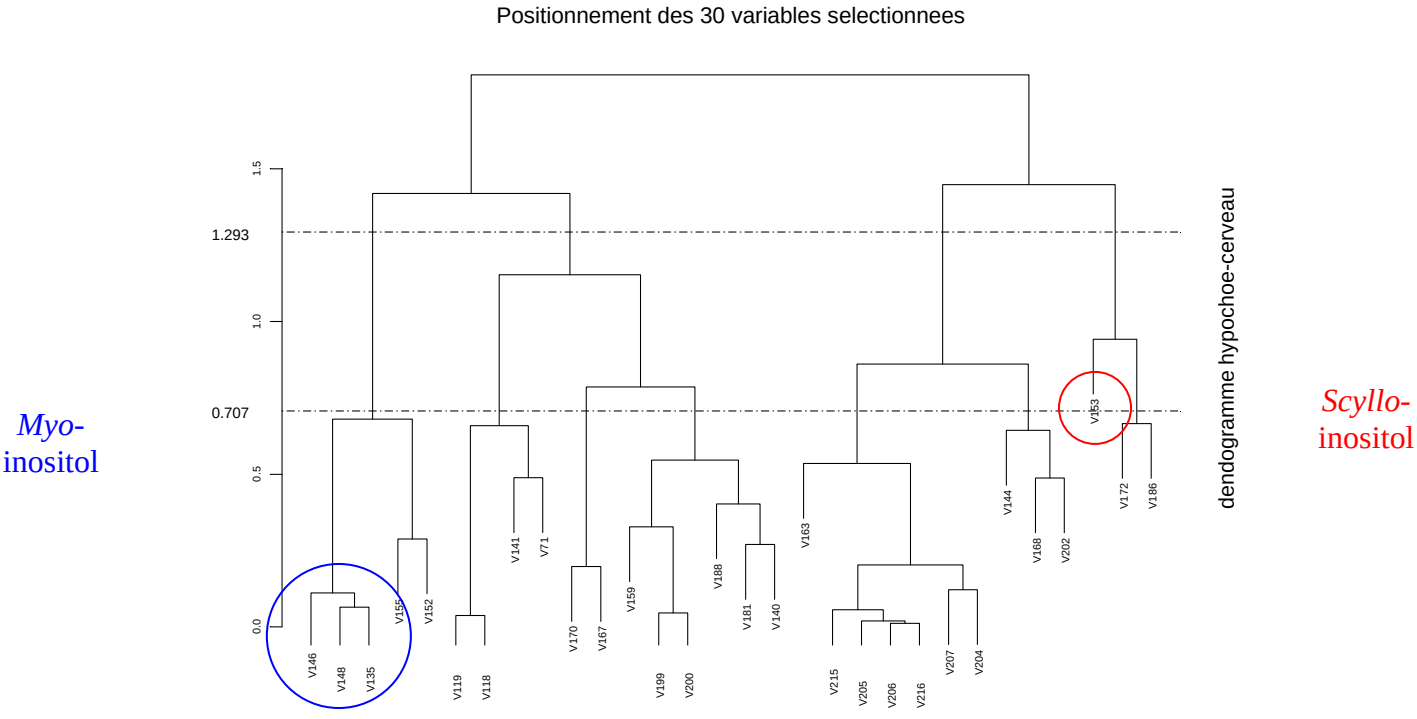


Figure II.13 : Dendrogramme obtenu à partir des 30 premières variables sélectionnées après filtration sur données analysés par RMN du ^{1}H à 600 MHz, des extraits de cerveau des 36 rats. La variable relative au déplacement du *scyllo*-inositol est anti corrélée aux 4 variables relatives aux déplacements chimiques du *myo*-inositol, ces deux métabolites étant les 2 principaux impliqués dans la construction de l'axe 1.

Dans le but d'identifier formellement ce métabolite à δ = 3,35 ppm ou δ = 3,34 ppm dans les urines et dans les extraits hydrosolubles de foie, la molécule de *scyllo*-inositol a été **analysée seule ou en surcharge** à un extrait tissulaire hydrosoluble ou à des urines : dans tous les cas, une superposition parfaite des pics et une correspondance des déplacements chimiques a été retrouvée, confortant ainsi l'identité du métabolite.

1.2. Expérimentation sur souris : variations métaboliques entre les doses 0, 3 et 9%

Cette deuxième série d'expérimentations effectuées sur souris a été réalisée afin de tester l'effet de **doses plus fortes de végétal** et de déterminer si les observations faites sur rats pouvaient être **reproduites** chez la souris.

1.2.1. Données zootechniques, cliniques et post-mortem

Aucun symptôme clinique n'a pu être observé, même sur les souris ayant reçu une dose de 9% d'*Hypochœris radicata* dans leur régime, durant 21 jours.

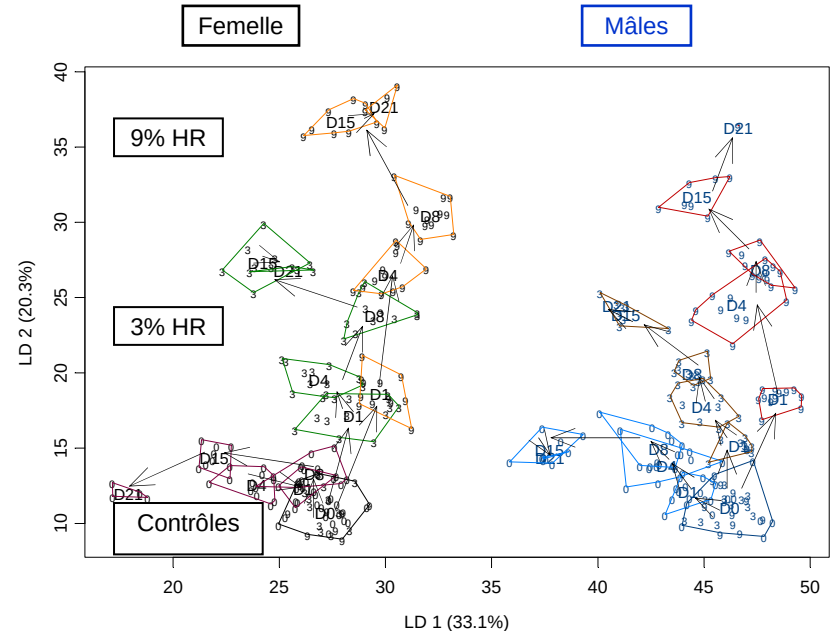
Les poids entre les animaux nourris avec un régime témoin et un régime à base d'*Hypochœris radicata* n'ont pas été différents. L'analyse des indices de consommation ainsi que des GMQ moyens n'a pas pu être réalisée car les animaux étaient en cage collective de 4.

Lors de l'autopsie des animaux, **aucune modification macroscopique** des tissus et des organes n'a pu être relevée et aucune différence n'a pu être notée concernant le poids des cerveaux et des foies, pour chaque date de sacrifice.

1.2.2. Signatures métaboliques urinaires

L'évolution de la nature des disruptions métaboliques provoquées par l'ingestion des doses de 3 et 9% d'*Hypochœris radicata* incorporées dans l'aliment a pu être aisément caractérisée par une exploration des urines collectées chez les 2 sexes durant les 21 jours (*Figure II.14*).

(a)



(b)

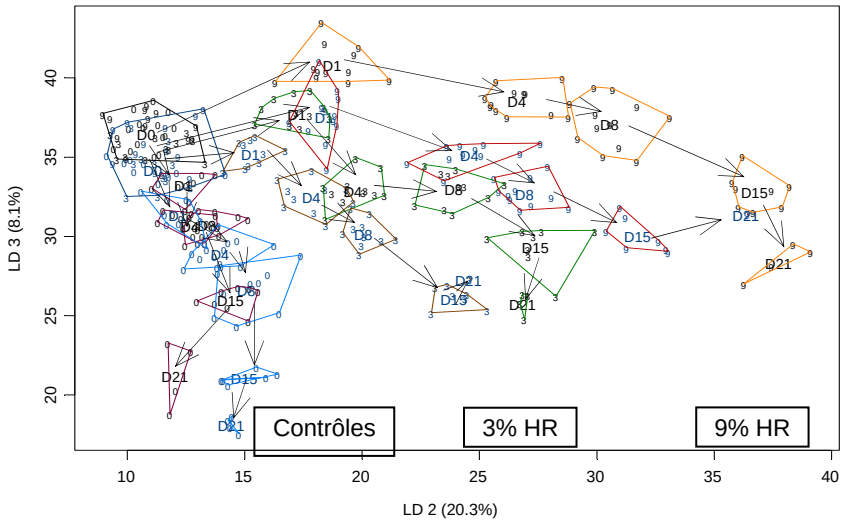


Figure II.14 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée à partir des données d'analyse RMN du ^{1}H, à 600 MHz, sur les urines des souris mâles et femelles, en fonction du facteur groupe (Date*Dose) (a) suivant le premier plan factoriel (1*2) et (b) suivant le second plan factoriel (2*3). La première composante permet de projeter les groupes en fonction du facteur sexe, la seconde composante, une projection des groupes en fonction du facteur dose. La composante 3 permet la projection des groupes au cours du temps et rend compte de l'évolution physiologique des animaux en termes notamment de croissance. Une des variables les plus impliquées dans la construction de la seconde composante possède un déplacement chimique à δ = 3,35 ppm et a été identifiée comme étant le *scyllo*-inositol. Chaque groupe est représenté avec une couleur spécifique et une notation groupée correspondant à la dose d'*Hypochœris radicata* introduite dans le régime, et ce par jour de collecte. Les flèches représentent les trajectoires métaboliques au cours de l'étude.

Un traitement préalable des données urinaires n'a pas été nécessaire. L'AFD a été réalisée à partir des 332 échantillons d'urines et sur 150 variables sélectionnées grâce à l'algorithme de présélection pas-à-pas. Les 4 composantes étaient toutes fortement significatives et contenaient 66,2% de la variance calculée entre les différents groupes. Une **ségrégation claire entre les sexes**, et une **évolution significative au cours du temps**, sont apparues pour les 2 groupes contrôles (*Figure II.14a*). De plus, grâce à cette analyse multidimensionnelle, il a été possible de détecter des **variations métaboliques subtiles** mais significatives **à partir du quatrième jour** : (i) une évolution en fonction de l'âge similaire pour chaque groupe, avec une **discrétisation effectuée sur un pas de temps de quelques jours**, (ii) une **signature métabolique pour un âge donné significativement différente** entre chaque groupe d'après les données issues de l'analyse de Mahalanobis ($p < 0,0001$). Cette dernière caractéristique, mieux révélée sur l'axe 3 qui résume 8,1% de la variance intergroupe, montre une **évolution parallèle** du métabolisme général liée à la **croissance** de l'animal pour les animaux témoins mâles et femelles (*Figure II.14b*). Ces déviations des orientations métaboliques des animaux viennent conforter l'observation similaire révélée chez le rat.

Malheureusement, le nombre de variables caractérisées de façon sûre et expliquant majoritairement la construction de la composante 1 est réduit. La variable la plus corrélée à $\delta = 1,21$ ppm n'a pu être identifiée, la seconde variable en terme d'importance serait la **putrescine**. La valine, la **triméthylamine** (TMA) et la **diméthylamine** (DMA) sont ensuite les seules variables identifiées impliquées dans la séparation des groupes en **fonction du sexe**.

Le second axe discriminant porte 20,3% de la variance intergroupe. Il permet de révéler les **ajustements métaboliques à la suite de l'ingestion d'*Hypochœris radicata*** avec notamment une trajectoire métabolique de plus faible amplitude chez le lot à 3% d'*Hypochœris radicata* que celle du lot à 9% d'*Hypochœris radicata* (*Figure II.14Figure II.15a*). De plus, avec le régime à 3% d'*Hypochœris radicata*, une inflexion des trajectoires métaboliques à J_{15} et J_{21} est perceptible avec une tendance telle que les trajectoires deviennent parallèles à l'axe 1. Cette situation métabolique intermédiaire, en termes de réponse à l'ingestion de la dose à 3% d'*Hypochœris radicata* dans le régime, est clairement visualisable sur la seconde carte factorielle (2*3) (*Figure II.14b*) et est plus amplifiée chez les femelles que chez les mâles. Cette configuration métabolique transitoire n'a pas été observée chez les

animaux ayant ingéré une dose de **9%** d'*Hypochœris radicata* pour laquelle les **changements métaboliques sont plus intenses** et **plus marqués**. Sur cette carte factorielle, il peut être noté que les souris mâles répondent, « métaboliquement » parlant, de façon moins intense que les souris femelles quelle que soit la dose d'*Hypochœris radicata* incorporée à l'aliment. Il semble que les **femelles** ingérant *Hypochœris radicata* soient **plus sensibles** que les mâles traités alors qu'aucun effet sexe n'a pu être souligné chez les animaux témoins.

Le principal métabolite lié à l'axe 2 a été identifié comme étant l'**hippurate** (3,96 ppm ; 7,64 ppm ; 7,84 ppm) (***Tableau II.10***).

Tableau II.10 : Résumé des principaux métabolites urinaires impliqués dans la construction des axes de l'AFD, identifiés grâce à leur déplacement chimique du ^{1}H δ (ppm) par comparaison avec des tables d'identification de déplacements chimiques. Le signe de corrélation de chaque métabolite nous permet d'expliquer les changements de direction en réponse au traitement avec *Hypochœris radicata*.

déplacement chimique du ^{1}H, δ (ppm), multiplicité[a]	Axe 1		Axe 2		Axe 3		Métabolites	Changement de direction avec le traitement HR
	ρ	rang	ρ	rang	ρ	rang		
1.21	0.98	1	-0.05		-0.11		Non assigné	↗
1.79,br	0.90	2	0.01		-0.32		putrescine	↗
1.04,d	0.88	3	0.40		-0.14		valine	↗
2.87,s	0.81	14	0.01		-0.36		triméthylamine	↗
3.03,s	-0.68	21	0.25		-0.48	20	créatine	↗
3.05,s	0.57	25	-0.71	7	0.05		créatinine	↘
2.71,s	-0.49	30	-0.37		0.50	14	diméthylamine	↘
3.36,s	0.33	35	0.54		0.49	15	*scyllo*-inositol	↗
7.64,t	-0.08		0.87	5	0.27		hippurate	↗
2.72,s	-0.06		-0.43		0.60	6	diméthylamine	↘
3.35,s	0.05		0.91	2	0.25		*scyllo*-inositol	↗
7.83,d	-0.03		0.89	4	0.29		hippurate	↗
7.84,d	-0.01		0.90	3	0.28		hippurate	↗
3.96,s	0.00		0.95	1	0.26		hippurate	↗

[a] multiplicité : br : broad (large pic) ; d : doublet; s: singlet; t: triplet

Un **second biomarqueur de l'intoxication à *Hypochœris radicata*** corrélé positivement à l'axe LD2 dont le déplacement chimique est de **3,35 ppm** correspond au ***scyllo*-inositol** (*Figure II.15*). Ce métabolite est seulement présent chez les souris soumis au régime à base d'*Hypochœris radicata*. Le pic, indiscernable sur les spectres des souris témoins, augmente en intensité ou hauteur en fonction de la dose croissante d'*Hypochœris radicata* dans les régimes, traduisant ainsi la nature de biomarqueur du *scyllo*-inositol.

Le premier métabolite canoniquement relié à l'axe LD3 a été identifié comme étant la **créatinine** (δ = 4,03 ppm) mais plusieurs autres variables n'ont pu être identifiées (***Tableau II.10***).

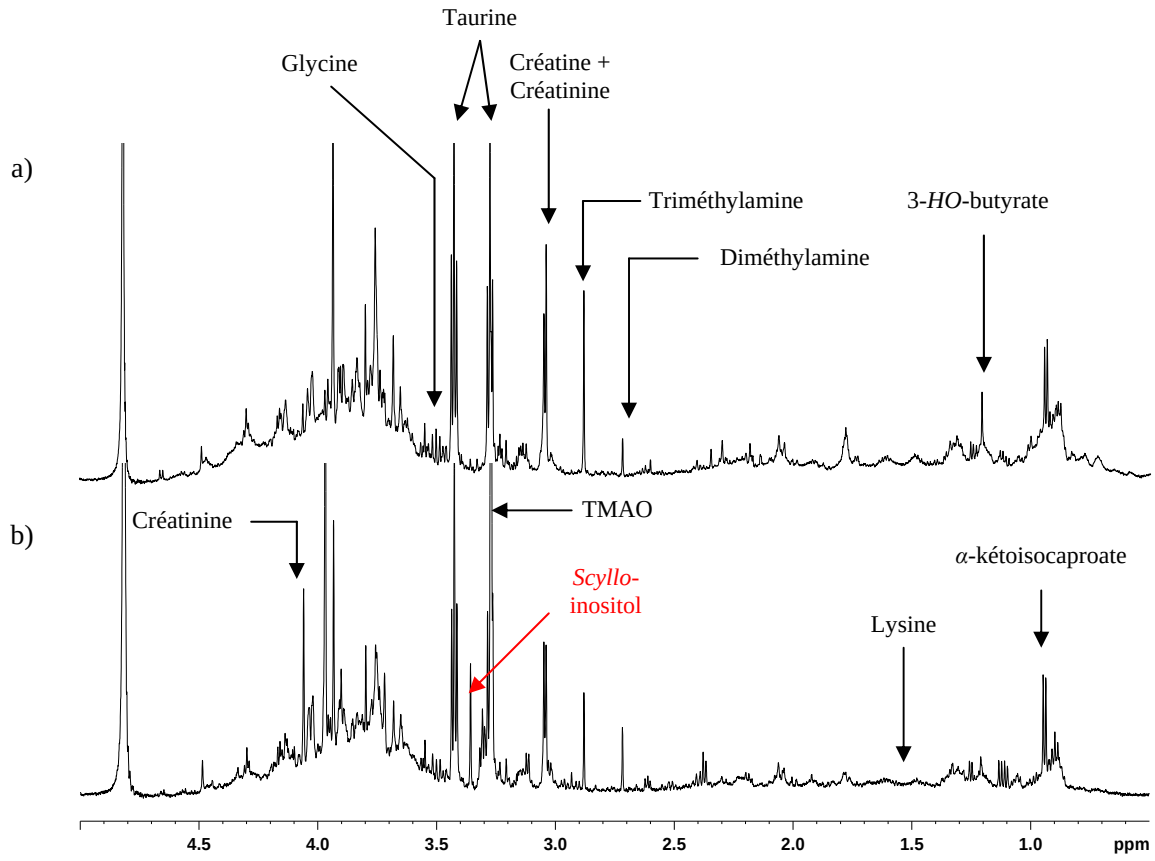


Figure II.15 : Comparaison entre des spectres issus d'échantillons urinaires analysés par RMN du ^{1}H, à 600 MHz d'une (a) souris témoin et d'une (b) souris recevant une dose de 9% d'Hypochœris radicata. Un pic à δ = 3,35 ppm est bien visible sur le spectre de la souris ingérant la plante mais à peine détectable sur le spectre de la souris témoin.

1.2.3. Perturbations métaboliques hépatiques

Dans le foie, **aucune** réelle **structuration** de l'information métabolique provenant des données obtenues en RMN du proton à partir des extraits **lipophiles** n'a pu être révélée, contrairement aux extraits aqueux. Cependant, ces derniers ont nécessité un **prétraitement** des données brutes afin d'éliminer la part d'information métabolique non modélisable par les facteurs étudiés ici. En effet, les AFD ou les analyses Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA) réalisées sur les signatures RMN du ^{1}H brutes, obtenues à partir des extraits hydrosolubles hépatiques, n'ont permis de révéler aucune structuration entre les groupes d'animaux.

Cette absence de structure montre que l'ingestion d'*Hypochœris radicata* ne suscite qu'un **faible impact sur le métabolisme** des animaux. En vue d'améliorer les résultats, un **effet bloc**, manifeste bien qu'inexpliqué, correspondant à l'effet de la date d'euthanasie de l'animal et de la durée d'ingestion d'*Hypochœris radicata*, c'est-à-dire 8, 15 et 21 jours a été **éliminé**. Cet effet bloc était clairement détectable sur l'AFD chez les animaux témoins euthanasiés 15 jours après le commencement de l'expérimentation lorsque ceux-ci sont comparés à ceux euthanasiés à 8 ou 21 jours après le début du traitement. Puis, une procédure combinant des **corrections OSC avec une PLS** a été nécessaire pour éliminer une part importante de la variance non modélisable par les effets du sexe, du traitement avec *Hypochœris radicata* ou de la durée d'intoxication.

Une fois les corrections des données RMN établies sur plusieurs facteurs contrôlés, la PLS-DA permet de hiérarchiser les effets des différents facteurs étudiés ici (*Figure II.16*).

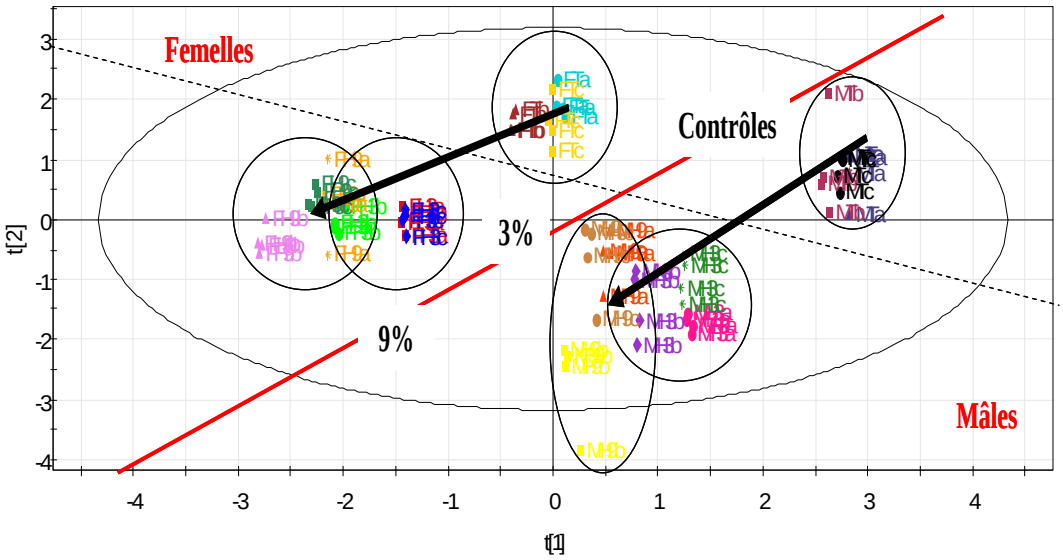


Figure II.16 : Représentation graphique de la PLS-DA après correction OSC du facteur bloc et à partir des données RMN du ^{1}H à 600 MHz des extraits hydrosolubles hépatiques de souris.

Parmi les principales variables qui ont pu être identifiées et qui interviennent de façon notable dans la construction des axes, le ***scyllo*-inositol** constitue la troisième variable impliquée dans la composante 2 (*Tableau II.11*).

Tableau II.11 : Principaux métabolites impliqués dans la construction des 3 premiers axes de la PLS-DA issue des spectres des extraits aqueux de foie. Chaque métabolite est identifié par son déplacement chimique RMN du ^{1}H (δ en ppm). Le signe de la corrélation pour chaque métabolite permet d'expliquer les changements de direction en réponse au traitement par *Hypochœris radicata.*

déplacement chimique du ^{1}H δ (ppm), multiplicité*	LD1		LD2		LD3		Métabolites	Changement avec le traitement avec HR
	ρ	rang	ρ	rang	ρ	rang		
8.74,d	0.80	4	0.44		-0.25		nicotinamide	↗
8.26,s	-0.60		-0.00		-0.12		inosine	↘
3.34,s	0.45		0.65	3	0.29	7	*scyllo*-inositol	↗

Le nicotinamide et, dans une moindre mesure, l'inosine sont les principales variables identifiées participant à la construction de l'axe 1. L'observation de la représentation graphique de la PLS-DA renseigne sur leur implication dans le facteur sexe.

1.2.4. Perturbations métaboliques cérébrales

Les extraits **lipophiles** de cerveau n'ont **pas** permis de faire ressortir **de structure** factorielle caractéristique et le traitement des données issues de l'exploration cérébrale par RMN s'est volontairement limitée à l'analyse des AFD réalisées sur les données RMN du ^{1}H obtenues sur extraits **hydrosolubles** de cerveaux. Le nombre de variables répertoriées étant de 901 pour un pas de 0,01 ppm, si l'on considère la totalité des données, mâles et femelles (*Figure II.17*), l'AFD a permis d'offrir **un seul premier plan factoriel explicite**. L'**axe 1** explique une très grande part de l'inertie du modèle : **93,3%** de la variance est contenue dans le **facteur dose** et la variable la plus fortement impliquée est la variable V617 correspondant au ***scyllo*-inositol** (δ = 3,34 ppm) (*Tableau II.12*).

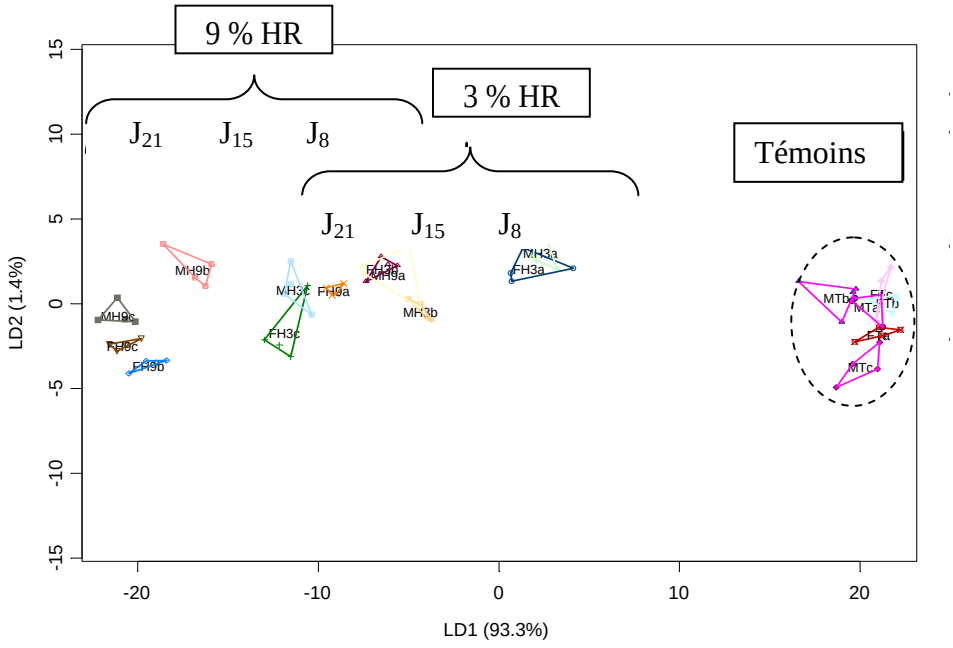


Figure II.17 : Premier plan factoriel de l'analyse factorielle discriminante obtenue à partir des 20 premières variables sélectionnées à partir des données RMN du ^{1}H, à 600 MHz des extraits aqueux cérébraux de souris. L'axe 1 explique une très grande part de l'inertie du modèle : 93,3% de la variance est contenue dans le facteur dose. La réponse dose-dépendante cérébrale des animaux, ayant ingéré *Hypochœris radicata* est univoque, unidirectionnelle et s'intensifie au cours du temps.

Le dendrogramme (*Figure II.18*) réalisé sur les données des souris mâles et notamment sur les 34 variables sélectionnées ou filtrées fait ressortir d'un côté, les variables V617 (δ = 3,34 ppm) et V616 (δ = 3,35 ppm) (la présence de 2 variables étant due à la séparation d'un même signal sur 2 variables contigües, le pas utilisé étant réduit) correspondant au ***scyllo*-inositol** et, de l'autre côté, **anti-corrélées**, les variables V591 (δ = 3,60 ppm) et V598 (δ = 3,53 ppm), représentant 2 des 4 déplacements chimiques propres au ***myo*-inositol**.

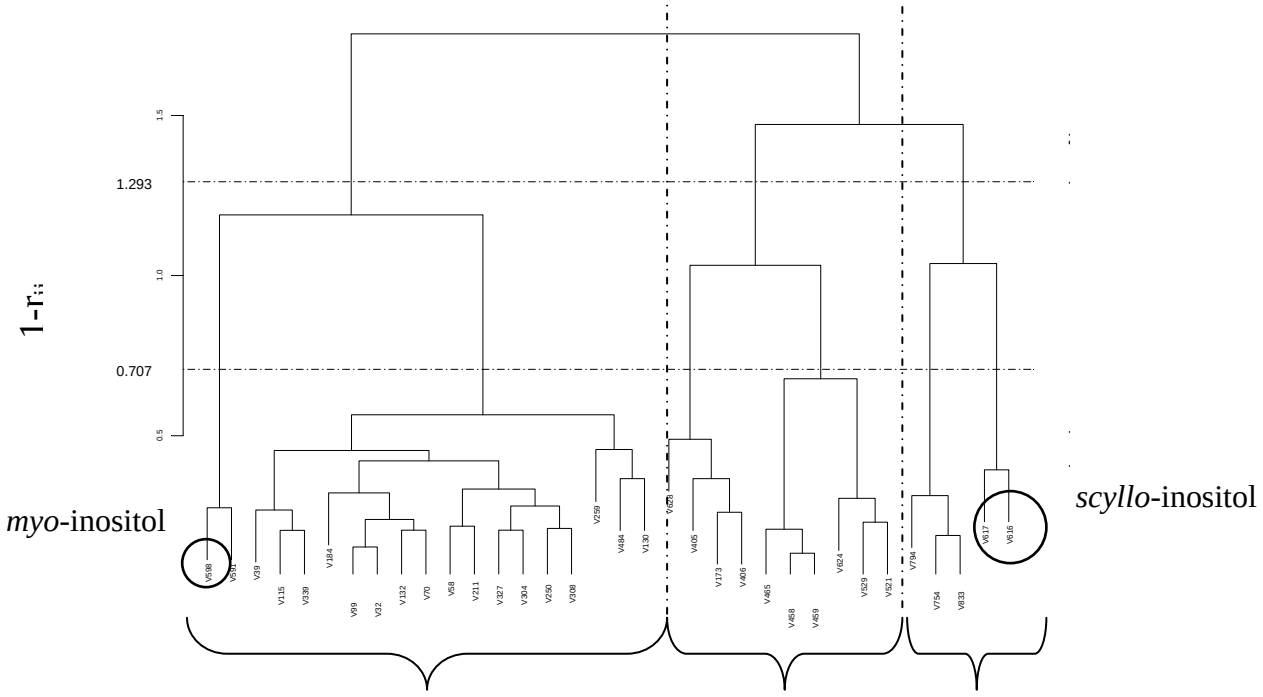


Figure II.18 : Dendrogramme ou arbre de classification hiérarchique obtenu à partir des 34 premières variables sélectionnées sur données RMN du ^{1}H, à 600 MHz, des extraits aqueux de cerveaux des souris recevant le régime avec 9% d'Hypochœris radicata. Les variables relatives au *scyllo*-inositol et au *myo*-inositol appartiennent à deux clusters opposés.

Il existe une **anti-corrélation entre le *myo* et le *scyllo*-inositol**. De plus, l'augmentation de la teneur cérébrale relative en *scyllo*-inositol (rapportée à la teneur en créatine) en fonction de la dose est significative ($p < 10^{-6}$). La diminution réciproque du rapport *myo*-inositol/créatine, même de significativité moindre ($p = 3.10^{-5}$), est bien présente (*Figure II.19*).

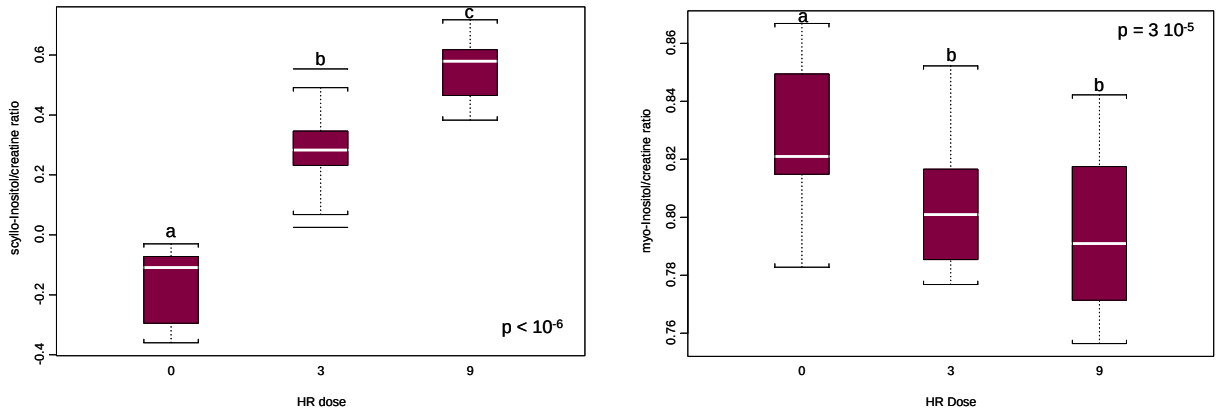


Figure II.19 : Evolutions respectives des rapports scyllo-inositol/créatine (à gauche) et myo-inositol/créatine (à droite) en fonction de la dose d'Hypochœris radicata ingérée par les animaux. Les différences des rapports en fonction de la dose sont significatives, $p < 10^{-6}$ et $p = 3.10^{-5}$, respectivement pour les rapports du *scyllo*-inositol et du *myo*-inositol.

Tableau II.12 : Résumé des principaux métabolites, des extraits aqueux de cerveau, impliqués dans la construction des 3 premiers axes. Chaque métabolite est identifié par son déplacement chimique RMN du ^{1}H (δ en ppm). Le signe de la corrélation pour chaque métabolite nous permet d'expliquer les changements de direction en réponse au traitement par *Hypochœris radicata.*

déplacement chimique du ^{1}H δ (ppm), multiplicité*	LD1		LD2		LD3		Métabolites	Changement de direction avec le traitement avec HR
	ρ	rang	ρ	rang	ρ	rang		
3.34,s	0.99	1	0.01		-0.00		*scyllo*-inositol	↗
3.60,t	-0.69	2	0.33	4	0.29		*myo*-inositol	↘
1.05,d	-0.31	3	0.28		0.47	2	valine	↘
1.49,d	-0.30	9	0.39	2	0.37	5	alanine	↘
6.06,d	0.15		0.20		0.05		inosine	↗
2.36,m	-0.06		-0.14		-0.31	6	glutamine	↘
4.09,q	0.01		-0.00		0.43	4	lactate	↗
2.08,m	-0.01		-0.47	1	-0.00		glutamate	↘
3.93,s	0.00		0.04		-0.01		créatine	↗

Dans le but de confirmer et renforcer la caractérisation structurale du *scyllo*-inositol, une analyse **RMN 2D ^{1}H-^{13}C HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) a été réalisée afin de préciser les déplacements chimiques des atomes de carbone auxquels sont rattachés les protons (*Figure II.20*). Sur ce spectre, nous pouvons noter, plus spécifiquement, une tache, dont les coordonnées sont 3,34 ppm (déplacement chimique du ^{1}H) et 76,3 ppm (déplacement chimique du ^{13}C), ce qui correspond de **façon univoque au *scyllo*-inositol.**

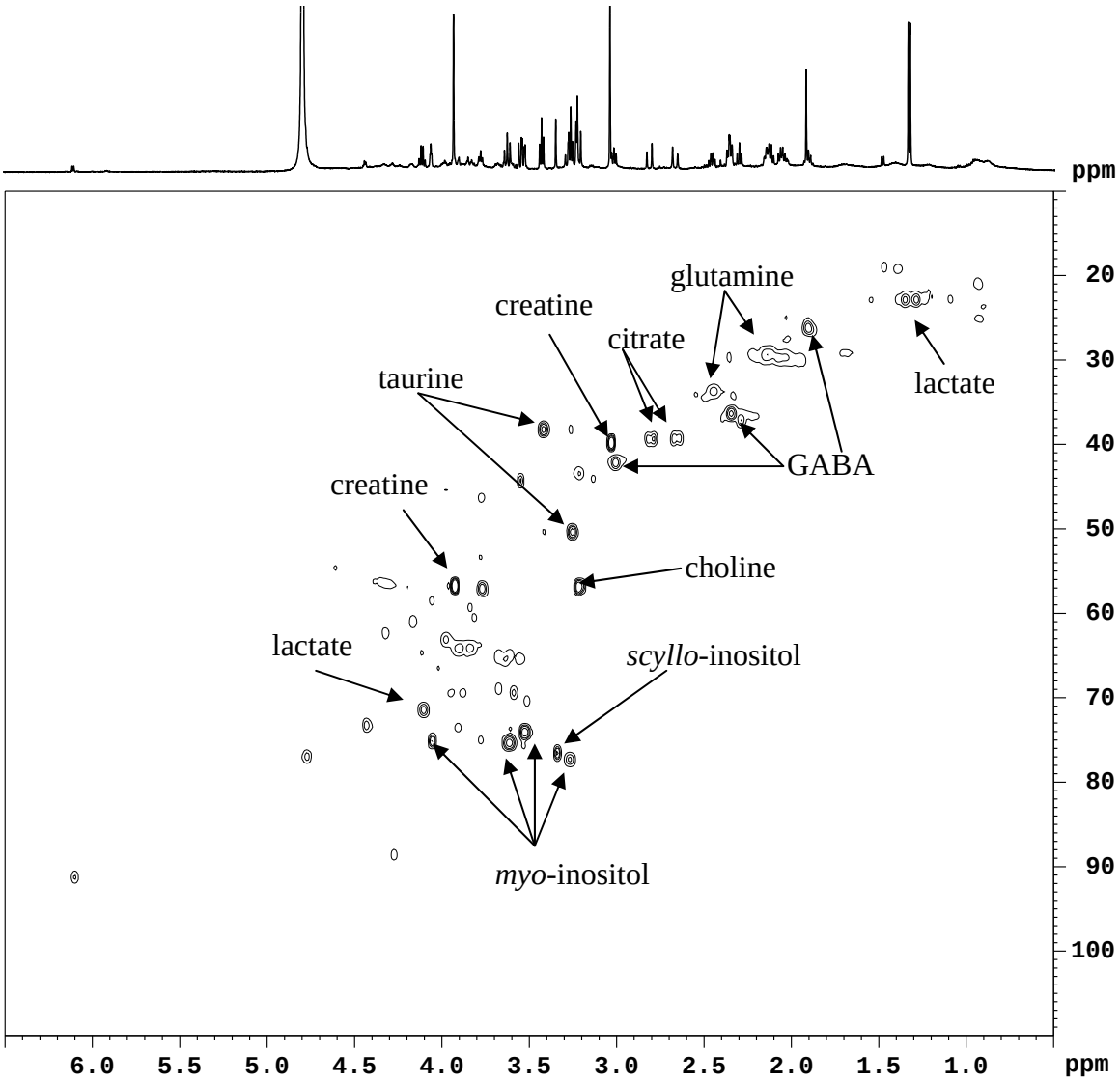


Figure II.20 : Spectre issu de l'analyse RMN 2D ^{1}H-^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) obtenu à partir d'un pool d'extraits hydrosolubles de cerveau provenant de 3 souris recevant le régime avec 9% d'Hypochœris radicata. L'axe des abscisses rend compte du déplacement chimique relatif aux protons ^{1}H (de 1,0 à 6,0 ppm), l'axe des ordonnées, aux déplacements chimiques des atomes de carbone ^{13}C auxquels sont rattachés ces mêmes protons (de 20 à 100 ppm).

1.2.5. Relations canoniques entre signatures cérébrales et hépatiques

L'analyse des organes pris individuellement a permis d'obtenir un certain nombre de renseignements concernant les perturbations métaboliques, mais un des intérêts propres à la métabonomique est la capacité à **confronter deux jeux de données**, de matrices biologiques différentes, mais issues des mêmes individus. Cette mise en parallèle a été obtenue grâce à une **analyse canonique ou analyse PLS2 (Partial Least Square).** Après correction des données pour éliminer un effet bloc, une **corrélation significative** a été révélée entre les deux premières composantes de l'analyse PLS2 réalisées entre les données métabolomiques d'extraits hydrosolubles de foie et de cerveau (*Figure II.21*). Elle a permis aussi de visualiser une opposition nette entre les sexes et entre les traitements. Un point important à souligner est la **relation étroite révélée** entre le ***scyllo*-inositol**, présent dans le **cerveau** (flèche 1) et dans le **foie** (flèche 2) des animaux ayant reçu le régime à base d'*Hypochœris radicata*. Pour le *myo*-inositol, les résultats sont moins clairs car il apparait, certes, projeté de façon anti-corrélée au *scyllo*-inositol dans le cerveau mais pas dans le foie. Ceci pourrait s'expliquer par la plus grande part de variance explicitée par le facteur sexe dans ce dernier organe, comme les inerties relatives déjà mentionnées précédemment en ont déjà fait part. En effet, les variables explicatives dans le cerveau se séparent plus en fonction du régime (axe 2), celles dans le foie, plus en fonction du sexe (axe 1).

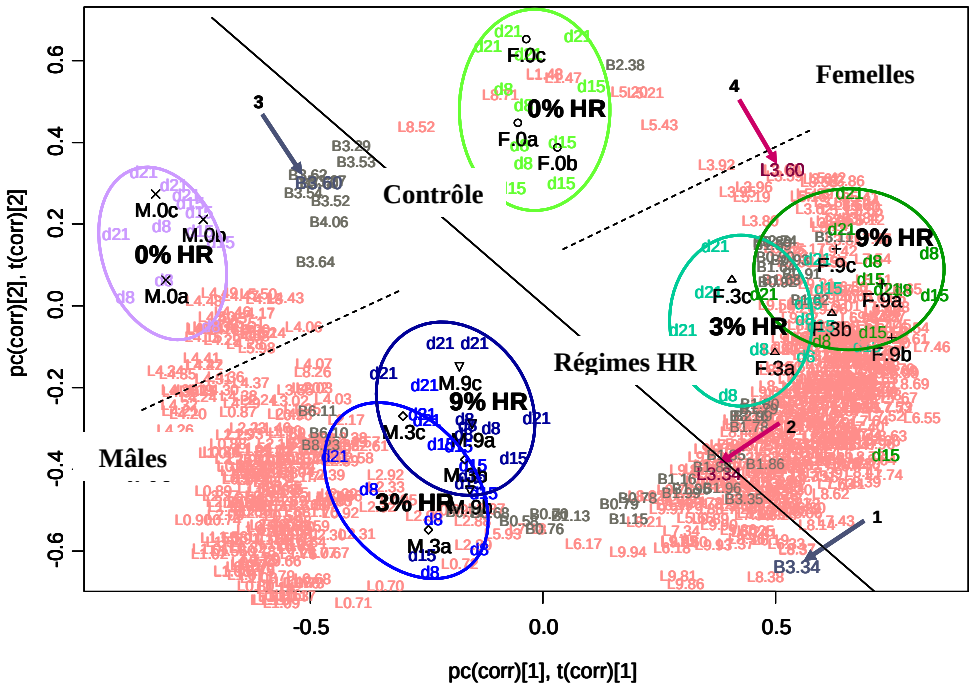


Figure II.21 : Biplot réalisé sur les 2 premières composantes de la PLS2 entre les métabolomes des extraits hydrosolubles de cerveau et de foie. Les données de signatures brutes ont subi un prétraitement comme décrit pour les signatures des extraits hépatiques de souris grâce à une ANOVA suivie (foie) ou non (cerveau) par des procédures de correction OSC. La projection des variables est présentée pour les variables ayant une contribution supérieure à 0.5 (en gris pour les variables cérébrales, en rose pour les variables hépatiques). On peut noter que la majeure partie des variables emmagasinant l'information se répartit en fonction du sexe pour le foie, en fonction du régime pour le cerveau. La variable cérébrale nommée B3.34 (flèche 1) et la variable hépatique correspondante nommée L3.34 (flèche 2) correspondent au *scyllo*-inositol, détecté à δ = 3,34 ppm. La variable cérébrale nommée B3.60 (flèche 3) et la variable hépatique correspondante nommée L3.60 (flèche 4) correspondent au *myo*-inositol détecté à δ = 3,60 ppm.

1.2.6. Perturbations métaboliques plasmatiques

Le nombre de variables répertoriées est de 911 pour un pas d'intégration de 0,01 ppm.

Une séparation des données RMN obtenues chez les mâles et les femelles a permis de mieux observer la séparation des lots. Sur l'AFD réalisée à partir des 15 premières variables filtrées issues des données RMN des plasmas des souris mâles (*Figure II.22*), une bonne ségrégation des doses est visible après projection sur l'axe 1 (36,8% d'inertie expliquée) avec comme variable majoritairement impliquée dans celui-ci (rang 1), la variable V627, correspondant au ***scyllo*-inositol.**

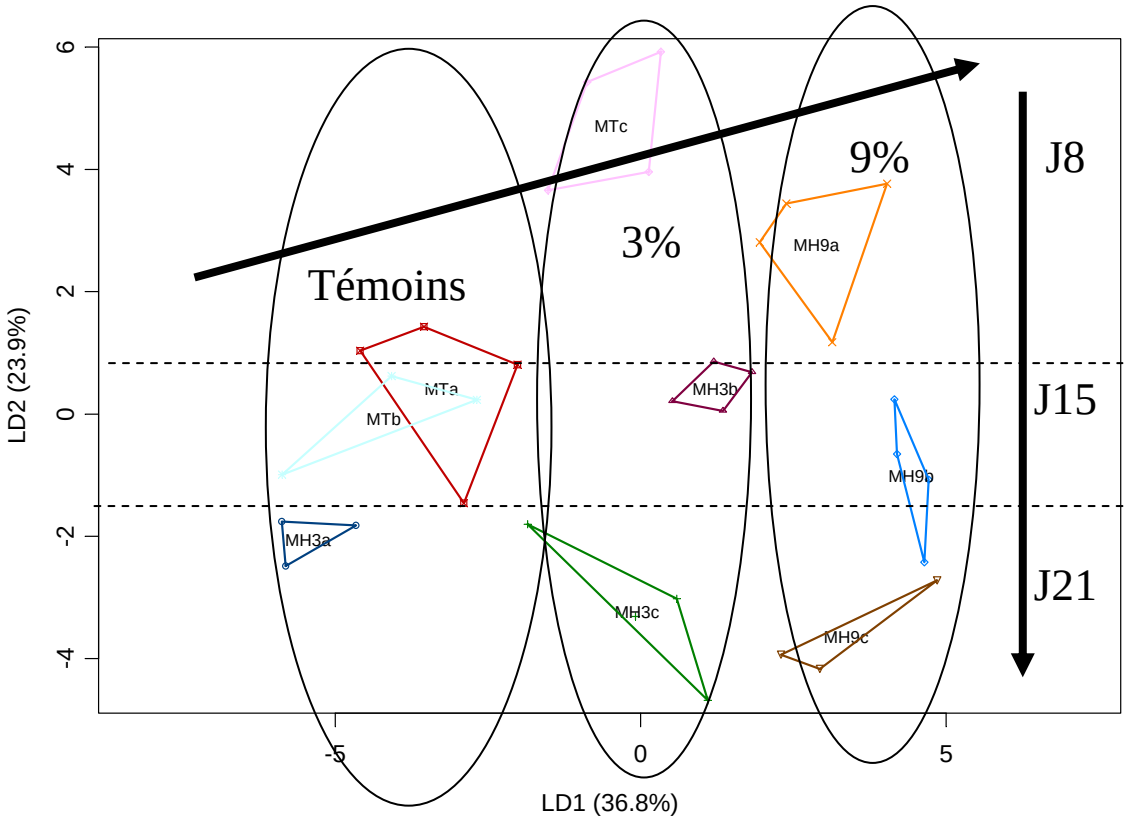


Figure II.22 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée à partir des 15 premières variables issues de l'analyse RMN du ^{1}H à 600 MHz des plasmas des souris mâles. Malgré le fait que deux groupes soient placés de façon inexpliquée (MH3a et MTc), la figure montre une ségrégation des lots en fonction de la dose suivant la projection sur l'axe 1 et en fonction de la date d'abattage suivant la projection sur l'axe 2.

Ces résultats obtenus par étude métabonomique montrent l'**ampleur relative de la réponse au niveau du cerveau à la suite de l'ingestion d'*Hypochœris radicata***. Il est apparu comme fondamental de conforter ces résultats par une autre approche, en particulier en mettant à jour d'autres biomarqueurs de la perturbation cérébrale. L'approche choisie a été l'IRM ou Imagerie par Résonance Magnétique.

2. Approche par IRM

2.1. Etudes pilotes

2.1.1. Etude de faisabilité sur des cerveaux fixés ex vivo

Dans le but de s'affranchir des contraintes liées à l'étude *in vivo*, une première expérimentation sur cerveaux fixés au paraformaldéhyde a été réalisée. Cependant, les images spectroscopiques obtenues n'ont pas permis de bien identifier les différentes structures cérébrales (*Figure II.23*).

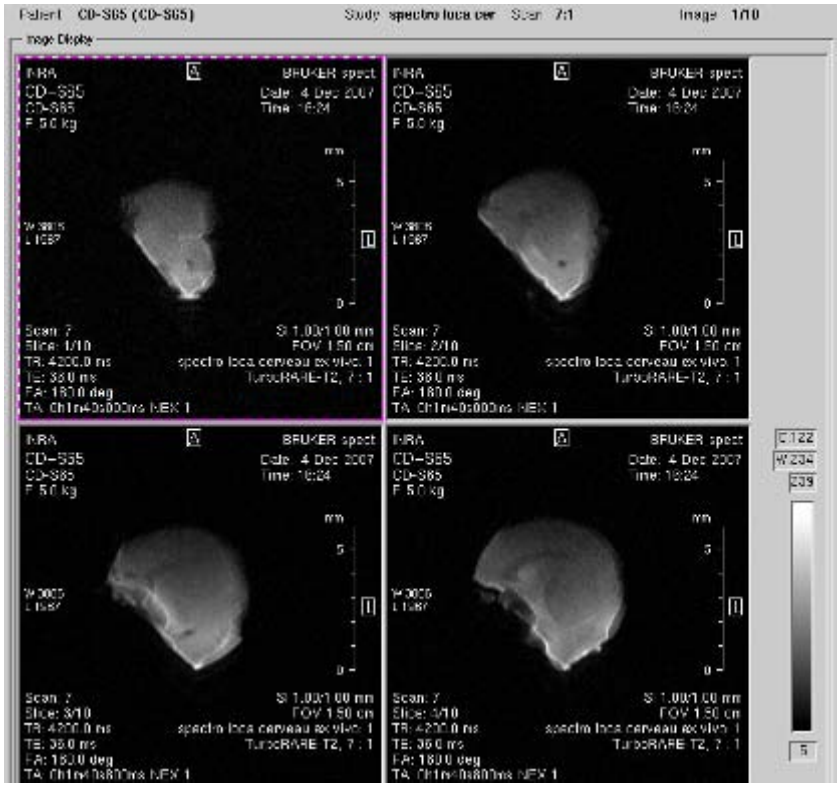


Figure II.23 : Images obtenues en spectroscopie localisée sur des cerveaux fixés ex vivo et analysés par la méthode TurboRARE T2 (coupes axiales).

De plus, après un essai de **positionnement des voxels sur la région thalamique**, l'acquisition a confirmé que les spectres engendrés n'étaient pas exploitables car ils ne rendaient pas compte de la totalité des métabolites présents physiologiquement au sein des structures cérébrales (*Figure II.24*).

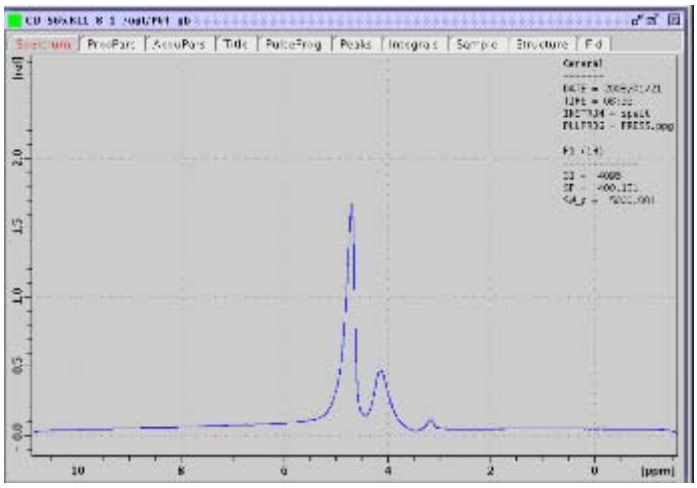


Figure II.24 : Exemple de spectre obtenu (δ 0-10 ppm) par séquence PRESS sur cerveau fixé ex vivo.

De ce fait, la possibilité d'utiliser une telle méthode pour analyser ultérieurement des cerveaux, sans la contrainte du maintien des grandes fonctions vitales de l'animal dans l'aimant, a été rejetée.

2.1.2. Etude de faisabilité in vivo sur animaux nourris avec 9% d'Hypochœris radicata

A partir d'une série d'images de repérage balayant la totalité du cerveau de souris, les principales structures cérébrales telles que le thalamus, le cortex, les ventricules, le striatum et l'hippocampe ont pu être identifiées (*Figure II.25*).

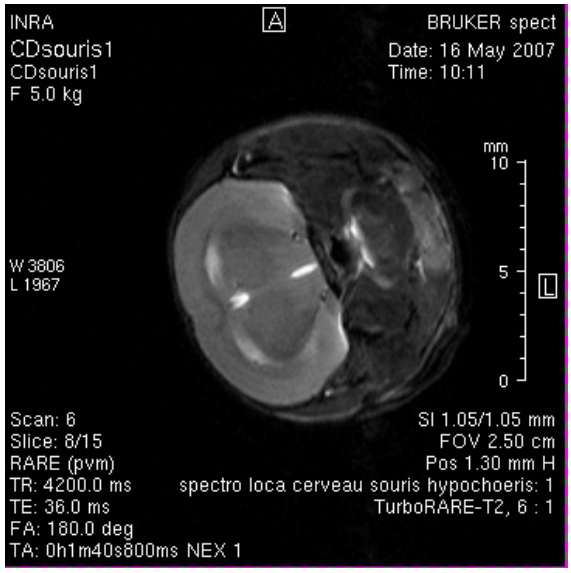


Figure II.25 : Paramètres d'acquisition de l'image et coupe axiale du cerveau permettant de visualiser les principales structures nerveuses telles le thalamus, le cortex, les ventricules, le corps calleux.

N'ayant pas d'*a priori* sur la localisation préférentielle du métabolite *scyllo*-inositol et au vu de l'impossibilité d'accéder à l'ensemble du cerveau à l'aide de la séquence PRESS, il a été décidé de focaliser l'analyse par spectroscopie par résonance magnétique sur des voxels centrés sur 2 régions encéphaliques spécifiques au niveau du lobe pariétal : le **thalamus et le cortex,** ces deux régions permettant d'accéder et de rendre compte du profil métabolique intrinsèque à la **substance blanche et à la substance grise**, respectivement (*Figure II.26*).

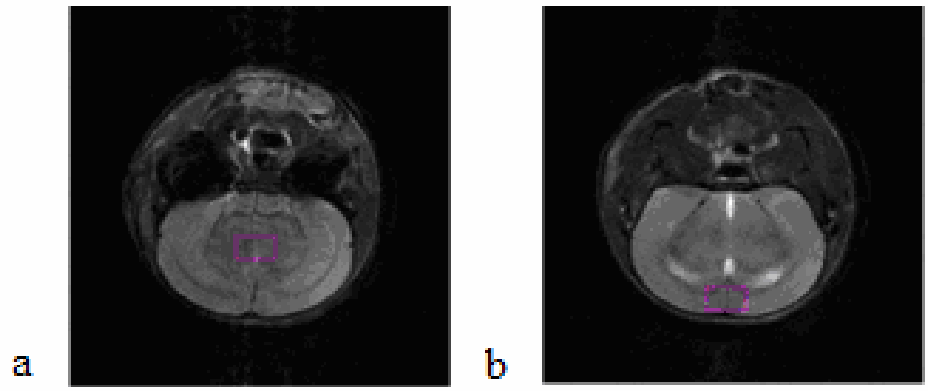


Figure II.26 : Localisation des voxels au niveau (a) du thalamus et (b) du cortex sur des coupes axiales d'encéphales de souris.

Les conclusions issues de l'observation des spectres métaboliques acquis à partir des voxels centrés sur le thalamus et sur le cortex des animaux témoins et des animaux traités peuvent se résumer ainsi :

1. Du ***scyllo*-inositol** est présent en **quantité plus importante** au sein du **thalamus** des individus nourris avec **9%** d'*Hypochoeris radicata* que chez les individus témoins (*Figure II.27*).
2. La présence du *scyllo*-inositol est proportionnellement **plus importante dans le thalamus** des individus traités **par rapport au cortex** de ces mêmes individus (*Figure II.28*).

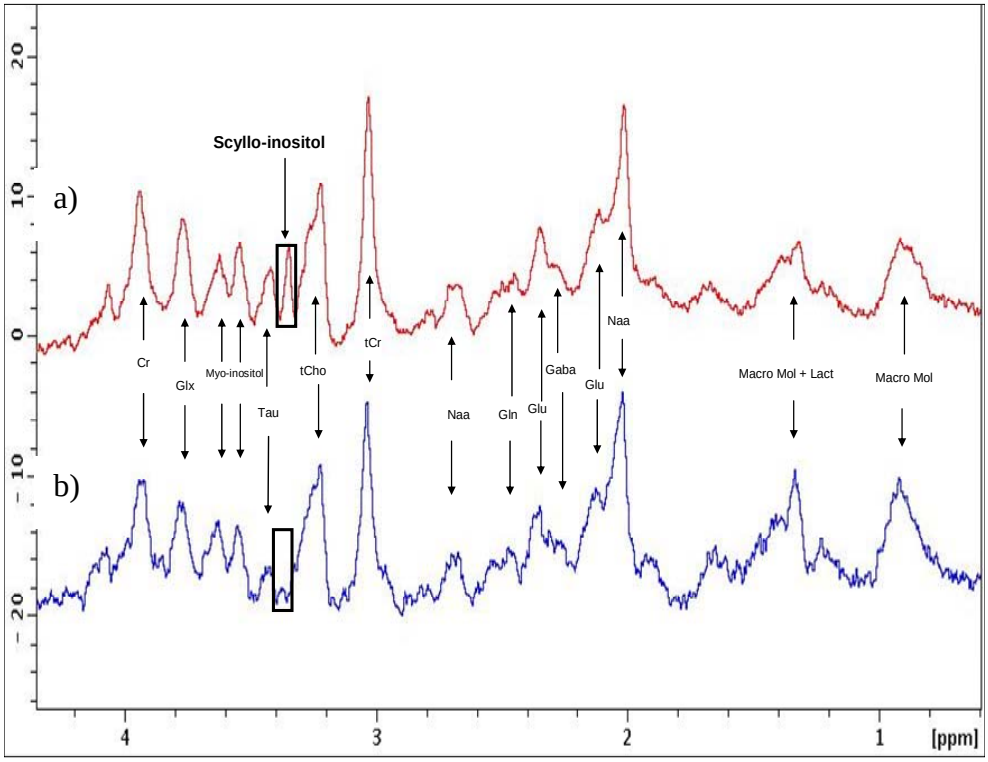


Figure II.27 : Spectres (δ 1,0-4,0 ppm) issus des voxels (3*3*3 mm) centrés sur la région cérébrale du thalamus a) chez une souris traitée avec 9% d'Hypochœris radicata et b) chez une souris témoin. Un pic de *scyllo*-inositol plus marqué chez l'individu soumis au régime à base d'*Hypochœris radicata* par rapport à l'individu témoin peut être noté.
Glucose (Glx), créatine (Cr), créatine totale (tCr), N-acétyl-aspartate (Naa), lactate (Lact), choline et ses dérivés (tCho), glutamate (Glu), glutamine (Gln), macromolécules (Macro mol), taurine (Tau).

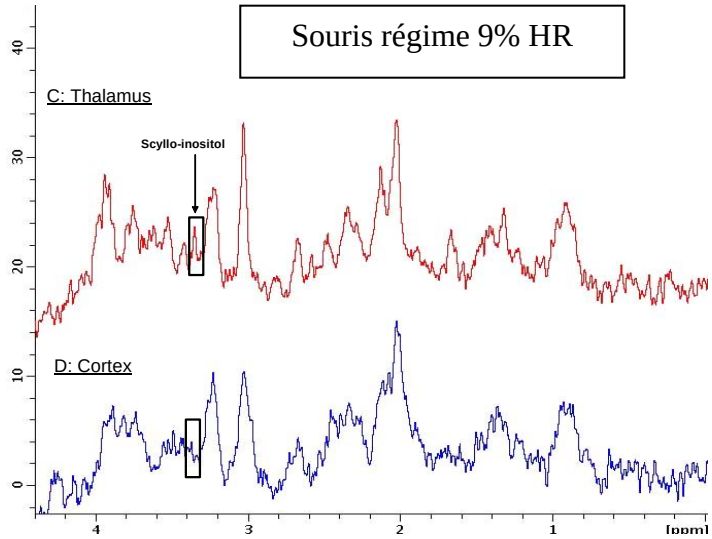


Figure II.28 : Comparaison de spectres issus de l'analyse de voxels (2*1,2*1,7 mm) localisés au sein du thalamus et du cortex chez un individu recevant une dose de 9% d'Hypochœris radicata dans l'aliment. Le pic correspondant au *scyllo*-inositol, à δ = 3,36 ppm est plus conséquent au sein du thalamus que du cortex.

2.2. Exploration par spectroscopie localisée des encéphales de souris *in vivo* après traitement par 9% d'*Hypochœris radicata*

L'étude pilote ayant révélé la faisabilité et l'intérêt d'une spectroscopie localisée *in vivo*, une expérimentation sur **12 jours** a été menée avec la distribution d'une dose de 9% d'*Hypochœris radicata* et **12 souris**, 6 témoins et 6 ingérant la plante.

Pour chaque souris, **deux mesures** ont été réalisées sur 2 coupes différentes (*Figure II.29*) positionnées au niveau du **thalamus**, plus apte à révéler des perturbations que le cortex.

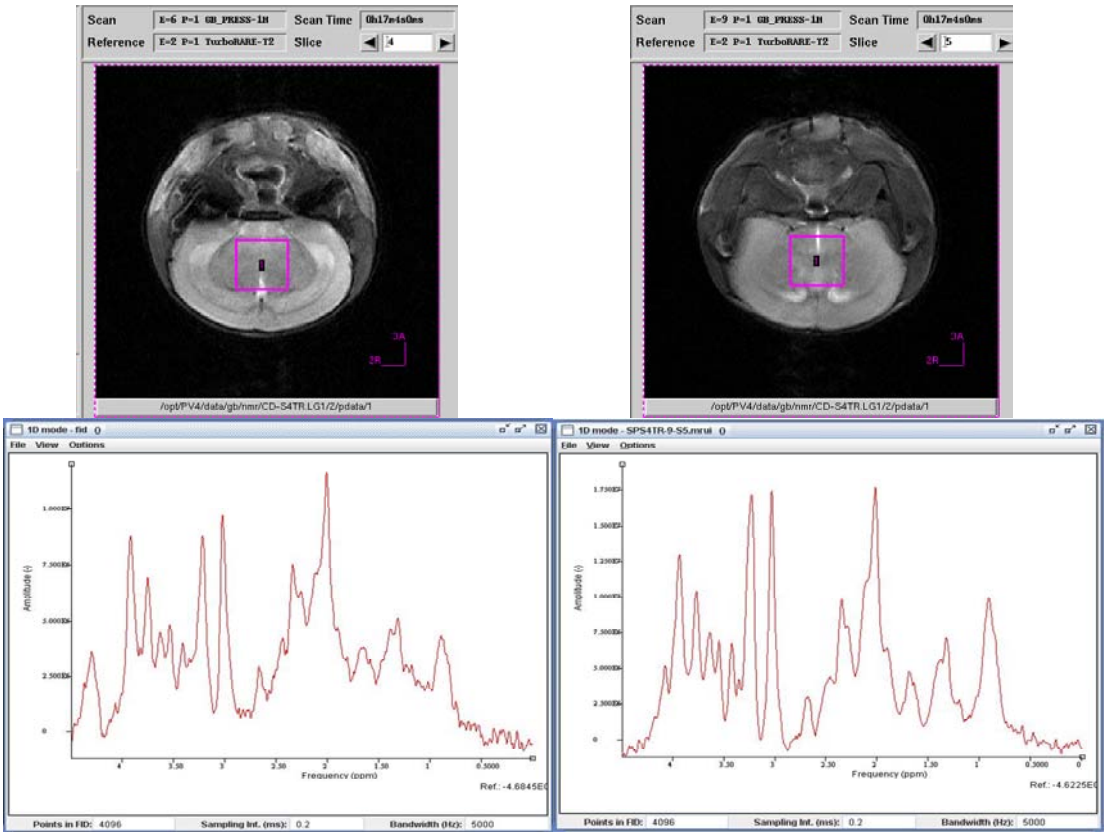


Figure II.29 : Images spectroscopiques de deux coupes consécutives sur un animal recevant un régime contenant 9% d'Hypochœris radicata, précisant la localisation des voxels centrés sur le thalamus et les spectres correspondants à chaque acquisition.

Cette analyse a permis de mettre en évidence une **augmentation de *scyllo*-inositol** sur les spectres des individus soumis au **régime contenant 9% d'*Hypochœris radicata*** (*Figure II.30*) à l'inverse des individus témoins (*Figure II.31*). La sommation des spectres sur l'ensemble des individus a permis d'objectiver le résultat (*Figure II.32*).

En ce qui concerne le traitement des données mono voxel, 2 types d'intégration ont été réalisées à l'aide de deux logiciels: l'une par **jmrui®** et l'autre par **peakfit®.** La quantification absolue des pics de *scyllo*-inositol n'a pas été possible même en mono voxel, la concentration du *scyllo*-inositol étant trop faible par rapport au bruit de fond. Les premiers résultats ont montré que l'intégration obtenue grâce au logiciel peakfit® a semblé plus cohérente que celle obtenue avec le logiciel jmrui®, pourtant habituellement utilisé. En effet, avec ce dernier logiciel, les teneurs relatives des métabolites, obtenues chez les animaux témoins, n'apparaissent pas dans les intervalles de référence. Cela a confirmé la différence observée *de visu* sur les spectres entre souris témoins et traitées. L'intensité de chaque pic a été exprimée en **% de l'ensemble intégré** dans peakfit®.

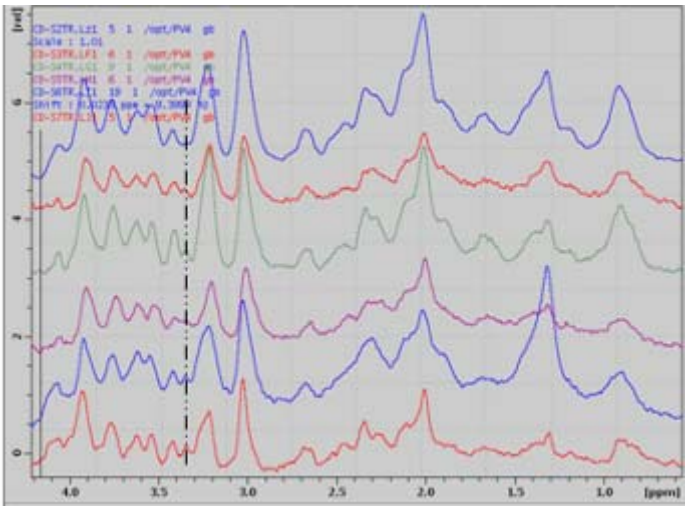


Figure II.30 : Spectres obtenus sur des encéphales de souris ayant reçu un régime avec 9% d'Hypochœris radicata. On peut noter la présence de *scyllo*-inositol chez toutes les souris.

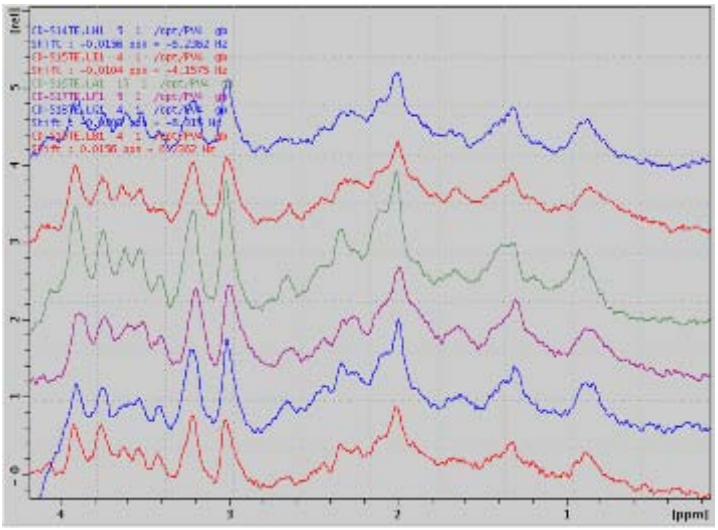


Figure II.31 : Spectres obtenus sur des encéphales de souris témoins. Le pic de *scyllo*-inositol n'est pas visible chez les individus témoins.

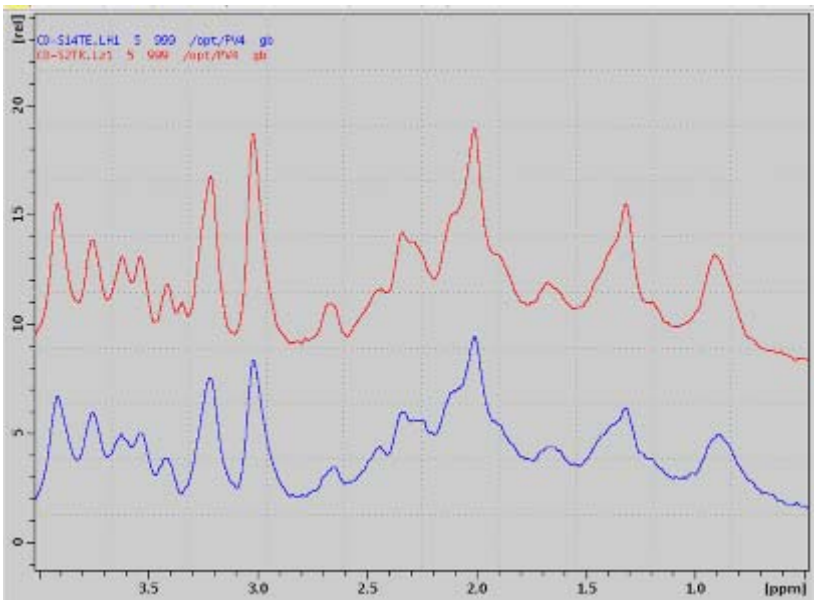


Figure II.32 : Spectres obtenus après avoir sommé la totalité des spectres des souris traitées (en rouge) ainsi que des souris témoins (en bleu). La différence par comparaison des deux spectres apparaît nettement à δ = 3,34 ppm.

Les analyses de variance réalisées sur l'ensemble des métabolites répertoriés et identifiés n'ont donné de résultat significatifs que pour le ***scyllo*-inositol** (p = 0,0013).

3. Analyses canoniques IRM/métabonomique

Les analyses précédentes ont permis, par deux approches différentes de trouver de façon récurrente un **biomarqueur d'intérêt dans le système nerveux central : le *scyllo*-inositol**. Afin de confirmer la relation existante entre la signature métabonomique de l'extrait hydrosoluble de cerveau et les observations faites par imagerie par résonance magnétique, et afin de mettre en évidence d'éventuels biomarqueurs supplémentaires, une **analyse canonique** a été réalisée entre ces deux jeux de données **pour les 12 individus** ayant été **étudiés *in vivo* en IRM.**

Les spectres ont subi une phase de **prétraitement**. Ainsi, les données brutes d'extraits cérébraux, analysés en RMN du ^{1}H, ont subi une **correction OSC** qui a permis de rejeter 49,6% de la variance métabolomique initiale puis, une analyse PLS. Les 14 métabolites cérébraux quantifiés à partir des données brutes issues de l'analyse IRM *in vivo*, ont subi préalablement, une **transformation $\sin^{-1}(\sqrt{p})$** pour chaque variable afin d'obtenir une **homoscédasticité satisfaisante**. Puis les données ont été **corrigées par OSC**, ce qui a permis d'écarter 55,6% de la variance initiale, qui ne pouvait être expliquée par le facteur traitement puis ont été analysées par **régression PLS**.

Cette analyse canonique réalisée à partir de l'analyse PLS2 entre ces données corrigées a permis de dresser le graphe suivant (*Figure II.33*) dans lequel la variable désignée par B3.34 correspondant au *scyllo*-inositol est retrouvée projetée dans le périmètre des animaux traités. Certaines précisions supplémentaires sont apparues : les teneurs en **N-acétyl-aspartate** ainsi qu'en **choline** et **lactate** apparaissent augmentées après ingestion d'*Hypochœris radicata*, contrairement au **glutamate et à la glutamine**.

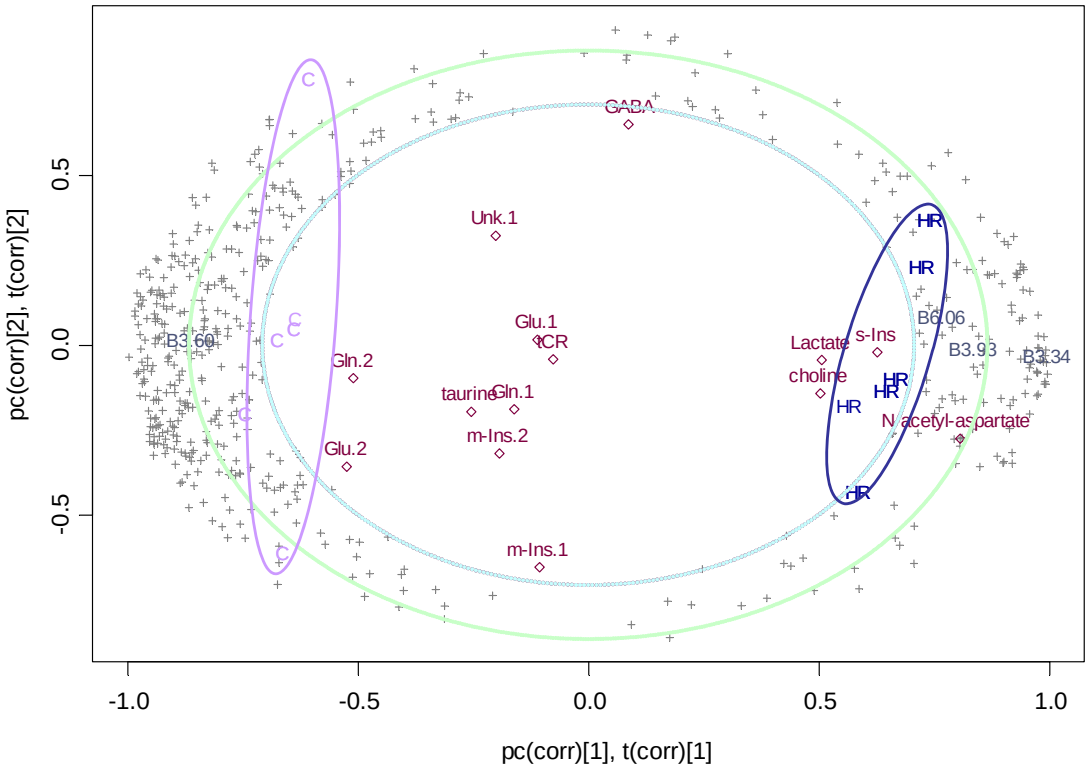


Figure II.33 : Graphe de l'analyse de régression canonique basée sur une PLS2 entre le jeu de données des métabolites cérébraux obtenus en IRM et les signatures RMN du ^{1}H sur des extraits hydrosolubles de cerveau, les deux jeux de données provenant des 12 animaux observés en IRM. Les métabolites en caractères rouges sont les métabolites dont les pics ont été observés en imagerie *in vivo*. Les croix grises correspondent aux variables issues de l'analyse RMN du ^{1}H sur extraits de cerveau. La projection des variables est présentée pour les variables métabonomiques ayant une contribution supérieure à 0,5 (cercle bleu clair) ou au dessus de 0,75 (cercle vert clair). Les ellipses mauves et bleu foncé correspondent respectivement aux individus témoins et aux individus soumis au régime à base de 9% *d'Hypochœris radicata*, étudiés *in vivo*. Les principales variables ayant une corrélation positive avec le traitement à *Hypochœris radicata* sont le *scyllo*-inositol (s-Ins), le N-acétyl-aspartate, le lactate et la choline. Les variables ayant une corrélation négative avec le traitement à *Hypochœris radicata* sont le glutamate (Glu.2, 2nd déplacement chimique) et la glutamine (Gln.2, 2nd déplacement chimique). Les variables issues de l'analyse par imagerie par résonance magnétique qui ne sont pas informatives comme le *myo*-inositol (m-Ins.1 et m-Ins.2), le glutamate, (Glu.1, 1er déplacement chimique), la glutamine, (Gln.1, 1er déplacement chimique), le GABA, la taurine ainsi qu'un métabolite non identifié (Unk.1) sont projetés au centre du graphique.

C. Discussion

Cette partie du travail de thèse constitue une **étape primordiale** à l'établissement des biomarqueurs d'intérêt. En effet, il est nécessaire de rappeler que l'objectif n'était pas de reproduire la maladie chez une espèce animale de laboratoire mais uniquement **d'obtenir des renseignements d'ordre métabolique** permettant de **circonscrire l'impact** d'un **processus toxicologique** au sein d'un organisme animal. Cette démarche, certes novatrice et inhabituelle, est ici largement justifiée par le faible nombre d'éléments cliniques à notre disposition, l'incapacité à réaliser des études de toxicologie classique et l'impossibilité de travailler expérimentalement sur l'espèce sensible. L'utilisation de deux méthodes d'approche performantes, conjointes et complémentaires, la métabonomique et l'imagerie par résonance magnétique, ont permis, à la fois, d'accéder aux modifications des **profils métaboliques**, grâce à la première, puis de **valider**, renforcer l'interprétation et un complément d'information sur les **biomarqueurs** d'intoxication, grâce à la seconde. Ce choix s'appuie sur l'aptitude de la métabonomique à visualiser des changements au sein d'un organisme, aussi minimes soient-ils, ce qui permet, même en l'absence de manifestation clinique, d'orienter et de limiter les futures explorations du processus toxicologique. Il ne s'agit pas d'une technique mais bien d'une **méthode d'approche** permettant, **sans *a priori*** sur le mode d'action, sur la composition chimique d'un ou plusieurs composé(s) toxique(s) et sans forcément travailler sur un individu réceptif ou sensible, de déceler la réponse « clinique » de l'organisme uniquement au niveau des disruptions métaboliques.

Ces travaux apparaissent concluants quant à l'utilisation du **rat ou de la souris** comme modèle d'animaux de laboratoire pour révéler des **perturbations métaboliques ténues mais univoques.** Afin de pouvoir augmenter les doses de végétal incorporé dans l'aliment pour renforcer les résultats obtenus chez le rat, l'expérimentation sur souris a pu être menée. Si on considère ces deux expérimentations conjointement, les résultats montrent que : i) la **souris** et le **rat** peuvent être considérés comme des **animaux modèles** des disruptions métaboliques induites par l'ingestion d'*Hypochœris radicata*, ii) l'ingestion d'*Hypochœris radicata* entraîne une **réponse dose-dépendante**, visible au niveau des **urines**, du **foie** et amplifiée dans le **cerveau,** iii) le métabolite majoritairement impliqué dans ces disruptions métaboliques est le ***scyllo*-inositol**, iv) l'imagerie *in vivo* confirme la présence de *scyllo*-inositol dans le cerveau des souris recevant une dose de 9% d'*Hypochœris radicata.*

Cependant, après ces premiers éléments de réponse, une question légitime se pose : comment distinguer une réponse adaptative de l'organisme animal à la suite d'un changement alimentaire, de réels désordres métaboliques induits par un toxique présent dans l'aliment ? En effet, la métabonomique, en étudiant le métabolisme général au niveau de la matrice urinaire, est apte à déceler des perturbations toxiques mais aussi des modifications de la flore bactérienne dans le tractus digestif. De telles modifications et **adaptations de la flore** sont retrouvées de façon récurrente dans les études de métabonomique dans lesquelles des régimes différents sont testés et où les augmentations en **hippurate**, par exemple, sont régulièrement citées (*18,19*). La connaissance et la maîtrise des facteurs alimentaires est donc un premier facteur essentiel à prendre en compte lors de l'interprétation de profils métaboliques, notamment urinaires (*20*). Le fait d'avoir au préalable réalisé un **réajustement nutritionnel des régimes** lorsque la dose d'*Hypochœris radicata* incorporée était forte (9%) a constitué un point positif qui devrait être mis en œuvre systématiquement lorsque la métabonomique est utilisée pour des recherches en toxicologie. Ceci est capital **pour éviter des confusions de facteurs** et ne pas interpréter des déficits ou excès en nutriments en potentialités subtoxiques.

Une augmentation en hippurate associée à la dose est retrouvée dans les profils urinaires étudiés chez le rat ou chez la souris. Cependant, les analyses factorielles soulignent que cette augmentation est associée à la présence d'un autre biomarqueur, le ***scyllo*-inositol**. Ce dernier est étranger à la matrice urinaire ou tout du moins normalement absent de ce biofluide, et non décrit lors de changements alimentaires. Sa présence dans le système nerveux central, les urines, le plasma et le foie et son augmentation dose-dépendante laissent supposer que ce métabolite constitue la **signature spécifique liée à l'ingestion d'*Hypochœris radicata*.** Les profils métaboliques des animaux ayant ingeré *Hypochœris radicata* ne sont donc pas uniquement de simples reflets de changements alimentaires mais bien une **conséquence de perturbations subtoxiques**. Si les résultats issus des analyses statistiques des matrices urinaires ont montré une évolution et une contribution de l'hippurate et du *scyllo*-inositol, chacun de ces métabolites n'a **pas le même poids en termes d'interprétation** des perturbations métaboliques.

A ce stade, la difficulté à laquelle nous nous heurtons concerne la **provenance du *scyllo*-inositol**. Ce métabolite est-il biosynthétisé dans l'organisme animal ? Est-ce un composé issu d'*Hypochœris radicata* ou un métabolite formé dans l'organisme animal ? En effet, dès 1971, Plouvier avait déjà mentionné sa large répartition dans les **feuilles** et les tiges

vertes feuillées des **Composées** (*21*) et des Malvacées (*22*), et avait émis l'hypothèse que du *scyllo*-inositol pourrait être présent dans d'autres organes. Une étude plus récente (2000) a identifié de nouveau ce composé dans les feuilles et les **inflorescences du Chrysanthème** (*23*). La concentration de *scyllo*-inositol pourrait augmenter lors de **stress hydrique**, car il a été montré que le métabolisme du *myo*-inositol et des inositols phosphates est très souvent exacerbé lors de réponse au stress (*24*). Ceci peut être mis en relation avec les épizooties de harper qui apparaissent lors d'étés particulièrement chauds et secs (*3, 25-31*).

Cependant, la présence de *scyllo*-inositol dans la plante peut-elle expliquer l'augmentation du *scyllo*-inositol dans l'encéphale des animaux qui en consomment ? Stewart *et al.*, lors de tests de régimes synthétiques contenant ou non du *myo*-inositol (125 mg/kg d'aliment) effectués chez le rat, ont montré que de tels régimes n'entrainaient pas d'augmentation de la concentration en inositols des tissus nerveux (*32,33*). Cette conclusion a été confortée, sur rat et lapin, par Sherman *et al.*. Ces derniers ont conclu que les *myo* et *scyllo*-inositols alimentaires ne contribuaient pas, de façon appréciable, à l'augmentation de la concentration en inositols des tissus et, ne pouvaient constituer l'unique source de variation en *scyllo*-inositol qu'ils observaient (*34*). De plus, Moore *et al.* ont souligné que l'augmentation en *myo*-inositol dans le cerveau humain après en avoir ingéré était limitée dans le temps (*35*). Après une augmentation dès le quatrième jour, les concentrations revenaient à des valeurs physiologiques dès le huitième jour, même si l'apport de *myo*-inositol était prolongé.

Dans nos expérimentations, l'augmentation de *scyllo*-inositol observée chez les souris ne présente pas de plafond ni de retour à des valeurs initiales même après 21 jours, ce qui suggère que ce résultat n'est pas seulement le reflet d'un état transitoire lié à un changement alimentaire mais plus probablement **la résultante de disruptions métaboliques dans l'équilibre *scyllo*-inositol ↔ *myo*-inositol** soulignant ainsi une réelle **modification dans les mécanismes d'homéostasie métabolique** ainsi que dans les **voies métaboliques des inositols**.

Au stade actuel, nous ne pouvons prétendre répondre à la question de l'origine du *scyllo*-inositol, n'ayant pas étudié la composition chimique du végétal. Mais l'objectif de cette étape initiale était de renseigner sur la **description des disruptions** engendrées et non sur l'origine des disrupteurs.

Ainsi, sans *a priori* concernant le(s) tissu(s) cible(s), l'étude des **urines** et des extraits **hépatiques**, qui sont le reflet du **métabolisme général**, a permis d'avoir une première image des perturbations induites par l'ingestion de *Hypochœris radicata*. Clairement établie **à partir du quatrième jour** dans les urines et visualisable par une **inflexion dans les orientations métaboliques**, une réponse à l'intoxication à *Hypochœris radicata*, similaire quel que soit le sexe, amplifiée avec la dose a pu être matérialisée avec une **augmentation** de la concentration en ***scyllo*-inositol**. Ce premier élément de réponse a permis d'orienter les recherches au niveau du **système nerveux central**. En effet, ce tissu est le seul, jusqu'à présent, où le *scyllo*-inositol a pu être recensé.

La capacité et la puissance de la métabonomique a révélé **un métabolite spécifique à l'intoxication,** qui, après des recherches d'informations dans le domaine des pathologies comparées, a conduit à mieux circonscrire certaines voies métaboliques pouvant être affectées.

En effet, le ***scyllo*-inositol** est l'un des 9 stéréoisomères d'inositol dont le ***myo*-inositol** (*Figure II.34*). A eux deux, ils représentent les **principaux inositols** présents dans l'organisme animal, retrouvés et mesurés dans de nombreux tissus (*34,36*).

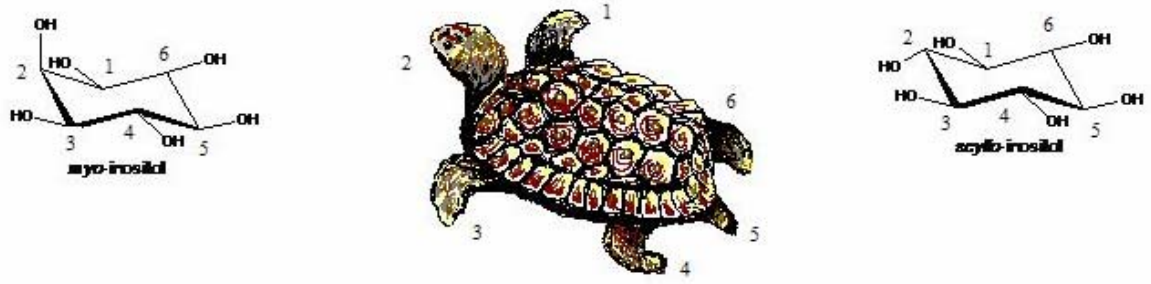


Figure II.34 : Structures et nomenclature du myo et du scyllo-inositol. Vues en configuration « chaise ». Le *myo*-inositol possède un groupe hydroxyle en position axiale et 5 groupements hydroxyle en position équatoriale. Le *scyllo*-inositol ne diffère du *myo*-inositol que par le groupement hydroxyle 2 en position non pas axiale mais équatoriale. Le moyen mnémotechnique consiste à visualiser la molécule en trois dimensions sous forme de tortue chez laquelle la tête (axiale) correspond à la position 2 et la patte avant à la position 1. Le *myo*-inositol constitue un des neufs isomères possibles d'hexahydrocyclohexane et reste l'isomère le plus abondant dans la nature. Le terme de « cyclitol » peut être employé en référence aux 9 isomères d'inositol pris collectivement.

Contrairement au *scyllo*-inositol sur lequel les connaissances sont limitées, le ***myo*-inositol** est relativement bien connu. Il constitue près de **90%** des inositols totaux retrouvés dans le corps, en majeure partie dans les reins, le foie mais surtout dans le cerveau. Ses rôles sont très nombreux. Parmi ceux-ci, il intervient dans les processus d'**osmorégulation** *via* sa forme libre (*37*) mais est aussi sous sa forme phosphorylée, un précurseur fondamental des **inositides** et particulièrement du **phosphatidylinositol**, constituant **membranaire** et **second messager** impliqué dans la transduction du signal au niveau des récepteurs neuronaux. Le ***scyllo*-inositol**, second inositol le plus représenté, dériverait, d'après les données actuelles, du *myo*-inositol *via* le *myo*-inosose (*34,38,39*). Il se situe exclusivement au sein des **systèmes nerveux périphérique et central**. Physiologiquement, il est présent en **très faibles quantités** par rapport aux autres métabolites cérébraux. Ses **fonctions** physiologiques sont **inconnues**. Cependant, une **augmentation** relative de sa concentration au sein du système nerveux est recensée dans de nombreuses **neuropathologies**. Ainsi, il a été démontré que ce métabolite constituait un marqueur cérébral des disruptions métaboliques observées lors **d'alcoolisme chronique** (*40*). De même, la teneur en *scyllo*-inositol est augmentée au sein de cerveaux de patients atteints de la **maladie d'Alzheimer** (*41*). Une des différences existantes entre ces affections et les profils métaboliques des rongeurs étudiés ici réside dans le fait que l'évolution des concentrations du *scyllo*-inositol et du *myo*-inositol va dans le même sens, les deux ayant des teneurs augmentées chez les patients malades alors que nos résultats montrent une anticorrélation. Ceci pourrait rendre compte en fait de certaines différences dans les processus toxicologiques impliqués.

Il apparaît aussi important de souligner que le *scyllo* et le *myo*-inositol sont reliés à l'activité **des pompes à sodium** et, de ce fait, sont impliqués dans les fonctions de **vélocité et de conduction nerveuse** au sein des nerfs périphériques. Il a pu être mentionné que ces fonctions peuvent être altérées en cas de **neuropathie diabétique périphérique** accompagnée **d'axonopathie distale**, touchant majoritairement les **axones myélinisés de large diamètre** (*42*). Or, chez des chevaux atteints de harper, les lésions histologiques montrent une axonopathie distale périphérique impliquant les fibres nerveuses de large diamètre des membres postérieurs (*4,5,43*).

De plus, même si le *scyllo*-inositol ressort comme majoritairement impliqué dans le facteur dose, d'autres métabolites, de contribution relative moindre, sont intéressants à étudier et interpréter. En considérant les données de métabonomique issues des extraits aqueux de

cerveau (*Tableau II.12*), l'**inosine** apparaît comme augmentée. Ce métabolite, intervient *via* le relargage d'adénosine pour compenser des dysfonctionnements métaboliques découlant d'états de **stress oxydatif** comme l'**hypoxie** (*44*), **l'ischémie-reperfusion** (*45*) ou l'**inflammation** (*46*), assurant ainsi une certaine préservation de la viabilité cellulaire des cellules gliales et des neurones. L'élévation en **créatine** semble aussi être un signe de disruptions métaboliques au niveau cérébral (*47*) et de remaniements concernant les métabolites cérébraux allant dans le sens d'une activité cellulaire et de transmission neuronale accrues (*48*). Les diminutions conjointes d'alanine, valine et glutamate obtenues dans les extraits de cerveaux de souris ont été également soulignées lors de l'étude de l'effet de neurotoxique chez le rat (*49*).

Un des points forts de notre étude a été de pouvoir confronter les résultats des signatures métaboliques au niveau du cerveau avec des données quantitatives d'imagerie sur animal vivant. Cette démarche, dont la résultante est matérialisée par le biplot de la *Figure II.33*, a permis de conforter la présence inhabituelle de *scyllo*-inositol au sein de l'encéphale et de révéler d'autres biomarqueurs de désordres neuronaux engendrés par l'ingestion d'*Hypochœris radicata,* comme le **N-Acétyl-Aspartate** (NAA), le lactate, la choline et le complexe glutamate/glutamine. En effet, la signature en fonction de la dose d'*Hypochœris radicata* s'accompagnait d'une augmentation en NAA. Cet acide aminé, métabolite essentiel du système nerveux central, présente de très fortes concentrations au sein du cerveau même si ses rôles précis y sont encore **méconnus** (*50*). Son intérêt réside surtout dans le fait que de nombreuses études ont présenté sa **diminution** comme un **marqueur de pertes neuronales**, ce qui permet même de mesurer l'état de **neurodégénérescence** lors de neuropathologies. La seule pathologie pour laquelle on observe non pas une diminution mais une **augmentation** de ce composé est **le syndrome de Cavanan**, une leucodystrophie rare affectant les jeunes enfants et qui est due à une mutation de l'enzyme aspartoacyclase qui permet de cliver le NAA en acétyl et aspartate (*51,52*). De plus, ce syndrome est associée à une dégénérescence spongieuse avec **atrophie cérébrale démyélinisante progressive**. Ce tableau renvoie aux données concernant le harper pour lequel il a été rapporté des démyélinisations/remyélinisations segmentaires (*43*) avec atteinte des nerfs (*5*) et, dans quelques cas, des lésions de cavitation et de **leucoencéphalomalacie** (*3*).

De plus, l'implication de la balance **glutamine/glutamate** est encore un élément supplémentaire confortant la présence de désordres métaboliques neuronaux. En effet, de par

son rôle de premier neuromédiateur excitateur, le glutamate est impliqué dans les **dysfonctionnements de transmissions nerveuses** et le phénomène d'**excitotoxicité** présents dans la **maladie d'Alzheimer** (*53-55*). Ces modifications dans le cycle glutamine/glutamate peuvent également souligner certaines **disruptions dans la détoxification cellulaire** ainsi qu'un **déséquilibre entre cellules gliales et neurones** (*56,57*).

Enfin, l'analyse PLS2 a également fait ressortir que le traitement avec *Hypochœris radicata* s'accompagnait d'une augmentation en lactate et en choline. L'intervention du **lactate** peut être à rapprocher de l'augmentation en inosine. En effet, l'altération du métabolisme énergétique et une diminution de la production d'énergie aérobie au sein des mitochondries génèrent une compensation relative **anaérobie** grâce à la voie de la glycolyse menant à terme à la production de lactate (*58*).

L'augmentation de **choline** signe un état de **démyélinisation** car ce composé est habituellement rattaché à la myéline (*59*) mais également une **dégradation membranaire** exacerbée, en tant que composant essentiel des membranes (*58*). De plus, certains auteurs ont pu montrer qu'une augmentation en choline pouvait traduire un état pré-lésionnel sans atteinte concomitante de la gaine de myéline (*59*) mais juste un **état inflammatoire** accompagné de **prolifération de cellules gliales** (*60*), comme cela a pu être mis en évidence dans la maladie d'Alzheimer (*61,62*).

En résumé, tous ces changements métaboliques cérébraux attestent de **disruptions** évidentes affectant de façon conjointe les **neurones et les cellules gliales** et pouvant entraîner à plus long terme des **désordres fonctionnels dans l'homéostasie et l'osmorégulation, dans le métabolisme énergétique ainsi que dans la transmission nerveuse.** Cette première étape qui se devait de mieux circonscrire l'impact toxique potentiel de l'ingestion d'*Hypochœris radicata* doit maintenant être étayée par des données plus précises concernant les éventuelles fonctions impliquées.

Comme les changements de concentrations en inositols ont pu être mis en évidence lors de **désordres cognitifs, psychiatriques et comportementaux** (*41,63,64*) tels que la trisomie 21 ou dans le cerveau et le liquide cérébrospinal de patients suicidaires (*65*) ou dépressifs (*66*), nous avons voulu étudier le comportement des animaux intoxiqués afin d'obtenir ou non des données pouvant venir étayer les premiers résultats.

Dans cette optique nous avons décidé d'étudier d'éventuels **troubles du comportement** sur modèle rongeur, ceci en collaboration avec le Docteur Henri Schroeder et son équipe spécialisée dans le neurocomportement à l'Université Henri Poincaré à Nancy.

Sans connaître les effecteurs ou les tissus potentiellement cibles, la réalisation concomitante et complémentaire de la **métabonomique et de l'IRM** a permis de remonter à un **biomarqueur de perturbations neuronales et gliales, impliqué dans d'autres affections nerveuses connues.**

C'est la première fois à ce jour que la métabonomique est utilisée dans un tel domaine d'exploration toxicologique. Ces premiers résultats nous ont permis de nous diriger progressivement vers une **prospection plus approfondie du système nerveux central** qui semble bien être un **organe-clé dans la compréhension de la pathologie du harper**.

Les manifestations cliniques entre maladies, les mécanismes impliqués, les principes actifs responsables peuvent différer les uns des autres, mais il est indéniable qu'une certaine **communauté de caractères** existe **entre les espèces** mais également entre les affections qui peuvent être retrouvées de façon récurrente. Les travaux de métabonomique menés ici se basent sur le **concept d'orthologie**. Même si le métabolisme du rat, de la souris et du cheval diffèrent, les « règles » et conclusions pouvant être observées chez une espèce peuvent être, non pas extrapolées, mais réutilisées chez une autre espèce. En nous basant sur cette hypothèse puissante, nous avons contribué **à reconsidérer l'approche toxicologique classique.**

Références

(1) Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E., (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica, 29*, 1181-1189.

(2) Nicholson, J.K., Connelly, J., Lindon, J.C., and Holmes, E., (2002) Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov., 1*, 153-161.

(3) Robertson-Smith, R.G., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., and Badcoe, L.M., (1985) An unusual incidence of neurological disease affecting horses during a drought. *Aust. Vet. J., 62*, 6-12.

(4) Huntington, P.J., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., Luff, A.R., Finkelstein, D.I., and Flynn, R.J., (1989) Australian Stringhalt-epidemiological, clinical and neurological investigations. *Equine Vet. J., 21*, 266-273.

(5) Slocombe, R.F., Huntington, P.J., Friend, S.C., Jeffcott, L.B., Luff, A.R., and Finkelstein, D.K., (1992) Pathological aspects of Australian Stringhalt. *Equine Vet. J., 24*, 174-183.

(6) Von Kienlin, M., Kunnecke, B., Metzger, F., Steiner, G., Richards, J.G., Ozmen, L., Jacobsen, H., and Loetscher, H., (2005) Altered metabolic profile in the frontal cortex of PS2APP transgenic mice, monitored throughout their life span. *Neurobiol. Dis., 18*, 32-39.

(7) Dedeoglu, A., Choi, J.K., Cormier, K., Kowall, N.W., and Jenkins, B.G., (2004) Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain Res., 1012*, 60-65.

(8) Tkac, I., Dubinsky, J.M., Keene, C.D., Gruetter, R., and Low, W.C., (2007) Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo ^{1}H NMR spectroscopy. *J. Neurochem., 100*, 1397-1406.

(9) Normalisation, A.f.d., (1993) Produits agricoles et alimentaires. Détermination de la cellulose brute. Méthode générale. Norme NF V03-040. *Assoc. Franç. Normal., Paris France.*

(10) Hennebeg, W. and Stohmann, F., (1859) Uber das Erhaltungsfutter volljahrigen Rindviehs. *J. Landwirtsch, 34*, 485-551.

(11) Normalisation, A.F.d., (1977) Aliments des animaux. Dosage de l'azote en vue du calcul de la teneur en protéines brutes (EQV ISO 5983). Norme NF V18-100. *Assoc. Franç. Normal., Paris France.*

(12) Lee S.C., Prosky L., and J.W., V., (1992) Fiber in foodsenzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer : collaborative study. *J. Assoc. Anal. Chem., 75*, 395-416.

(13) Van Soest, P.J. and H., W.R., (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plant cell wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 50-50.

(14) Van Soest, P.J., Robertson, J.B., and Lewis, B.A., (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci., 74*, 3583-3597.

(15) Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J.A., and Le, B.N., (1951) Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem., 191*, 833-841.

(16) Waters, N.J., Holmes, E., Waterfield, C.J., Farrant, R.D., and Nicholson, J.K., (2002) NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with [alpha]-naphthylisothiocyanate. *Biochem. Pharmacol., 64*, 67-77.

(17) Dumas, M.E., Canlet, C., Andre, F., Vercauteren, J., and Paris, A., (2002) Metabonomic assessment of physiological disruptions using ^{1}H-^{13}C HMBC-NMR spectroscopy

combined with pattern recognition procedures performed on filtered variables. *Anal. Chem.*, *74*, 2261-2273.
(18) Nicholls, A.W., Mortishire-Smith, R.J., and Nicholson, J.K., (2003) NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats. *Chem. Res. Toxicol.*, *16*, 1395-1404.
(19) Phipps, A.N., Stewart, J., Wright, B., and Wilson, I.D., (1998) Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica*, *28*, 527-537.
(20) Lenz, E.M., Bright, J., Wilson, I.D., Hughes, A., Morrisson, J., Lindberg, H., and Lockton, A., (2004) Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ^{1}H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *36*, 841-849.
(21) Plouvier, V., (1971) New study of scyllitol in some botanical groups: its broad distribution in the Compositae. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *273*, 1625-1628.
(22) Plouvier, V., (1971) Research of scyllitol, *myo*-inositol and dulcitol in some botanical divisions. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *272*, 141-144.
(23) Ichimura, K., Kohata, K., Yamaguchi, Y., Douzono, M., Ikeda, H., and Koketsu, M., (2000) Identification of L-inositol and scyllitol and their distribution in various organs in chrysanthemum. *Biosci Biotechnol Biochem*, *64*, 865-8.
(24) Loewus, F.A. and Murthy, P.P.N., (2000) *Myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.*, *150*, 1-19.
(25) Cahill, J.I. and Goulden, B.E., (1992) Stringhalt-current thoughts on aetiology and pathogenesis. *Equine Vet. J.*, *24*, 161-162.
(26) Galey, F.D., Hullinger, P.J., and McCaskill, J., (1991) Outbreaks of stringhalt in northern California. *Vet. Hum. Toxicol.*, *33*, 176-177.
(27) Gardner, S.Y., Cook, A.G., Jortner, B.S., Troan, B.V., Sharp, N.J.H., Campbell, N.B., and Brownie, C.F., (2005) Stringhalt associated with a pasture infested with *Hypochoeris radicata*. *Equine vet. Educ.*, *17*, 118-122.
(28) Gay, C.C., Fransen, S., Richards, J., and Holler, S., (1993) *Hypochoeris*-associated stringhalt in North America. *Equine Vet. J.*, *25*, 456-457.
(29) Araya, O., Krause, A., and Solis de Ovando, M., (1998) Outbreaks of stringhalt in southern Chile. *Vet. Rec.*, *142*, 462-463.
(30) Cahill, J.I., Goulden, B.E., and Pearce, H.G., (1985) A review and some observations on stringhalt. *N. Z. Vet. J.*, *33*, 101-104.
(31) Gouy, I., Egron, G., Leblond, A., and Cadoré, J.L., (2005) Etude de cas de harper australien après sa recrudescence dans la région lyonnaise. *Prat. Vét. Equine*, *37*, 53-60.
(32) Stewart, M.A., Kurien, M.M., Sherman, W.R., and Cotlier, E.V., (1968) Inositol changes in nerve and lens of galactose fed rats. *J. Neurochem.*, *15*, 941-946.
(33) Stewart, M.A., Sherman, W.R., Kurien, M.M., Moonsammy, G.I., and Wisgerhof, M., (1967) Polyol accumulations in nervous tissue of rats with experimental diabetes and galactosaemia. *J. Neurochem.*, *14*, 1057-1066.
(34) Sherman, W.R., Stewart, M.A., Kurien, M.M., and Goodwin, S.L., (1968) The measurement of *myo*-inositol, *myo*-inosose-2 and *scyllo*-inositol in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, *158*, 197-205.
(35) Moore, C.M., Breeze, J.L., Kukes, T.J., Rose, S.L., Dager, S.R., Cohen, B.M., and Renshaw, P.F., (1999) Effects of *myo*-inositol ingestion on human brain *myo*-inositol

levels: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Biol. Psychiatry*, *45*, 1197-1202.

(36) Sherman, W.R., Stewart, M.A., Simpson, P.C., and Goodwin, S.L., (1968) The identification of *myo*-inososе-2 and *scyllo*-inositol in mammalian tissues. *Biochemistry*, *7*, 819-824.

(37) Fisher, S.K., Novak, J.E., and Agranoff, B.W., (2002) Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.*, *82*, 736-754.

(38) Helleu, C., (1957) Elimination urinaire du mésoinositol en relation avec le système digestif. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, *39*, 633-640.

(39) Fenili, D., Brown, M., Rappaport, R., and McLaurin, J., (2007) Properties of *scyllo*-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. *J. Mol. Med.*, *85*, 603-611.

(40) Viola, A., Nicoli, F., Denis, B., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Ranjeva, J.P., Viout, P., and Cozzone, P.J., (2004) High cerebral *scyllo*-inositol: a new marker of brain metabolism disturbances induced by chronic alcoholism. *MAGMA*, *17*, 47-61.

(41) Griffith, H.R., den Hollander, J.A., Stewart, C.C., Evanochko, W.T., Buchthal, S.D., Harrell, L.E., Zamrini, E.Y., Brockington, J.C., and Marson, D.C., (2007) Elevated brain *scyllo*-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed.*, *20*, 709-716.

(42) Hirano, F., Tanaka, H., Okamoto, K., Makino, Y., Inaba, M., Nomura, Y., Fukawa, E., Miura, T., Tani, T., and Makino, I., (1995) Natural course of diabetic peripheral neuropathy in spontaneous-onset diabetic Chinese hamsters. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, *28*, 151-159.

(43) Cahill, J.I., Goulden, B.E., and Jolly, R.D., (1986) Stringhalt in horses: a distal axonopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, *12*, 459-475.

(44) Litsky, M.L., Hohl, C.M., Lucas, J.H., and Jurkowitz, M.S., (1999) Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia. *Brain Res.*, *821*, 426-432.

(45) Hsiao, G., Lin, K.H., Chang, Y., Chen, T.L., Tzu, N.H., Chou, D.S., and Sheu, J.R., (2005) Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *25*, 1998-2004.

(46) Yang, J.H., Luo, X., Nie, Y., Su, Y., Zhao, Q., Kabir, K., Zhang, D., and Rabinovici, R., (2003) Widespread inosine-containing mRNA in lymphocytes regulated by ADAR1 in response to inflammation. *Immunology*, *109*, 15-23.

(47) Ross, B. and Bluml, S., (2001) Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Anat. Rec.*, *265*, 54-84.

(48) Bluml, S., Zuckerman, E., Tan, J., and Ross, B.D., (1998) Proton-decoupled ^{31}P magnetic resonance spectroscopy reveals osmotic and metabolic disturbances in human hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.*, *71*, 1564-1576.

(49) Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y., Kondo, A., Maihara, T., Yokoi, N., Kuramoto, T., Sasa, M., and Serikawa, T., (2000) Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J. Neurochem.*, *74*, 2512-2519.

(50) Moffett, J.R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C.N., and Namboodiri, A.M., (2007) N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.*, *81*, 89-131.

(51) Austin, S.J., Connelly, A., Gadian, D.G., Benton, J.S., and Brett, E.M., (1991) Localized ^{1}H NMR spectroscopy in Canavan's disease: a report of two cases. *Magn. Reson. Med.*, *19*, 439-445.

(52) Grodd, W., Krageloh-Mann, I., Petersen, D., Trefz, F.K., and Harzer, K., (1990) In vivo assessment of N-acetylaspartate in brain in spongy degeneration (Canavan's disease) by proton spectroscopy. *Lancet, 336*, 437-438.

(53) Scott, H.L., Pow, D.V., Tannenberg, A.E., and Dodd, P.R., (2002) Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J. Neurosci., 22*, RC206.

(54) Kirvell, S.L., Esiri, M., and Francis, P.T., (2006) Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurochem., 98*, 939-950.

(55) Moussa, C.E., Rusnak, M., Hailu, A., Sidhu, A., and Fricke, S.T., (2008) Alterations of striatal glutamate transmission in rotenone-treated mice: MRI/MRS in vivo studies. *Exp. Neurol., 209*, 224-233.

(56) Danbolt, N.C., (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol., 65*, 1-105.

(57) Pears, M.R., Cooper, J.D., Mitchison, H.M., Mortishire-Smith, R.J., Pearce, D.A., and Griffin, J.L., (2005) High resolution ^{1}H NMR-based metabolomics indicates a neurotransmitter cycling deficit in cerebral tissue from a mouse model of Batten disease. *J. Biol. Chem., 280*, 42508-42514.

(58) Ross, A.J. and Sachdev, P.S., (2004) Magnetic resonance spectroscopy in cognitive research. *Brain Res. Brain. Res. Rev., 44*, 83-102.

(59) Tartaglia, M.C., Narayanan, S., De Stefano, N., Arnaoutelis, R., Antel, S.B., Francis, S.J., Santos, A.C., Lapierre, Y., and Arnold, D.L., (2002) Choline is increased in pre-lesional normal appearing white matter in multiple sclerosis. *J. Neurol., 249*, 1382-1390.

(60) Brenner, R.E., Munro, P.M., Williams, S.C., Bell, J.D., Barker, G.J., Hawkins, C.P., Landon, D.N., and McDonald, W.I., (1993) The proton NMR spectrum in acute EAE: the significance of the change in the Cho:Cr ratio. *Magn. Reson. Med., 29*, 737-745.

(61) MacKay, S., Meyerhoff, D.J., Constans, J.M., Norman, D., Fein, G., and Weiner, M.W., (1996) Regional gray and white matter metabolite differences in subjects with AD, with subcortical ischemic vascular dementia, and elderly controls with ^{1}H magnetic resonance spectroscopic imaging. *Arch. Neurol., 53*, 167-174.

(62) Kaiser, E., Chiba, P., and Zaky, K., (1990) Phospholipases in biology and medicine. *Clin. Biochem., 23*, 349-370.

(63) Shetty, H.U., Holloway, H.W., and Schapiro, M.B., (1996) Cerebrospinal fluid and plasma distribution of *myo*-inositol and other polyols in Alzheimer disease. *Clin. Chem., 42*, 298-302.

(64) Atack, J.R. and Schapiro, M.B., (2002) Inositol monophosphatase activity in normal, Down syndrome and dementia of the Alzheimer type CSF. *Neurobiol. Aging, 23*, 389-396.

(65) Shimon, H., Agam, G., Belmaker, R.H., Hyde, T.M., and Kleinman, J.E., (1997) Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *Am. J. Psychiatry, 154*, 1148-1150.

(66) Barkai, A.I., Dunner, D.L., Gross, H.A., Mayo, P., and Fieve, R.R., (1978) Reduced *myo*-inositol levels in cerebrospinal fluid from patients with affective disorder. *Biol. Psychiatry, 13*, 65-72.

CHAPITRE III

DONNEES DE COMPORTEMENT

III. Chapitre III : Données de comportement

Introduction

Chez le cheval, la traduction clinique du **harper australien** est d'ordre **neuro-musculaire** et s'accompagne au niveau histopathologique de lésions **d'axonopathie distale périphérique,** associées à une atrophie musculaire neurogénique au niveau des membres postérieurs (*1-3*). Cette **atteinte du système nerveux périphérique,** matérialisée par une atteinte motrice nous a semblé aussi être associée à des **troubles de comportement.** Cependant, ces derniers n'ont, jusqu'à ce jour, été relatés que de manière purement **subjective**. En effet, l'animal semble présenter de l'abattement, des sautes d'humeurs, un état proche de ce qui pourrait s'apparenter à de la dépression chez l'homme. Même si ces observations apparaissent non objectivées puisque la prospection du statut comportemental reste délicate chez le cheval (*4*) et, même si la transposition des atteintes comportementales entre espèces doit être faite avec la plus grande précaution, elles n'en méritent pas moins d'être mentionnées.

Jusqu'à ce jour, contrairement aux lésions périphériques, **aucune atteinte du système nerveux central** n'a pu être recensée au niveau histopathologique. Cependant, des travaux préliminaires, effectués lors du Master, ont suggéré l'éventuelle implication de l'ingestion d'*Hypochœris radicata* dans des troubles du système nerveux central. L'étude consistait en une approche histopathologique réalisée sur des rats recevant 1% d'*Hypochœris radicata* dans leur ration. Lors de l'euthanasie des animaux, avant leur sacrifice et autopsie, la perte de conscience réalisée au Pentobarbital sodique, habituellement obtenue pour une dose de 1 mL/kg, a nécessité de multiplier cette dose par 1,5 pour les femelles ingérant la plante. Cette simple constatation nous a laissé supposer que l'ingestion du végétal, chez le cheval, pouvait éventuellement avoir un impact au niveau du système nerveux central, ceci se traduisant par une **élévation de l'excitabilité, voire de l'agressivité chez le rat**. Cet état chez le rat ne peut pas être qualifié de pathologique car ni symptôme ni lésion n'ont pu être mis en évidence. En effet, les études macroscopiques et histologiques réalisées au niveau de l'encéphale, de la moelle épinière, du foie, des reins, de l'iléon, des muscles et des nerfs périphériques des membres postérieurs et antérieurs n'ont pas révélé de lésion (travaux en collaboration avec le Docteur A. Casteignau et le Docteur M. Pumarola de l'Université Autonome de Barcelone).

Cependant, cette observation doit être mise en relation avec les études de métabonomique et d'IRM que nous avons réalisées. En effet, celles-ci ont révélé la présence et l'**augmentation dose-dépendante du *scyllo*-inositol** au sein de la **matrice cérébrale,** chez des animaux nourris avec un régime comportant 3 à 9% d'*Hypochœris radicata*. Or, l'implication d'un tel métabolite est connu dans certains troubles du comportement et/ou dans certaines atteintes du système nerveux central (*5-9*). Aussi, il nous a paru nécessaire d'accéder à l'intégrité de ce dernier en privilégiant les **fonctions atteintes plutôt** que les métabolites impliqués chez les animaux consommant le toxique.

Concrètement, **l'accessibilité du système nerveux central est limitée et réduite**. La métabonomique et l'IRM ont la capacité de révéler des perturbations d'ordre métabolique au niveau cérébral, sans forcément que cela soit accompagné de troubles fonctionnels. Une autre approche complémentaire doit permettre d'explorer l'intégrité des fonctions non décelables classiquement. Tout comme l'approche métabonomique, **l'exploration comportementale** réalisée ici s'est faite sans *a priori* sur les zones, structures ou fonctions pouvant être altérées ou simplement impliquées. La confirmation de la souris en tant que modèle de disruptions métaboliques nous a permis de reprendre ce même modèle afin d'explorer la composante comportementale. Cette étude a donc eu pour but d'accéder à l'intégrité cérébrale en **testant différents registres comportementaux** incluant la **mémoire, l'anxiété, l'activité et le comportement social**. Une **batterie de 8 tests** a ainsi été testée sur **24 animaux**. Ces tests peuvent être classés en 4 catégories : ceux testant les processus d'**apprentissage** avec plus globalement la **mémorisation temporelle, spatiale** (labyrinthe aquatique de Morris, labyrinthe en Y), ceux révélant un éventuel **état d'anxiété** (labyrinthe en croix surélevé, planche à trous), avec le cas spécifique du test de la nage forcée de Porsolt rendant compte du **niveau de résignation ou de motivation,** ceux étudiant d'éventuels **troubles de l'activité locomotrice ainsi que de la coordination motrice** (Locotronic, Openfield) et enfin un test plus général, appréhendant différentes facettes des **comportements sociaux** (Résident-intru). La réalisation et l'exploitation de tels tests n'étant pas triviale, les travaux ont été réalisés et supervisés par le Dr Henri Schroeder et son équipe au sein de l'URAFPA (Unité de Recherche Animal & Fonctionnalités des Produits Animaux), laboratoire relevant de l'Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL) et de l'Université Henri Poincaré (UHP), et associé à l'INRA (UC340).

Dans un premier temps, seront exposés un résumé des tests effectués puis les principaux résultats obtenus. Puis, en établissant un **profil comportemental général**, nous tenterons de donner certains éléments de réponse et/ou d'interprétation concernant les résultats comportementaux obtenus, toujours en confrontant ceux-ci avec les données précédentes de clinique, de métabonomique et d'imagerie. Le but est de donner et de préciser certaines **hypothèses de voies métaboliques nerveuses pouvant être impliquées** dans l'intoxication par *Hypochœris radicata*.

A. Matériel et Méthodes

1. Animaux

30 souris mâles, de souche C57BL/6J (Harlan, Jackson Lab), âgées d'au minimum 8 semaines en début d'expérimentation (18-20 g) ont été utilisées.

Les animaux ont subi une première période d'adaptation d'une semaine, durant laquelle ils ont eu libre accès à l'eau et à l'aliment conventionnel UAR 210. Ils ont été maintenus dans un environnement contrôlé, caractérisé par un cycle lumineux artificiel (12h/12h, jour/nuit, éclairage dès 7h du matin), une humidité relative de 40 ± 5% et une température ambiante de 22 ± 2°C. Pendant la phase d'obscurité, la salle d'hébergement des animaux a été éclairée avec une lumière rouge de faible intensité, non perçue par les souris et ne perturbant pas le cycle veille/sommeil des animaux.

Les animaux ont été répartis aléatoirement en **10 lots** de 3 animaux, en fonction du régime et de la finalité (*Tableau III.1*) :

Les lots A, B, C, D et I correspondaient à la série 1, les lots E, F, G, H et J, à la série 2.

- Les lots **A, C, E et G** sont des lots **témoins** et les animaux ont été nourris uniquement avec de l'aliment UAR 210 en poudre, à hauteur de 5 g/animal/jour.
- Les lots **B, D, F et H** correspondent aux lots testant l'ingestion **d'*Hypochœris radicata*** et nourris avec un mélange d'aliment UAR 210 et de 9% poudre d'inflorescence *d'Hypochœris radicata*, à hauteur de 5 g/animal/jour.
- Les lots **I et J** constituent des lots contenant les **résidents** pour le test du « résident-intrus » et nourris uniquement avec de l'aliment UAR 210 en poudre, à hauteur de 5 g/animal/jour.

Au sein de chaque cage, les souris ont été identifiées par un système de code de points : 1 point, 2 points ou absence de marque, le tout ayant été réalisé au feutre indélébile noir sur la partie proximale de la queue.

Tableau III.1 : Répartition des animaux au sein des lots en fonction du traitement : Témoin ou 9% d'Hypochœris radicata (HR), du numéro de cage (A-J), de l'appartenance à une série et donc à la date de passage.

Identifiant souris	N° cage	N° souris dans la cage	N° série	Traitement
A0	A	0	Série 1	Témoin
A1	A	1	Série 1	Témoin
A2	A	2	Série 1	Témoin
B0	B	0	Série 1	HR 9%
B1	B	1	Série 1	HR 9%
B2	B	2	Série 1	HR 9%
C0	C	0	Série 1	Témoin
C1	C	1	Série 1	Témoin
C2	C	2	Série 1	Témoin
D0	D	0	Série 1	HR 9%
D1	D	1	Série 1	HR 9%
D2	D	2	Série 1	HR 9%
E0	E	0	Série 2	Témoin
E1	E	1	Série 2	Témoin
E2	E	2	Série 2	Témoin
F0	F	0	Série 2	HR 9%
F1	F	1	Série 2	HR 9%
F2	F	2	Série 2	HR 9%
G0	G	0	Série 2	Témoin
G1	G	1	Série 2	Témoin
G2	G	2	Série 2	Témoin
H0	H	0	Série 2	HR 9%
H1	H	1	Série 2	HR 9%
H2	H	2	Série 2	HR 9%
I0	I	0	Série 1	Résident
I1	I	1	Série 1	Résident
I2	I	2	Série 1	Résident
J0	J	0	Série 2	Résident
J1	J	1	Série 2	Résident
J2	J	2	Série 2	Résident

2. Expérimentation

Après la période d'adaptation, les différents régimes ont été distribués durant **3 semaines**. Chaque souris a reçu, par voie orale, 5 g d'aliment par jour, soit 15 g par jour et par lot de 3 souris à heure régulière dans des gamelles. Les animaux ont été pesés à heure fixe quotidiennement.

Au bout de 21 jours de consommation des régimes contenant ou non *Hypochœris radicata,* les souris ont été soumises à une **batterie de tests comportementaux** s'échelonnant sur 1 semaine environ et répartis en **2 séries** (*Tableau III.2*). Cette répartition dans deux séries permet de prendre en considération l'ordre de passage des animaux au cours des tests et de ne pas faire intervenir ce facteur dans les résultats statistiques.

Tableau III.2 : Calendrier résumant les dates de passage des souris dans les différents tests en fonction des numéros de séries

Test	Labyrinthe en Croix Surélevé	Locotronic	Piscine de Morris	Openfield	Test de Porsolt	Labyrinthe en Y	Planche à trous	Résidents/ Intrus
Série 1	3/07	3/07	3/07	4/07	4/07	4/07	5/07	5/07
Série 2	4/07	4/07	4/07	5/07	5/07	5/07	6/07	6/07

Après la réalisation des tests de comportement, les souris ont été **sacrifiées par exsanguination** puis leur cerveau a été prélevé, plongé immédiatement dans l'azote liquide puis conservé à -80°C.

3. Exploration comportementale

Les tests comportementaux avaient pour but d'attester plus spécifiquement de l'intégrité d'un certain nombre de fonctions comportementales. Parmi les tests réalisés et présentés ci-dessous, certains rendent compte de manifestations comportementales appartenant à différents registres. Afin de simplifier la présentation des résultats des tests effectués, ceux-ci seront classés en fonctions des principales fonctions qu'ils permettent d'étudier, les autres performances testées étant éventuellement précisées, le cas échéant.

De façon générale, le comportement des animaux a été filmé grâce à une installation vidéo appropriée et les variables comportementales quantifiées par le même opérateur pour chaque test de manière à éviter toute variabilité inter-opérateur. Seul le test du Locotronic® n'a pas nécessité de filmer la séance, les résultats étant obtenus via le logiciel qui pilote l'appareil. Le but étant de limiter au maximum la présence de l'opérateur, ce dernier est absent lors du déroulement des tests.

3.1. Tests comportementaux révélant d'éventuels troubles locomoteurs

Les tests décris ci-dessous permettent d'accéder à l'activité locomotrice au sens large : le Locotronic® permet de mesurer et détecter d'éventuelles perturbations de la coordination motrice, l'openfield décrit le comportement exploratoire et l'activité des animaux.

3.1.1. Locotronic®

a. Dispositif

L'appareil (Locotronic®, Inteli-Bio, France) est constitué d'une boîte d'entrée (10 cm x 5 cm x 20 cm, aux parois en plastique blanc, illuminée par une lumière froide blanche), d'un couloir (75 cm x 5 cm x 20 cm) et d'une boîte d'arrivée (10 cm x 5 cm x 20 cm, aux parois en plastique noir). Le sol du couloir est constitué de barreaux de 3 mm de diamètre et espacés de 7 mm (*Figure III.1*). Au dessus et au dessous de chaque barreau, sont positionnés 3 détecteurs infrarouges. Ces derniers sont enregistrés 100 fois par seconde afin de répertorier la position, le nombre et la durée des faux pas de l'animal.

b. Principe

Ce dispositif a pour but de déceler d'éventuels **troubles de la coordination motrice** en observant les modalités de traversée de l'animal sur une échelle à barreaux. La réalisation de 2 tests successifs permet également de mesurer l'intégrité de la **capacité d'apprentissage** au plan moteur et de détecter d'éventuels troubles liés à l'ingestion de la plante.

c. Méthode

Une fois l'animal positionné dans la boîte d'entrée fermée, l'enregistrement est lancé. La souris est stimulée par une diode luminescente. Le test commence lorsque la souris a touché le premier barreau et prend fin lorsqu'elle a atteint le dernier barreau. Deux essais sont réalisés par souris. Les paramètres enregistrés par le logiciel sont le nombre total d'erreurs, des pattes avant, des pattes arrière, de la queue ainsi que leurs temps respectifs et la durée totale de la traversée de l'animal. Une erreur est enregistrée lorsqu'une patte ne parvient pas à saisir un barreau, ce qui amène l'animal à chuter et à passer la patte entre les barreaux.

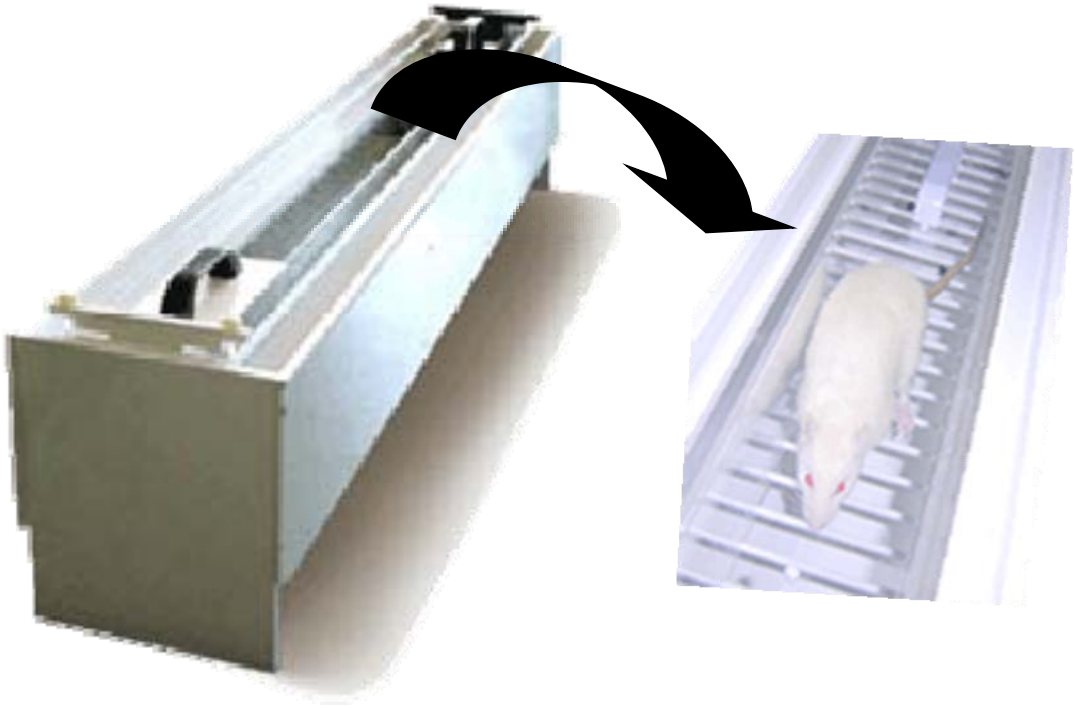


Figure III.1 : Photo illustrant l'appareil Locotronic®, avec un rat.

3.1.2. Openfield

a. Dispositif

Le dispositif correspond à un espace circulaire, caractérisé par un plancher en bois de 48 cm de diamètre et des parois en bois opaques de 30 cm de hauteur. Le disque constituant le plancher est divisé, par 2 cercles concentriques et équidistants (le plus petit de 16 cm de diamètre, le plus grand de 32 cm de diamètre), en 3 zones. Ces dernières, ainsi délimitées, sont, elles-mêmes, subdivisées en cases. Le disque intérieur comprend ainsi 4 cases, la couronne intermédiaire, 12 cases et la couronne extérieure, 20 cases (*Figure III.2*).

b. Principe

A l'origine, l'openfield était un test classique permettant d'observer l'anxiété non pathologique des animaux (*10*) et d'étudier les réponses émotionnelles, le test consistant à confronter l'animal à un environnement qu'il ne connaît pas, et dont la fuite est rendue impossible par la présence de parois sur la périphérie. Dans un tel environnement, les rongeurs privilégient spontanément l'environnement sécurisé, à savoir la périphérie de l'appareil, protégée par les parois, à la zone centrale éclairée et ouverte.

Cependant, son inaptitude à détecter certains anxiolytiques et la possibilité d'introduction de nombreux biais font que dans cette étude, l'openfield n'a été utilisé que pour **tester l'activité exploratoire.** Le nombre total de cases traversées, leur localisation dans les différentes zones et le temps passé dans celles-ci sont des indicateurs du comportement exploratoire dans un nouvel environnement, de l'activité générale et d'une aversion ou non pour les zones découvertes (zones intermédiaires et centrales).

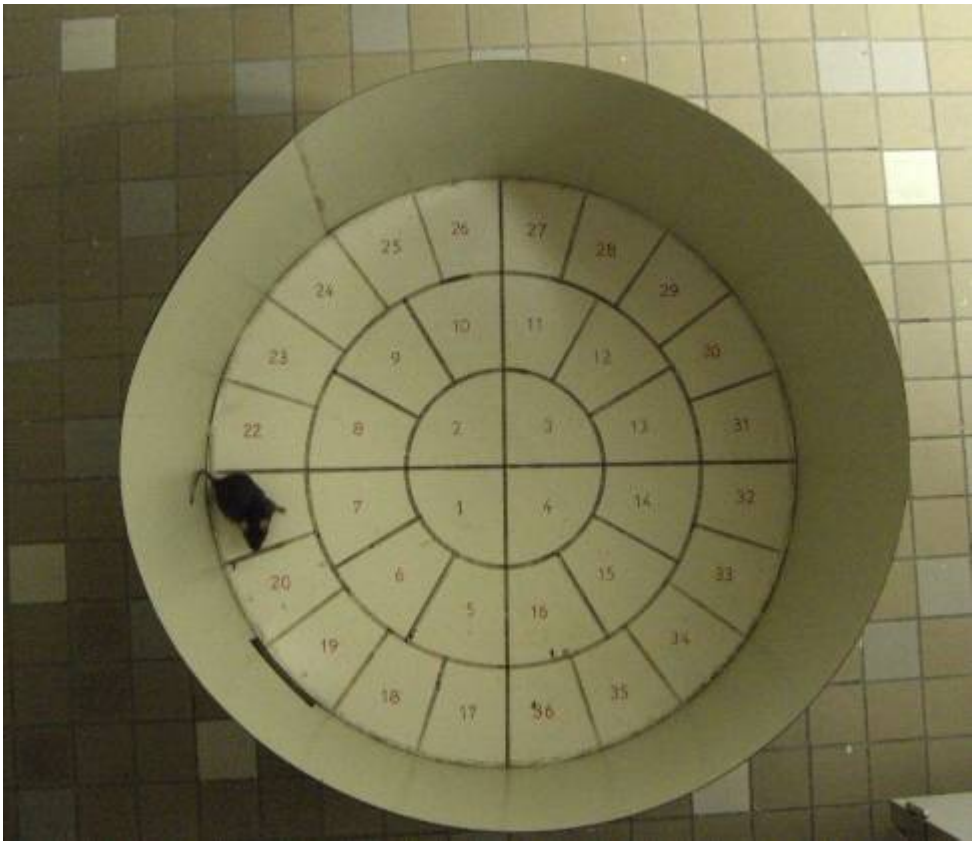


Figure III.2 : Dispositif d'openfield, vue de dessus. La surface est subdivisée en 3 couronnes et 36 cases. L'ensemble est entouré par une paroi de 30 cm de hauteur.

c. Méthode

Avant chaque test, le plancher du dispositif est soigneusement nettoyé à l'aide d'éthanol à 20% afin de supprimer d'éventuels messages olfactifs du congénère précédent. L'animal est positionné au départ au centre de l'openfield. Le comportement de la souris est enregistré et étudié durant 5 minutes. Le nombre total de cases traversées au sein de chaque zone (centrale, intermédiaire et extérieure) ainsi que les temps et les pourcentages respectifs passés au sein de chaque zone sont notés plus particulièrement. Un caméscope est positionné

au dessus du dispositif pour enregistrer le test. La souris est considérée comme entrée dans une zone, lorsque ses 4 pattes sont positionnées dans cette zone.

3.2. Tests comportementaux révélateurs de l'état d'anxiété et de dépression

Les tests qui suivent permettent d'accéder aux degrés d'anxiété ou de résignation des animaux. Les tests du labyrinthe en croix surélevé et de la planche à trous mettent en évidence des types d'anxiétés spécifiques révélées par le caractère exploratoire des animaux. Le test du Porsolt rend compte du degré de résignation des animaux face à une situation à laquelle ils ne peuvent pas échapper, lui-même étant considéré comme relié à l'état de « dépression » de l'individu.

3.2.1. Labyrinthe en croix surélevé

a. Dispositif

Le labyrinthe en croix surélevé consiste en 2 branches ouvertes (5 cm x 25 cm) et 2 branches fermées (5 cm x 25 cm x 20 cm) qui s'étendent autour d'une zone centrale (5 cm x 5 cm). La configuration globale est celle du signe « plus » (*Figure III.3*). Le labyrinthe se situe à 22 cm au dessus du sol.

Figure III.3 : Labyrinthe en croix surélevé, vue de profil (à gauche) et vue de dessus (à droite). Le dispositif présente deux branches fermées par des parois en bois et deux branches ouvertes, l'ensemble, vue de dessus, représentant une croix. Le tout est positionné en hauteur, à environ 22 cm au dessus du sol.

b. Principe

Le labyrinthe en croix surélevé, mis au point en 1984 par Handley et Mithany, exploite la **méfiance innée des rongeurs pour les espaces ouverts** lors d'exploration d'un environnement nouveau (*11*). Ce test combine le **caractère aversif** d'un espace nouveau surtout lorsqu'il est ouvert et lumineux et l**'anxiété** que génère la hauteur du dispositif au niveau de cet espace non sécurisé que sont les branches ouvertes. L'animal se trouve dans une situation conflictuelle car il a le choix entre explorer une **zone potentiellement dangereuse** (branches ouvertes, compartiment lumineux) ou rester dans une **zone sûre** (branches fermées, compartiment noir). Plus l'animal est anxieux, moins il passe de temps dans les espaces ouverts.

c. Méthode

Avant chaque essai, le dispositif est précautionneusement nettoyé à l'aide d'éthanol à 20%, afin de supprimer toute trace dont la persistance d'odeurs qui pourraient perturber le comportement de l'animal suivant. Au départ, l'animal est positionné au centre du labyrinthe, face à une branche ouverte. Dès lors, il peut explorer librement le labyrinthe durant 5 minutes. Le nombre d'entrées dans les branches ouvertes et les branches fermées ainsi que le temps passé dans les différentes zones du labyrinthe sont comptabilisés. L'animal est considéré comme entré dans une zone lorsque ses 4 pattes y sont positionnées.

3.2.2. Test de Porsolt ou test de la nage forcée

a. Dispositif

Le dispositif consiste en un cylindre en plexiglas transparent de 20 cm de hauteur et 10 cm de diamètre. Le cylindre est rempli d'eau, de telle manière à ce qu'une souris plongée à l'intérieur ne puisse pas toucher le fond du dispositif (*Figure III.4*).

b. Principe

Ce test permet de mesurer le degré d**'état de « dépression »** ou plus précisément de **l'état de résignation ou de motivation** de l'animal *via* la durée d'immobilité mesurée. En effet, la diminution de cette dernière peut rendre compte d'un effet similaire à celui observé après l'administration d'antidépresseurs : moins l'animal est résigné, plus il aura tendance à lutter, diminuant d'autant plus sa durée d'immobilité.

Figure III.4 : Dispositif utilisé lors du test de Porsolt ou test de la nage forcée. La souris lutte (à droite) durant une durée proportionnelle à son état psychique puis abandonne et reste immobile (à gauche).

Le terme de « dépression », emprunté au vocabulaire de médecine humaine est à utiliser avec précaution au niveau de ce test.

c. Méthode

Le test de la nage forcée a été décrit pour la première fois par Porsolt en 1977 (*12*) qui lui a ainsi laissé son nom. Il s'agit du test le plus largement utilisé chez les rongeurs, dans le but d'étudier le phénomène de « dépression ». L'animal est placé dans le cylindre et ses réactions sont enregistrées durant 10 minutes. Après un certain temps de nage, il abandonne et se laisse flotter. Lors du dépouillement du test, sont notés la latence de la première immobilité, la durée totale d'immobilité et de mobilité ainsi que les pourcentages respectifs correspondants à ces deux derniers paramètres.

3.2.3. Planche à trous

a. Dispositif

L'appareil consiste en une planche en bois de 36 x 36 cm (0,5 cm d'épaisseur), située à 80 cm du sol, dans laquelle sont percés 16 trous (diamètres de 2,5 cm), équidistants les uns des autres et à 3,5 cm des bords. Peuvent être ainsi distingués les 12 trous extérieurs et les 4 trous intérieurs (*Figure III.5*).

Figure III.5 : Dispositif de la planche à trou. La planche est surélevée à 80 cm au dessus du sol. Chaque fois que la souris introduit la tête et les épaules dans un trou ou à l'extérieur de la planche, un « head dipping » est comptabilisé.

b. Principe

Le test de la planche à trous permet de mettre en évidence les **comportements exploratoires et relatifs à l'anxiété** (*13*).

c. Méthode

L'animal est positionné au départ sur la planche à trou en son centre et laissé libre d'explorer le dispositif pendant 5 minutes. Le comportement de l'animal est filmé et sont mesurés le nombre total de head-dippings dans les trous ou à l'extérieur de la planche, le nombre de trous visités dans les couronnes intérieures et extérieures de la planche. On estime que la souris réalise un head-dipping lorsqu'elle introduit ou penche sa tête jusqu'aux épaules

dans le trou ou sous le plan horizontal formé par la planche. Le nombre d'étirements (où la souris tend la partie supérieure de son corps sans bouger ses postérieurs) est également noté.

3.3. Tests comportementaux sur la mémorisation spatiale et/ou temporelle

Les deux tests qui suivent permettent d'accéder à l'intégrité de la capacité mnésique de l'animal.

3.3.1. Piscine de Morris (labyrinthe aquatique de Morris)

a. Dispositif

Le labyrinthe est une piscine circulaire de 60 cm de diamètre et de 27 cm de hauteur, en plastique, avec les parois recouvertes de plastique noir. Une plateforme permettant à l'animal, lorsqu'il la trouve de sortir de l'eau, est immergée juste sous la surface de l'eau en un point du labyrinthe. Une croix, servant de repère et située au dessus d'une pierre ou plateforme, est dessinée sur une paroi. Le bassin est rempli avec de l'eau chauffée à 32°C et colorée avec du lait pour éviter que l'animal puisse repérer visuellement la plateforme (*Figure III.6*).

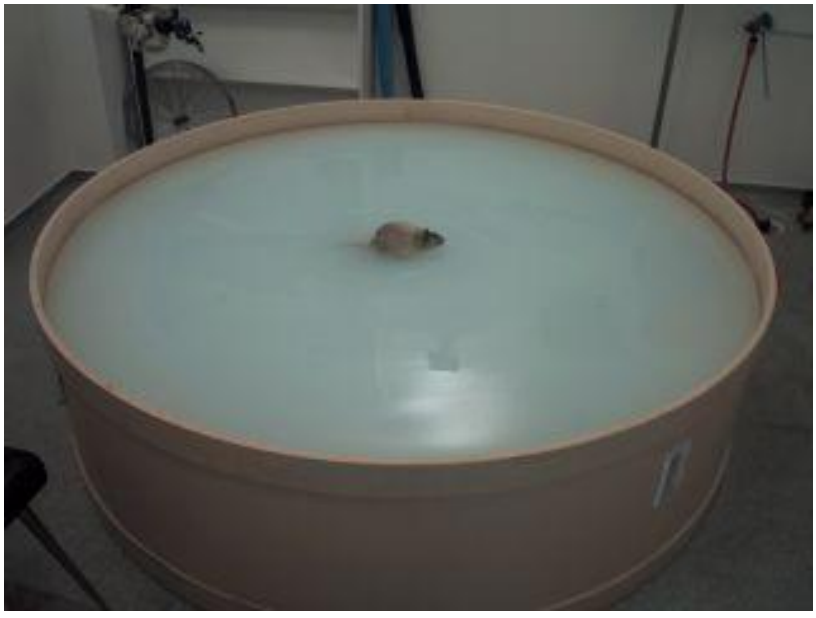


Figure III.6 : Photo du dispositif de la piscine de Morris ou labyrinthe aquatique de Morris.

b. Principe

Il s'agit d'un **test d'apprentissage et de mémorisation spatiale**. La réalisation de **5 tests successifs** dans des conditions strictement identiques permet de mettre en place la **courbe d'apprentissage** propre à chaque animal. L'utilisation d'un **repère visuel** lors des tests permet à l'animal d'avoir un repère à l'intérieur du labyrinthe qui lui permet de s'orienter.

c. Méthode

Au début, la souris est positionnée dans l'eau, à l'opposé du repère et de la plate-forme. La durée au bout de laquelle la souris atteint la plate-forme est chronométrée, ceci marquant la fin du test. 5 tests successifs sont réalisés. Lors du **sixième test**, la **plateforme est retirée** et le comportement de la souris est enregistré durant 5 minutes. Le nombre d'entrées dans le **quart supérieur de l'écran qui contenait la plate-forme** ainsi que le temps passé dans cette zone sont comptabilisés.

Un **comportement inhabituel** de certaines souris a pu être mis en évidence dans ce test : ces animaux, contrairement à la majorité qui présentaient une nage fluide, homogène et rapide, se déplaçaient plus lentement, avec difficulté, de façon hétérogène et semblant s'enfoncer dans l'eau puis refaire surface. Ceci a amené à quantifier un **nouveau paramètre** dans le dernier test, correspondant au **nombre d'«à-coups»** visualisables, lors du déplacement de la souris dans l'ensemble de la piscine.

3.3.2. Labyrinthe en « Y »

a. Dispositif

Le labyrinthe est une croix à trois branches en bois noir, identifiées A, B et C, mesurant 39 cm de long et entourées de parois de 20 cm de hauteur. Les extrémités, au niveau distal, mesurent 9,5 cm de large et au niveau proximal ou central, 3 cm de large. Les 3 branches se réunissent en un triangle central de 3 x 3 x 3 cm (*Figure III.7*).

b. Principe

Le Labyrinthe en « Y » permet d'évaluer la **mémoire et la capacité d'apprentissage** de l'animal et rend compte également de l'activité de celui-ci.

Figure III.7 : Photo du dispositif du labyrinthe en Y, vue de dessus. Le dispositif est en bois, les trois branches entourées de parois de 20 cm de haut sont resserrées au niveau où elles se rejoignent.

c. Méthode

L'animal est positionné dans la branche A du labyrinthe et son comportement est enregistré durant 10 minutes. Les différentes branches visitées successivement puis le nombre de triplets « corrects », le nombre de triplets « incorrects », leurs pourcentages respectifs sur le nombre total, le temps passé dans chaque branche sur l'ensemble du test puis par minute sont notés.

Des exemples de triplets corrects sont : ABC ; ACB ; BCA ; CBA ; …

Des exemples de triplets incorrects sont : AAB ; BCB ; ACC ; BBB ; …..

Le dépouillement du labyrinthe en Y nécessite de distinguer plusieurs types d'activités :

La **capacité de mémorisation** des animaux est révélée par le **pourcentage d'alternance**. Le pourcentage d'alternance est calculé à partir du ratio du nombre de triplets

corrects sur le nombre total de triplets. Un triplet correct correspond à une visite successive des 3 branches différentes, un triplet incorrect, à une visite de 3 branches dont deux, au moins sont identiques.

Cette exploration peut également être étudiée de façon plus approfondie en analysant le profil d'exploration du labyrinthe minute par minute.

3.4. Tests d'interactions sociales

3.4.1. Résident-Intrus

a. Dispositif

Dans ce test, une souris, dite « résidente », est utilisée avec sa propre cage. Une souris « intrus » ayant consommé *Hypochœris radicata* est introduite dans cette cage. La grille recouvrant la cage est retirée et remplacée par une plaque en plexiglas transparent afin de voir l'intérieur de la cage. Une caméra reliée à un écran est située à la verticale afin d'enregistrer le comportement des deux souris. L'opérateur se retire lors du test.

b. Principe

Ce test permet d'accéder aux **comportements d'interaction sociale et d'agressivité**.

c. Méthode

Une souris à étudier dite « intrus » est introduite dans la cage d'une congénère « résidente». Durant 5 minutes, le comportement des animaux est enregistré. Durant le dépouillement des vidéos, un certain nombre de paramètres peut être relevés **théoriquement** (*14, 15*) tels que :

- 1) la durée de première latence avant de toucher ou rentrer en contact avec l'intrus,
- 2) la durée de première latence, la durée et le nombre de fois durant lesquelles le résident sent ou nettoie le corps de l'intrus,
- 3) le temps durant lequel le résident reste inactif et le temps durant lequel il a été en contact physique direct avec l'intrus,
- 4) la période de première latence, la durée et le nombre de fois durant lesquels le résident a fouillé la litière,

- 5) la période de première latence, la durée et le nombre de fois durant lesquels le résident a suivi l'intrus.

- 6) une manifestation agressive est enregistrée si le résident réalise au moins 2 des attitudes agressives (mordre, poursuivre, lutter, se jeter sur) durant l'ensemble du test. La période de première latence de l'agression est également notée.

Cependant, lors de la réalisation de nos tests, l'activité importante des animaux a nécessité de **limiter les paramètres** à :

1) la **durée de première latence** avant le premier contact,

2) le nombre de **reniflements**,

3) le nombre de **suivis**,

4) le nombre **d'exploration de litière**,

5) la **durée** durant laquelle la **litière est explorée**.

Lors de chaque série, une attente de 5 minutes est effectuée entre chaque test, après retrait de l'animal intrus, afin de revenir dans des conditions sereines pour l'animal résident laissé dans sa cage, le but étant de limiter au mieux l'influence des tests les uns sur les autres.

4. Dépouillement des vidéos des tests comportementaux

Chaque enregistrement vidéo a été lu en **double aveugle**. Parfois, une lecture au ralenti a été nécessaire afin de pouvoir comptabiliser certains paramètres. Ceci a été le cas pour le test de l'openfield, pour compter le nombre de cases traversées. Dans le dépouillement du test du labyrinthe en Y, la lecture a été faite en totalité sur 10 minutes puis minute par minute.

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel ***SPSS 11.5*** Windows (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA).

Les animaux sont retirés des analyses statistiques lorsqu'ils ne correspondent pas aux critères ***SPSS 11.5***. Ainsi sont définis comme des observations n'appartenant pas à la

distribution des mesures qui se situent à une distance supérieure à la distance 1,5 x espace interquartile ± Quartile supérieur ou inférieur.

Comme les résultats ne suivent pas une distribution normale et que les variances des différents groupes testés ne sont pas égales, des tests statistiques non paramétriques ont été réalisés. Dans ce type de test, les valeurs observées sont remplacées par des valeurs indicatrices des rangs pour tester la différence entre les moyennes. Ainsi, les rangs des observations des contrôles ont été comparés à ceux des animaux recevant *Hypochœris radicata,* en utilisant un test de Kruskall-Wallis, suivi par une procédure de Mann-Whitney modifiée pour les comparaisons.

Lorsque les groupes étudiés étaient indépendants, le test de Mann-Whitney a été utilisé. En parallèle, lorsque les groupes étaient appariés, le test de Wilcoxon pour échantillons appariés a été privilégié.

Les résultats des **tests** ont été jugés **significativement différents** lorsque la valeur de la probabilité **était inférieure à 0,05**. Dans ce cas, un test unilatéral a été réalisé pour pouvoir interpréter le sens de la variation.

Cependant, pour certaines valeurs de *p* proches de la significativité, une interprétation a quand même été présentée.

B. Résultats

1. Poids des animaux

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence au cours de l'expérimentation pour un même individu (test de Student *t-test* pour mesures répétées) et entre les différents groupes (test de Student-Newman-Keuls *t-test* pour comparaisons multiples).

2. Tests comportementaux

2.1. Tests comportementaux pour révéler d'éventuels troubles locomoteurs et accéder au comportement exploratoire

2.1.1. Locotronic®

4 animaux ont été exclus de l'étude statistique : 2 animaux témoins (C1 et C2) et 2 animaux traités (F1 et F2). Les résultats obtenus à l'issue de ce test n'ont pas révélé de perturbations de la coordination motrice chez les animaux consommant *Hypochœris radicata*.

Tableau III.3 : Performances des souris dans le Locotronic®

N° Essai	Essai 1		Essai 2	
Groupes	Témoins (n = 8)	9% HR (n = 8)	Témoins (n = 8)	9% HR (n = 8)
Temps traversée (s)	*12,2 (9,5-16,7)*	*12,5 (9,8-14,3)*	*8,2 (6,4-9,8)*#	*7,4 (6-10,6)*#
Nombre erreurs pattes antérieures	2,5 (2-4,25)	*3,5 (0,75-5)*	4 (3,5-6,25)*	4 (2-6,75)
Nombre erreurs pattes postérieures	*3 (1,5-3,5)*	3 (1,75-3,5)	2 (0,75-4)	2 (1-4)
Nombre total erreurs pattes	5 (3,75-6,75)	6,5 (3,5-8,25)	6,5 (4,75-8,75)	6 (4-8,5)
Temps erreurs pattes (s)	*0,84 (0,17-1,39)*	0,69 (0,34-0,83)	0,55 (0,36-0,97)	0,48 (0,31-0,63)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses) sur le nombre total de souris par groupe.
* $p < 0,05$, différence significative pour les animaux témoins entre les deux tests (Mann-Whitney, Wilcoxon *W-test*).
# $p < 0,01$, différences significatives pour les animaux témoins et traités entre les deux tests (Mann-Whitney, Wilcoxon *W-test*).

A l'intérieur de chaque essai, l'activité locomotrice des animaux dans l'appareil Locotronic®, mesurée par les paramètres recensés, n'a pas été influencée par l'ingestion d'*Hypochœris radicata* (*Tableau III.3*). Cependant, une différence significative du nombre d'erreurs des pattes antérieures entre les deux essais (p = 0,048) a été relevée chez les animaux témoins. La coordination motrice ainsi que la **capacité d'apprentissage** ont été étudiées en comparant **entre les deux essais** le temps écoulé lors de la traversée et le nombre d'erreurs de pattes. Lors du second essai, le temps mis pour traverser l'appareil a été significativement diminué dans les deux groupes d'animaux par rapport au premier essai (p < 0,01). Ce résultat rend compte d'un **phénomène d'apprentissage** tout à fait classique.

2.1.2. Openfield

Un seul animal a été retiré de l'étude (A2, animal témoin). Ce second test n'a **pas** permis de détecter de **particularité concernant l'activité motrice et exploratoire** des animaux ingérant *Hypochœris radicata*.

Tableau III.4 : Paramètres résumant l'indice d'activité dans le test de l'openfield

Groupes	Témoins (n = 9)	9% HR (n = 10)
Nombre total de cases traversées	288 (270-337)	296 (254-326)
Nombre de cases intérieures	16 (15-21)	14 (13-26)
% cases intérieures	5,69 (5,23-7,50)	5,81 (4,55-8,25)
Nombre de cases intermédiaires	61 (47-63)	62 (52-72)
% cases intermédiaires	19,93 (15,52-23,11)	22,37 (17,37-24,95)
Nombre de cases extérieures	227 (192-260)	204 (177-234)
% cases extérieures	74,84 (68,53-78,82)	70,00 (68,05-79,27)
Temps cases intérieures	12 (10-25)	12 (9-15)
Temps cases intermédiaires	58 (48-73)	58 (40-67)
Temps cases extérieures	225 (202-247)	231 (217-252)
Nombre redressements	27 (23-41)	30 (25-37)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses) sur le nombre total de souris par groupe.

Dans le test de l'openfield, le nombre de cases traversées n'a pas été différent entre les 2 groupes (*Tableau III.4*). En conclusion, le régime à base d'*Hypochœris radicata* n'a **pas affecté significativement l'activité locomotrice** des animaux. L'indice d'activité a été identique, quel que soit le traitement.

2.2. Tests comportementaux attestant de l'état d'anxiété

2.2.1. Labyrinthe en croix surélevé (LCS) :

Un seul animal a été retiré de l'étude statistique (G2, animal témoin).

Les résultats issus du test de LCS ont permis de souligner que le régime à base d'*Hypochœris radicata* serait susceptible de **supprimer une bimodalité** existante chez les souris témoins et classique chez les souris C57BL/6J en **amoindrissant l'état d'anxiété uniquement chez les plus anxieuses** d'entre elles.

Tableau III.5 : Résultats du test du labyrinthe en croix surélevé

Groupes	Témoins (n =11)	9% HR (n = 12)
Nombre d'entrées branches fermées	9,00 (7,00-12,00)	10,50 (8,00-11,00)
Nombre d'entrées zone centrale	16,00 (12,00-18,00)	17,50 (13,75-19,00)
Nombre d'entrées branches ouvertes	8,00 (3,00-11,00)	9,50 (5,50-13,00)
Nombre total d'entrées	18,00 (12,00-20,00)	18,50 (14,75-21,50)
% entrées branches fermées	45,00 (38,89-80,00)	49,72 (41,88-62,75)
% entrées branches ouvertes	55,00 (20,00-61,11)	50,28 (37,25-58,12)
Temps branches fermées (s)	105,00 (72,00-151,00)	107,00 (84,75-142,50)
Temps zone centrale (s)	168,00 (155,00-193,00)	161,00 (144,00-197,00)
Temps branches ouvertes	72,00 (21,00-89,00)	70,50 (33,00-98,00)
Temps zone protégée	275,00 (251,00-319,00)	295,00 (243,25-317,75)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses) sur les 10 souris par groupe.

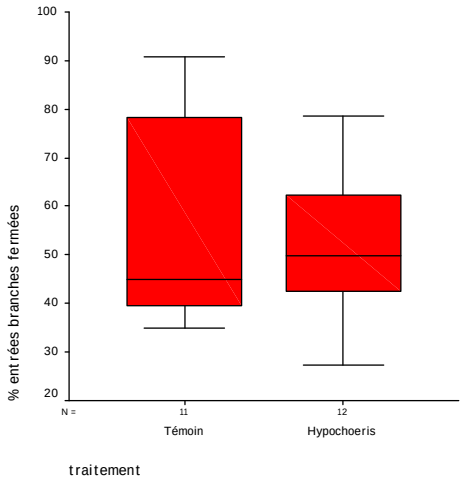


Figure III.8 : Pourcentage d'entrées dans les branches fermées du labyrinthe en croix surélevé. La variance intragroupe a été plus grande chez les individus témoins que chez les animaux consommant *Hypochœris radicata*.

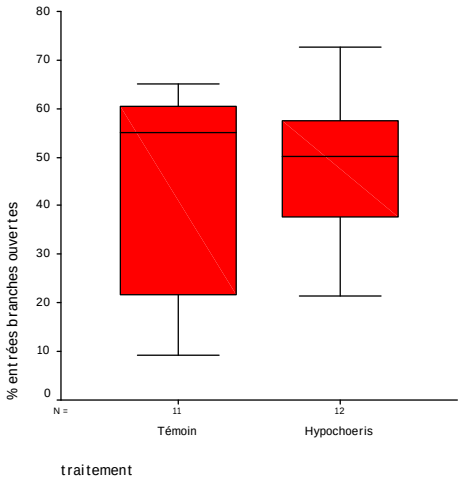


Figure III.9 : Pourcentage d'entrées dans les branches ouvertes du labyrinthe en croix surélevé. La variance intragroupe a été plus forte chez les individus témoins que chez les individus consommant 9% d*'Hypochœris radicata*.

Ce test n'a **pas** permis de mettre en évidence **d'effet significatif** de l'ingestion d'*Hypochœris radicata* **sur l'activité** des animaux (*Tableau III.5*). Néanmoins, il est apparu que la **population des animaux témoins était bimodale** avec deux sous-groupes (*Figure III.8* et *Figure III.9*). Sur les 10 animaux témoins retenus dans les statistiques, 5 ont réalisé un pourcentage d'entrées dans les branches ouvertes de 60% et plus et peuvent être qualifiés d'animaux à bas niveau d'anxiété. Les 5 autres ne présentant que 40% et moins d'entrées dans ces mêmes branches, peuvent être qualifiés d'animaux à haut niveau d'anxiété.

De ce fait, deux interprétations peuvent être retenues :

- Si l'on considère les **2 sous populations** chez les individus **témoins** et que l'on ne conserve que le groupe des animaux dits « à haut niveau d'anxiété », on constate que les individus consommant *Hypochœris radicata* apparaissent comme **plus actifs** et présentent en parallèle un niveau d'**anxiété moindre.** En effet, la présence de deux sous populations n'apparaît pas chez les individus recevant *Hypochœris radicata*. Ceci pourrait laisser supposer que la présence de deux sous populations, ce qui est classique chez les souris C57BL/6J, pourrait être effacée ou atténuée chez les animaux traités avec *Hypochœris radicata.* De ce fait, en **réduisant l'anxiété des plus anxieux** et en **n'affectant pas les moins anxieux**, l'ingestion de la plante « gomme » pour ainsi dire la différence d'état d'anxiété présente naturellement dans cette population.
- Si l'on considère les individus **témoins pris dans leur globalité**, la comparaison avec ceux traités avec *Hypochœris radicata* ne rend compte d'**aucune différence significative** concernant l'activité locomotrice des animaux.

2.2.2. Test de Porsolt ou test de la nage forcée

Un seul animal a été exclu de l'étude : l'individu témoin G0. Ce test a abouti au résultat que les animaux ingérant *Hypochœris radicata* **lutteraient plus longtemps** que les animaux témoins.

Tableau III.6 : Résultats du test de la nage forcée de Porsolt, en fonction des lots de souris.

Groupes	Témoins (n = 11)	9% HR (n = 12)
Latence 1ère résignation (s)	70 (56-89)*#	112 (69-301)*#
Durée de mobilité (s)	282 (156-322)	360 (225-452)
Durée d'immobilité (s)	318 (278-444)	240 (148-375)
Durée de mobilité (%)	47,04 (34,97-58,00)	60,94 (35,90-77,21)
Durée d'immobilité (%)	52,96 (42,00-65,03)	39,06 (22,79-64,10)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses) sur les 10 souris par groupe.
* $p < 0,05$, différence significative entre animaux témoins et traités (Mann-Whitney, Wilcoxon *W-test*).
\# $p < 0,05$, différence significative entre animaux témoins et traités (*Student bilatéral, t-test*).

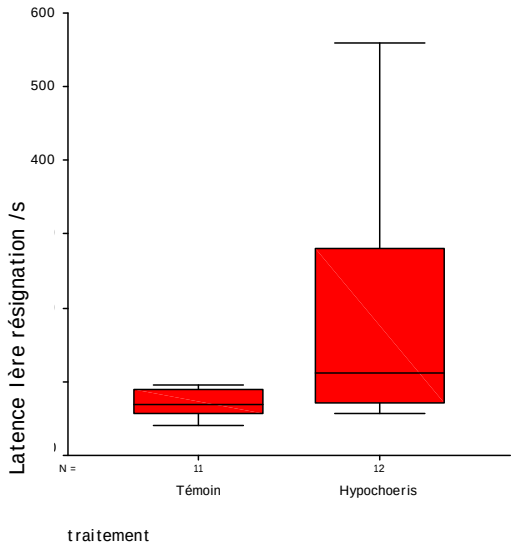


Figure III.10 : Durée de la latence de première résignation lors du test de Porsolt ou de la nage forcée, en fonction des groupes (en secondes).

En effectuant une comparaison régime témoin/régime *Hypochœris* à l'aide du test de Wilcoxon, la **latence de première résignation** est apparue **significativement différente** entre les groupes (*Figure III.10* et *Tableau III.6*). Cependant, les durées de mobilité et d'immobilité ne l'étaient pas. La réalisation du test de Student a permis de confirmer la significativité de la latence de 1ère résignation et de souligner la tendance à la significativité de la durée d'immobilité ($p = 0,097$). On peut donc affirmer que les animaux ingérant *Hypochœris radicata* ont présenté une diminution de la durée d'immobilité et/ou une augmentation de la durée de mobilité ce qui serait le reflet d'une **activité plus élevée** et d'un **état de résignation moindre**

2.2.3. Planche à trous

Les animaux exclus de l'étude sont les individus témoins A0 et C0 et l'individu traité F0.

Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau ci-dessous (*Tableau III.7*). Ils ont souligné l'activité plus importante des souris consommant *Hypochœris radicata* associée à une diminution d'un certain type d'anxiété, dans un environnement sécurisé.

Tableau III.7 : Performances comportementales relatives à l'anxiété avec le test de la planche à trous

Groupes	Témoins (n = 10)	9% HR (n = 11)
Nombre total de trous visités	40,00 (36,75-47,25)	54,00 (34,00-61,00)
Nombre de trous visités couronne intérieure	7,00 (6,00-8,50)	11,00 (7,00-18,00)*
% de trous visités couronne intérieure	15,39 (14,41-21,09)	25,00 (20,51-33,33)#
Nombre de trous visités couronne extérieure	20,50 (18,75-24,50)	26,00 (19,00-28,00)
% de trous visités couronne extérieure	51,72 (43,23-56,82)	50,00 (44,26-56,41)
Nombre de HD bord de la planche	14,00 (7,00-22,00)	11,00 (7,00-16,00)
% HD bord de la planche	33,87 (20,81-42,71)	25,00 (12,50-32,35)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses) sur les 10 souris par groupe.
HD : Head Dipping
* $p < 0,05$, différence significative entre animaux témoins et traités (Mann-Whitney, Wilcoxon *W-test*).
\# $p < 0,01$, différence significative entre animaux témoins et traités (Mann-Whitney, Wilcoxon *W-test*).

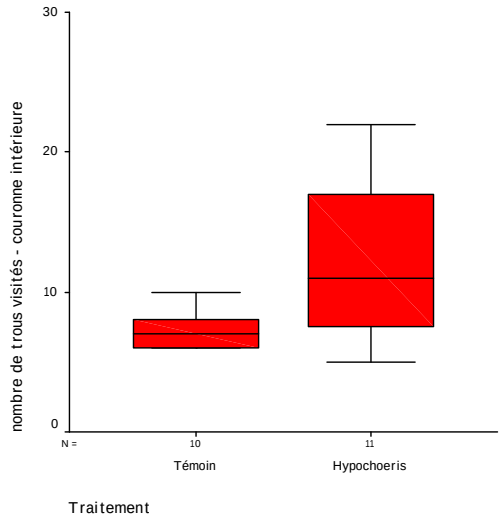


Figure III.11 : Nombre de trous visités en 5 minutes, au sein de la couronne intérieure dans le test de la planche à trous.

Le nombre et le pourcentage de trous visités dans la couronne intérieure a été plus important ($p < 0,005$) chez les individus recevant *Hypochœris radicata* (*Tableau III.7*). Cependant, le nombre total de trous visités a été identique, quel que soit le groupe de souris. L'augmentation du nombre de trous visités dans l'espace intérieur serait donc en fait compensée par une diminution du nombre de Head Dipping (HD) (nombre de fois où l'animal

place sa tête et ses épaules en dessous du plan formé par la planche, à l'intérieur d'un trou ou à l'extérieur de la planche) (p = 0,121 ; % HD). En conclusion, les souris consommant *Hypochœris radicata* semblent être **plus actives et ont une activité exploratrice plus importante** mais dans un **contexte plus sécurisé** à l'intérieur de la planche (*Figure III.11*). En comparant les paramètres entre couronnes intérieure et extérieure, il **semblerait** que l'ingestion d'*Hypochœris* réduirait l'**anxiété mais uniquement dans un contexte où le risque est faible**. Cependant, aucune comparaison n'ayant été réalisée avec un anxiolytique, la conclusion doit être prise avec précaution.

2.3. Tests comportementaux sur la mémorisation spatiale et/ou temporelle

2.3.1. Piscine de Morris (labyrinthe aquatique de Morris)

Le test du labyrinthe aquatique de Morris est un test qui doit être analysé en 2 temps. L'évolution du comportement des animaux durant les 5 premiers essais, rend compte de la **courbe d'apprentissage**, puis, le comportement lors du 6^{ième} et dernier test, durant lequel la plateforme a été ôtée, permet de mesurer la **capacité d'adaptation** dans un contexte différent.

- Courbe d'apprentissage :

Les courbes d'apprentissages ont été similaires chez les individus témoins et les individus ingérant *Hypochœris radicata*.

- *Chez les individus témoins :*

L'animal A1 a été retiré dans les essais 1 et 2, l'individu E1 dans l'essai 4.

Tableau III.8 : Temps mis par les souris témoins pour accéder à la plate forme immergée au cours des 5 essais (en secondes).

N° Essai	Essai 1 (n = 11)	Essai 2 (n = 11)	Essai 3 (n = 12)	Essai 4 (n = 11	Essai 5 (n = 12)
Temps (s)	30,00 (15,00-41,00)	30,00 (27,00-35,00)	11,50 (6,50-15,50)	10,00 (4,00-14,00)	15,00 (8,00-30,00)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses).

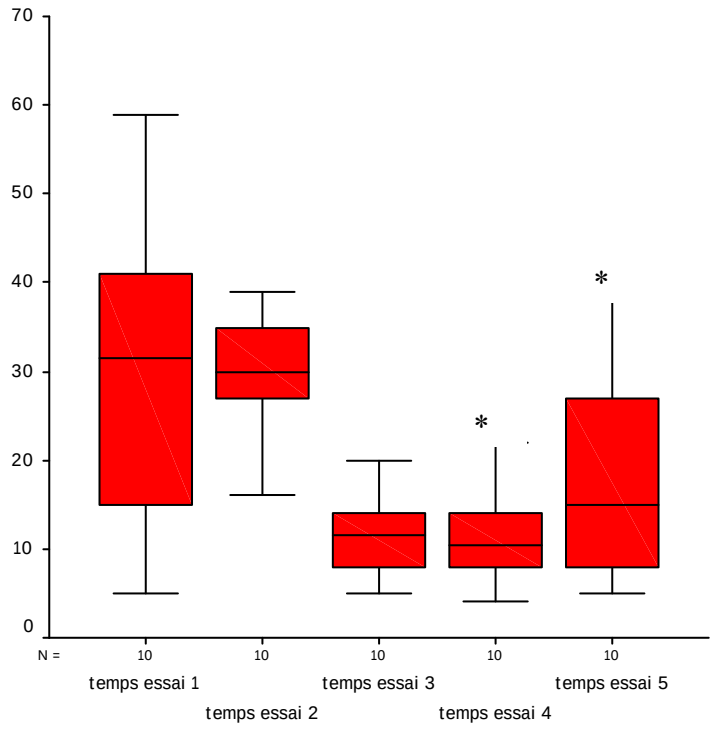


Figure III.12 : Temps mis pour accéder à la plate forme lors des 5 premiers essais des individus témoins (*p≤ 0,05) Comparaison des essais 2 à 2 par rapport au premier essai (Tests de Wilcoxon). La diminution d'environ ½ du temps montre l'apprentissage des souris au cours du temps.

La courbe d'apprentissage a été validée chez les animaux témoins sur les 5 premiers essais (*Figure III.12* et *Tableau III.8*).

- *Chez les individus traités :*

Les animaux H1 et H2 ont été retirés dans l'essai 2, les individus F0 et H0 dans les essais 4 et 5.

Tableau III.9 : Temps mis par les souris traitées pour accéder à la plate forme immergée au cours des 5 essais (en secondes).

N° Essai	Essai 1 (n = 12)	Essai 2 (n = 8)	Essai 3 (n = 12)	Essai 4 (n = 10)	Essai 5 (n = 10)
Temps (s)	27,50 (14,25-54,50)	10,00 (6,75-26,50)	15,50 (10,50-18,75)	8,50 (6,50-10,50)	17,50 (10,50-31,00)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses).

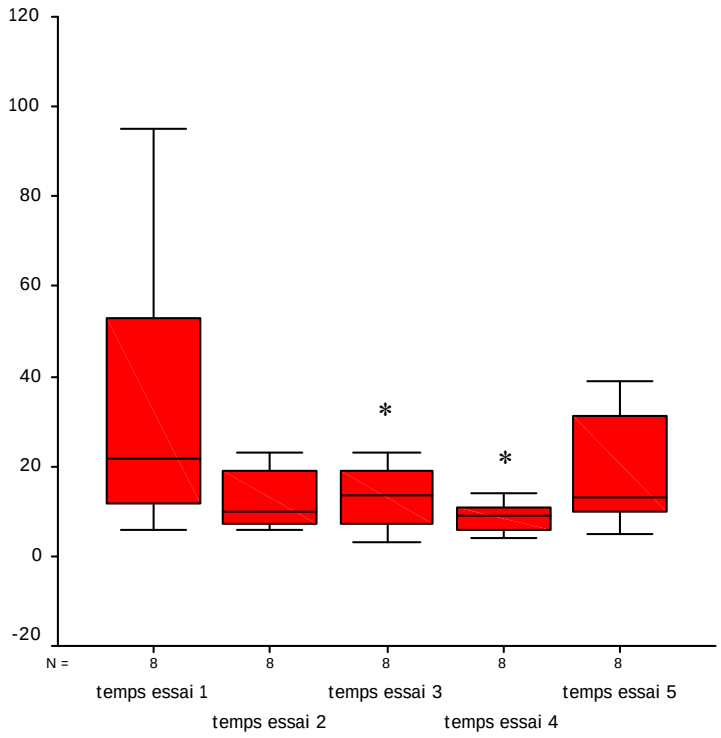


Figure III.13 : Temps mis pour accéder à la plate forme lors les 5 premiers essais des individus traités (*p ≤ 0,05). Comparaison des essais 2 à 2 par rapport au premier essai (Tests de Wilcoxon). La diminution dès le deuxième essai et jusqu'au quatrième rend compte de l'apprentissage des souris.

Tout comme chez les animaux témoins, il existe un apprentissage au cours du temps chez les souris traitées (*Figure III.13* et *Tableau III.9*).

➢ Comportement lors du 6ème essai :

- *Temps passé dans le ¼ supérieur*

Les animaux G2 (témoin) et H1 (traité) ont été exclus de l'étude.

Tableau III.10 : Comparaison du temps passé dans le quart supérieur de la piscine en fonction du traitement lors de l'essai sans plate-forme (en secondes).

Groupes	Témoins (n = 11)	9% HR (n = 11)
Temps (s)	50,50 (46,25-59,00)	62,00 (50,00-68,00)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*

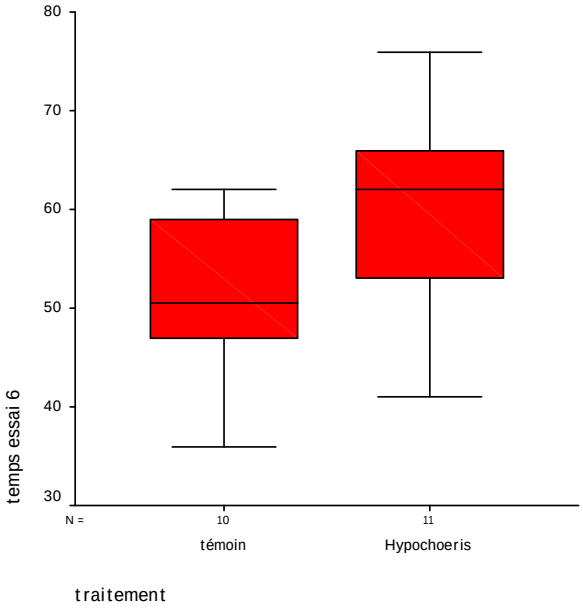


Figure III.14 : Temps passé par les animaux dans le quart supérieur de la piscine en fonction du traitement.

Les animaux recevant le régime à base d'*Hypochœris radicata* ont présenté une **tendance à passer plus de temps** que les animaux témoins **dans le quart supérieur** (p = 0,061) (*Figure III.14* et *Tableau III.10*).

- *Nombre d'entrées dans le ¼ supérieur*

Les animaux G2 (témoin) et H1 (traité) ont été exclus de l'étude.

La mesure de ce paramètre a permis de compléter le résultat précédent : les animaux consommant *Hypochœris radicata* passent **plus de temps dans le quart supérieur** de la piscine, par rapport aux individus témoins mais y font moins d'entrées. Ce fait pourrait être en partie expliqué par une attitude inhabituelle des souris dans ce type de test.

Tableau III.11 : Nombre d'entrées dans le quart supérieur de la piscine en fonction du traitement.

Groupes	Témoins (n = 11)	9% HR (n = 11)
Nombre d'entrées	16,00 (15,00-18,00)	13,00 (9,00-17,00)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*

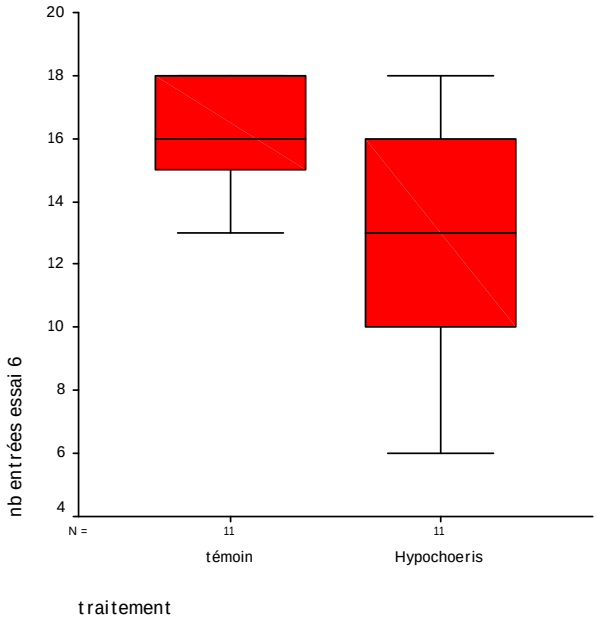


Figure III.15 : Nombre d'entrées des animaux dans le quart supérieur en fonction du traitement lors du dernier essai sans la plate-forme.

Les souris **traitées ont passé plus de temps dans le quart supérieur** (p = 0,061) mais en y faisant **moins d'entrées** (p = 0,044, *W-Test de Wilcoxon*) (*Figure III.15* et *Tableau III.11*). Ceci pourrait être révélateur d'un **épuisement** ou d'une incapacité pour les animaux consommant la plante de repartir en exploration, donc une incapacité de réadaptation comportementale. L'obstination dont ils font preuve pourrait également signer une atteinte du système nerveux au niveau frontal.

Un **essai d'explication** peut être apporté par une constatation supplémentaire. En effet, lors du dépouillement de ce test, une observation de **comportement assez inhabituel et spécifique** a pu être soulignée. Il est apparu que, contrairement à la majorité des animaux dont le déplacement au sein de la piscine était relativement fluide, homogène et rapide, celui de certains pouvait être qualifié d'hétérogène, se faisant par « **à coups** », l'animal semblant alors s'enfoncer, couler puis appliquer un sursaut pour refaire surface. Cette observation, jamais décrite avant chez des animaux lors de ce test a, de ce fait, été recensée. Le paramètre quantifié a été le nombre de sursauts, sans compter ceux ayant lieux contre les parois de la piscine. En effet, ces derniers peuvent être simplement associés au fait que la souris veuille s'agripper à la paroi ou tente de sauter par-dessus.

Tableau III.12 : Nombre de sursauts comptabilisés au centre de la piscine en fonction du traitement reçu par les animaux

Groupes	Témoins (n = 12)	9% HR (n = 11)
Nombre d'animaux présentant des sursauts	1	5
Nombre de sursauts chez les animaux en présentant	10	27 (9-55,5)

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*

Cependant, ce paramètre semble **difficilement interprétable** du fait du faible **nombre d'animaux** présentant une telle attitude, la différence entre les deux groupes n'étant **pas significative** (p = 0,0593). Cependant, cette attitude particulière et inhabituelle des animaux dans ce test nécessite d'en faire mention (*Tableau III.12*).

2.3.2. Labyrinthe en « Y »

Les animaux qui ont du être retirés de l'étude, d'après les critères SPSS 11.5, sont les individus témoins E2 et G1 et l'individu traité F1. Les résultats des paramètres mesurés dans le labyrinthe en Y sont résumés dans le Tableau III.13.

Tableau III.13 : Performances comportementales relatives à l'activité exploratrice et aux capacités mnésiques des souris, mesurées dans le test du labyrinthe en Y

Groupes	Témoins (n = 10)	9% HR (n = 11)
I. Alternance spontanée		
% d'alternance	64,24 (56,61-69,87)	69,39 (66,67-77,50)
II. Activité dans le labyrinthe		
Nombre total de branches visitées	44 (41-45)	41 (44-52)*
Nombre de branches visitées par min	4,40 (4,08-4,53)	4,70 (4,40-5,20)*
III. Exploration du labyrinthe		
Nombre d'entrées dans la branche A	16 (13-16)	16 (13-19)
Nombre d'entrées dans la branche B	14 (13-15)	16 (16-17)
Nombre d'entrées dans la branche C	15 (12-16)	15 (14-17)
% d'entrées dans la branche A	35,62 (32,56-38,23)	34 (31,71-36,36)
% d'entrées dans la branche B	33,33 (29,22-34,29)	34,04 (31,82-36,36)
% d'entrées dans la branche C	32,21 (29,68-35,61)	31,82 (28,57-33,33)
IV. Activité au cours du test		
Nombre de branches visitées 1ère minute	7 (7-8)	8 (7-8)
Nombre de branches visitées 2ième minute	6 (5-7)	7 (6-8)
Nombre de branches visitées 3-6ième minutes	16 (14-17)	17 (16-19)
Nombre de branches visitées 7-10ième minutes	13 (12-17)	17 (15-18)*

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses).
* $p < 0,05$, différence significative entre animaux témoins et traités (Mann-Whitney, Wilcoxon *W-test*).

Les résultats issus du dépouillement de ce test ont permis d'obtenir des informations sur la **capacité de mémorisation à court terme ou mémoire qualifiée d'immédiate** avec le pourcentage d'alternance et sur l'activité générale des animaux :

- Les individus ingérant *Hypochœris* ont une tendance (p = 0,08, test de Wilcoxon) à augmenter l'alternance des branches visitées, ce qui signifie que les processus de mémorisation ont été performants (*Figure III.16*).

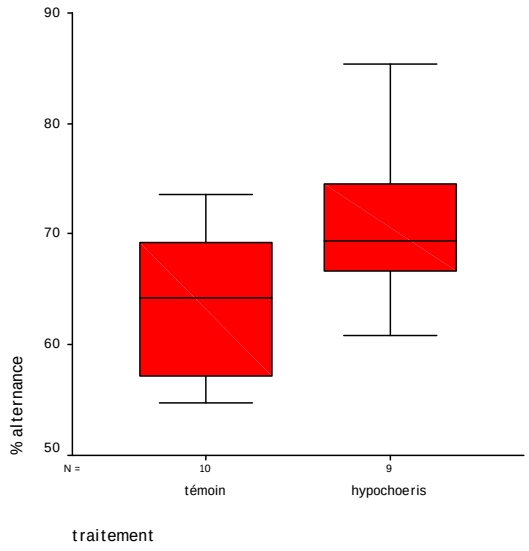


Figure III.16 : Comparaison des pourcentages d'alternance entre les deux groupes.

- Le nombre total de branches visitées (*Figure III.17*) et le nombre de branches visitées par minute ont été significativement plus importants chez les individus traités que chez les témoins, respectivement (p = 0,031 et p = 0,031). Les animaux consommant *Hypochœris radicata* ont eu **tendance à être plus actifs** que les animaux témoins.

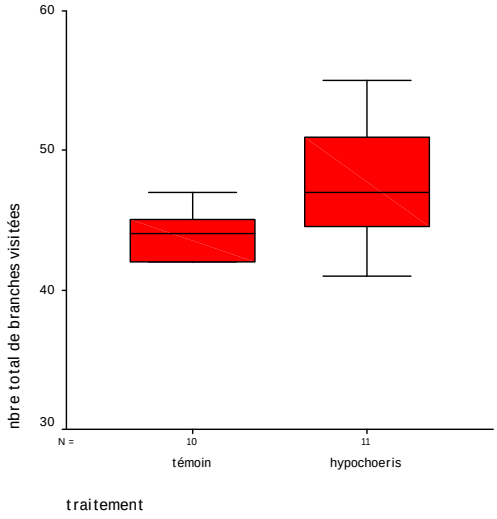


Figure III.17 : Nombre total de branches visitées en fonction du groupe d'individus.

- **L'exploration générale du labyrinthe** est utile si l'on désire accéder à l'activité des animaux sur l'ensemble du test. Le pourcentage d'entrées pour chaque branche visitée, qui rend compte de cette exploration, n'a pas permis de montrer de différence significative (*Figure III.18*).

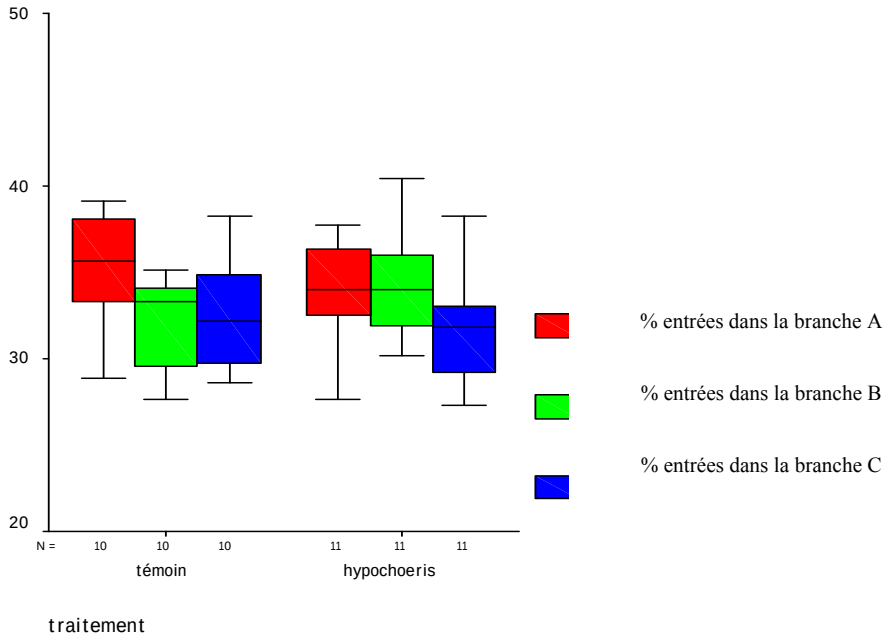


Figure III.18 : Pourcentages d'entrées dans les différentes branches du labyrinthe en fonction des groupes d'individus.

- Le **profil d'exploration du labyrinthe minute par minute** permet de mettre en évidence que les souris consommant *Hypochœris radicata* sont **plus actives durant les dernières minutes** du test par rapport aux souris témoins (p = 0,013) (*Figure III.19*).

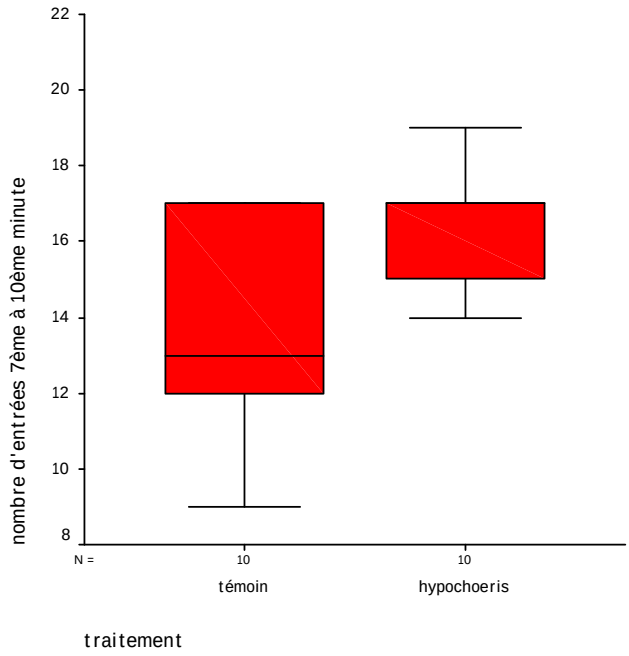


Figure III.19 : Nombre d'entrées des animaux dans les branches entre la 7ème et la 10ème minute du test en fonction du traitement.

2.4. Test d'interaction sociale du résident/intrus

Les individus exclus de l'étude statistique sont l'individu témoin A2 et les individus consommant la plante B1 et D0.

Les résultats (*Tableau III.14*) n'ont **pas** fait apparaître **de différence significative** concernant la durée de latence entre les deux individus avant le premier contact (*Figure III.20*) ni concernant le nombre de suivis de l'individu intrus effectués par l'individu résident (*Figure III.21*).

Tableau III.14 : Paramètres comportementaux d'interaction sociale mesurés dans le test du résident-intrus.

Groupes	Témoins (n = 11)	9% HR (n = 10)
Durée de latence avant 1er contact	4,00 (3,00-8,00)	5,00 (3,00-5,25)
Nombre reniflements	34,00 (30,50-36,50)	28,50 (22,50-32,25)*
Nombre de suivis	20,00 (16,25-25,75)	19,50 (15,75-22,75)
Nombre d'exploration de la litière	2,00 (0,00-9,50)	0,00 (0,00-0,00)*
Durée totale d'exploration de la litière	10,00 (0,00-50,25)	0,00 (0,00-0,00)*

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*
Les résultats sont exprimés en médiane et quartiles (entre parenthèses).
* $p < 0,05$, différence significative entre animaux témoins et traités (Mann-Whitney, Wilcoxon *W-test*).

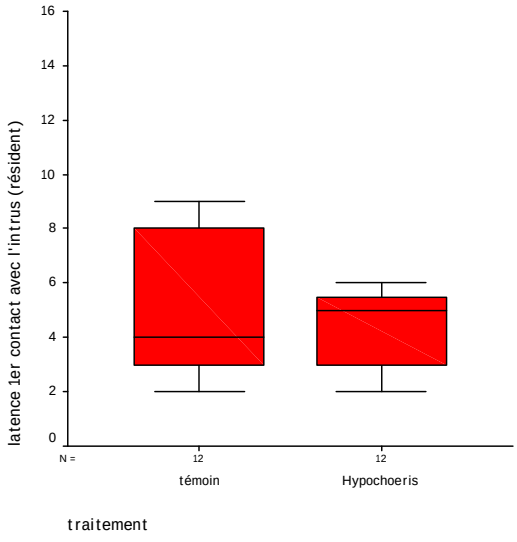


Figure III.20 : Durée de latence avant le premier contact entre l'individu résident et l'individu intrus.

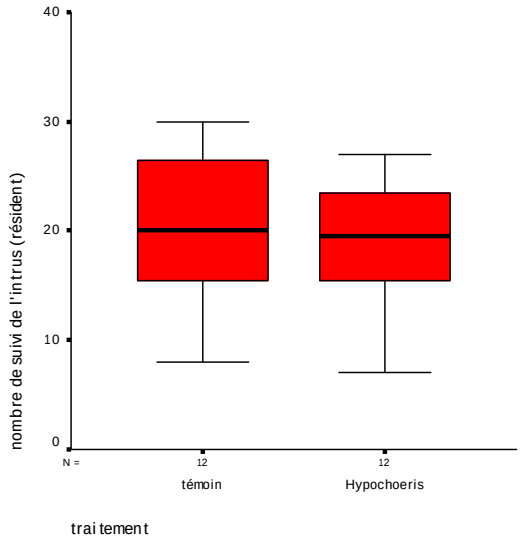


Figure III.21 : Nombre de suivis de l'individu intrus par l'individu résident.

En revanche, une **diminution** significative (p = 0,045) du nombre **d'attitude de reniflement** de l'individu intrus ayant ingéré *Hypochœris* par l'individu résident a pu être relevée (*Figure III.22*).

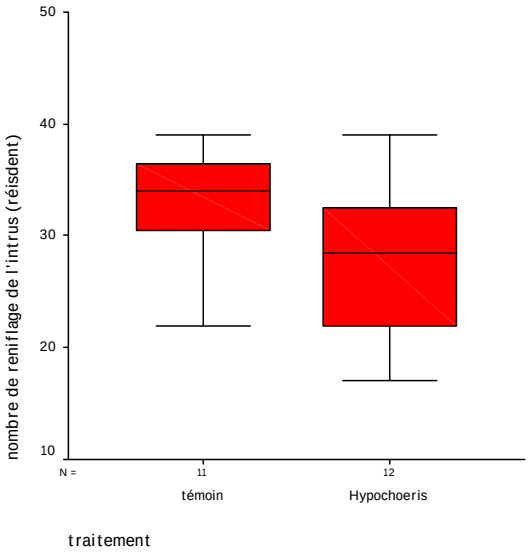


Figure III.22 : Nombre d'attitudes de reniflement de l'individu intrus par l'individu résident.

De plus, une diminution significative du nombre (p = 0,026) d'attitudes d'exploration de la litière (*Figure III.23*) associée à une diminution de la durée totale d'exploration de la litière (p = 0,029) de la part de l'individu résident en présence d'un individu intrus ayant ingéré Hypochœris ont également pu être mis en évidence (*Figure III.24*).

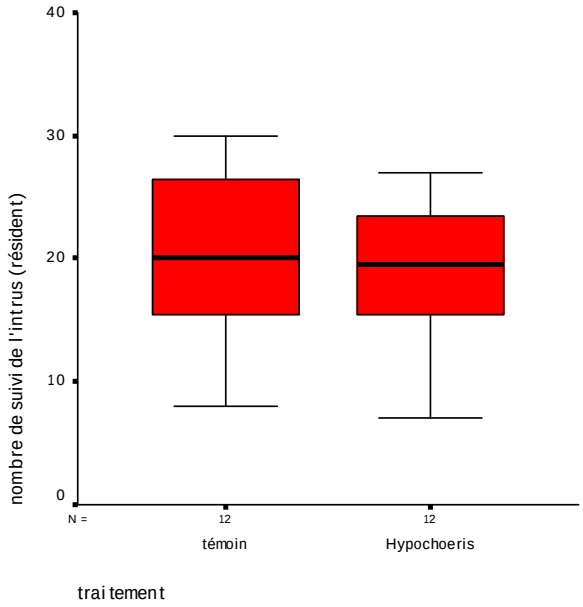


Figure III.23 : Nombre d'attitudes d'exploration de la litière de la part de l'individu résident, en présence de l'individu intrus.

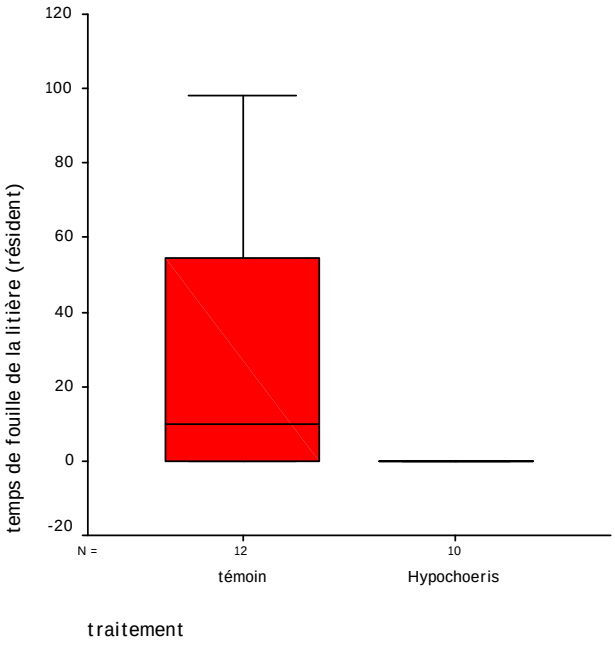


Figure III.24 : Durée totale correspondante aux phases d'exploration de la litière de la part de l'individu résident, en présence de l'individu intrus.

Les résultats issus de ce test apparaissent **difficilement exploitables** en termes d'interprétation. Des mesures de paramètres supplémentaires seraient peut-être nécessaires.

2.5. Résumé des différents tests

Si on résume l'ensemble des résultats des différents tests réalisés sur les animaux dans un tableau (*Tableau III.15*), certains points montrent que l'ingestion d'*Hypochœris radicata* entraîne des **modifications du comportement**. En effet, même si les individus consommant cette plante ne présentent (à pondérer avec le nombre et les caractéristiques des tests employés) ni trouble moteur et locomoteur, ni altération de l'intégrité des fonctions de mémoire et d'apprentissage, une **augmentation générale de leur activité** a pu être mis en évidence. Ce caractère peut être mis en relation avec une **certaine inhibition de leur anxiété** mais uniquement dans un **contexte sécurisé** ou lorsque le **risque est faible** ainsi qu'un **état de résignation moindre** ou pourrait-on parler également d'un **degré plus important de motivation** que chez les individus témoins.

Tableau III.15 : Résumé des performances comportementales chez les animaux traités avec 9% d'Hypochœris radicata.

Tests	Openfiefl Locotronic	Porsolt	Planche à trous LCS	Piscine Morris LY	Planche à trous LY Porsolt	Résident-Intrus
Animaux consommant 9%HR	Absence de dysfonctionnement locomoteur	↓ état de résignation/ ↑ degrés de motivation	- Suppression de la bimodalité des témoins (LCS) - ↓ anxiété lorsque le risque est faible	Absence de dysfonctionnement mnésique	↑ activité locomotrice ↑ degrés de motivation	↓attitudes reniflement et d'exploration de la litière en présence intrus consommant HR

9% HR : animaux consommant le régime à base de 9% d'*Hypochœris radicata*

C. Discussion

L'absence totale de connaissance sur la pathogénie et le mode d'action du ou des principes actifs *d'Hypochœris radicata* nous ont conduits à utiliser de nombreux tests **pour exploiter un large éventail de registres comportementaux**. Dans certains cas (test de Porsolt ; test du Labyrinthe en croix surélevé), l'absence de test conjoint avec des molécules thérapeutiques telles que les anxiolytiques ou les antidépresseurs peuvent nous limiter dans l'interprétation à donner aux résultats obtenus. Cependant, tout comme la réalisation de ces tests et leurs résultats sont des données fiables et rigoureuses, leur interprétation se doit d'être tout aussi précise, mais toujours rattachée au contexte précis de cette étude.

L'ensemble des tests réalisés sur les deux groupes permettent de dresser un **profil comportemental global** des animaux consommant *Hypochœris radicata* différent de celui des individus témoins (*Tableau III.15*). Les premiers présenteraient une **activité plus intense** (Labyrinthe en Y, Porsolt, Planche à trous) que les individus témoins mais ne manifesteraient **ni problème locomoteur** ni perturbation de la coordination motrice (Openfield, Locotronic®). L'augmentation de cette **activité semble** associée à une **diminution d'un certain type d'anxiété**, plus spécialement dans un **contexte sécurisé** ou lorsque le **risque apparaît plus faible** (Labyrinthe en croix surélevé, Planche à trous). L'observation d'une **diminution de l'état de résignation** qui semble être engendrée par l'ingestion d'*Hypochœris radicata* (Test de Porsolt) (*12, 16, 17*) semblerait être associée à l'**augmentation de leur activité** précédemment mentionnée et à une **augmentation dans leur degré de motivation** (test de Porsolt, Labyrinthe en Y). Les centres de la mémoire à court terme et de l'apprentissage sembleraient ne pas être affectés (Labyrinthe en Y, labyrinthe aquatique de Morris). Cependant, la mémoire étant très complexe et comprenant différents registres, les conclusions relatives à certains d'entre eux, obtenues avec les tests précédents, ne permettent pas de conclure catégoriquement quant à l'absence d'action de la plante sur la mémoire des animaux. De plus, l'absence de test réitéré dans ces tests (labyrinthe aquatique de Morris, labyrinthe en Y) ne permet pas de conclure quant à l'intégrité de la mémoire dite à long terme.

En reprenant les différents résultats dans le détail, des **éléments de réponse redondants** entre les différents tests transparaissent. En effet, concernant la première catégorie de tests (Locotronic® et Openfield), ceux-ci n'ont **pas** permis de mettre en évidence

d'effet de l'ingestion de la plante sur **la coordination motrice et la locomotion** des animaux. L'observation, au sein de la piscine de Morris, d'attitudes tout à fait inhabituelles aurait pu laisser penser à un désordre moteur. Cependant, l'inadaptation du test pour révéler ce type de trouble, l'absence d'une réelle significativité dans les différences de ce paramètre, le changement de tests avec le test du Locotronic® juste avant et donc le passage d'une activité de marche à une activité de nage, tous ces éléments ne permettent pas de conclure sur l'origine de cette attitude.

La capacité d'exploration des animaux aurait pu être approfondie en améliorant le dispositif de l'openfield mais celui utilisé dans cette étude ne permet pas de donner des indications sur le degré de motivation des animaux. En revanche, dans le **labyrinthe en Y**, les augmentations de l'activité, notamment en fin de test et du pourcentage d'alternance chez les animaux ingérant *Hypochœris* pourraient être expliquées par un **plus grand degré de motivation**.

En reprenant ce test du **labyrinthe en Y** avec le test de la **piscine de Morris**, les aspects concernant la **mémoire spatiale et temporelle à court terme ou immédiate** n'ont pas montré d'altération. **L'augmentation du pourcentage d'alternance** chez les animaux ingérant la plante est difficilement interprétable en termes de performances accrues et semblerait trouver plus facilement une réponse dans la **motivation plus élevée**. Cette conclusion pourrait d'ailleurs trouver un écho dans l'observation des résultats du **dernier essai dans le test de Morris** ; l'augmentation du temps passé pour les animaux consommant *Hypochœris* dans le quart de la piscine où se trouvait la plateforme pourrait laisser supposer là aussi une **persistance de leur motivation**.

Dans les tests étudiant les états d'anxiété et de résignation, celui de la **nage forcée de Porsolt** souligne que les animaux recevant *Hypochœris radicata* présentent une **durée d'immobilité diminuée** par rapport aux animaux témoins. La diminution de ce temps rend compte d'une plus grande aptitude à lutter, comparable à ce qui a été recensé lors d'études avec des antidépresseurs (*12, 17-19*). Le traitement avec *Hypochœris radicata* serait donc à l'origine **chez la souris** d'une **motivation accrue** et inversement d'une **diminution de l'état de résignation. Ceci viendrait conforter les résultats précédents.** Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec **beaucoup de prudence**. En effet, ce test dépend de nombreux paramètres dont celui de la souche murine utilisée. De ce fait, l'interprétation doit privilégier le terme d'aspects comportementaux critiques suite à une réponse au stress plutôt que celui

d'effet « antidépresseur » au sens strict (*17*). En effet, en médecine humaine, la « dépression » est définie cliniquement comme un complexe pathologique de symptômes psychologiques, neuroendocriniens et somatiques. Or, on ne peut que révéler des comportements spécifiques à chaque espèce (**endophénotypes**) d'où la précaution à prendre si l'on désire généraliser. De plus, comme il a pu être fait mention en début de discussion, l'absence, dans les protocoles, de groupes de souris testant une molécule reconnue comme ayant les propriétés antidépressives doit nous limiter dans notre interprétation. Dans la suite de ce chapitre, je discuterai donc non pas d'un effet antidépresseur mais plus d'effet **à induire une motivation accrue** et donc **à retarder la résignation**. Ceci reste en effet important en termes d'indice concernant les éventuelles voies métaboliques impliquées.

Cependant, je conserverai également une certaine réserve quant à une interprétation ou une extrapolation trop hâtive.

Parallèlement à ces résultats, les observations faites avec le **test d'anxiété du labyrinthe en croix surélevé** soulignent que les animaux consommant *Hypochœris radicata* apparaissent **plus actifs**. De plus, la présence de deux sous populations chez les individus témoins, ce qui est une observation classique et d'intensité plus ou moins marquée en fonction des souches de souris, disparaît chez les animaux consommant *Hypochœris radicata*. Or, cette « bimodalité » intrinsèque et spécifique d'une population et d'une souche murine est très souvent recensée dans les études de réponses au stress (*20*). Dans notre étude, nous avons pu remarquer que la présence de deux groupes à niveaux d'anxiété différents était non seulement plus marquée que pour d'autres souches murines, notamment comparée aux BALB/c (*21*), mais également plus marquée par rapport aux études sur C57BL/6J ayant pu être précédemment menées au sein de la même équipe. Le **« gommage » de ce trait de caractère** chez les individus consommant la plante, aboutissant à **une seule population à « bas niveau d'anxiété »,** pourrait être révélateur d'un effet non négligeable de l'ingestion d'*Hypochœris radicata*. Celle-ci **réduirait ainsi l'état d'anxiété** chez des **individus** initialement **plus anxieux** mais n'aurait **aucun effet** sur l'état d'anxiété des **individus naturellement moins anxieux**.

Cette observation peut être remise en parallèle avec les données du test de la **planche à trou** dans lequel la conclusion avait mentionné une **diminution de l'état d'anxiété** des animaux uniquement dans un **contexte sécurisant** (centre de la planche) et une tendance à l'**augmentation** de ce niveau dans un contexte de **risque accru** (bord de la planche).

Ces deux tests souligneraient donc bien **l'effet de l'ingestion de la plante sur le niveau d'anxiété** de l'animal **mais** avec un **impact différent** en fonction de paramètres intrinsèques et extrinsèques à l'**individu**.

Le ***myo*-inositol** est un composé dont les effets anxiolytiques et antidépresseurs ont été démontrés. De très nombreuses études cliniques et expérimentales le considèrent comme un traitement médicamenteux alternatif intéressant. Ces effets, initialement révélés par Cohen *et al.* en 1997 après des administrations chroniques (*22*), ont pu être mis en évidence chez l'homme (*23*) mais également chez l'animal (*24-26*).

En dehors de ces propriétés, le *myo*-inositol peut également avoir un impact sur l'activité locomotrice (*27*). Après une administration chronique *per os* durant 3 semaines à raison de 1,5 g/kg, chez le rat, Kofman et son équipe en 1998, ont pu mettre en évidence une **augmentation de l'activité** des animaux associée à une **élévation de la concentration en *myo*-inositol** dans le cortex (+ 36%) ainsi que dans l'hippocampe (+ 27%).

Ces données bibliographiques pourraient recouper les données de comportement que nous avons pu obtenir, caractérisées par une **augmentation générale de l'activité** (tests du labyrinthe en Y et de la planche à trous), une **diminution de l'anxiété sous certaines conditions** (tests de la planche à trous, du labyrinthe en croix surélevé) et une **motivation accrue** et/ou **résignation amoindrie** (test de la nage forcée de Porsolt, labyrinthe en Y, piscine de Morris) mais elles diffèrent avec les données de métabonomique et d'IRM qui ont pu montrer une élévation de la concentration cérébrale en *scyllo*-inositol et non en *myo*-inositol. Cependant, les études et les discussions précédentes nous ont conduits à admettre que les disruptions induites par *Hypochœris radicata* s'apparentaient plus à un **dérèglement de la balance *scyllo*-inositol/*myo*-inositol**. De plus, il peut être supposé qu'une augmentation en *scyllo*-inositol peut aussi avoir certaines répercussions communes avec son stéréoisomère. C'est ainsi, que certaines études réalisées sur **l'*épi*-inositol** ont pu affirmer que l'effet **anxiolytique était similaire,** voire augmenté à celui du *myo*-inositol (*28, 29*). La différence majeure résidait dans le fait que l'*épi*-inositol n'étant pas substrat pour l'enzyme phosphatidylinositol synthase, contrairement au *myo*-inositol, il ne rentrait pas dans le cycle du second messager (cycle PIP). Or, le cycle PIP ou inositol phosphate-phosphoinositide et les seconds messagers sont impliqués dans de nombreux systèmes de **neurotransmission**, notamment **sérotoninergiques.** L'implication du *myo*-inositol dans ces systèmes de neurotransmission et l'effet « antidépresseur » engendrée ont été démontrés (*26*).

L'*épi*-inositol aurait donc des propriétés anxiolytiques mais ne serait pas antidépresseur. Malheureusement, les références tendent souvent à être peu précise en matière d'inositol, englobant les différents isomères ensemble, ce qui n'était pas le cas lors des analyses par RMN du proton que nous avons pu réaliser. Les rôles du *scyllo*-inositol, nous l'avons déjà précisé précédemment, sont inconnus. On peut donc **supposer qu'il puisse partager certaines propriétés avec le *myo*-inositol**, notamment concernant un **effet sur le niveau d'anxiété et de résignation**.

Enfin, nos observations préliminaires faites lors d'une expérimentation à but histologique chez le rat, qui avaient souligné la nécessité d'injecter une plus forte quantité de Pentobarbital pour anesthésier les rattes traitées pourraient trouver matière à explication. En effet, l'augmentation de l'activité motrice révélée par les tests comportementaux pourrait expliquer la nécessité d'administrer des doses plus fortes d'anesthésique. Un effet miroir a d'ailleurs pu être mis en évidence, chez des rongeurs (rats et souris), lors de l'administration intrapéritonéale d'extraits de feuilles de calendula (*Wedelia calendulacea* Less.), autre espèce de la famille des Composées ou Astéracées. Les animaux traités présentaient une diminution de leur activité motrice avec une diminution de la dose de **barbiturique** utilisée (*30*). L'ingestion d'*Hypochœris radicata* n'entraînerait pas d'effet sédatif mais bien au contraire un **effet stimulant et excitant, augmentant ainsi leur activité et leur niveau de « motivation »**. Par contre, les tests comportementaux ayant été réalisés uniquement sur rongeurs mâles, aucune conclusion sur l'effet sexe ne peut être avancée. De plus, souris et rats peuvent réagir différemment, les dimorphismes sexuels pouvant différer entre eux.

La première hypothèse pour expliquer la pathogénie de la dépression se basa, en 1965, sur l'hypothèse des monoamines (*31*) désignant une carence en monoamines comme le facteur causal. Même si l'implication des monoamines, dopamine, noradrénaline et sérotonine est reconnue, les structures ou fonctions pouvant être altérées sont nombreuses.

Durant un état « dépressif », un des dérèglements pouvant avoir lieu se trouve, au niveau du processus de **neurotransmission**, par l'intermédiaire des seconds messagers, précédemment obtenus à partir du *myo*-inositol, sur les **récepteurs sérotoninergiques**. Cet effet peut être évalué, soit en étudiant ces récepteurs, notamment les récepteurs post-synaptiques 5-HT_2, soit en étudiant les concentrations intracellulaires en Ca^{2+}. En effet, il a été démontré que les **teneurs intracellulaires en ions Ca^{2+}** étaient intimement **liées aux états dépressifs**. Ainsi, un blocage du relargage des ions Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires

diminue la durée d'immobilité dans le test de la nage forcée de Porsolt et signale donc un état proche de ceux initiés par les antidépresseurs, chez la souris. A l'inverse, une stimulation de ce relargage serait à l'origine d'un état « dépressif » chez la souris (*18*). En médecine humaine, une étude clinique **chez des patients dépressifs** a montré que la durée de rémission dépendait de l'augmentation en Ca^{2+} intracellulaire générée par la sérotonine (*32*).

Ces observations sont aussi à mettre en parallèle avec la physiopathologie de la **polyneuropathie sensorimotrice distale**, complication du diabète sucré. En effet, l'étiologie de cette dernière est encore peu connue mais il existe certaines connaissances sur les mécanismes impliqués : dans le diabète, des **élévations de la concentration en Ca^{2+} cytosolique** sont responsables de la **dégénérescence neuronale** ainsi que des phénomènes d'apoptose. Or, la polyneuropathie sensorimotrice distale est une des complications du diabète dont les caractéristiques cliniques et histopathologiques présentent des analogies avec le Harper. Nous retrouvons ainsi un assemblage, un réseau de données, à la fois biochimiques (augmentation de la teneur en calcium intracellulaire), histologiques (dégénérescence neuronale), comportementales (**niveau de résignation ou de motivation affecté**) et cliniques (neuropathie sensorimotrice distale) qui pourraient s'apparenter aux données cliniques recensées dans le harper.

L'implication des ions calcium a également été révélée dans la pathogénie de la maladie d'**Alzheimer**. La neurodégénérescence caractéristique de cette maladie semble être liée à une **accumulation intracellulaire en calcium**. Cette altération dans l'homéostasie calcique pourrait être liée à l'intégrité des récepteurs à la ryanodine mais également aux **récepteurs inositols triphosphates ou IP_3** (*33, 34*). De même, cette augmentation de calcium intracellulaire, due à l'activation anormale des récepteurs IP_3, a pu être soulignée comme dénominateur commun des maladies des **motoneurones** comme **la sclérose latérale amyotrophique** (*35, 36*). Ici encore, la pathologie comparée montre qu'il existerait certains recoupements entre l'augmentation intracellulaire anormale de calcium et l'activation exacerbée des récepteurs provenant du *myo*-inositol en parallèle avec, au niveau clinique, des troubles des motoneurones et au niveau histologique, des lésions de neurodégénérescence.

Une autre hypothèse permettant d'établir une origine éventuelle de l'augmentation d'activité des souris traitées avec *Hypochœris radicata* repose sur **l'augmentation en N-Acetyl-aspartate (NAA) dans le cerveau** des animaux, qui a été mis en évidence après analyse PLS2 entre les données de métabonomique et d'IRM. Dans le chapitre précédent,

nous avions souligné le fait qu'une telle variation de ce métabolite était rare et n'avait pu être à ce jour révélée que dans le **syndrome de Cavanan**, dont les symptômes et les lésions histopathologiques rappellent les caractéristiques du Harper. En effet, sur un plan neurocomportemental, il a pu être démontré qu'une accumulation en NAA, bien que liée à des lésions de neurodégénérescence, était également fonctionnellement responsable de **neuroexcitation** (*37*). Cette neuroexcitation peut se traduire sous forme de convulsions, comme chez les épileptiques. Cependant, Kitada souligne que d'autres manifestations cliniques peuvent apparaître, influencées par le fond génétique ainsi que les différences inter espèces.

L'augmentation de NAA qui a été mise en évidence chez les patients atteints du syndrome de Cavanan a pu être reproduite chez le rat Tremor, un rat mutant présentant spontanément, sur le plan histologique, une dégénérescence cérébrale spongiforme et cliniquement, des **crises épileptiques** (*31, 37*). Nous avons déjà précédemment souligné les analogies entre la maladie de Cavanan et le harper mais sans mentionner les liens concernant les manifestations épileptiformes. Or, même si les chevaux atteints ne présentent pas de crises d'épilepsie ou épileptiformes, un des rares traitements médicamenteux ayant un effet sur les chevaux est un traitement avec de la **phénytoïne**. Cette molécule est un anticonvulsivant agissant sur la conduction nerveuse et réduisant les décharges répétitives et prolongées (*38*). Dans le cas du harper, cette molécule agit plus spécifiquement en **diminuant l'excitabilité** des cellules nerveuses et en **minimisant l'activité électromyographique** chez les animaux atteints (*38*). Des crises d'excitabilité n'ont pas été visibles lors de la réalisation des tests comportementaux sur les souris traitées. Cependant, leur **activité exacerbée** pourrait signer un **dysfonctionnement au niveau de la transmission de l'influx nerveux,** similaire à celui observé chez des animaux ou patients épileptiques. La présence pour certains individus de manifestations tout à fait inhabituelles (**« à coups » dans le test de Morris)** pourrait venir étayer cette hypothèse. Cependant, l'origine d'un tel comportement n'ayant pas été établie, cette observation ne peut être retenue. Ce dysfonctionnement pourrait néanmoins être conforté indirectement par **l'augmentation de NAA** observée chez les souris ingérant la plante et **l'action bénéfique de la phénytoïne** chez des chevaux atteints de harper. L'action bénéfique de cette molécule peut être expliquée par sa capacité à inhiber le relargage de Ca^{2+}, interférant ainsi dans le cycle des inositols et limitant les phénomènes d'ischémie cérébrale (*39*), ces derniers pouvant être à l'origine des états épileptiformes.

Le résultat intéressant obtenu chez le cheval avec de la **méphénésine** qui est un relaxant musculaire à action centrale agissant en diminuant les décharges électriques répétitives et prolongeant la durée de récupération, pourrait aussi venir expliquer une partie de la pathogénie du harper, la présence d'impulsions nerveuses excessives et répétitives à l'origine d'une stimulation exacerbée des muscles fléchisseurs ou d'une inhibition des extenseurs (*40*). De plus, la **diminution de l'excitation** de l'animal atteint par ce traitement recouperait les éléments de comportement sur les souris, les données bibliographiques recensées précédemment ainsi que le traitement bénéfique à la phénytoïne.

Références :

(1) Huntington, P.J., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., Luff, A.R., Finkelstein, D.I., and Flynn, R.J., (1989) Australian Stringhalt-epidemiological, clinical and neurological investigations. *Equine Vet. J.*, *21*, 266-273.

(2) Slocombe, R.F., Huntington, P.J., Friend, S.C., Jeffcott, L.B., Luff, A.R., and Finkelstein, D.K., (1992) Pathological aspects of Australian Stringhalt. *Equine Vet. J.*, *24*, 174-183.

(3) Cahill, J.I., Goulden, B.E., and Jolly, R.D., (1986) Stringhalt in horses: a distal axonopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, *12*, 459-475.

(4) Hausberger, M., Roche, H., Henry, S., and Visser, E.K., (2008) A review of the human-horse relationship. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, *109*, 1-24.

(5) Griffith, H.R., den Hollander, J.A., Stewart, C.C., Evanochko, W.T., Buchthal, S.D., Harrell, L.E., Zamrini, E.Y., Brockington, J.C., and Marson, D.C., (2007) Elevated brain *scyllo*-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed.*, *20*, 709-716.

(6) Shetty, H.U., Holloway, H.W., and Schapiro, M.B., (1996) Cerebrospinal fluid and plasma distribution of *myo*-inositol and other polyols in Alzheimer disease. *Clin. Chem.*, *42*, 298-302.

(7) Atack, J.R. and Schapiro, M.B., (2002) Inositol monophosphatase activity in normal, Down syndrome and dementia of the Alzheimer type CSF. *Neurobiol. Aging*, *23*, 389-396.

(8) Shimon, H., Agam, G., Belmaker, R.H., Hyde, T.M., and Kleinman, J.E., (1997) Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *Am. J. Psychiatry*, *154*, 1148-1150.

(9) Barkai, A.I., Dunner, D.L., Gross, H.A., Mayo, P., and Fieve, R.R., (1978) Reduced *myo*-inositol levels in cerebrospinal fluid from patients with affective disorder. *Biol. Psychiatry*, *13*, 65-72.

(10) Prut, L. and Belzung, C., (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.*, *463*, 3-33.

(11) Handley, S.L. and Mithani, S., (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, *327*, 1-5.

(12) Porsolt, R.D., Bertin, A., and Jalfre, M., (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, *229*, 327-336.

(13) Boissier, J.R., Simon, P., and Lwoff, J.M., (1964) Use of a Particular Mouse Reaction (Hole Board Method) for the Study of Psychotropic Drugs. *Therapie*, *19*, 571-583.

(14) McPhie-Lalmansingh, A.A., Tejada, L.D., Weaver, J.L., and Rissman, E.F., (2008) Sex chromosome complement affects social interactions in mice. *Horm. Behav.*

(15) Gatewood, J.D., Wills, A., Shetty, S., Xu, J., Arnold, A.P., Burgoyne, P.S., and Rissman, E.F., (2006) Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. *J. Neurosci.*, *26*, 2335-2342.

(16) Porsolt, R.D., Le Pichon, M., and Jalfre, M., (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, *266*, 730-732.

(17) Petit-Demouliere, B., Chenu, F., and Bourin, M., (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl.)*, *177*, 245-255.

(18) Galeotti, N., Bartolini, A., and Ghelardini, C., (2006) Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Neuropharmacology*, *50*, 309-316.
(19) Zhang, Y.Z., Li, Y.F., Yu, N.J., Yuan, L., Zhao, Y.M., Xiao, W.B., and Luo, Z.P., (2007) Antidepressant-like effects of the ethanolic extract of Xiaobuxin-Tang, a traditional Chinese herbal prescription in animal models of depression. *Chin. Med. J.*, *120*, 1792-1796.
(20) Jakovcevski, M., Schachner, M., and Morellini, F., (2008) Individual variability in the stress response of C57BL/6J male mice correlates with trait anxiety. *Genes Brain Behav.*, *7*, 235-243.
(21) Avgustinovich, D.F., Lipina, T.V., Bondar, N.P., Alekseyenko, O.V., and Kudryavtseva, N.N., (2000) Features of the genetically defined anxiety in mice. *Behav. Genet.*, *30*, 101-109.
(22) Cohen, H., Kotler, M., Kaplan, Z., Matar, M.A., Kofman, O., and Belmaker, R.H., (1997) Inositol has behavioral effects with adaptation after chronic administration. *J. Neural. Transm.*, *104*, 299-305.
(23) Levine, J., (1997) Controlled trials of inositol in psychiatry. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, *7*, 147-155.
(24) Einat, H., Karbovski, H., Korik, J., Tsalah, D., and Belmaker, R.H., (1999) Inositol reduces depressive-like behaviors in two different animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl.)*, *144*, 158-162.
(25) Einat, H. and Belmaker, R.H., (2001) The effects of inositol treatment in animal models of psychiatric disorders. *J. Affect. Disord.*, *62*, 113-121.
(26) Einat, H., Clenet, F., Shaldubina, A., Belmaker, R.H., and Bourin, M., (2001) The antidepressant activity of inositol in the forced swim test involves 5-HT(2) receptors. *Behav. Brain Res.*, *118*, 77-83.
(27) Kofman, O., Agam, G., Shapiro, J., and Spencer, A., (1998) Chronic dietary inositol enhances locomotor activity and brain inositol levels in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, *139*, 239-242.
(28) Bersudsky, Y., Einat, H., Stahl, Z., and Belmaker, R.H., (1999) *Epi*-inositol and inositol depletion: two new treatment approaches in affective disorder. *Curr. Psychiatry Rep.*, *1*, 141-147.
(29) Einat, H., Elkabaz-Shwortz, Z., Cohen, H., Kofman, O., and Belmaker, R.H., (1998) Chronic *epi*-inositol has an anxiolytic-like effect in the plus-maze model in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, *1*, 31-34.
(30) Prakash, T., Rao, N.R., and Viswanatha Swamy, A.H., (2008) Neuropharmacological studies on *Wedelia calendulacea Less* stem extract. *Phytomedicine*, in press.
(31) Schildkraut, J.J., (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*, *122*, 509-522.
(32) Tomiyoshi, R., Kamei, K., Muraoka, S., Muneoka, K., and Takigawa, M., (1999) Serotonin-induced platelet intracellular Ca^{2+} responses in untreated depressed patients and imipramine responders in remission. *Biol. Psychiatry*, *45*, 1042-1048.
(33) Lopez, J.R., Lyckman, A., Oddo, S., Laferla, F.M., Querfurth, H.W., and Shtifman, A., (2008) Increased intraneuronal resting [Ca^{2+}] in adult Alzheimer's disease mice. *J. Neurochem.*, *105*, 262-271.
(34) Stutzmann, G.E., (2005) Calcium dysregulation, IP_3 signaling, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*, *11*, 110-115.
(35) Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joo, F., and Appel, S.H., (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotropic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, *39*, 203-216.

(36) Pagani, M.R., Reisin, R.C., and Uchitel, O.D., (2006) Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J. Neurosci.*, *26*, 2661-2672.
(37) Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y., Kondo, A., Maihara, T., Yokoi, N., Kuramoto, T., Sasa, M., and Serikawa, T., (2000) Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J. Neurochem.*, *74*, 2512-2519.
(38) Huntington, P.J., Seneque, S., Slocombe, R.F., Jeffcott, L.B., McLean, A., and Luff, A.R., (1991) Use of phenytoin to treat horses with Australian stringhalt. *Aust. Vet. J.*, *68*, 221-224.
(39) Kinouchi, H., Imaizumi, S., Yoshimoto, T., and Motomiya, M., (1990) Phenytoin affects metabolism of free fatty acids and nucleotides in rat cerebral ischemia. *Stroke*, *21*, 1326-1332.
(40) Dixon, R.T. and Stewart, G.A., (1969) Clinical and pharmacological observations in a case of equine stringhalt. *Aust. Vet. J.*, *45*, 127-130.

CHAPITRE IV :
EXPLORATIONS COMPLEMENTAIRES

IV. Chapitre IV : Explorations complémentaires

Introduction

Les chapitres précédents ont présenté les réponses d'animaux de laboratoire à l'administration, *per os,* d'*Hypochœris radicata* à l'aide des trois méthodes d'approches complémentaires. Ces études avaient pour but, d'une part, de mettre en évidence le lien direct entre le végétal et les disruptions métaboliques mesurées chez l'animal et, d'autre part, de mieux circonscrire la nature et la localisation de ces disruptions. Cependant, cette réponse chez l'animal a été révélée en partant d'un pool d'inflorescences provenant de collectes ayant eu lieu à des dates réparties entre août et novembre, sur des parcelles différentes et correspondant à plusieurs stades de développement. Certes, nous avons pu **mettre en évidence** la **neurotoxicité potentielle de ce végétal** mais le **principe actif** ainsi que les **facteurs prédisposants** restent encore à déterminer. Si le végétal est susceptible de synthétiser un principe toxique, sa production peut être favorisée sous certaines conditions pédologiques, géographiques, saisonnières ou climatiques et être importante à certains stades floraux. En effet, les métabolites secondaires végétaux sont en général produits lors de **réponses à des stress hydriques et osmotiques** (*1-4*), comme intermédiaires dans d'autres **mécanismes de défense** (*4,5*), et lors d'étapes cruciales dans le développement du végétal comme la floraison (*6*). La connaissance de certains de ces facteurs permettrait, d'une part, de mieux prévenir les épidémies de harper en modulant le contrôle et la gestion d'*Hypochœris radicata* sur les parcelles et, d'autre part, de circonscrire la fraction végétale contenant le principe actif.

Aussi, dans un premier temps, des **extraits de végétaux triés par stade** ont été **analysés par différentes techniques analytiques**, le but étant de visualiser et **hiérarchiser les différents facteurs**, lieux, dates de collecte et stade d'inflorescence. Dans un second temps, ces mêmes échantillons ont été **testés sur animal** pour étudier les variations métaboliques du végétal et révéler ses potentialités toxiques.

En parallèle à cette exploration du potentiel toxique du végétal, une hypothèse relative au pouvoir antioxydant de la taurine a été testée. La **taurine** possède en effet de multiples propriétés, en particulier des propriétés **antioxydantes et neuroprotectrices** de première

importance au sein du système nerveux. Un certain nombre de travaux ont pu mettre en évidence son rôle prépondérant dans les problèmes de conduction nerveuse. Une supplémentation permet par exemple d'**améliorer** notablement la **vélocité,** lors de **neuropathie diabétique** dont la symptomatologie présente des analogies avec le harper (*7,8*). D'autres auteurs ont souligné le potentiel **anxiolytique** de ce composé (*9,10*). Avant de conduire des tests comportementaux sur la souris, les données épidémiologiques avaient révélé, de façon assez subjective, l'attitude anormale et anxiogène des chevaux atteints. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse qu'une supplémentation en taurine pourrait améliorer l'état clinique de chevaux atteints de harper, soit en agissant directement sur les voies métaboliques « disruptées », soit, de façon indirecte, par modulation d'autres voies métaboliques. En vue de déterminer l'effet de l'administration de taurine chez des animaux de laboratoire consommant *Hypochœris radicata,* deux expérimentations de métabonomique ont été réalisées chez le rat et chez la souris.

Ainsi, la **première partie** de ce chapitre s'attachera à reprendre les données issues de **l'exploration du végétal** afin d'apporter des éléments supplémentaires d'information. La **seconde partie** exposera les **essais de traitement à la taurine** et les impacts ou interactions éventuelles avec l'administration d'*Hypochœris radicata*.

A. Etude exploratoire du végétal

1. Etude des variations intrinsèques au végétal

1.1. Matériel et Méthodes

1.1.1. Matériel végétal

Dans les précédentes expérimentations, un pool réalisé à partir de proportions strictement et rigoureusement identiques issues de **48 échantillons** (*Tableau IV.1*) de poudre de fleur d'*Hypochœris radicata* a été employé. Dans la suite des travaux exposés, celui-ci sera réutilisé et nommé « pool moyen ». L'unicité du **matériel végétal dans** chaque expérimentation a permis d'assurer un **suivi et une correspondance** dans les conclusions et les interprétations proposées après chaque exploration.

Tableau IV.1 : Identification des 48 échantillons d'Hypochœris radicata, en fonction de la date (en 2005), du lieu de collecte et des stades d'inflorescence.

Lieux de collecte	**Dates** de collecte	Stades d'inflorescence					
		Boutons fermés **a**	Boutons ouverts **b**	Fleurs ouvertes (pleine floraison) **c**	Fleurs fanées **d**	Fleurs début de fructification **e**	Fruit mâtures (aigrettes) **f**
Marly (78)	15/08				X	X	X
Poey (64)	18/08	X	X		X	X	X
Poey (64)	31/08	X	X		X	X	X
Poey (64)	15/09			X	X	X	X
Lescar (64)	16/09			X			X
Lescar (64)	19/09			X	X	X	X
Poey (64)	24/09	X	X		X	X	X
La Salvetat (31)	05/10	X	X	X	X	X	X
Labastide (64)	06/10	X	X	X	X	X	X
Lescar (64)	12/10	X	X	X	X	X	
Bougarber (64)	08/11			X	X		X

Dans l'expérience qui suit, les **48 échantillons individualisés ont été analysés au moyen de différentes techniques analytiques**.

Avant de pouvoir être étudiés grâce à ces différentes techniques, les échantillons présents sous forme de poudre ont subi une **étape préalable d'extraction par des solvants**. **Deux protocoles d'extraction** ont été testés, l'un aboutissant à l'obtention d'une phase unique, l'autre permettant de collecter une phase aqueuse et une phase organique.

1.1.2. Protocoles d'extraction

a. Méthode d'extraction 1 : obtention d'une phase unique

Les solvants utilisés, de qualité analytique, ont été achetés à la société Scharlau Chimie SA (Barcelone, Espagne). Le Butyl Hydroxy Toluène (BHT) provient de chez Sigma Aldrich Chimie SA (St Quentin Fallavier, France). L'eau utilisée est de l'eau ultrapure du système Millipore (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France).

Afin de pouvoir obtenir une seule et même phase, le solvant d'extraction a nécessité de mélanger :

- 200 mL de chloroforme ($CHCl_3$) pour HPLC,
- 100 mL de méthanol (CH_3OH) pour HPLC,
- 2,5 mL d'acide acétique (CH_3COOH), pour HPLC,
- 2,5 mL d'H_2O milli Q,
- 0,3 g de Butyl Hydroxy Toluène (BHT), soit 0,1%.

Une quantité de 10 mg de poudre de végétal lyophilisé a été placée dans des tubes de 3 mL dans lesquels ont été ajoutés 1,5 mL de solvant d'extraction. Le tout a été homogénéisé durant 1 min au Polytron (vitesse réglée à 22/26) puis centrifugé durant 5 min à 3000 g. Après centrifugation, la partie limpide a été récupérée (1 mL au minimum) avec une pipette et transvasée dans un tube Eppendorf. Un volume de 500 µL a été prélevé puis évaporé sous jet d'azote. Après évaporation, le résidu a été reconstitué dans 50 µL de solvant initial, permettant ainsi l'obtention d'un extrait concentré d'un facteur 10. Après homogénéisation, 0,2 µL ont été prélevés puis analysés.

b. Méthode d'extraction 2 : obtention de deux phases

Afin d'obtenir deux phases finales, le solvant d'extraction a été préparé en mélangeant :

- 200 mL de chloroforme ($CHCl_3$) pour HPLC,
- 100 mL de méthanol (CH_3OH) pour HPLC,
- 0,3 g de Butyl Hydroxy Toluène (BHT), soit 0,1%.

Une quantité de 10 mg de poudre de végétal a été prélevée puis placée dans un tube de 3 mL dans lequel 1 mL de solvant réalisé précédemment et 0,2 mL d'H_2O milli Q ont été versés. Le tout a été homogénéisé durant 1 min au Polytron (vitesse réglée à 22/26), permettant ainsi l'obtention de deux phases. Les tubes ont été centrifugés durant 5 min à 3000 g. Puis, la phase aqueuse (supérieure) et la phase organique (inférieure) ont été collectées puis transvasées séparément dans des tubes Eppendorf. Des volumes de 500 µL de phase organique et 200 µL de phase aqueuse ont été prélevés séparément et mis à évaporer sous jet d'azote. Le résidu de la phase organique a été reconstitué dans 50 µL de solvant initial (chloroforme/méthanol/BHT) pour obtenir un extrait concentré 10 fois. La phase aqueuse a été reconstituée dans 20 µL de mélange méthanol/H_2O en proportions 75/25 avec 0,1% de BHT. Après homogénéisation, 0,2 µL ont été prélevés puis analysés.

1.1.3. Méthodes d'analyses utilisées

Trois méthodes analytiques ont été utilisées dans cette expérimentation, la spectrométrie de masse en **Py-MAB-ToF** et en **LC-ESI-MS** puis la spectrométrie par **RMN** du ^1H. En effet, il n'existait aucune connaissance préalable sur le type d'analyse apte à révéler et hiérarchiser les facteurs de variation. Ces analyses ont pour but d'apporter des éléments d'information concernant les facteurs prédisposants et/ou les métabolites éventuellement intéressants à interpréter.

1.1.4. Justification des techniques employées

Cette étude a été menée **après les expérimentations *in vivo*** dans le but de déterminer si du ***scyllo*-inositol, du *myo*-inositol** et/ou des composés à base d'inositol sont **présents** initialement dans la plante, mais aussi d'étudier les **variations métaboliques entre les différents facteurs** tels que le lieu, la date de récolte et le stade de développement puis de **hiérarchiser** leur importance. Ce deuxième objectif découle d'une hypothèse que nous avons

pu émettre. En effet, la plante n'est pas connue pour être toxique pour les animaux bien qu'elle soit omniprésente au sein des pâtures. De plus, il est maintenant reconnu que les variations de potentialité toxique au sein d'un végétal dépendent étroitement des variations dans la synthèse des différents métabolites. De ce fait, nous sommes partis du principe **qu'en révélant les variations métaboliques entre les différents facteurs**, certaines **variations dans les potentialités toxiques** de la plante pourraient être mises en évidence.

Les principes toxiques ou métabolites secondaires au sein des végétaux peuvent appartenir à des familles très différentes : terpènes, flavonoïdes, coumarines, acétophénones, alkaloïdes, … L'intérêt n'est donc pas d**'identifier** la structure précise d'un composé mais de rechercher d'éventuels métabolites ou **familles de métabolites rattachés au degré de variabilité intrinsèque au végétal et donc à sa potentialité toxique**.

La **spectrométrie de masse LC-ESI-MS** est **extrêmement sensible** et, en ne réalisant qu'une fragmentation minimale, **préserve au maximum les molécules natives,** d'où son intérêt dans cette étude. Cependant, elle ne peut étudier que les molécules pouvant être **ionisées** par ce type d'ionisation et **dissoutes en phase liquide**.

La **spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)** ne fragmente pas les molécules et permet aussi d'analyser les **molécules natives**. Elle permet de plus de repérer un grand nombre de molécules, dont celles ne pouvant pas s'ioniser. En revanche, ces molécules ne peuvent être détectées que si elles se trouvent en **concentration suffisante** (de l'ordre de la µmole).

Dans les analyses par **spectrométrie de masse Py-MAB-Tof**, l'énergie utilisée pour ioniser les molécules est faible. De ce fait, la fragmentation engendrée est faible, ce qui permet également de conserver une **richesse d'information** dans l'empreinte. De plus, l'utilisation de l'azote comme gaz conduit à l'ionisation d'une seule partie des molécules présentes. L'intérêt de cette technique est de faire une **analyse rapide** et de pouvoir identifier les **« analytes » volatils.** Ce dernier point explique son inaptitude à identifier de grosses molécules.

1.1.5. Traitement des données

Dans l'analyse par **spectrométrie de masse Py-MAB-ToF, 2 dépôts** ont été réalisés par échantillon et 613 variables ont été obtenues. L'analyse a été réalisée sur la phase obtenue

par la première méthode d'extraction, ainsi que sur les phases organiques ou lipophiles obtenues par la seconde méthode d'extraction. Les échantillons ont été analysés concentrés 10 fois. Un dépôt de 0,3 µL a été réalisé. La gamme de masse m/z utilisée s'est étendue de 55 à 1000. Le gaz utilisé était de l'azote. Enfin, la programmation de pyrolyse retenue s'est faite de 20 à 1100°C avec une pente de 20°C par ms et un palier jusqu'à 125 s.

L'analyse par **RMN du proton** a généré 890 variables et a permis d'étudier les extraits aqueux et lipophiles issus de la deuxième méthode d'extraction. Les conditions d'analyse sont les mêmes que celles utilisées pour les échantillons animaux (chapitre II).

Enfin, l'analyse par **spectrométrie de masse LC-ESI-MS** a été réalisée en **mode positif et en mode négatif** sur les **extraits aqueux** de la seconde méthode d'extraction. Les échantillons ont été analysés concentrés 10 fois. Un volume de 10 µL d'échantillon a été injecté. La gamme de masse m/z utilisée s'est étendue de 50 à 2000. Le débit de l'échantillon était de 0,2 $mL.min^{-1}$. Le gradient de phases mobiles utilisé est décrit dans le *Tableau IV.2* ci-dessous :

Tableau IV.2 : Gradient HPLC utilisé en spectrométrie de masse LC-ESI-MS.

Temps	0 min	3 min	8 min	9 min	15 min
Phase A : 90% H_20, 10% MeOH	100%	0%	0%	100%	100%
Phase B : 100% MeOH	0%	100%	100%	0%	0%

Les données ont été traitées par des outils de **statistique multidimensionnelle**. Les résultats ont été visualisés grâce à des analyses factorielles discriminantes, en fonction des différents facteurs testés : stade de développement, date ou lieu de collecte.

1.2. Résultats

1.2.1. Analyse des échantillons en spectrométrie de masse Py-MAB-Tof

Les ACP et AFD réalisées en fonction des facteurs date et lieu de collecte n'ont pas permis de révéler de structure particulière au sein des échantillons analysés. En revanche,

l'analyse factorielle discriminante des 48 échantillons filtrés en fonction du **stade de développement floral** a permis de mettre en évidence sur les deux premiers plans factoriels, d'une part, **l'évolution au cours du temps du métabolome du bouton floral** vers les stades de floraison et de fructification et, d'autre part, de montrer que le métabolome suit **2 orientations au cours du développement floral**. La première composante décrit la variation du « métabolome floral » entre les stades « Fleurs ouvertes » et « Fruits mâtures ». La seconde composante rend compte de la variation du « métabolome floral » entre le stade « Boutons fermés » et le stade « Fleurs ouvertes » (*Figure IV.1*). Ces observations ont été plus évidentes en analysant la phase unique issue de la première méthode d'extraction (*Figure IV.1*), qu'en analysant la phase aqueuse issue de la seconde (*Figure IV.2*).

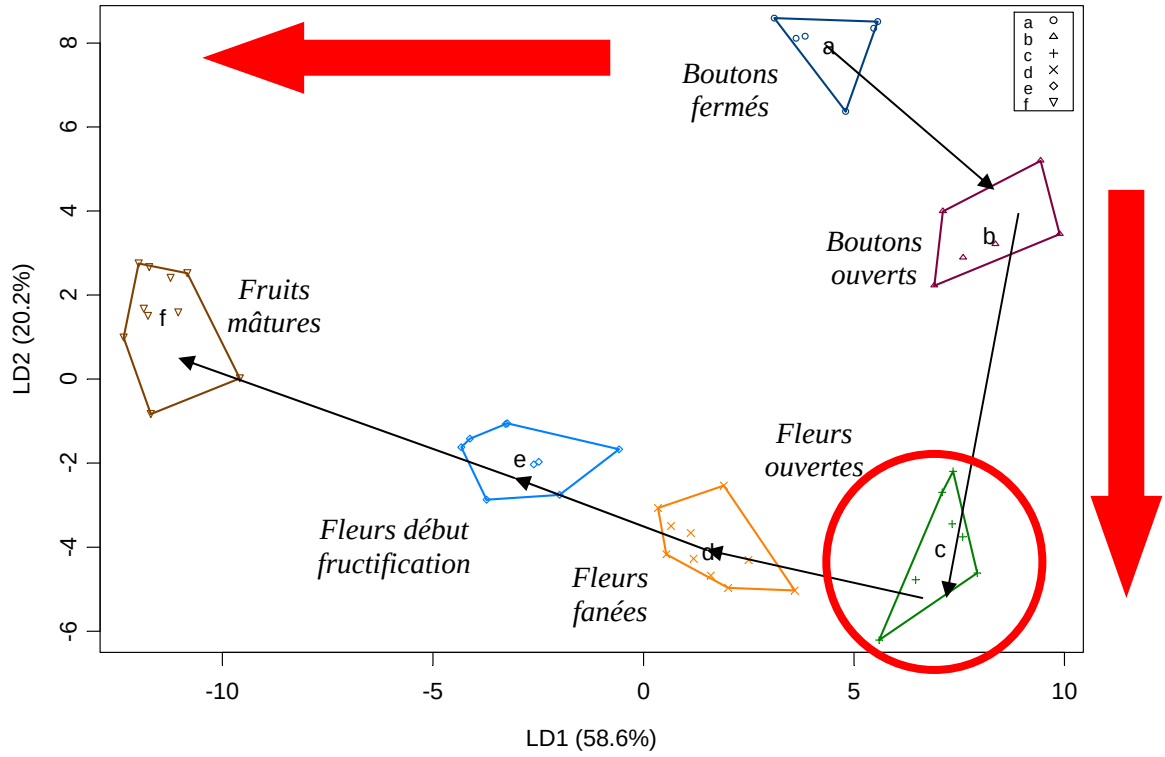


Figure IV.1 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*2, réalisée sur 20 variables filtrées à partir des données issues de l'analyse en spectrométrie de masse Py-Mab-Tof des 48 extraits végétaux obtenus par la première méthode d'extraction. Les flèches matérialisent l'évolution au cours du développement floral avec succession des 6 stades représentés par une couleur et une lettre différente. La grande majorité de la variance, soit 78,8%, est expliquée par le stade de développement floral. Le métabolome suit 2 orientations différentes au cours du développement floral, avec comme stade charnière le stade « Fleurs ouvertes». Les stades de développement floral étudiés sont dans l'ordre d'apparition chronologique : « Boutons fermés », « Boutons ouverts », « Fleurs ouvertes », « Fleurs fanées », « Fleurs début de fructification » et « Fruits mâtures ».

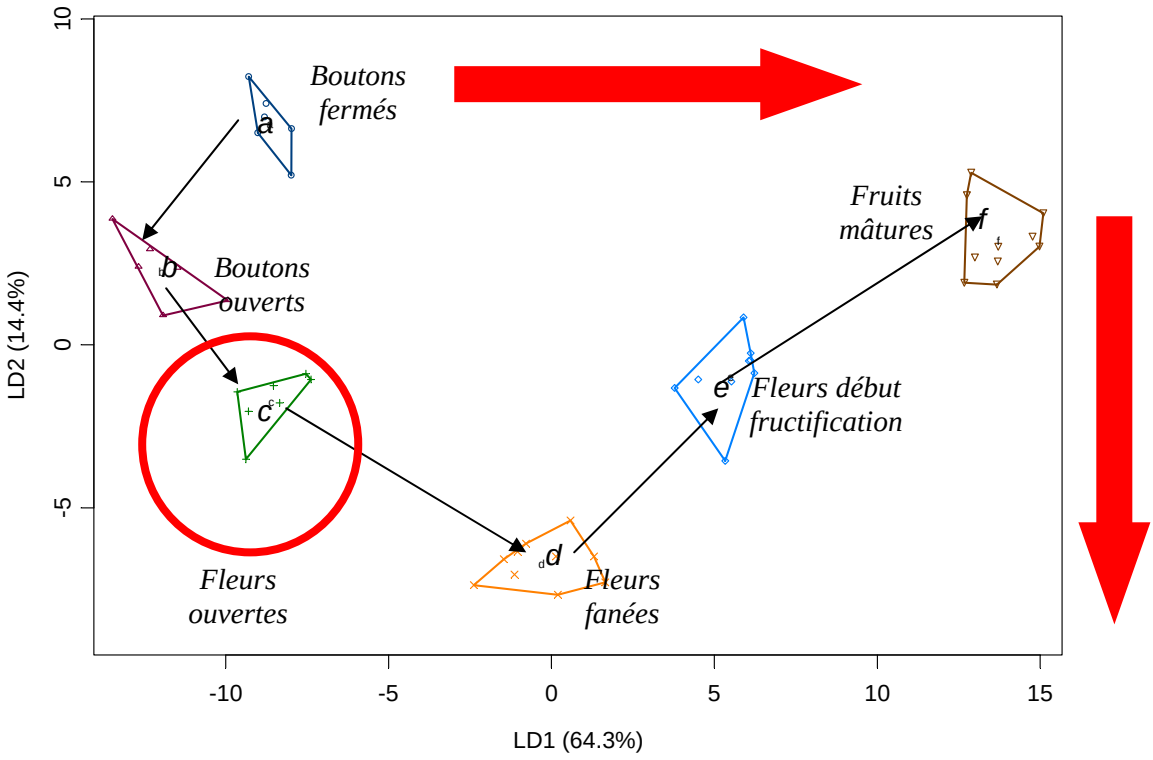


Figure IV.2 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*2, réalisée sur 21 variables filtrées à partir des données issues de l'analyse en spectrométrie de masse Py-Mab-Tof des 48 extraits végétaux, phase organique, obtenus par la seconde méthode d'extraction. Les flèches matérialisent l'évolution au cours du développement floral avec succession des 6 stades représentés par une couleur et une lettre différente. La structuration suivant deux axes est moins évidente que lors de l'analyse des extraits issus de la première méthode d'extraction (*Figure IV.1*) mais reste visible. Les stades de développement floral étudiés sont dans l'ordre d'apparition chronologique : « Boutons fermés », « Boutons ouverts », « Fleurs ouvertes », « Fleurs fanées », « Fleurs début de fructification » et « Fruits mâtures ».

Avec la première méthode, les principales variables impliquées dans la construction des axes sont les suivantes :

- m/z = 98, ρ = -0,99 ; m/z = 316, ρ = +0,98 ; m/z = 114, ρ = -0,98 ; m/z = 164, ρ = +0,98 ; m/z = 228, ρ = -0,93 ; m/z = 123, ρ = +0,91 ; m/z = 254, ρ = -0,90, pour la construction de **l'axe 1**
- m/z = 121, ρ = +0,92 ; m/z = 611, ρ = -0,81, pour la construction de **l'axe 2**.

1.2.2. Analyse des échantillons en spectrométrie par RMN du proton

Les analyses factorielles discriminantes effectuées sur les données obtenues par RMN du proton n'ont pas permis de séparer les échantillons en fonction des facteurs date et lieux de collecte. En revanche, les AFD réalisées en fonction du facteur **stade de développement** soulignent, sur les premiers plans factoriels 1*2 et 1*3, la **double orientation prise par le métabolome** lors du développement de l'appareil reproducteur avec, comme stade charnière, la phase de **pleine maturité florale ou stade « Fleurs ouvertes »** (*Figure IV.3* et *Figure IV.4*).

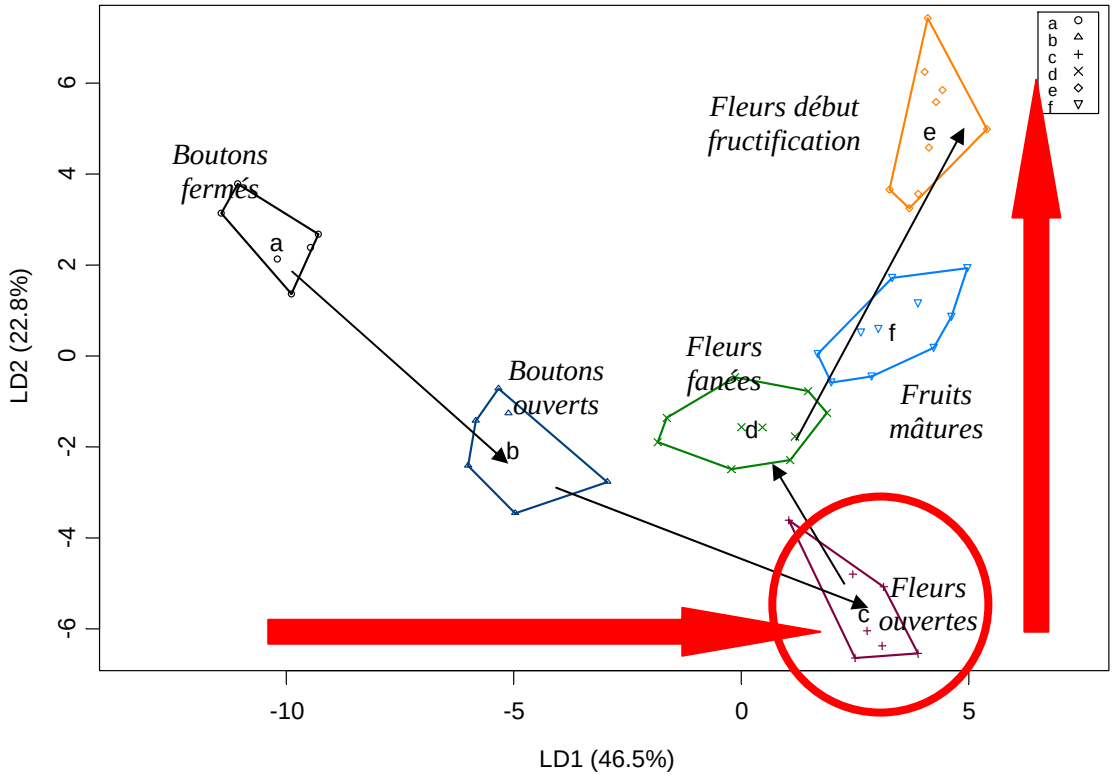


Figure IV.3 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, sur 15 variables filtrées à partir des données issues de l'analyse en RMN du ^{1}H des 48 extraits végétaux phase aqueuse, obtenus après la seconde méthode d'extraction en fonction du stade de développement. Le premier axe factoriel qui contient 46,5% de l'information permet d'expliquer les variations existantes entre les stades précoces du développement floral, à savoir les stades « Boutons fermés », « Boutons ouverts » et « Fleurs ouvertes ». L'information supplémentaire apportée par la seconde composante (22,8%) permet d'expliquer les variations entres les stades plus tardifs du développement floral mais antérieurs au développement du fruit, à savoir entre les stades de « Fleur ouvertes » et jusqu'au stade de « Fleurs début de fructification ». Le stade de « Fruits mâtures » n'est pas bien explicité sur ce plan factoriel. Les stades de développement floral étudiés sont dans l'ordre d'apparition chronologique : « Boutons fermés », « Boutons ouverts », « Fleurs ouvertes », « Fleurs fanées », « Fleurs début de fructification » et « Fruits mâtures ».

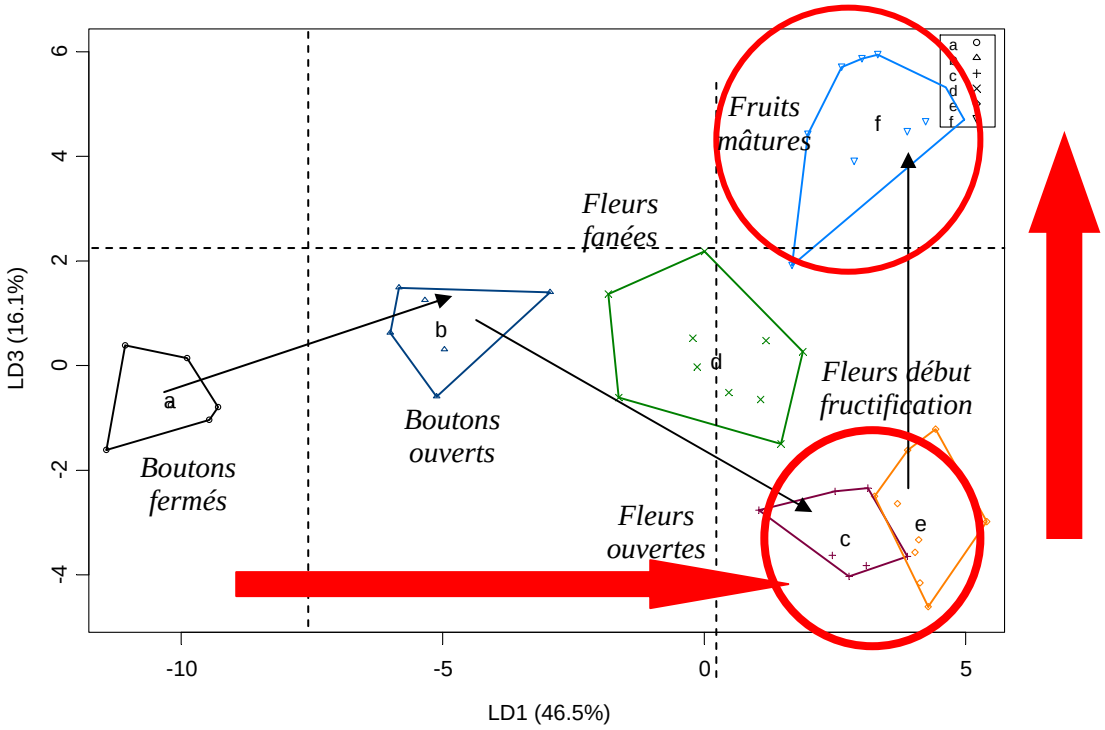


Figure IV.4 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*3, sur 15 variables à partir des données issues de l'analyse en RMN du ^{1}H des 48 extraits végétaux, phase aqueuse, obtenus après la seconde méthode d'extraction en fonction du stade de développement. Le premier axe factoriel qui contient 46,5% de l'information permet d'expliquer les variations existantes entre les stades précoces du développement floral, à savoir entre les stades « Boutons fermés », « Boutons ouverts » et le stade « Fleurs ouvertes ». L'information apportée par la troisième composante (16,1%) permet d'isoler le stade ultime plus spécifique de « Fruits mâtures ». Ceci s'explique car la fructification implique des mécanismes métaboliques ainsi que des métabolites qui diffèrent du développement purement floral. Les stades de développement floral étudiés sont, dans l'ordre d'apparition chronologique : « Boutons fermés », « Boutons ouverts », « Fleurs ouvertes », « Fleurs fanées », « Fleurs début de fructification » et « Fruits mâtures ».

L'information complémentaire apportée par le plan factoriel 2*3 ne concerne que le **stade de fructification** qui, *a priori*, sollicite **d'autres voies métaboliques** que celles impliquées dans le développement floral et de début de fructification (*Figure IV.5*).

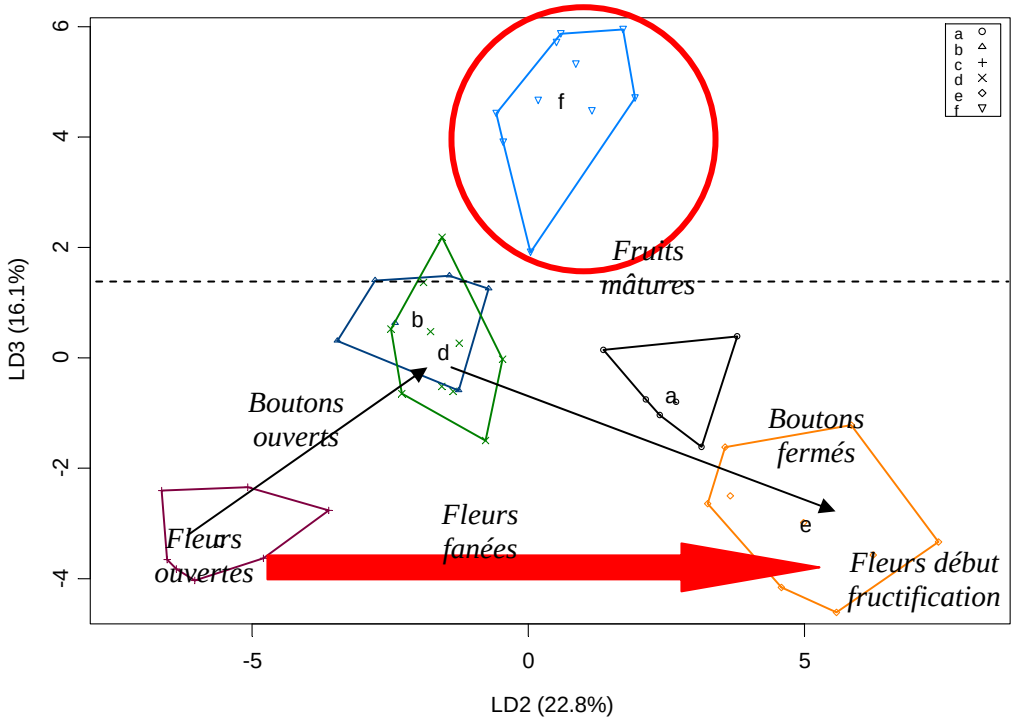


Figure IV.5 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 2*3, sur 15 variables à partir des données issues de l'analyse en RMN du ^{1}H des 48 extraits végétaux, phase aqueuse, obtenus après la seconde méthode d'extraction en fonction du stade de développement. Le second axe factoriel rend compte de l'évolution entre les derniers stades du développement floral compris entre les stades « Fleurs ouvertes » et « Fleurs début de fructification ». L'information supplémentaire (16,1%) apportée par la troisième composante permet d'isoler le stade ultime de « Fruits mâtures ». Les stades de développement floral étudiés sont, dans l'ordre d'apparition chronologique : « Boutons fermés », « Boutons ouverts », « Fleurs ouvertes », « Fleurs fanées », « Fleurs début de fructification » et « Fruits mâtures ».

L'analyse de la structure des différents plans factoriels souligne que les variables dont la contribution positive est la plus forte au sein de **l'axe 1** sont intimement liées au **métabolisme d'épanouissement floral**. Les variables rattachées à l'information contenue dans **l'axe 2** sont associées au phénomène de **sénescence florale**. Les variables dont la contribution positive est la plus forte pour **l'axe 3** rendent compte plus particulièrement du métabolisme particulier lors de la **fructification**. Afin de déterminer quelle(s) composante(s) factorielle(s) est(sont) la(les) plus impliquée(s) dans le potentiel de disruption métabolique induit par l'ingestion d'*Hypochœris radicata*, une expérimentation complémentaire *in vivo* avec ces différents stades est nécessaire.

Les déplacements chimiques relatifs aux 40 variables obtenues après filtration des données sont présentés dans le tableau ci-dessous (*Tableau IV.3*).

Tableau IV.3 : Variables significatives obtenues après filtration des données des extraits végétaux analysés en RMN du ^{1}H et identification des métabolites correspondants.

N° variable	Déplacement chimique (δ en ppm)	Métabolite	N° variable	Déplacement chimique (δ en ppm)	Métabolite
V1	2,085	Glutamate	V22	3,685	Fructose
V2	3,635	*Myo*-inositol	V23	1,885	GABA
V3	3,745	Glucose, Glutamate, Glutamine	V25	7,235	Coumarine ?
			V26	7,265	Coumarine ?
V7	6,405	Coumarine ?	V27	4,115	Fructose, Glucose
V8	3,205	Choline	V28	3,885	Sucres
V9	3,805	Fructose	V29	1,005	Isoleucine
V10	4,275	Malate	V31	2,335	Glutamate
V11	7,775	?	V32	6,435	Coumarine ?
V12	1,315	Lactate/Thréonine	V40	3,425	Glucose
V13	3,295	Glucose + *Myo*-inositol	V34	7,725	Coumarine ?
V15	6,985	?	V35	2,235	?
V17	3,815	Fructose	V36	4,085	Fructose
V19	3,975	Fructose	V37	2,205	?
V20	4,185	Sucrose	V38	3,585	*Myo*-Inositol
V21	5,435	Sucrose	V40	3,425	Glucose

La plupart de ces variables possèdent des **déplacements chimiques compris entre 3 et 5 ppm** et correspondent surtout à des **sucres** (**fructose, sucrose, glucose**). On retrouve également le ***myo*-inositol**, le **glutamate**, la **glutamine** et le **GABA**.

L'observation des spectres dans cette même zone a permis de mettre en évidence la présence de ***scyllo*-inositol**, même si le déplacement chimique de celui-ci est absent des variables retenues après filtration, et sa concentration **plus importante** pour les échantillons analysés au stade « **Fleurs ouvertes** » (*Figure IV.6*) que pour les échantillons pris au stade « **Fruits mâtures** » (*Figure IV.7*).

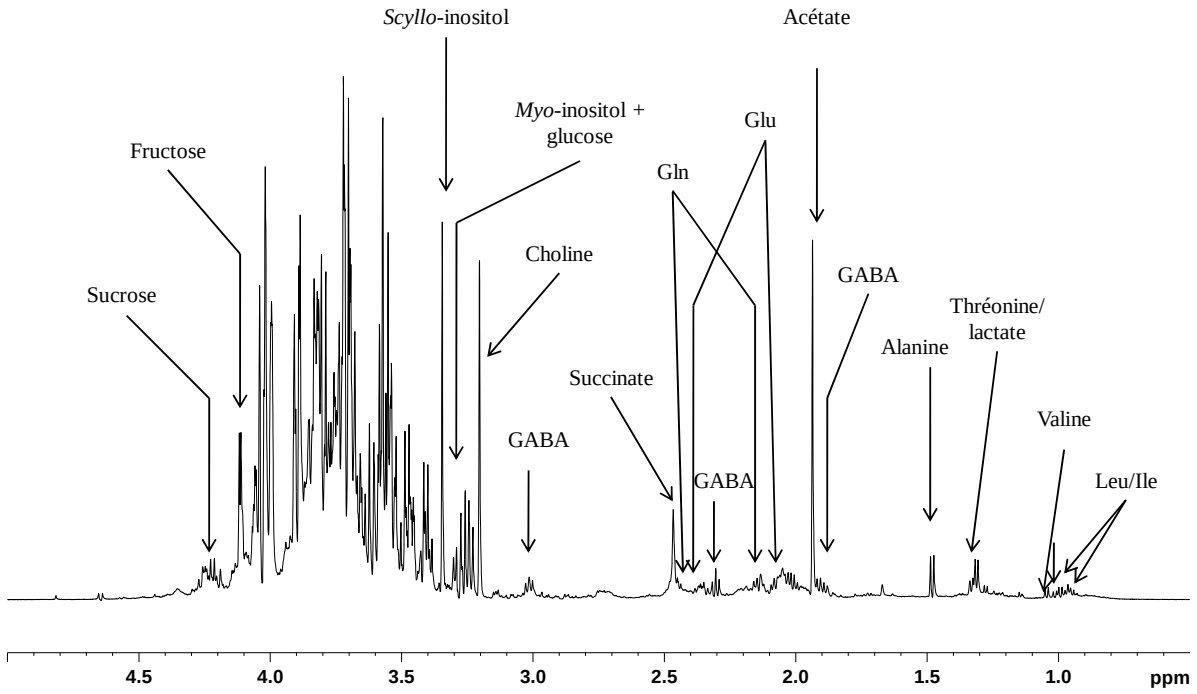


Figure IV.6 : Spectre RMN du ^{1}H à 600 MHz entre 0 et 5 ppm d'un extrait aqueux d'Hypochœris radicata au stade « Fleurs ouvertes ». Les métabolites compris entre 3 et 4 ppm, dont beaucoup s'apparentent à des sucres (sucrose, fructose, glucose, inositol), prédominent. Le pic correspondant au *scyllo*-inositol est présent à 3,34 ppm et de façon plus importante que dans le spectre relatif au stade « Fruits mâtures » (*Figure IV.7*). D'autres métabolites d'intérêt peuvent aussi être cités : le GABA, le glutamate et la glutamine. L'acétate est en plus grande quantité qu'au stade « Fruits mâtures » (*Figure IV.7*). Cependant, ces métabolites ne sont pas ressortis significatifs.

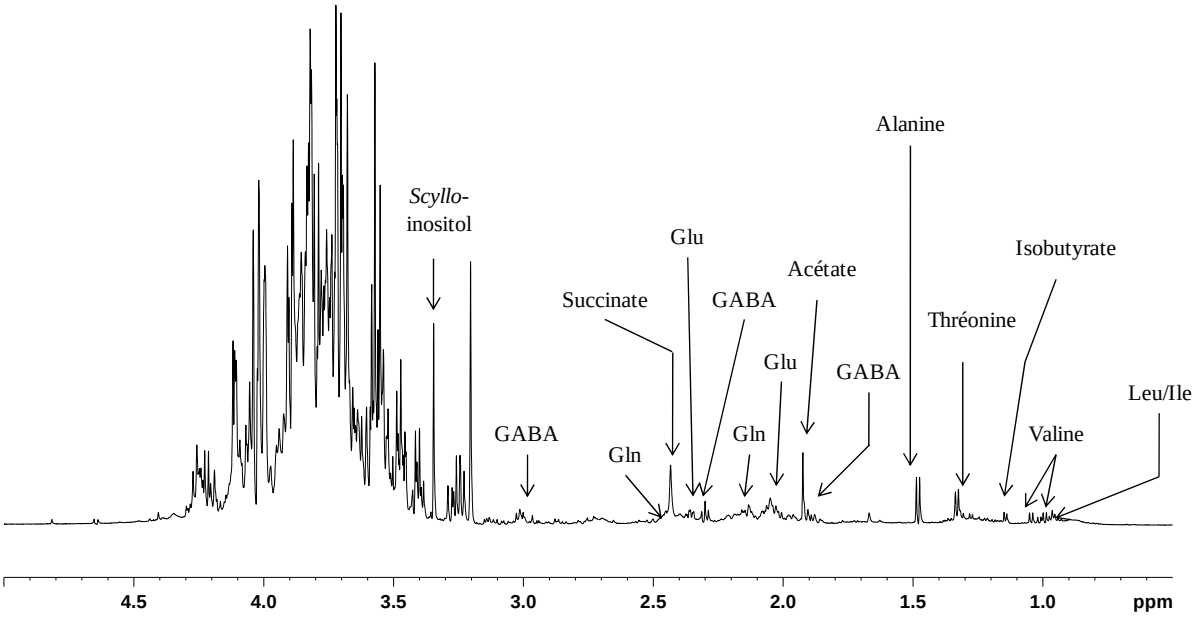


Figure IV.7 : Spectre RMN du ^{1}H à 600 MHz entre 0 et 5 ppm d'un extrait aqueux d'Hypochœris radicata au stade « Fruits mâtures ». Les métabolites dont les déplacements chimiques sont compris entre 3 et 4 ppm sont les plus nombreux. Le *scyllo*-inositol est présent mais en moins grande proportion en comparaison du stade « Fleurs ouvertes ».

L'étude des spectres a mis en évidence certains métabolites qui ne sont pas apparus comme significativement impliqués dans la ségrégation des différents stades floraux. Outre le ***scyllo*-inositol,** l'alanine et l'acétate peuvent être cités.

Dans le but de confirmer et renforcer la caractérisation structurale du *scyllo*-inositol, et des autres métabolites repérés sur les spectres 1D du ^{1}H, une analyse **RMN 2D ^{1}H-^{13}C HSQC** (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) a été réalisée afin de préciser les déplacements chimiques des atomes de carbone auxquels sont rattachés les protons (*Figure IV.8*).

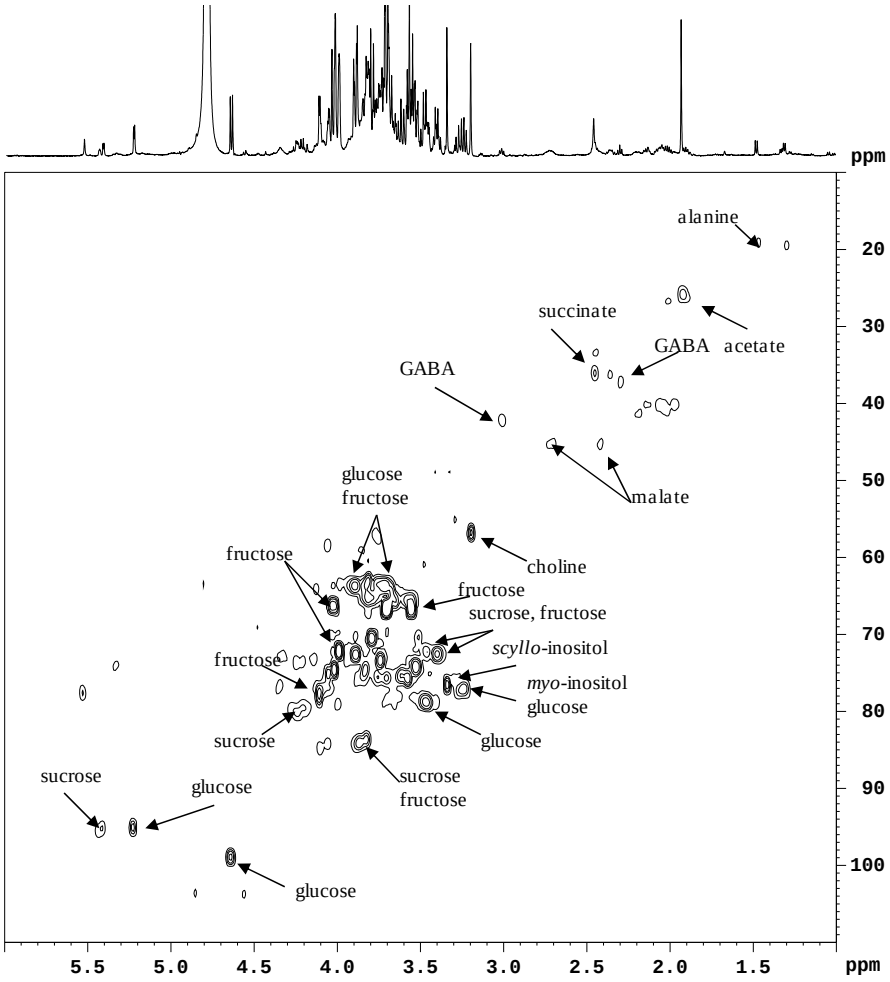


Figure IV.8 : Spectre RMN 2D ^{1}H-^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy) à 600 MHz, obtenu à partir d'un extrait aqueux d'Hypochoeris radicata au stade « Fleurs ouvertes». L'axe des abscisses rend compte du déplacement chimique relatif aux protons ^{1}H (de 1,0 à 6,0 ppm) ; l'axe des ordonnées, aux déplacements chimiques des atomes de carbone ^{13}C auxquels sont rattachés ces mêmes protons (de 20 à 100 ppm). On retrouve une grande proportion de sucres (glucose, fructose, sucrose) ainsi que du *scyllo*- et du *myo*-inositol.

Sur ce dernier spectre, on peut observer une tache, dont les coordonnées 3,34 ppm (déplacement chimique du ^{1}H) et 76,3 ppm (déplacement chimique du ^{13}C) correspondent de façon univoque au ***scyllo*-inositol**. En outre, la présence de ***myo*-inositol**, de nombreux **sucres (fructose, glucose, sucrose)**, de GABA, d'acétate et de choline a également pu être confirmée.

1.2.3. Analyse des échantillons par spectrométrie de masse LC-ESI-MS en mode positif

Comme avec les autres méthodes d'analyse, les données obtenues par spectrométrie de type LC-ESI-MS en fonction des facteurs date et lieu de collecte, en mode positif ou négatif, n'a pas permis de mettre en évidence une structure particulière et donc d'attribuer une quelconque signification dans la construction des axes ainsi que dans les variables les composant.

Cependant, l'observation des représentations graphiques réalisées à partir des données en mode positif, filtrées par **stade de développement, a permis d'isoler le stade « Fleurs ouvertes » (***Figure IV.9***)**.

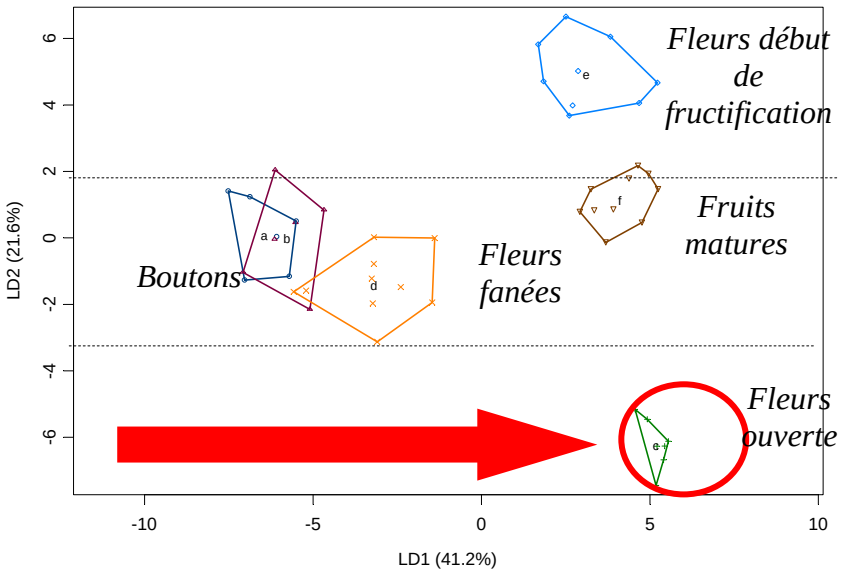


Figure IV.9 : Représentation graphique du premier plan factoriel (1*2) de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur 20 variables filtrées à partir des 48 échantillons floraux, phase aqueuse, analysés par spectrométrie de masse LC-ESI en infusion positive. Les stades de développement floral étudiés sont, dans l'ordre d'apparition chronologique : « Boutons fermés », « Boutons ouverts », « Fleurs ouvertes », « Fleurs fanées », « Fleurs début de fructification » et « Fruits mâtures ».

La projection des groupes sur l'axe 2 montre une progression, observée précédemment avec les autres techniques analytiques, allant du stade « Fleurs début de fructification » en passant par les stades de boutons puis se terminant par le stade « Fleurs ouvertes » (*Figure IV.9*). Les principales variables impliquées dans la construction de ce second axe présentent les valeurs de m/z suivantes : **m/z = 291 (ρ = +0,82), m/z = 290 (ρ = +0,81),** m/z = 439 (ρ = +0,78), m/z = 451 (ρ = +0,78) et m/z = 290 (ρ = +0,81).

1.3. Discussion

Les résultats des trois différents types d'analyse (RMN et spectrométrie de masse) des extraits d'*Hypochœris radicata* permettent d'obtenir des éléments de réponse en observant d'une part, les représentations graphiques des analyses factorielles discriminantes et, d'autre part, en interprétant certaines variables significativement impliquées dans la construction de ces axes factoriels.

L'absence de structuration visible dans les analyses factorielles réalisées en fonction des facteurs date et lieu de collecte permet de conclure que le **facteur prépondérant** dans l'explication de la variabilité phénotypique intrinsèque à la plante *Hypochœris radicata*, perçu au travers de l'analyse du métabolome, est le **facteur stade de développement**.

En d'autres termes, les **facteurs date et lieu de collecte n'interviennent pas de façon prépondérante** dans l'explication de cette variance. Cependant, les échantillons végétaux collectés ne peuvent prétendre constituer un échantillon représentatif de la population végétale de cette espèce. En effet, les dates de prélèvement sont relativement échelonnées entre les mois d'août et novembre de la même année, ce qui permet de bien appréhender le facteur temps et saison. En revanche, les lieux de collecte sont restreints à quelques départements : Haute Garonne (31), Pyrénées Atlantiques (64) et Yvelines (78). De ce fait, la conclusion concernant l'impact du facteur géographique est difficile à établir.

L'autre élément important à considérer est la mise en évidence, notamment après les analyses par spectroscopie de masse PY-PAB-Tof et par spectrométrie RMN, d'une **double composante dans le développement de l'appareil reproducteur végétal** avec comme stade charnière celui de « **Fleurs ouvertes** ». Ceci montre qu'il existe une différence dans la synthèse de métabolites au cours des différents stades. Nous avons déjà mentionné dans le chapitre I que les épisodes de **harper** coïncident généralement avec la **période de floraison de la plante** (*11,12*). En effet, celle-ci correspond aux mois allant de juin à octobre en Europe

avec le pic d'incidence de la maladie en août et en septembre. Ce pic recule en juin et en juillet en ce qui concerne les fréquences des cas observés au Japon (*13*). Les observations des plans factoriels obtenus, les données épidémiologiques des périodes préférentielles de harper sont à mettre aussi en relation avec les études réalisées sur la composition de certaines autres plantes de la famille des Composées ou Astéracées. En effet, dans cette famille, le **scyllitol,** ancien nom du ***scyllo*-inositol**, est très largement répandu (*14-16*). Dans le genre Chrysanthemum, des hydrates de carbone solubles tels que le L-*chiro*-inositol et le *scyllo*-inositol ont été mis en évidence dans les feuilles et les **boutons floraux**, et leur présence, dans ces derniers, serait intimement liée au développement floral. Or, ils auraient un rôle primordial, comme substrats pour la **respiration cellulaire**, comme **molécules membranaires** et comme **osmolytes** dans l'ouverture des fleurs (*6*). En effet, cette phase correspondant à une phase d'expansions membranaires, requiert de grandes quantités d'énergie, d'où un besoin accru en sucres. Ceux-ci peuvent être catabolisés lors de la respiration cellulaire ou accumulés dans les vacuoles, nécessitant alors un processus compensant les déséquilibres osmotiques ainsi créés.

L'orientation du métabolome végétal suivant deux composantes nécessite d'être expliquée. En effet, retrouve-t-on ces deux axes lorsque l'on étudie la réponse métabolique des animaux à l'ingestion d'*Hypochœris radicata* ?

Afin de répondre à cette question, une expérimentation sera détaillée dans la seconde partie de ce chapitre.

Les variables significativement impliquées dans la construction des plans factoriels d'intérêts et issues des trois techniques d'analyse permettent tout d'abord de souligner l'absence d'identification du *scyllo*-inositol et du *myo*-inositol dans les variables filtrées et considérées comme significatives car impliquées dans la structuration de l'information. En effet, même si beaucoup de variables explicatives des axes 1 et 2 des analyses factorielles discriminantes n'ont pu être identifiées lors des analyses par RMN du proton, aucun des déplacements chimiques de ces deux molécules, notamment le déplacement chimique δ = 3,34 ppm du *scyllo*-inositol, n'a été répertorié. De même, les rapports m/z caractéristiques des ions issus de la fragmentation du *myo*- et du *scyllo*-inositol n'ont pas été retrouvés (*17*). En revanche, l'observation des spectres des extraits hydrosolubles d'inflorescences d'*Hypochœris radicata* a montré la présence de **pics relatifs au *myo*- et au *scyllo*-inositol** au sein du végétal au stade « Fleurs ouvertes » (*Figure IV.6* et *Figure IV.7*).

De plus, certains composés connus chez *Hypochœris radicata* comme des sesquiterpènes, un glucoside phénylbutanoïde, des guaïanolides lactones sesquiterpènes, ainsi que 12 nouveaux glucosides de sesquiterpène n'ont pas été retrouvés dans les variables expliquant la séparation des différents stades de développement (*18, 19*).

En revanche, lors de l'analyse par **RMN du ^{1}H**, nous avons pu remarquer que la grande majorité des variables obtenues après filtration possédait un déplacement chimique compris **entre 3 et 5 ppm**, dans le secteur des **oses** avec une nette **prédominance des sucres** comme le **glucose**, le **fructose**, le **sucrose**. Ceci expliquerait l'**appétence** du végétal et sa consommation préférentielle par les animaux lorsqu'ils pâturent sur une parcelle où d'autres espèces végétales sont présentes. De plus, cette observation peut être mise en parallèle avec une étude réalisée sur la composition en **inositols phosphate** de graines de Fabacées ou Légumineuses (*20*). Lors de cette étude, les auteurs ont identifié les déplacements chimiques relatifs aux différents inositols phosphates retrouvés habituellement dans la plante. Or, il est apparu que certains de ces déplacements pouvaient concorder avec ceux retrouvés lors des analyses par RMN du proton, effectuées sur les extraits aqueux d'*Hypochœris radicata*. Dans cette étude, certains déplacements chimiques d'inositol phosphate tels ceux de l'inositol (1,2,3,5,6)P_5 à δ = 3,63 ppm, l'inositol (1,3,4,5)P_4 à δ = 4,12 ppm, l'inositol (1,4,5)P_3 à δ = 3,74 ppm, l'inositol (1,2,6)P_3 à δ = 4,18 ppm, l'inositol (4) ou (6)P_1 à δ = 3,59 ppm et δ = 3,32 ppm, l'inositol (1) ou (3)P_1 à δ = 3,42 ppm pourraient correspondre à certaines variables ressorties comme significativement impliquées dans la variance relative au facteur stade. Cependant, l'identification exacte de ces composés aurait nécessité de réaliser des analyses supplémentaires en RMN 2D HSQC, avec des standards ou des analyses en RMN du ^{31}P. De ce fait, aucune conclusion ne peut être avancée.

De plus, si certains inositols phosphate sont des molécules susceptibles d'entraîner les disruptions chez l'animal, leur présence ubiquitaire chez de nombreux végétaux laisse perplexe quant à leur véritable toxicité chez l'animal. En effet, **l'acide phytique**, autre nom de l'hexaphosphate d'inositol, est principalement reconnu pour avoir des effets **antinutritionnels**. Néanmoins, dès 1990, Smith *et al.* mettaient en évidence que l'hexaphosphate d'inositol (IP_6) pouvait conduire à des **crises convulsives** (*21*). Dans la continuité, Sun *et al.* (1992) ont pu préciser l'action **excitotoxique** de l'hexaphosphate d'inositol sur les neurones (*22*). Cette **neuroexcitation** serait intimement liée au **pouvoir chélateur de l'IP_6 sur les ions Ca^{2+} extracellulaires**, l'administration conjointe de chlorure

de calcium ($CaCl_2$) à la dose de 30 nmol abolissant la toxicité. Cette chélation serait responsable d'une **augmentation en Ca^{2+} intracellulaire**, augmentation déjà mentionnée dans les chapitres précédents dans des pathologies nerveuses telle la polyneuropathie sensorimotrice distale diabétique. En parallèle, cette dernière étude souligne l'inaptitude du *myo*-inositol à agir sur les variations de concentration en Ca^{2+} et donc son incapacité à être responsable d'excitotoxicité nerveuse.

Parmi les variables explicatives des différents stades de développement, deux des 3 variables identifiant le **L-*chiro*-inositol**, un autre stéréoisomère du *myo* et du *scyllo*-inositol, avec des déplacements chimiques à δ = 3,58 ppm et à δ = 3,75 ppm pourraient correspondre. Cependant, des analyses supplémentaires en RMN 2D HSQC en comparant avec des standards seraient nécessaires. Le L-*chiro*-inositol a déjà été identifié dans les feuilles, tiges et fleurs de certaines **Composées,** comme il a pu en être fait mention précédemment. De plus, ce composé serait présent dans les plantes en concentration plus importante que son isomère, le *scyllo*-inositol (*6*).

Autre fait intéressant à soulever, 4 déplacements chimiques (δ = 3,68 ppm, δ = 3,89 ppm, δ = 3,97 ppm et δ = 4,18 ppm) sur les 7 que compte le **2-*O*-(*β*-L-arabinopyranosyl)-*myo*-inositol**, identifié auparavant dans des feuilles de thé vert Longjing, sembleraient correspondre à ceux retenus après filtration statistique des variables (*23*). Néanmoins, la confirmation nécessiterait une analyse complémentaire en RMN 2D HSQC avec comparaison avec des standards.

De plus, le **galactinol** ou **1-*O*-(*α*-D-galactopyranosyl)-*myo*-inositol**, un galactoside du *myo*-inositol, combinaison entre le galactose et le *myo*-inositol, possède un rôle prépondérant chez les végétaux en tant que précurseur dans la synthèse du raffinose (triholoside composé d'une unité de galactose, d'une unité de glucose et une unité de fructose). Il a été démontré que le galactinol, tout comme le raffinose, intervient en tant qu'**osmoprotecteur** au sein de la plante, dans les processus de **tolérance et de résistance aux stress** engendrés par la **sécheresse et la dessiccation**, ainsi que dans les processus de **maturation des graines** et donc de l'appareil reproducteur (*24*). Ces données sont à mettre en parallèle des éléments épidémiologiques qui soulignent la prédominance des cas de harper après des épisodes de sécheresse intense.

En fonction de ces données et de nos résultats, on peut émettre l'hypothèse que des plants d'*Hypochœris radicata*, soumis à des conditions de sécheresse, seraient susceptibles de synthétiser des composés comme le galactinol, un éventuel précurseur de *myo*-inositol, grâce à la catalyse d'une enzyme de type galactinol-raffinose galactosyltransferase (*Figure IV.10*). Cependant, jusqu'à ce jour, cette enzyme n'a été mise en évidence que chez certains végétaux appartenant à la famille des Légumineuses, comme le pois (*Pisum sativum L.)*, la lentille (*Lens culinaris L.*), le Haricot azuki (*Vigna angularis Willd.)*, ou à la famille des Curcubitacées avec les courges ou *Cucurbita pepo L.*. De plus, ces *α*-galactosidases ne sont pas ou très peu présentes chez les animaux monogastriques (*25,26*). Mais le **cheval** est un monogastrique herbivore qui possède une **flore caecale** constituée de bactéries et de protozoaires dont les **activités *α*- et *β*-galactosidiques** sont connues (*27*). On peut donc supposer que le cheval, de par son métabolisme digestif spécifique, serait plus sensible car capable d'hydrolyser des oligosides composés à partir de *myo*-inositol, libérant ainsi du cyclitol. Ceci expliquerait sa sensibilité face au potentiel de disruption d'*Hypochœris radicata*. La présence d'une flore caecale chez les rongeurs, certes différente de celle du cheval, permettrait peut-être d'expliquer la perturbation de la balance *scyllo*/*myo*-inositol mise en évidence dans leur cerveau.

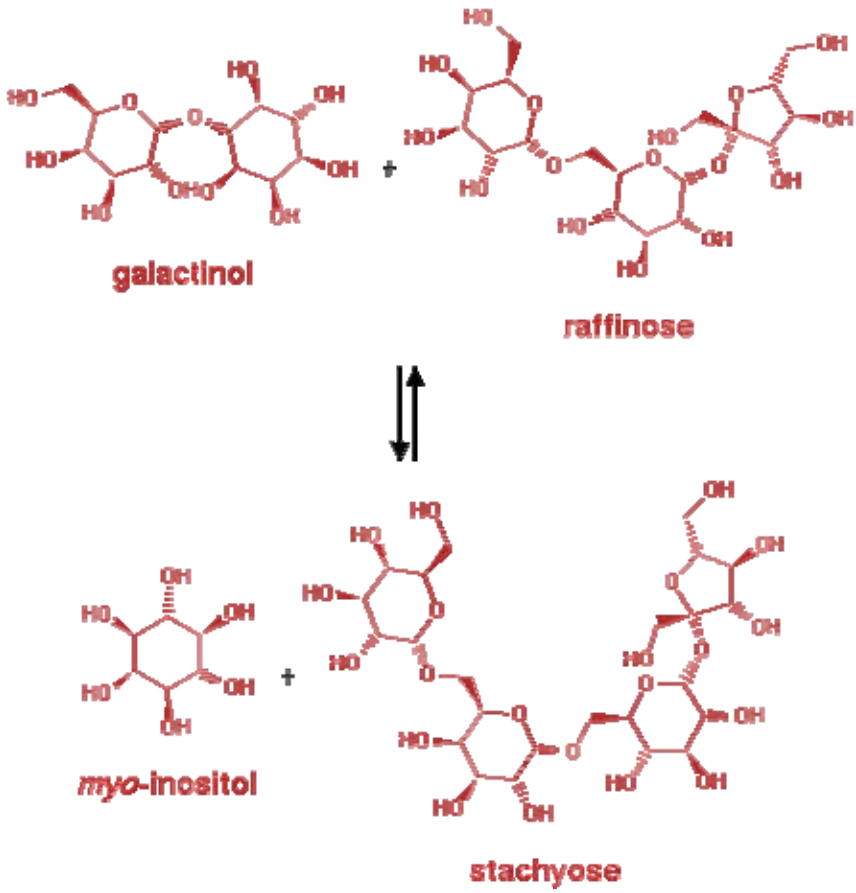


Figure IV.10 : Réaction catalysée par l'enzyme galactinol-raffinose galactosyltransférase, permettant la libération de myo-inositol à partir de galactinol.

De plus, outre l'augmentation des teneurs en galactinol, certaines études ont montré qu'il existe une augmentation de la biosynthèse de ***O*-méthyl-inositol** lors de **stress osmotiques induits par des déficits hydriques**. En effet, lors de stress impliquant des troubles hydriques et ioniques, les réserves d'oligosaccharides de la famille du raffinose et du stachyose des parties chlorophylliennes diminuent du fait de la **réorientation du métabolisme du *myo*-inositol vers la biosynthèse de *O*-méthyl-inositol** (*28*) (*Figure IV.11*). Outre des propriétés **osmoprotectrices**, cette dernière molécule a des propriétés **antioxydantes** et agit comme intermédiaire de **détoxification métabolique** en retirant l'excès de groupements méthyle produits par les tissus photosynthétiques placés en conditions de stress. Ce composé, contrairement aux oligosaccharides piégés dans les vacuoles, peut également être facilement libéré des cellules végétales de l'appareil végétatif, **parcourir le phloème** où circule la sève élaborée et **accéder ainsi aux organes reproducteurs** (*29*) (*Figure IV.11*).

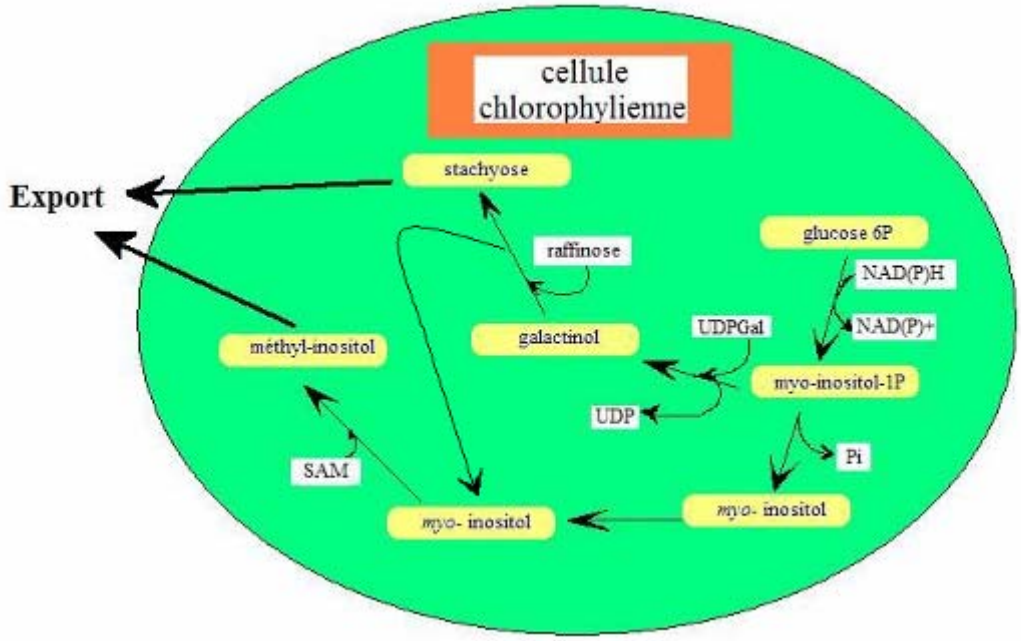


Figure IV.11 : Voies métaboliques montrant les flux de carbone, dans la cellule chlorophyllienne lors de stress et de déficit hydrique. Une fois synthétisés, les méthyl-inositols ont la capacité de pouvoir être exportés hors des cellules chlorophylliennes jusqu'aux organes reproducteurs. SAM : S-adénosyl méthionine, UDP : uridine di phosphate, UDPGal : Uridine di phosphate galactose, Pi : phosphate inorganique, $NAD(P)^+$: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme oxydée, NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite. D'après Pattanagul *et al.* (1999).

Les types de méthylinositols qui peuvent être produits dans les cellules végétales sont assez nombreux (*30*). Le ***D*-pinitol** ou 1*D*-3-méthyl-*chiro*-inositol a été retrouvé chez certaines Fabacées (*31*) et chez des gamétophytes (*32*). Le ***D*-ononitol** ou 4-*O*-méthyl-inositol (*3*) et le ***O*-méthyl-*scyllo*-inositol** ont été mis en évidence dans le genre *Vigna sp.* soumis à un stress hydrique (*3*). De ce fait, il est probable que certains composés polyols cycliques ou **cyclitols**, méthylés ou non, soient produits, accumulés dans le cytosol des cellules chlorophylliennes, puis transférés en plus grandes quantités au sein des appareils reproducteurs d'*Hypochœris radicata* lors de stress hydrique. La plante ingérée, ces inositols pourraient être catabolisés dans l'organisme animal et fournir du *scyllo*-inositol lors du processus de déméthylation.

Lors des analyses par **spectrométrie de masse LC-ESI en mode positif**, la variable ayant un rapport **m/z = 290** est ressortie comme significative dans la ségrégation des stades de développement. Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette variable explicative pourrait être

reliée à la présence d'un **hexitol** (*33*) ou d'un **hexose** (*34*), ce qui pourrait être un élément supplémentaire confirmant la présence d'un isomère d'inositol, conjugué ou non au sein du végétal. Cependant, aucune identification structurale n'a permis de le confirmer.

En conclusion de cette étude, il apparaît que le **potentiel disrupteur d'*Hypochœris radicata*** serait lié, d'une part, à son **développement floral** avec la synthèse et/ou la mobilisation de certains métabolites secondaires et, d'autre part, à une **réorientation de son métabolisme à la suite d'un stress hydrique ou osmotique.** On ne peut pas, à ce jour, relier ces deux facteurs mais les éléments de réponse apportés par la littérature, ainsi que les variables significativement impliquées et explicatives du statut particulier des stades de développement examinés ici, convergent vers le fait suivant : le potentiel de disruption métabolique d'*Hypochœris radicata* serait vraisemblablement relié à la présence de composés (méthylés, isomères ou glycosides) obtenus à partir de *myo*-inositol ou d'autres polyols et la teneur de ce(s) composé(s) dans la plante augmenterait en réponse à un stress hydrique et/ou ionique (*4*).

Dans le but de déterminer si les deux dimensions phénotypiques observées chez Hypochœris radicata se retrouvent chez l'animal, après ingestion de la plante, une expérimentation in vivo a été conduite. Celle-ci a été réalisée en testant les différents stades de développement floral et en utilisant plusieurs doses de végétal incorporé dans l'aliment.

2. Etude métabonomique chez l'animal

Cette étude a été menée dans le but de **caractériser le type de réponse métabolique de l'animal en fonction de l'ingestion des différents stades floraux**.

En d'autres termes, retrouve t-on chez l'animal les deux dimensions phénotypiques observées chez le végétal ou une seule composante ? Si le profil métabolique présente deux orientations de disruption, une synthèse de principes toxiques peut supposer être réalisée en deux temps au cours du développement floral. En revanche, si le profil ne rend compte que d'une seule composante de disruption, une seule de ces synthèses végétales serait susceptible de générer des principes toxiques pour l'animal. En **projetant la réponse métabolique de l'animal sur une échelle de dose**, on peut espérer hiérarchiser le potentiel toxique de chaque facteur et plus particulièrement le potentiel de disruption métabolique de chaque stade floral.

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Matériel végétal

Cette expérimentation de métabonomique a pour but de tester, d'une part, le potentiel toxique d'un **pool moyen** d'*Hypochoeris radicata*, obtenu par mélange des 48 échantillons, le tout incorporé suivant une échelle de doses croissantes (**0, 0,5, 1, 3, 6 et 9%)** dans l'aliment de base UAR 210 (Tableau IV) et, d'autre part, la réponse animale à l'ingestion de **chaque stade de développement** (« Boutons fermés », « Boutons ouverts », « Fleurs ouvertes », « Fleurs fanées », « Fleurs en début de fructification », « Fruits mâtures »), le tout incorporé aux doses de **3 ou 9%** dans l'aliment (*Tableau IV.4*).

Dans le cas des régimes contenant **3, 6 et 9%** d'*Hypochœris radicata*, un **réajustement** de la composition du régime en énergie, en protéines et en lipides a été réalisé en utilisant de l'huile de colza et de la caséine, comme présenté précédemment (chapitre II).

2.1.2. Animaux et expérimentation

108 souris de souche consanguine C57BL/6J, de sexe mâle (Charles River, L'Arbresle, France), âgées de 5 semaines et pesant 15 à 20 g environ en début d'expérimentation ont été utilisées. **36** souris ont été prélevées au hasard afin de tester **l'échelle de doses** du **pool moyen** de fleurs d'*Hypochœris radicata*. Le régime a été distribué, pour chaque dose, à six souris (*Tableau IV.4*).

Tableau IV.4 : Répartition des souris en fonction de la dose d'Hypochœris radicata en pool moyen testé.

Doses	0%	0,5%	1%	3%	6%	9%
Nombre individus/lot	6	6	6	6	6	6
Nom des lots	M0	M0,5	M1	M3	M6	M9

Les souris ont été placées dans des cages collectives en plastique à couvercle métallique, par groupe de 3.

En parallèle, **72** souris prélevées au hasard ont permis de tester chaque **stade de développement floral** avec deux doses (**3 et 9%**). Les régimes ont été distribués à six souris pour une dose et un stade de développement spécifiques (*Tableau IV.5*).

Tableau IV.5 : Répartition des souris en fonction du stade de développement testé et de la dose correspondante.

Stades de développement		Boutons fermés	Boutons ouverts	Fleurs pleine floraison	Fleurs fanées	Fleurs début de fructification	Fruit mâtures
Nom des lots	3%	BF3	BO3	FO3	FF3	FD3	FR3
	9%	BF9	BO9	FO9	FF9	FD9	FR9
Nombre individus/lot		6	6	6	6	6	6

Les souris ont été placées dans des cages collectives en plastique à couvercle métallique, par groupe de 3. L'expérimentation a duré **15 jours**. Une période d'adaptation de 5 jours au minimum, après réception des animaux, a été réalisée, durant laquelle les animaux ont été nourris avec de l'aliment UAR 210 en poudre. A partir de J_0, les animaux ont reçu le régime qui leur a été assigné (*Tableau IV.4* et *Tableau IV.5*). Ce dernier a été distribué à heure fixe, dans des récipients en porcelaine.

Les **urines** ont été prélevées à J_0, J_1, J_4, J_8, J_{11} et J_{15}, individuellement pour chaque animal par compression légère de la vessie. Au terme des 15 jours d'administration du régime, les animaux ont été sacrifiés en suivant le même protocole que celui exposé dans les

chapitres précédents. Les organes, **foies et cerveaux** ont été prélevés et congelés à -80°C. Les urines et les extraits des organes ont été analysés par **RMN du proton**.

2.2. Résultats

2.2.1. Données zootechniques

L'analyse statistique par ANOVA du poids des animaux ainsi que des poids des cerveaux, foies et reins n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les animaux ni un effet lié à la dose ou au stade floral.

2.2.2. Etude métabonomique sur urines

Les analyses factorielles discriminantes des profils métaboliques urinaires pris tous ensemble, n'ont pas permis d'observer de structure factorielle particulière. Aussi, les échantillons issus de la gamme étalon du pool et les échantillons des différents stades ont été analysés séparément.

En outre, aucune correction de type OSC n'a été nécessaire pour obtenir des graphiques lisibles.

Pour les stades de développement, la représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée à partir des données filtrées à partir du facteur lot (*Figure IV.12*) montre une construction quasi-unidirectionnelle de ces stades avec un échelonnement de ceux-ci dans un ordre précis, de gauche à droite sur la figure 12 : FR, FD, FF, FO, BF, BO, quelle que soit la dose choisie, 3 ou 9%.

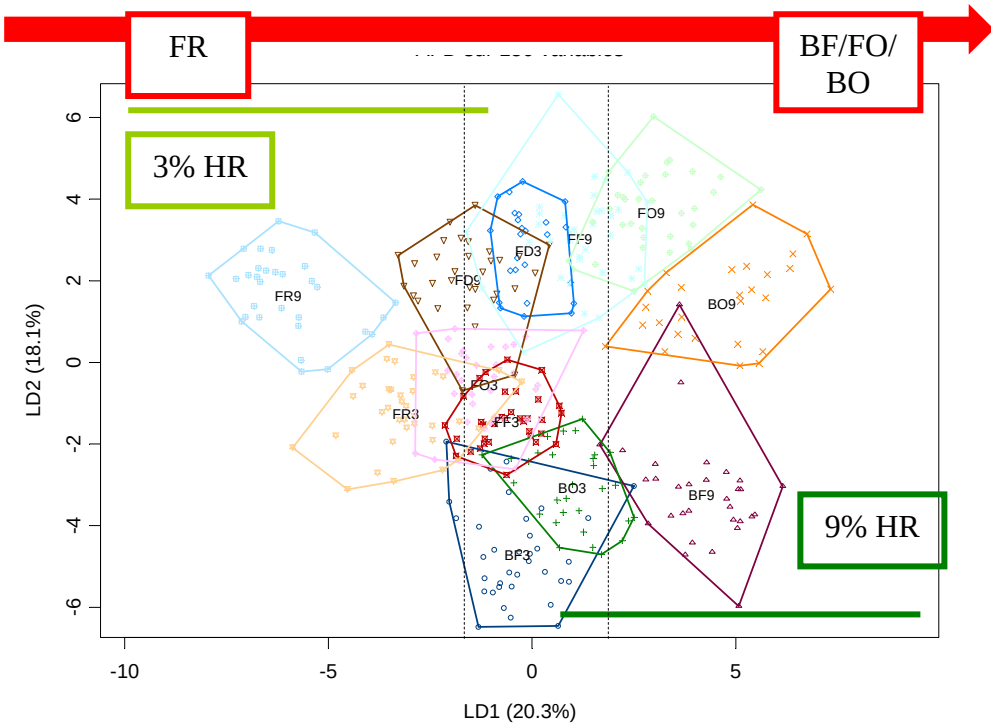


Figure IV.12 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*2, sur 150 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des échantillons urinaires des souris testant les différents stades de développement. La projection des échantillons sur l'axe 1 rend compte de l'échelle de potentiel de disruption en fonction des stades, proportionnelle à la dose d'*Hypochœris radicata* (HR). Les groupes testant les différents stades de développement sont identifiés par le stade (BF : « Bouton fermé », BO : « Bouton ouvert », FO : « Fleur pleine floraison », FF : Fleurs fanées », FD : « Fleur en début de fructification », FR : « Fruits mâtures ») et la dose d'*Hypochœris radicata* (3 et 9%).

L'analyse de ces mêmes échantillons en fonction du facteur correspondant à l'interaction entre la **date et le lot**, permet de représenter **l'évolution du métabolisme au cours du temps** (*Figure IV.13*). Sur cette représentation, le premier plan factoriel permet de souligner une évolution de la **réponse métabolique des animaux** après ingestion *d'Hypochœris radicata*, (l'axe 1 représente 34,5% d'inertie). Cette réponse est en majeure partie expliquée par deux métabolites : le ***scyllo*-inositol** (δ = 3,35 ppm, ρ = +0,95) et le ***myo*-inositol** (δ = 4,06 ppm, ρ = -0,81). Cette réponse est qualitativement la même, quelle que soit la dose utilisée, les trajectoires étant parallèles et identiques. Elle débute par une **phase d'adaptation** de l'organisme au nouveau régime durant les premiers jours (jusqu'à J_1/J_4), qui est plus importante pour la plus forte dose et qui est matérialisée par la projection des groupes sur l'axe 2 (11,5% d'inertie). La variable majoritairement impliquée dans cette composante est la **triméthylamine,** détectée à δ = 2,88 ppm avec une contribution positive de +0,87.

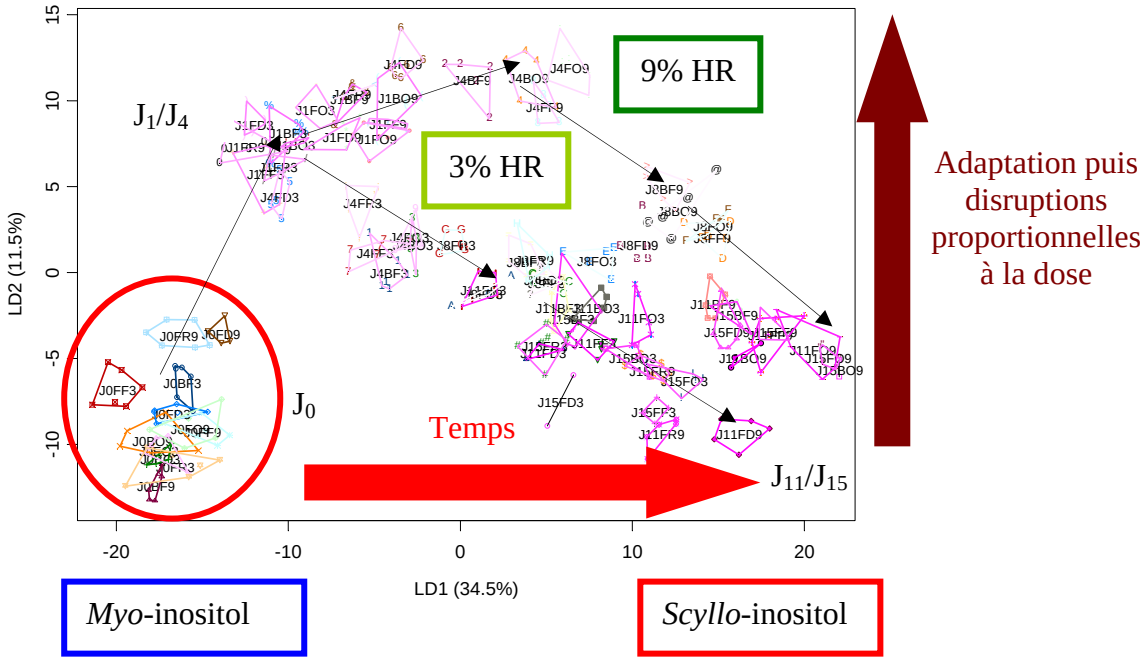


Figure IV.13 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*2, sur 180 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des échantillons urinaires des souris consommant les différents stades de développement d'Hypochœris radicata (HR), en fonction du facteur date*lot. La projection des échantillons sur le premier axe rend compte de l'évolution de l'intoxication au cours du temps qui est parallèle, quelle que soit la dose d'*Hypochœris radicata* utilisée dans le régime. La projection sur l'axe 2 montre la période d'adaptation des organismes entre J_0 et J_4 qui est proportionnelle à la dose. Les groupes testant les différents stades de développement sont identifiés par le stade (BF : « Bouton fermé », BO : « Bouton ouvert », FO : « Fleur pleine floraison », FF : Fleurs fanées », FD : « Fleur en début de fructification », FR : « Fruits mâtures ») et la dose d'*Hypochœris radicata* (3 et 9%) et grâce au jour de collecte (de J_0 à J_{15}).

Après filtration du nombre de variables par ce même facteur (date*lot), une représentation des échantillons urinaires issus des animaux ayant consommé la **gamme étalon obtenue à partir d'un pool moyen d'*Hypochœris radicata*** a été réalisée. Elle permet de mesurer sur une **échelle ordonnée le potentiel disrupteur** des différentes doses testées, par projection sur l'axe 1 (33,1% d'inertie) et l'**augmentation** de ce potentiel en **fonction de la durée d'administration du régime,** par projection sur l'axe 2 (*Figure IV.14*).

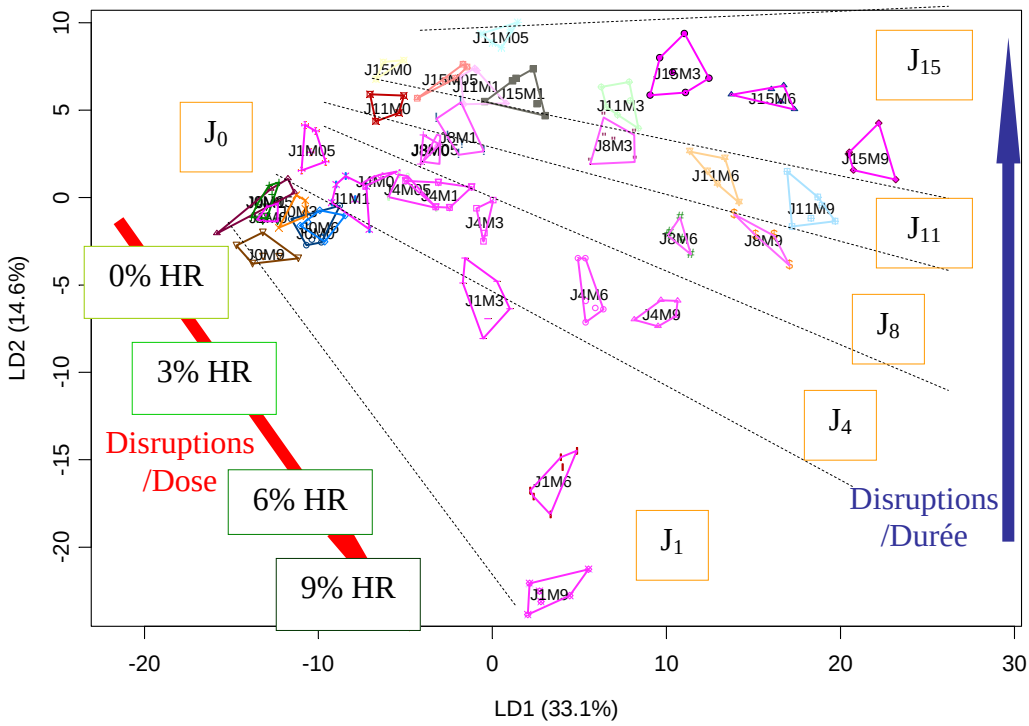


Figure IV.14 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*2, sur 90 variables, à partir des données RMN du ^{1}H des échantillons urinaires des souris recevant la gamme étalon de pool moyen d'Hypochœris radicata (HR), en fonction du facteur date*lot. La projection des échantillons sur le premier axe renseigne sur l'évolution du métabolisme au cours du temps, celle sur l'axe 2 matérialise l'échelle de dose d'HR et donc le potentiel toxique. Les groupes sont identifiés grâce au jour de collecte (de J_0 à J_{15}) et à la dose de pool végétal incorporée dans leur régime (de M0 = 0% HR à M9 = 9% HR).

Parmi les variables les plus impliquées dans la construction de l'axe 1, on retrouve le ***scyllo*-inositol** (δ = 3,35 ppm, ρ = +0,94) et l'**hippurate** (δ = 3,97 et δ = 7,84 ppm avec des contributions respectives ρ = + 0,85 et + 0,87).

2.2.3. Etude métabonomique des cerveaux

L'analyse des extraits lipophiles des cerveaux n'a pas permis d'identifier de structure définie dans l'organisation des données. En revanche, après filtration des données, l'analyse factorielle discriminante réalisée sur celles-ci, sur extraits **aqueux**, présente une **échelle des disruptions métaboliques en fonction de la dose**. Cet axe renferme la majeure partie de la variance (97,7%) (*Figure IV.15*). Il est expliqué principalement par 4 variables, elles-mêmes se rapportant à 2 métabolites **anti-corrélés** : le ***myo* et le *scyllo*-inositol**, la concentration de ce dernier augmentant proportionnellement à la dose.

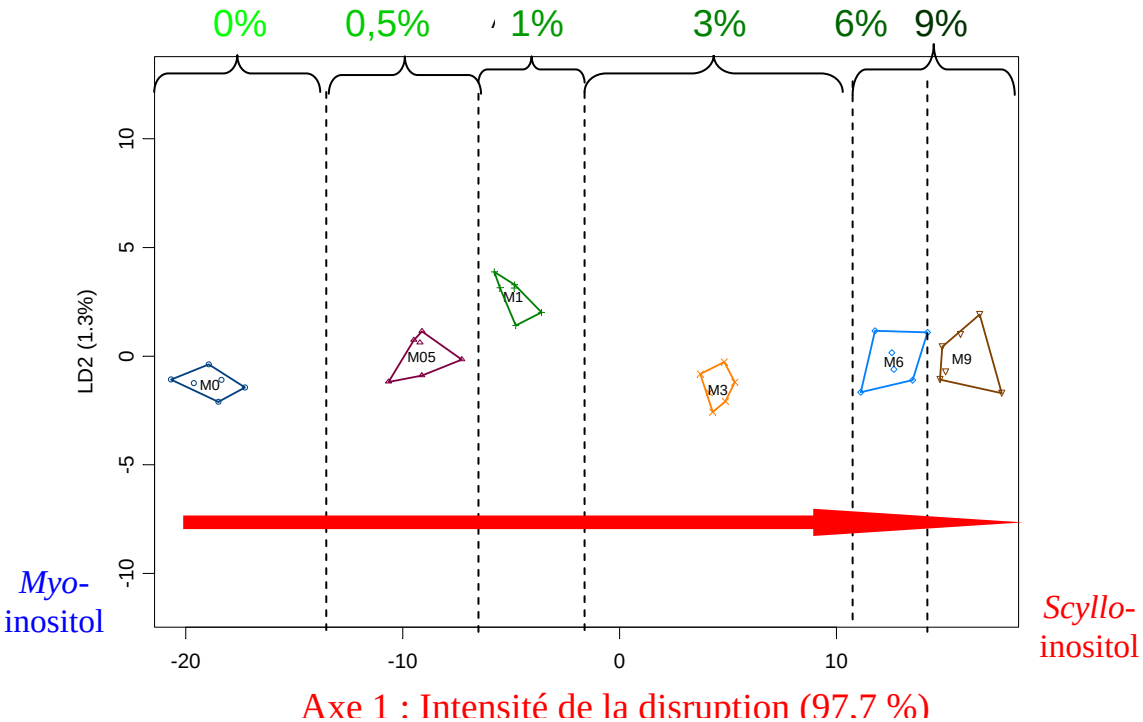


Figure IV.15 : Représentation graphique de l'Analyse Factorielle Discriminante suivant le plan factoriel 1*2, sur 8 variables filtrées, à partir des extraits aqueux de cerveaux des souris ayant consommé la gamme étalon de pool moyen d'HR à différentes doses. L'axe, qui explique 97,7% de l'inertie, permet de séparer les groupes en fonction de la dose. Les 2 métabolites majoritairement impliqués dans la construction de cet axe sont le *scyllo*-inositol et le *myo*-inositol. Les groupes sont identifiés grâce au jour de collecte (de J_0 à J_{15}) et à la dose de pool végétal incorporée dans leur régime (de M0 = 0% HR à M9 = 9% HR).

En étudiant simultanément les cerveaux des individus ayant ingéré le mélange propre à chaque stade de développement suivant les 2 doses et ceux ayant ingéré le pool étalon à 6 doses différentes, l'analyse factorielle discriminante montre trois points importants (*Figure IV.16*) :

- tout d'abord, les échantillons issus des individus ayant ingéré différents stades de développement aux doses de 3 et 9% **se projettent au même niveau** que les échantillons relatifs aux individus testant le pool étalon aux doses de 3 et 9%.
- chez **l'animal**, la **réponse** est résumée à une seule composante, contrairement au métabolome de la plante qui présentait 2 composantes factorielles.
- enfin, la **disposition et l'ordre** des **différents stades** sur l'échelle de « potentiel toxique » apparaissent comme **identiques** pour les doses de 3 et 9%. Les stades correspondants aux stades de **pleine maturité de l'appareil reproducteur** : « Bouton ouvert » (BO) et « Fleurs ouvertes » (FO) semblent être les stades revêtant la **potentialité toxique la plus importante**.

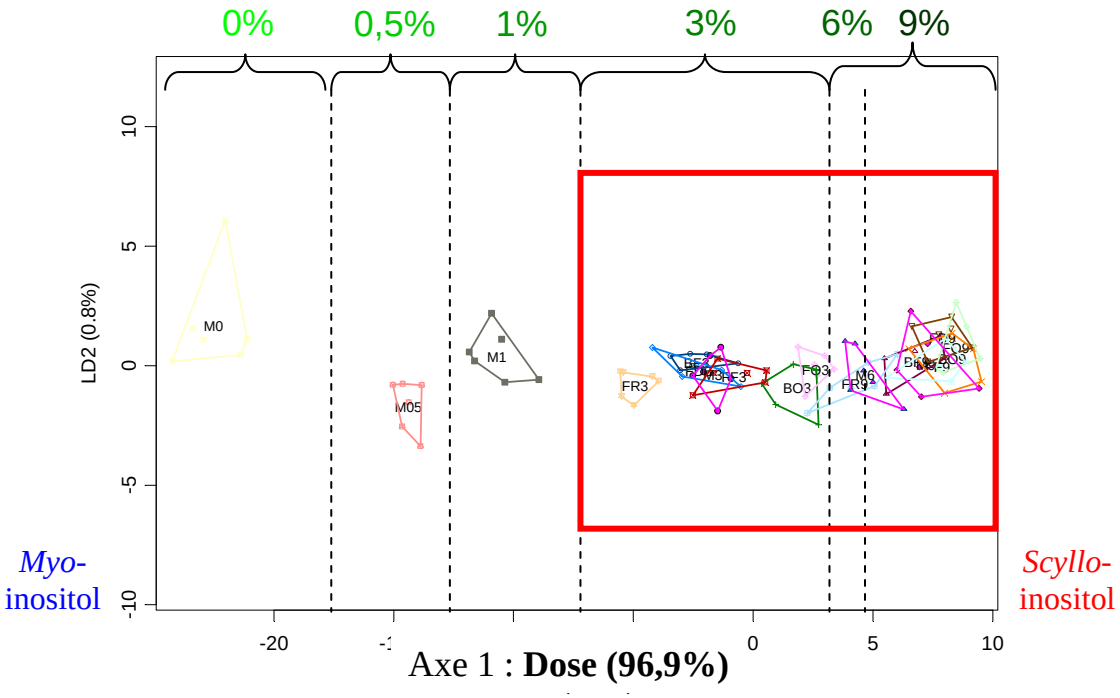


Figure IV.16 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante (premier plan factoriel : 1*2 sur 10 variables filtrées, à partir des extraits de cerveaux des souris en fonction des lots suivant les deux premiers axes (gamme étalon + différents stades de développement testés à 3 et 9%). L'axe 1 qui explique 96,9% d'inertie permet de séparer les lots en fonction du facteur dose. Les 2 métabolites majoritairement impliqués dans la construction de cet axe sont le *scyllo*-inositol et le *myo*-inositol. Les groupes de la gamme étalon sont M0, M05, M1, M3, M6 et M9. Les groupes testant les différents stades de développement sont identifiés par le stade (BF : « Bouton fermé », BO : « Bouton ouvert », FO : « Fleur ouvertes », FF : Fleurs fanées », FD : « Fleur en début de fructification », FR : « Fruits mâtures ») et la dose d'*Hypochœris radicata* (3 et 9%).

Cet ordre est confirmé en réalisant un agrandissement (*Figure IV.17*) dans lequel ne sont analysés que les échantillons obtenus après administration des différents stades de développement.

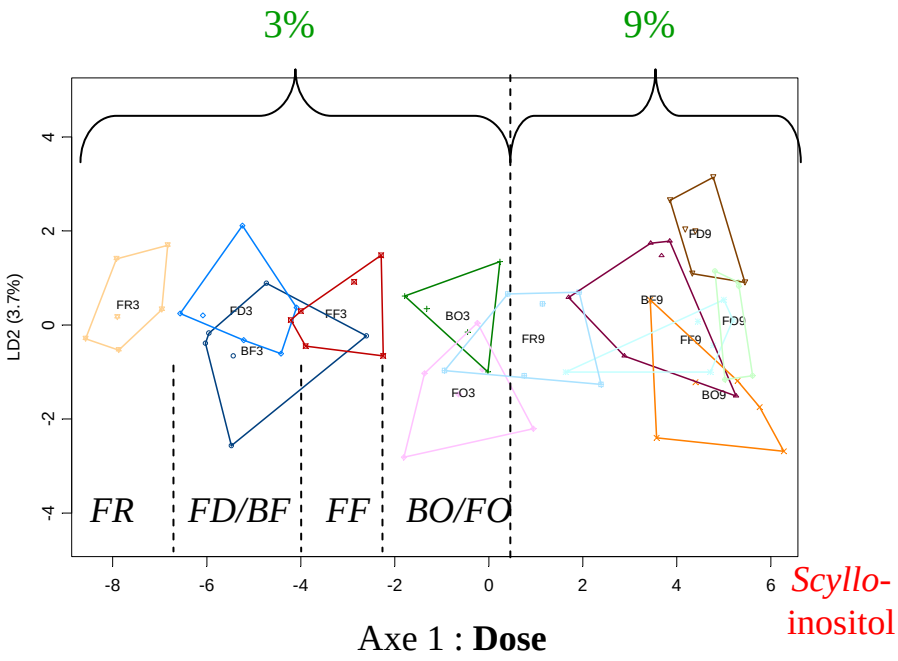


Figure IV.17 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante (premier plan factoriel : 1*2) sur 9 variables filtrées à partir des extraits de cerveaux des souris en fonction des lots suivant les 2 premiers axes. L'axe 1 qui explique 88,2% de l'inertie permet de séparer les lots en fonction de la dose avec comme métabolite majoritairement impliqué le *scyllo*-inositol. On observe également une bonne séparation des stades de développement sur cet axe et ceci, suivant un motif identique quelle que soit la dose ingérée. Enfin, le pouvoir de disruption métabolique semble être maximal pour les stades de pleine maturité florale (BO : « Bouton ouvert » et FO : « Fleur pleine floraison »). Les groupes sont identifiés par le stade (BF : « Bouton fermé », BO : « Bouton ouvert », FO : « Fleur ouvertes », FF : Fleurs fanées », FD : « Fleur en début de fructification », FR : « Fruits mâtures ») et la dose d'*Hypochœris radicata* (3 et 9%).

Cet échelonnement des différents stades est similaire à l'ordre observé en étudiant le métabolome du végétal : le stade susceptible d'engendrer le maximum de disruptions métaboliques chez l'animal correspond au stade situé à la charnière entre les deux dimensions phénotypiques de la plante, c'est-à-dire le stade de pleine floraison. De plus, l'organisation en fonction des différents stades est particulièrement bien visible au sein de la dose à 3% mais l'est moins pour la dose à 9%, ceci pouvant être dû à un **effet de « saturation »** chez l'animal apparaissant aux fortes doses.

2.3. Discussion

Cette étude a été menée en vue de **caractériser la réponse de l'animal à la suite de l'ingestion des différents stades de développement** de la plante. En effet, chez la plante, deux dimensions phénotypiques ont pu être mises en évidence lors de la synthèse des métabolites au cours du développement floral. En revanche, **chez l'animal**, il est apparu que sa réponse ne révélait **qu'une seule des deux composantes** visibles chez le végétal, matérialisant un pouvoir de disruption métabolique. De ce fait, l'animal ne serait réceptif qu'à certain(s) métabolite(s) synthétisés appartenant à une seule de ces deux dimensions phénotypiques.

Dans un même temps, la réalisation de cette expérimentation a permis d'établir une **échelle de toxicité pour l'animal**. En testant les **différents stades de développement floral** chez l'animal et en les **projetant sur cette échelle**, il est apparu que le **potentiel de disruption métabolique était maximal lors de la pleine maturité florale**. Les observations issues de cette étude viennent donc étayer les données épidémiologiques déjà précédemment mentionnées. En effet, celles-ci soulignaient que la période durant laquelle les cas de harper pouvaient être recensés coïncidait avec la période de pleine maturité florale d'HR (*11-13*). De plus, dans la première partie de ce chapitre, nous avions souligné que, chez certains autres genres de la famille des Astéracées, le développement floral était intimement associé à l'augmentation d'isomères d'inositol, notamment de ***chiro*-inositol** (*6*). Ceci montre que la synthèse de métabolites secondaires pouvant présenter un pouvoir toxique serait intimement liée à la période de floraison. En parallèle, les études épidémiologiques et les éléments d'explication proposés dans le paragraphe précédent ont montré l'importance du **stress hydrique** comme **facteur prédisposant** à la synthèse éventuelle de métabolites végétaux potentiellement toxiques pour l'animal. Deux facteurs interviendraient donc dans ce processus, un **facteur intrinsèque au végétal, la maturation du système reproducteur, et un facteur extrinsèque au végétal, les conditions de stress hydrique** auxquelles il doit faire face. Dans quelle mesure ces deux facteurs sont-ils liés ? Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce n'est que lors de la phase de pleine floraison qu'une plante est susceptible de synthétiser des métabolites secondaires spécifiques et, à la suite d'un stress hydrique supplémentaire, la plante peut orienter cette synthèse vers d'autres métabolites (*35*) présentant un pouvoir de disruption métabolique pour l'animal.

De plus, une autre observation mérite d'être mentionnée. En effet, en projetant les différents stades de développement floral sur l'échelle de toxicité, il est apparu que ces stades se projettent au sein de leurs doses respectives. En d'autres termes, même si une progression et une variation de la **potentialité toxique entre les différents stades** existent, celles-ci sont **moindres que l'effet disrupteur lié à la dose**. Ceci tend à suggérer que le facteur de risque le plus important ne serait pas tant le stade auquel se trouve la plante avant que l'animal ne l'ingère mais plus la **quantité de végétal ingéré**, **et ce, quel que soit le stade de développement floral auquel appartiennent les plantes ingérées.** Cette conclusion va à l'encontre de la conclusion précédente et minimise l'impact toxique du stade d'inflorescence en pratique. De ce fait, les **facteurs revêtant le plus d'importance dans le potentiel de disruptions métaboliques de la plante** seraient le **stress hydrique** de la plante et la **dose ingérée via la quantité de végétal consommée** par l'animal.

Néanmoins, la traduction en termes de disruptions métaboliques générées chez l'animal correspond toujours à une augmentation **de la concentration en *scyllo*-inositol associée à une diminution en *myo*-inositol**.

Ce pouvoir de disruption métabolique subit en revanche un **effet de saturation pour les fortes doses**. Le fait qu'une saturation de la réponse métabolique soit observable au sein du cerveau des animaux consommant la plante et, de façon moins significative au sein des urines, pourrait laisser supposer que cette dose de 9% induit une **incapacité de l'animal à compenser les perturbations homéostasiques** auxquelles il doit faire face, celles-ci **dépassant sa capacité de plasticité métabolique**. Ceci pourrait représenter un seuil **de toxicité** même si aucun signe clinique n'est encore visible, chez l'animal de laboratoire.

*En parallèle avec cette exploration du végétal, des expérimentations ont été menées afin de tester l'effet d'un traitement. En recourant à des **analogies thérapeutiques** comme les essais à la phénytoïne, au baclofen ou à la méphénésine ont pu l'être, des **essais avec de la taurine** ont été tentés sur des chevaux mais également sur des animaux de laboratoire.*

B. Etude exploratoire de l'impact métabonomique de la taurine

1. Contexte scientifique

La **taurine** ou acide 2-amino-éthane-sulfonique est un ***β*-acide aminé** sulfuré issu du métabolisme de la méthionine et de la cystéine. Contrairement aux *α*-acides aminés (*36,37*), elle ne rentre **pas dans la synthèse protéique**. De formule brute **$C_2H_7NO_3S$**, elle diffère des autres acides aminés car elle contient un groupement **acide sulfonique** et non carboxylique (*Figure IV.18*).

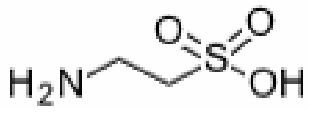


Figure IV.18 : Structure de la taurine ou acide 2-amino-éthane-sulfonique.

Sa biosynthèse, à partir de la cystéine, requiert une étape préalable de décarboxylation réalisée par l'acide sulfinique cystéine décarboxylase, ce qui conduit à la formation d'hypotaurine (*Figure IV.18*). Ceci constitue l'étape limitante. En effet, cette enzyme nécessite du **phosphate de pyridoxal** (vitamine B_6) comme coenzyme. De ce fait, une déficience en **vitamine B_6** entraîne une diminution de la teneur en taurine endogène (*38*).

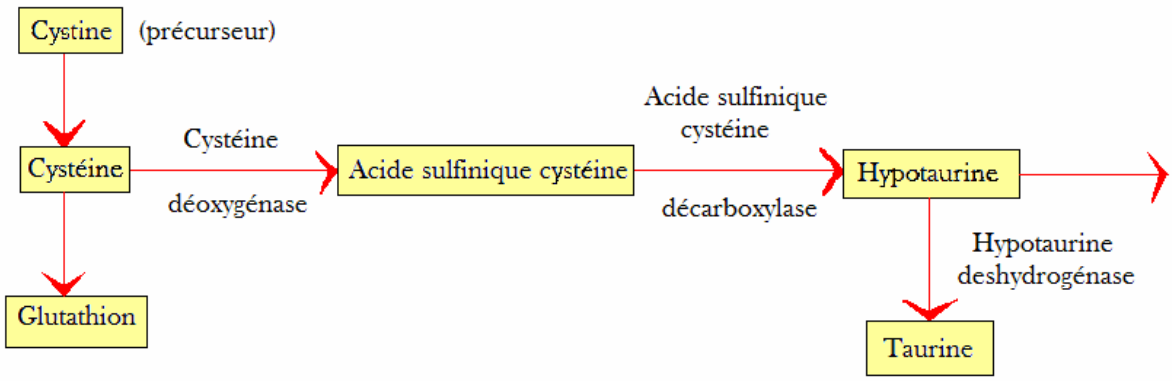


Figure IV.19 : Voie de synthèse de la taurine.

La **taurine** est présente à forte concentration dans de nombreux tissus et joue un rôle majeur dans de **très nombreuses fonctions biologiques** (*37,39*). Ainsi, elle représente près de 50% du pool des acides aminés dans les lymphocytes sans que sa fonction à ce niveau soit connue. Elle est aussi nécessaire à la **formation des sels biliaires**, au fonctionnement de la **rétine**, à la stabilisation des membranes biologiques, à **l'homéostasie calcique**, à

l'**osmorégulation**, à la modulation de l'apoptose et à la stimulation de la glycolyse et de la glycogenèse.

Sans entrer dans le détail de ses nombreux autres rôles biologiques, les fonctions de la taurine au sein du système nerveux méritent d'être développées. La taurine est un des acides aminés contenant du soufre, parmi les plus abondants au sein du **cerveau**. Les régions cérébrales les plus riches en taurine ou celles très sensibles à des variations de la concentration en taurine sont l'hippocampe, le corps strié et les projections corticostriées. Les conditions de stress, d'hypoxie ou de privation énergétique induisent une élévation de la concentration en taurine au niveau du système nerveux central, ceci pouvant être en relation avec son rôle d'**antioxydant**. Sa présence est nécessaire dans le **développement neuronal** et dans le fonctionnement normal du système nerveux central des mammifères de par son rôle **neuroprotecteur**. En effet, *in vitro*, de faibles doses de taurine peuvent diminuer l'agrégation de peptides β-amyloïdes, un des principaux composants des structures aberrantes retrouvées au sein de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (*40*). Il a pu être démontré que la taurine **protégeait** également les neurones au sein du système nerveux central de **dommages excitotoxiques** induits par de fortes concentrations en glutamate extracellulaire (*41*), en prévenant la dépolarisation membranaire induite par celui-ci, probablement par l'intermédiaire de l'ouverture de canaux chlore. De ce fait, la taurine préviendrait l'augmentation des influx de calcium induite par le glutamate (*41*). La taurine active les récepteurs $GABA_A$ et intervient donc en tant **qu'inhibiteur des excitations neuronales**.

De nombreux travaux réalisés sur les complications du **diabète sucré** et, notamment sur les **polyneuropathies sensorimotrices distales** associées, ont montré le rôle prépondérant joué par la taurine (*7, 8*). Le phénomène douloureux, omniprésent, associé aux neuropathies, pourrait résulter d'une **hyperexcitabilité neuronale** secondaire à des altérations du métabolisme calcique, au sein des neurones sensitifs. Or, les rôles **d'osmolyte, d'antioxydant, de modulateur d'ions calcium Ca^{2+}, de neurotransmetteur, d'inhibiteur et d'analgésique de la taurine** expliqueraient qu'une diminution de la concentration de cet acide aminé dans la pathogénie du diabète prédisposerait à une hyperexcitabilité neuronale et donc, à la douleur récurrente qui en découle. Les travaux de Pop-Busui *et al.*, en 2001, ont en effet montré que des rats STZ-D (Streptozotocin diabetic) **supplémentés avec 1% de taurine**, avaient une **meilleure vitesse de conduction nerveuse par rapport aux rats témoins** (*8*).

De façon complémentaire, Li *et al.* (2005), en travaillant sur le même modèle de rats STZ-D, ont pu montrer qu'une supplémentation du régime avec **2% de taurine** durant 6 à 12 semaines **atténuait les déficits de conduction nerveuse** des animaux diabétiques (*7*).

De plus, il a été montré qu'une **carence en taurine** était associée à de nombreuses autres maladies nerveuses telles que l'**épilepsie** (*37*) ou le **syndrome d'abstinence alcoolique** (*42*).

Concernant le rôle de la taurine au niveau comportemental, Wei Chen *et al.* (2004) ont mis en évidence des **effets potentiellement anxiolytiques** de cette molécule avec le test du labyrinthe en croix surélevé chez la souris (*10*). Dans cette espèce, des administrations *per os* de taurine entraînent, après une unique administration de 60 mg/kg (soit environ 4% du régime), une augmentation du temps passé dans les branches ouvertes d'un labyrinthe en croix surélevé. Wei Xi Kong *et al.* (2006) ont mis en évidence l'effet de la taurine dans **l'atténuation de l'anxiété** (*9*). L'utilisation de tests classiques pour évaluer l'anxiété comme les tests de la planche à trous, de l'openfield et celui révélant les caractéristiques des interactions sociales ont permis, en utilisant comme témoin positif le diazepam, drogue anxiolytique, de montrer **l'action anxiolytique ou modulatrice de l'anxiété** de la taurine.

*Comme les animaux atteints de **harper australien** présentent un tableau clinique général pouvant s'apparenter à une **polyneuropathie sensorimotrice distale** caractérisée par des **déficits de conduction nerveuse**, le tout associé à une composante **anxiogène**, nous avons émis l'**hypothèse** qu'il existait peut-être un **déficit fonctionnel en taurine** chez les animaux atteints ou, tout du moins, qu'il existait une **possible action bénéfique** de celle-ci, même de façon indirecte.*

*Ainsi, des **essais** de traitement avec de la **taurine** sont encore actuellement menés sur des **chevaux** atteints de harper. La taurine en poudre est distribuée dans la ration à raison de 10 g/jour/cheval.*

*En parallèle, des expérimentations ont été conduites chez le **rat et chez la souris** afin de définir les perturbations métaboliques et les interférences éventuelles engendrées par l'ingestion de taurine et/ou d'Hypochœris radicata.*

Les travaux présentés ci-dessous sont relatifs aux données obtenues chez le rat (partie IV. B), puis chez la souris (partie IV. C).

2. Expérimentation préliminaire sur rat

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Préparation de l'aliment

Les régimes des animaux ont été préparés en incorporant à l'aliment UAR 210 de la poudre d'***Hypochœris radicata*** à hauteur de **0 ou 3%** et/ou de la **taurine** à hauteur de **0 ou 1%.** Dans le cas des régimes contenant **3%** d'*Hypochœris radicata*, un **réajustement** de la composition du régime en énergie, en protéine et en lipide a été réalisé en utilisant de l'huile de colza et de la caséine, comme présenté précédemment (chapitre II). Les régimes, une fois préparés, ont été conditionnés dans des sachets plastiques par lot et stockés à -20°C avant utilisation.

2.1.2. Expérimentation

32 rats femelles de souche Wistar (Charles River, L'Arbresle, France), âgés de 5 semaines et pesant environ 120 g en début d'expérimentation ont été utilisés. Les 8 groupes de 4 rats femelles ont été répartis comme indiqué ci-dessous (*Tableau IV.6*) :

Tableau IV.6 : Répartition des rats en fonction du régime (Hypochœris radicata et taurine) et de la date d'abattage.

		Abattage à 15 jours		Abattage à 21 jours	
		0% taurine	1% taurine	0% taurine	1% taurine
Nom des lots	0% *HR*	b0	Tb0	c0	Tc0
	3% *HR*	b3	Tb3	c3	Tc3

HR : *Hypochœris radicata ; T : taurine*
b : abattage à 15 jours
c : abattage à 21 jours

Les animaux ont été nourris avec de l'aliment semi synthétique UAR 210 durant la période d'acclimatation de 5 jours puis avec le régime spécifique leur ayant été attribué (*Tableau IV.6*), à raison de 20 g/animal/jour. Les animaux ont été pesés chaque semaine. Les **urines** ont été prélevées 2 fois par semaine pendant **21 jours**. Le protocole d'abattage est identique à celui présenté dans le chapitre II. Des échantillons de **plasma** ont été collectés. Les **foies et cerveaux** ont été prélevés.

2.1.3. Analyse des échantillons

Les échantillons ont été analysés suivant la procédure décrite précédemment dans le chapitre II.

2.1.4. Analyse statistique des données

Les données issues de l'analyse par RMN du ^{1}H ont été analysées comme ce qui a pu être décrit précédemment dans le chapitre II.

2.2. Résultats

2.2.1. Données zootechniques

L'analyse du poids des rats a été réalisée en séparant les individus sacrifiés à 15 jours de ceux euthanasiés à 21 jours. Le poids des animaux et des organes, les indices de consommation et les GMQ moyens n'ont pas permis de faire apparaître ni effet significatif de la taurine, ni effet significatif de la dose d'*Hypochœris radicata*.

2.2.2. Empreintes métaboliques urinaires

Le nombre de variables répertoriées au sein des spectres urinaires est de 751 pour un pas de 0,01 ppm. En prenant en compte la totalité des données, la représentation graphique (non représentée) de l'analyse factorielle discriminante, obtenue après filtration en fonction du facteur régime, a permis d'isoler les lots recevant 3% d'*Hypochœris radicata* par projection sur l'axe 1 (explicitant 34,4% d'inertie). Les variables majoritairement impliquées sont le *scyllo*-inositol (δ = 3,36 ppm et δ = 3,35 ppm) et l'hippurate (δ = 7,55 ppm).

En considérant les données filtrées **en fonction du facteur (Date*Régime),** le premier plan factoriel de l'analyse factorielle discriminante montre que le facteur temps est représenté par projection sur l'axe 1 (38%) et le facteur régime par projection sur l'axe 2 (21,5%). La représentation de ce premier plan factoriel montre que les **groupes recevant simultanément 1% de taurine et 3% d'*Hypochœris radicata*** se **projettent au même niveau que les animaux témoins sur l'axe 2** (*Figure IV.20*). Cet axe est construit principalement avec les variables relatives à l'**hippurate** (δ = 3,97 ppm et δ = 7,56 ppm) et au ***scyllo*-inositol** (δ = 3,36 ppm).

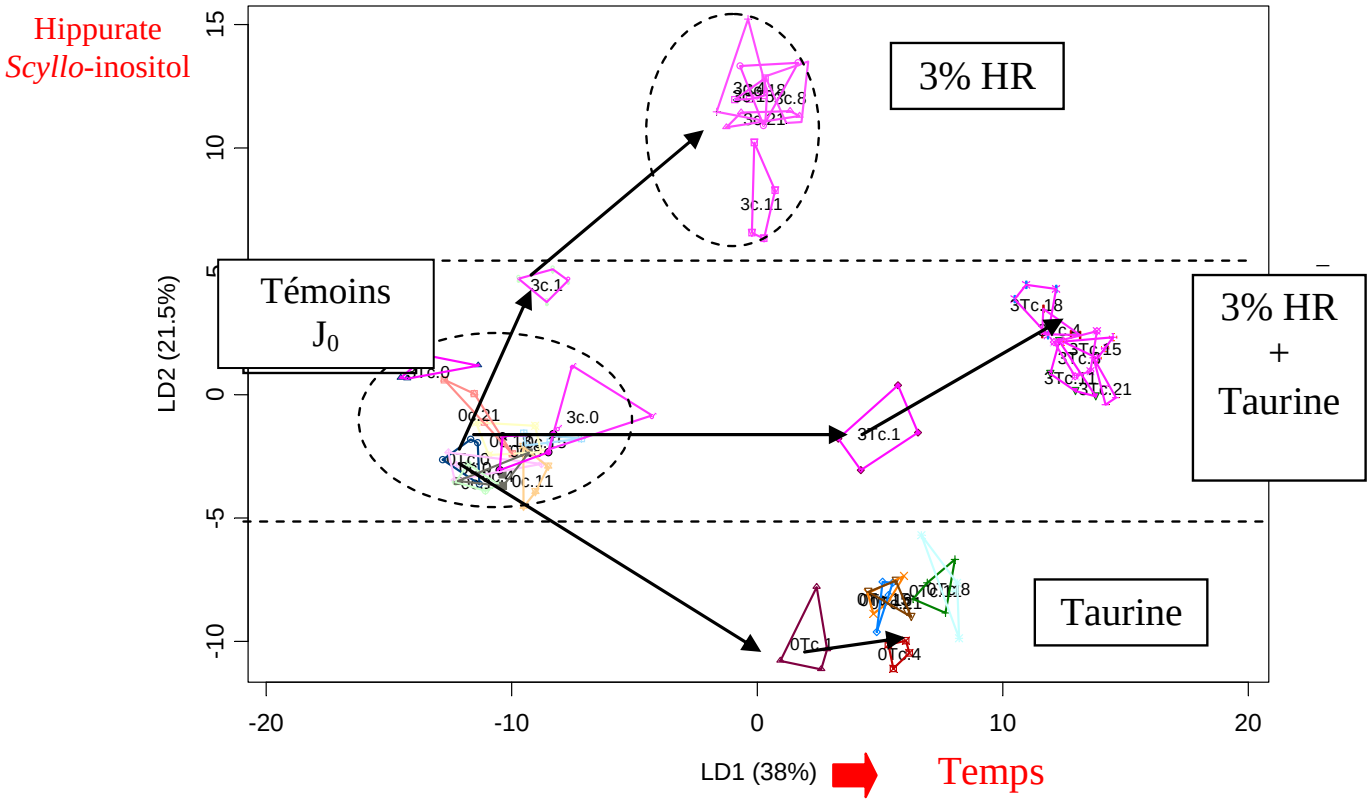


Figure IV.20 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, sur 60 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des urines de rats en fonction du facteur (Date *Régime). L'axe 1, qui explique 38% de l'inertie, montre une séparation des groupes d'individus en fonction de la date. L'axe 2, qui explique 21,5% de l'inertie, permet une projection des groupes en fonction du régime ingéré. Outre les variables relatives à l'hippurate, le *scyllo*-inositol (δ = 3,36 ppm) est également fortement impliqué dans la construction de l'axe 2. L'administration simultanée de 1% de taurine et de 3% d'*Hypochœris radicata* (HR) génère des échantillons dont la projection sur l'axe 2 se retrouve au même niveau que les individus témoins. Les groupes sont identifiés en fonction du régime reçu, de la date de sacrifice (b0 : individus témoins sacrifiés à 15 jours, Tb0 : individus consommant 1% de taurine et sacrifiés à 15 jours, c0 : individus témoins sacrifiés à 21 jours, Tc0 : individus consommant 1% de taurine et sacrifiés à 21 jours, b3 : individus consommant 3% d'HR et sacrifiés à 15 jours, Tb3 : individus consommant 1% de taurine et 3% d'HR et sacrifiés à 15 jours, c3 : individus consommant 3% d'HR et sacrifiés à 21 jours, Tc3 : individus consommant 1% de taurine et 3% d'HR et sacrifiés à 21 jours) et du jour de collecte des urines (0, 1, 4, 8, 11, 15, 18 et 21 jours).

Enfin, si une analyse factorielle discriminante est réalisée sur les prélèvements obtenus à J_{21} filtrées en fonction du facteur régime, il apparaît que l'axe 1, relatif à la présence ou non d'*Hypochœris radicata*, est construit grâce au *scyllo*-inositol (δ = 3,36 ppm) (*Figure IV.21*).

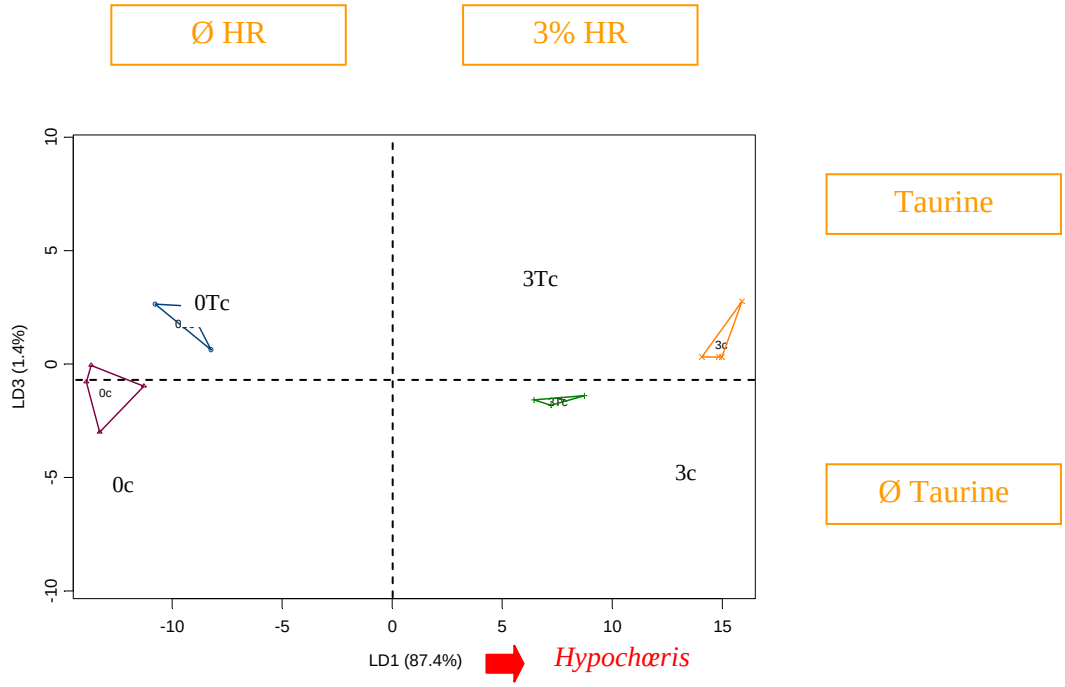


Figure IV.21 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*3, réalisée sur 5 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des urines de rats à 21 jours, en fonction du régime reçu. La projection des groupes sur l'axe 1, qui explique 87,4% de l'inertie, permet de les séparer en fonction de la présence ou non d'*Hypochœris radicata* dans le régime. L'axe 2, qui explique 11,2% de l'inertie, permet de projeter les groupes en fonction de la présence ou non de taurine dans leur régime. La variable la plus impliquée dans la construction de l'axe 1 est la variable V465 correspondant au *scyllo*-inositol à δ = 3,36 ppm, et celle la plus impliquée dans la construction de l'axe 2 est la variable V457 correspondant à la taurine à δ = 3,44 ppm. Les groupes sont identifiés en fonction du régime reçu (c0 : individus témoins sacrifiés à 21 jours, Tc0 : individus consommant 1% de taurine et sacrifiés à 21 jours, c3 : individus consommant 3% d'HR et sacrifiés à 21 jours, Tc3 : individus consommant 1% de taurine et 3% d'HR et sacrifiés à 21 jours).

L'axe 2, relatif à la présence ou non de taurine, est construit grâce à la variable correspondant à la taurine à δ = 3,44 ppm (*Figure IV.21*).

L'analyse des extraits lipophiles d'organes n'a pas permis de révéler de structure particulière au sein des groupes. L'analyse et l'interprétation se sont donc limitées aux données issues des extraits aqueux.

2.2.3. Profils métaboliques cérébraux

Le nombre de variables répertoriées sur les spectres des extraits aqueux de cerveau est de 901 pour un pas de 0,01 ppm.

Les analyses factorielles discriminantes obtenues sur les données RMN du ^{1}H de ces extraits (*Figure IV.22*) ont permis de séparer les différents lots en fonction de la présence ou non d'*Hypochœris* dans le régime (composante 1 : 76,1%), de la présence ou non de taurine dans ces mêmes régimes (composante 4 : 2%) et du temps (composante 2 : 11,5%).

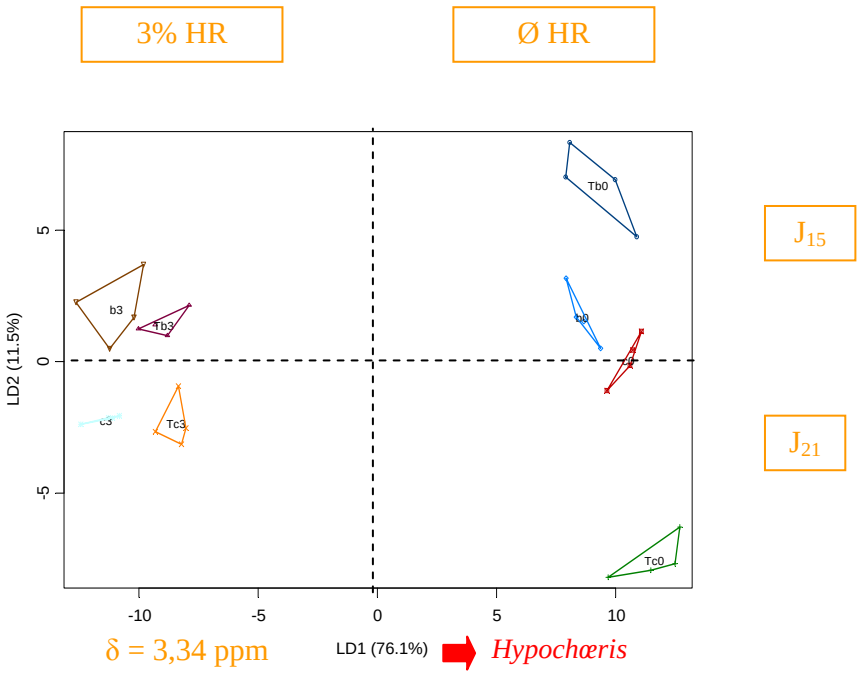


Figure IV.22 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, sur 15 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des extraits aqueux de cerveau des rats en fonction des lots. La première composante, qui explique 76,1% de l'inertie, permet une projection des lots en fonction de la présence ou non d'*Hypochœris* dans le régime. La seconde composante, qui explique 11,5% de l'inertie, permet une projection des lots en fonction de la présence ou non de taurine dans le régime. Les groupes sont identifiés en fonction du régime reçu et de la date de sacrifice (b0 : individus témoins sacrifiés à 15 jours, Tb0 : individus consommant 1% de taurine et sacrifiés à 15 jours, c0 : individus témoins sacrifiés à 21 jours, Tc0 : individus consommant 1% de taurine et sacrifiés à 21 jours, b3 : individus consommant 3% d'HR et sacrifiés à 15 jours, Tb3 : individus consommant 1% de taurine et 3% d'HR et sacrifiés à 15 jours, c3 : individus consommant 3% d'HR et sacrifiés à 21 jours, Tc3 : individus consommant 1% de taurine et 3% d'HR et sacrifiés à 21 jours).

La variable la plus impliquée dans la construction du premier axe est à nouveau le *scyllo*-inositol (δ = 3,34 ppm).

2.2.4. Profils métaboliques hépatiques

Le nombre de variables répertoriées sur les spectres des extraits hydrosolubles hépatiques est de 901 pour un pas de 0,01 ppm.

Les analyses factorielles discriminantes obtenues à partir des données RMN du ^{1}H de ces extraits en fonction des lots ont permis de séparer ces derniers en fonction de la présence ou non d'*Hypochœris* dans le régime (composante 1 : 37,7%), en fonction de la présence ou non de taurine dans le régime (composante 2 : 24,8%) et en fonction du temps (composante 3 : 15,4%) (*Figure IV.23*).

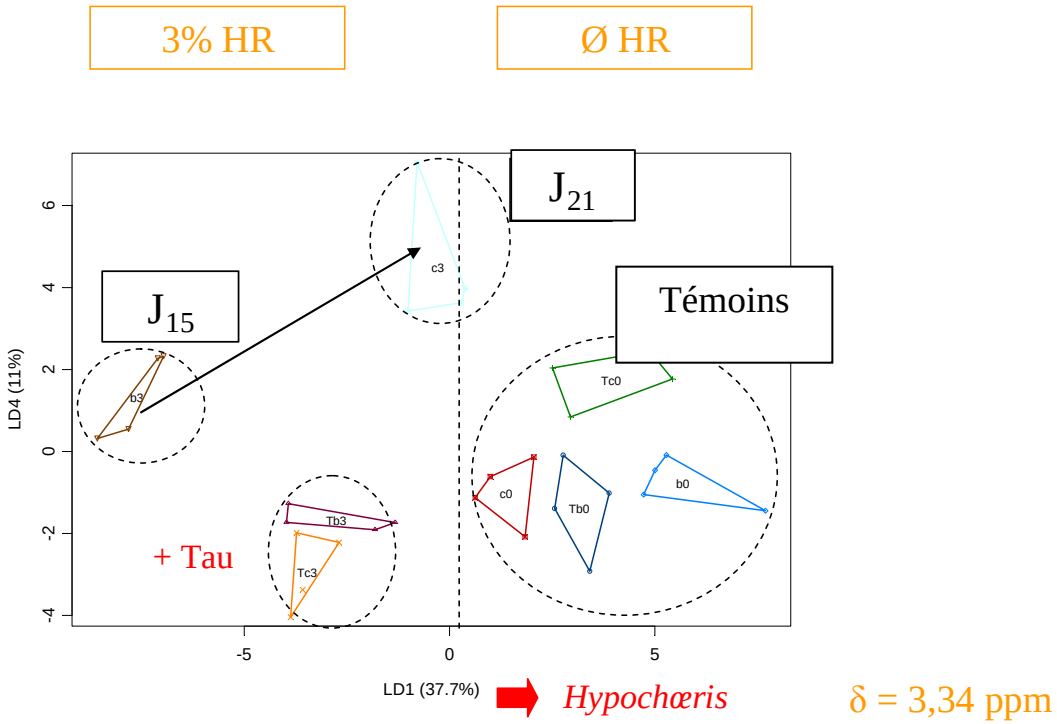


Figure IV.23 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*4, réalisée sur 14 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des extraits aqueux de foie de rats, en fonction des lots. Les individus témoins se projettent ensemble. Les rats consommant 3% d'*Hypochœris* s'individualisent et présentent une progression de leur métabolisme entre les dates J_{15} et J_{21}. Enfin, les rats consommant simultanément 3% d'*Hypochœris* et 1% de taurine se projettent au même niveau que les témoins sur l'axe 4 et ne présentent pas d'évolution de leur métabolisme au cours du temps. Les groupes sont identifiés en fonction du régime reçu et de la date de sacrifice (b0 : individus témoins sacrifiés à 15 jours, Tb0 : individus consommant 1% de taurine et sacrifiés à 15 jours, c0 : individus témoins sacrifiés à 21 jours, Tc0 : individus consommant 1% de taurine et sacrifiés à 21 jours, b3 : individus consommant 3% d'HR et sacrifiés à 15 jours, Tb3 : individus consommant 1% de taurine et 3% d'HR et sacrifiés à 15 jours, c3 : individus consommant 3% d'HR et sacrifiés à 21 jours, Tc3 : individus consommant 1% de taurine et 3% d'HR et sacrifiés à 21 jours).

La première variable impliquée dans la construction de l'axe 2 est le *scyllo*-inositol à δ = 3,35 ppm. Les 3 premières variables les plus impliquées dans la construction de l'axe 1 sont V744 (δ = 2,08 ppm), V660 (δ = 2,92 ppm) et V618 (δ = 3,34 ppm). De plus, le plan factoriel (1*4) met en évidence une évolution métabolique spécifique des animaux ayant ingéré simultanément la taurine et *Hypochœris*. En effet, les rats alimentés avec 3% d'*Hypochœris* présentent une variation de leur métabolisme entre J_{15} et $J_{21.}$ En revanche, les rats alimentés avec simultanément 3% d'*Hypochœris* et 1% de taurine sont projetés au même niveau que les individus témoins sur l'axe 4 et ne présentent pas la progression observée précédemment chez les individus ingérant *Hypochœris* seule (*Figure IV.23*).

2.2.5. Profils métaboliques plasmatiques

Le nombre de variables répertoriées sur les spectres obtenus avec les plasmas de rat est de 911 pour un pas de 0,01 ppm. Le dépouillement des données RMN du ^{1}H n'a pas permis de caractériser ou de révéler d'orientation métabolique particulière entre les groupes.

3. Analyse des perturbations du métabolisme général et du métabolisme tissulaire (foie, cerveau) chez la souris soumise à l'ingestion d'un régime contenant Hypochœris radicata et/ou de la taurine

3.1. Matériel et méthodes

3.1.1. Préparation de l'aliment

Les régimes des animaux ont été obtenus en incorporant à l'aliment UAR 210 la poudre d'***Hypochœris radicata*** à hauteur de **0, 3 ou 9%** et/ou la **taurine** à hauteur de **0 ou 1%** (*Tableau IV.7*). Dans le cas des régimes contenant **3 et 9%** d'*Hypochœris radicata*, un **réajustement** de la composition du régime en énergie, en protéine et en lipide a été réalisé en utilisant de l'huile de colza et de la caséine, comme présenté précédemment (chapitre II).

Les régimes, une fois réalisés, ont été conditionnés dans des sachets plastiques par lot et stockés à -20°C avant utilisation.

3.1.2. Expérimentation

36 souris mâles de souche **C57BL/6J**, âgées de 5 semaines en début d'expérimentation (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) ont été utilisées.

Après pesée, les animaux ont été répartis au hasard dans 12 cages collectives par groupe de 3. Au sein de chaque cage, les souris ont été identifiées grâce à un système de code de points au feutre indélébile noir sur la partie proximale de la queue.

Tableau IV.7 : Répartition des animaux en fonction du régime reçu et codage des 6 lots.

	0% HR	3% HR	9% HR
0% Taurine	H0	H3	H9
1% Taurine	TH0	TH3	TH9
Nombre d'animaux /lot	6	6	6

HR : *Hypochœris radicata*

Les animaux ont été nourris avec de l'aliment semi synthétique UAR 210 durant la période d'acclimatation de 5 jours puis avec le régime spécifique leur ayant été attribué (*Tableau IV.7*), à raison de 5 g/animal/jour. Les animaux ont été pesés chaque semaine. Les **urines** ont été prélevées 2 fois par semaine, après compression légère de la vessie au dessus d'un film de parafine. L'expérimentation a duré **15 jours** puis les animaux ont été euthanasiés.

Le protocole d'abattage est identique à celui présenté dans le chapitre II. Des échantillons de **plasma** ont été collectés. Les **foies et cerveaux** ont été prélevés.

3.1.3. Analyse des échantillons

Les échantillons ont été analysés suivant la procédure décrite précédemment dans le chapitre II.

3.1.4. Analyse statistique des données

Les données issues de l'analyse par RMN du ^{1}H ont été analysées comme ce qui a pu être décrit précédemment dans le chapitre II.

3.2. Résultats

3.2.1. Données zootechniques

Les poids des animaux et les poids des organes n'ont pas été différents entre les groupes.

3.2.2. Profils métaboliques urinaires

La représentation graphique de l'analyse en composantes principales des profils urinaires montre deux groupes bien distincts et montre l'impact prépondérant de la taurine sur les signatures métaboliques (*Figure IV.24*).

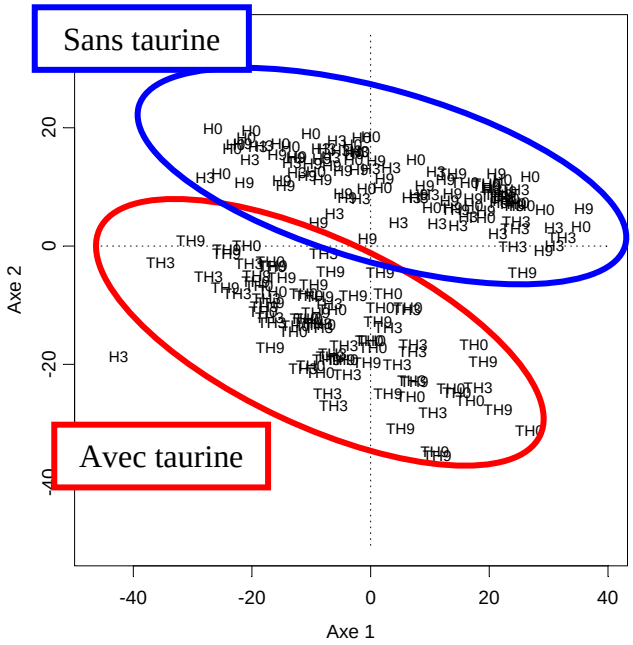


Figure IV.24 : Représentation graphique de l'analyse en composantes principales réalisée sur données RMN du ^{1}H des échantillons d'urine des souris, en fonction des lots. On note une séparation nette des échantillons en fonction du facteur taurine. Les groupes sont identifiés ainsi : H0 : animaux témoins, H3: animaux recevant 3% d'*Hypochœris radicata* (HR), H9 : animaux recevant 9% d'HR, TH0: animaux recevant 1% de taurine, TH3 : animaux recevant 1% de taurine et 3% d'HR, TH9: animaux recevant 1% de taurine et 9% d'HR.

La représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante issue des échantillons urinaires, après avoir filtré les variables en fonction du facteur lot, a souligné la **prépondérance du facteur traitement à la taurine** par projection sur l'axe 1 (inertie de 46,9%). Elle a souligné également un effet dû au facteur dose d'*Hypochœris radicata* (*Figure IV.25*) par projection sur l'axe 2. Parmi les principales variables liées à la construction de l'axe 1, ont pu être identifiés le ***myo*-inositol** (δ = 4,06 ppm, ρ = -0,99), le ***scyllo*-inositol** (δ = 3,34 ppm, ρ = +0,80), la **taurine** (δ = 3,42 ppm, ρ = -0,90), le **N-oxyde triméthylamine** ou TMAO (δ = 3,25 ppm, ρ = +0,94), la **triméthylamine** (δ = 2,88 ppm, ρ = -0,87), la choline (δ = 3,23 ppm, ρ = -0,95) et **l'α-cétoisocaproate** (δ = 0,93 ppm, ρ = -0,99).

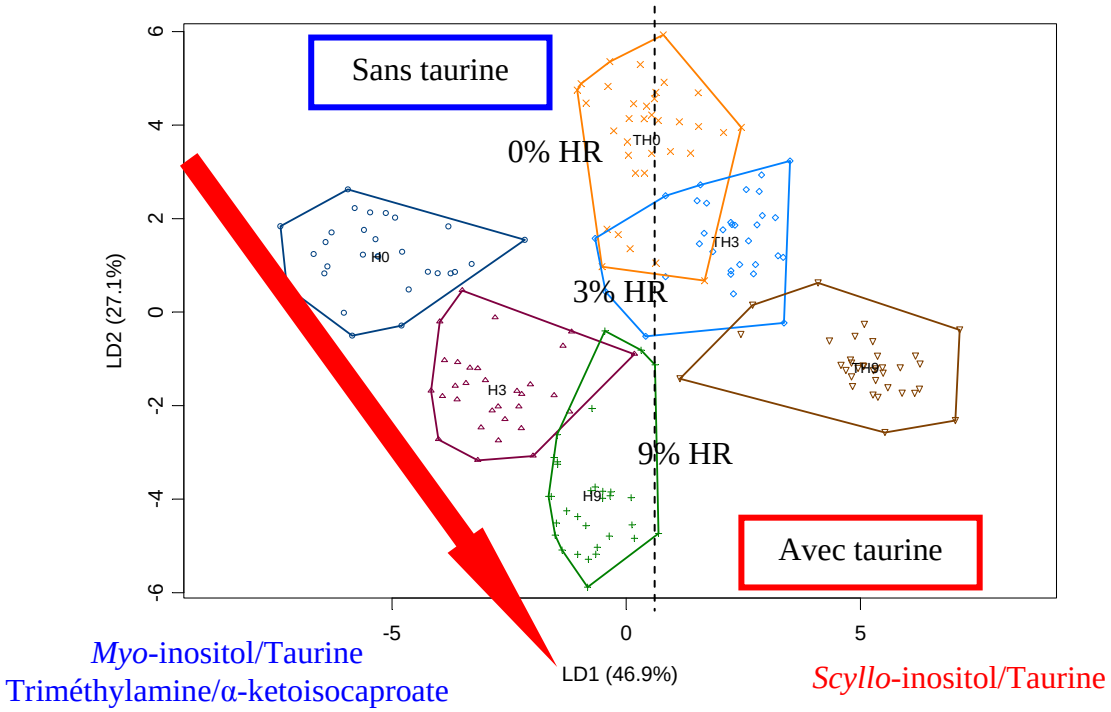


Figure IV.25 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, réalisée sur 60 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des échantillons d'urine en fonction des lots de souris. La projection des lots sur l'axe 1 rend compte du facteur taurine, celle sur l'axe 2 du facteur dose d'*Hypochœris radicata*. On retrouve également la hiérarchisation du facteur dose d'*Hypochœris radicata* dans le facteur taurine dans la construction de l'axe 1. Les groupes sont identifiés ainsi : H0 : animaux témoins, H3: animaux recevant 3% d'*Hypochœris radicata* (HR), H9 : animaux recevant 9% d'HR, TH0: animaux recevant 1% de taurine, TH3 : animaux recevant 1% de taurine et 3% d'HR, TH9: animaux recevant 1% de taurine et 9% d'HR.

En réalisant la filtration des données en fonction du facteur d'interaction **date*lot**, la projection des échantillons a permis de mieux matérialiser la progression de l'impact du traitement sur le métabolisme des animaux au cours du temps. Sans correction, le premier plan factoriel (1*2) rend compte, d'une part, de cette évolution temporelle par projection des groupes sur l'axe 1 et, d'autre part, du pouvoir de disruption des 2 traitements utilisés conjointement par projection sur l'axe 2 (*Figure IV.26*).

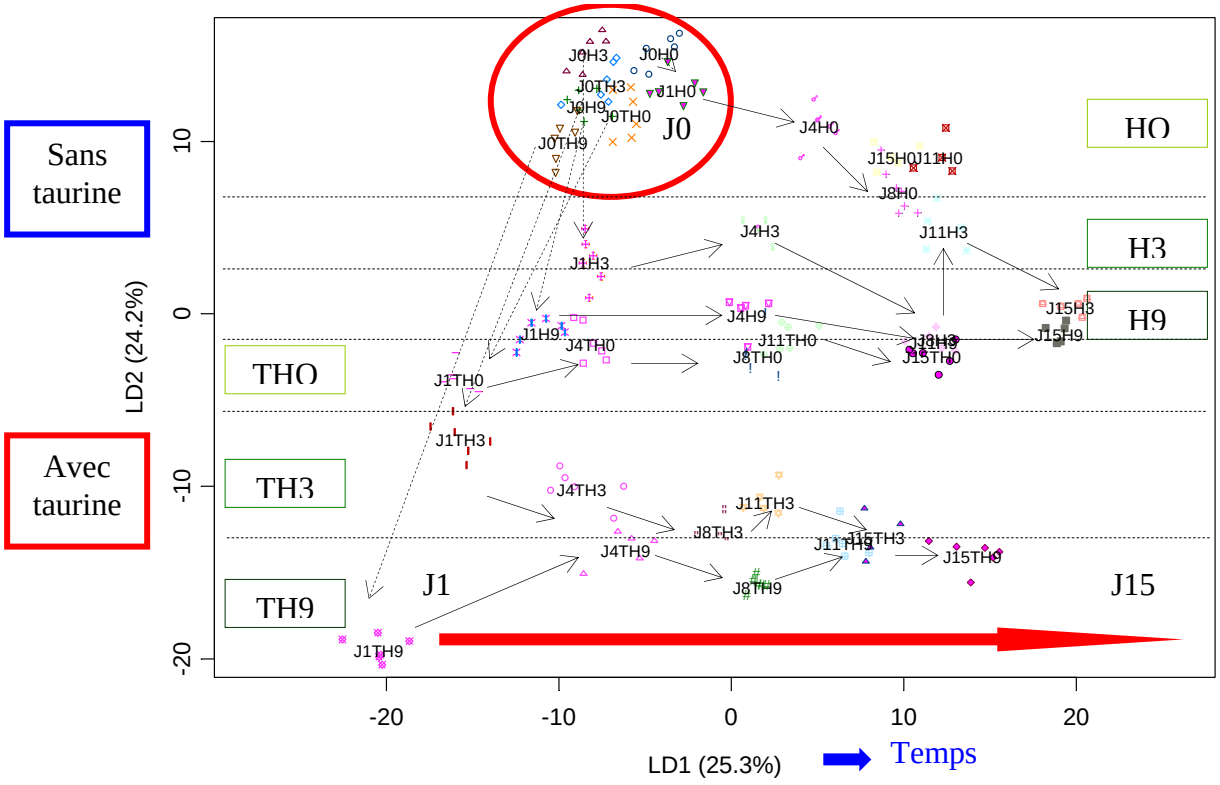


Figure IV.26 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le premier plan factoriel 1*2, réalisée sur 90 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H issues des échantillons urinaires en fonction du facteur date*lot. La projection des échantillons sur l'axe 1 rend compte de l'évolution au cours du temps, une fois que l'organisme a répondu au changement de régime suivant la projection sur l'axe 2. Cette dernière rend compte de la hiérarchisation du facteur dose d'*Hypochœris radicata* dans le facteur taurine. Les groupes sont identifiés ainsi : H0 : animaux témoins, H3: animaux recevant 3% d'*Hypochœris radicata* (HR), H9 : animaux recevant 9% d'HR, TH0: animaux recevant 1% de taurine, TH3 : animaux recevant 1% de taurine et 3% d'HR, TH9: animaux recevant 1% de taurine et 9% d'HR.

Les groupes s'échelonnent par doses croissantes d'*Hypochœris radicata* au sein du facteur taurine révélant ainsi un **effet additionnel ou cumulatif** mais non antagoniste. Les variables les plus impliquées dans la construction des axes sont la **phénylalanine** (δ = 7,35 ppm, ρ = +0,82) pour l'axe 1, le ***myo*-inositol** (δ = 4,06 ppm, ρ = +0,81) et le ***scyllo*-inositol** (δ = 3,34 ppm, ρ = -0,81) pour l'axe 2.

L'analyse des extraits lipophiles d'organes n'a pas permis de révéler de structure particulière au sein des groupes. L'analyse et l'interprétation se sont donc limitées aux données issues des extraits aqueux.

3.2.3. Profils métaboliques hépatiques

Un échantillon aberrant a été retiré puis une correction OSC a été réalisée.

La représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée à partir des données RMN du ^{1}H filtrées en fonction du facteur lot a permis, tout comme sur les urines, de faire apparaître le facteur taurine comme facteur prédominant par projection des groupes sur l'axe 1. La projection sur l'axe 2 est relative au facteur dose d'*Hypochœris radicata* (*Figure IV.27*).

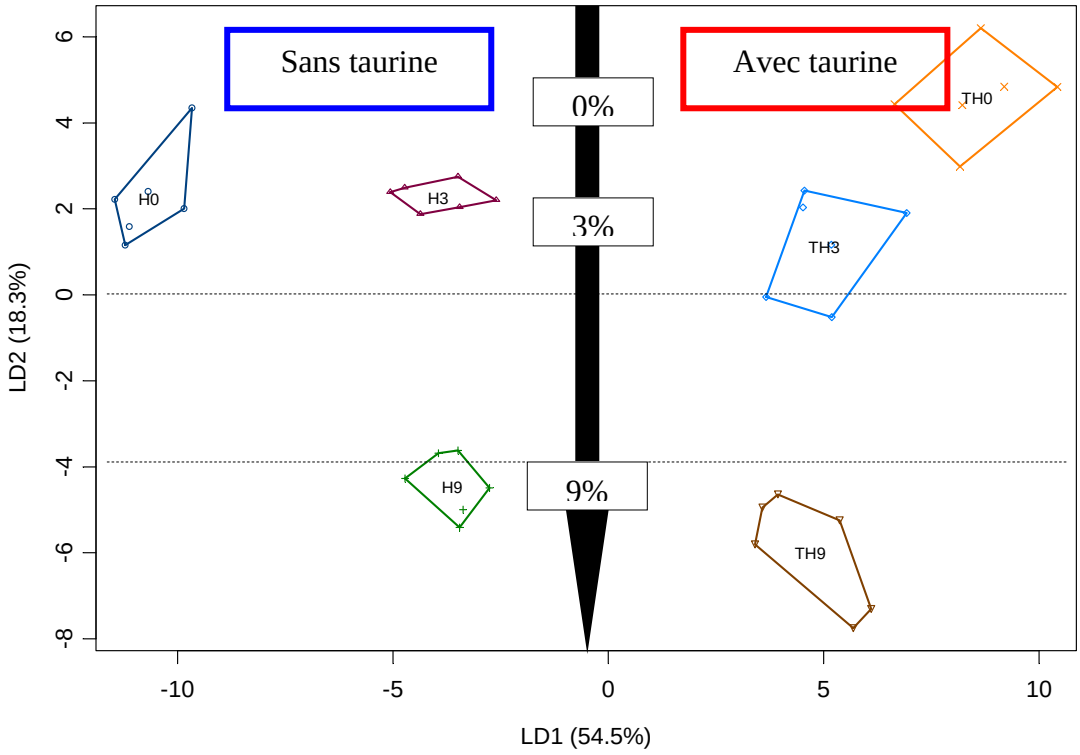


Figure IV.27 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*2, réalisée sur 15 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H, corrigées par OSC, des extraits hydrosolubles de foie en fonction du facteur lot. La projection des lots sur le premier axe est réalisée en fonction du facteur taurine, celle sur l'axe 2 en fonction de la dose *d'Hypochœris radicata* ingérée. Les groupes sont identifiés ainsi : H0 : animaux témoins, H3: animaux recevant 3% d'*Hypochœris radicata* (HR), H9 : animaux recevant 9% d'HR, TH0: animaux recevant 1% de taurine, TH3 : animaux recevant 1% de taurine et 3% d'HR, TH9: animaux recevant 1% de taurine et 9% d'HR.

Le plan factoriel (1*3) montre que les lots **consommant simultanément *Hypochœris radicata* et la taurine** se projettent **entre les individus témoins et les lots ingérant la plante seule** sur l'axe 3 (*Figure IV.28*).

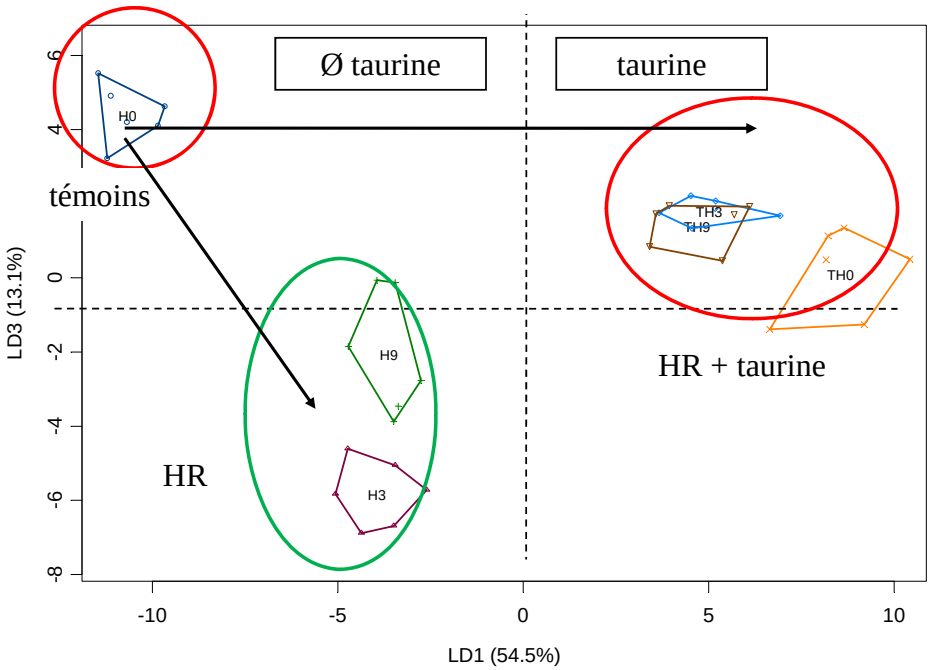


Figure IV.28 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le plan factoriel 1*3, obtenue sur 15 variables filtrées, à partir de données d'extraits hydrosolubles de foie de souris en fonction des lots. La projection des lots sur l'axe 1 rend compte des perturbations métaboliques engendrées par l'ingestion de la taurine. La projection sur l'axe 3 souligne une individualisation des groupes consommant *Hypochœris radicata*. Les lots consommant simultanément la plante et la taurine se projettent de façon plus proche des individus témoins. Les groupes sont identifiés ainsi : H0 : animaux témoins, H3: animaux recevant 3% d'*Hypochœris radicata* (HR), H9 : animaux recevant 9% d'HR, TH0: animaux recevant 1% de taurine, TH3 : animaux recevant 1% de taurine et 3% d'HR, TH9: animaux recevant 1% de taurine et 9% d'HR.

Aucune variable impliquée dans la construction des trois premières composantes n'a pu être identifiée.

3.2.4. Profils métaboliques cérébraux

La représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante réalisée sur les variables filtrées des extraits hydrosolubles cérébraux (*Figure IV.29*) a souligné la **prédominance** du facteur **dose d'*Hypochœris radicata*** par projection des lots sur l'axe 1 (95,5% de la variance). La variable la plus impliquée dans la construction de cet axe est le ***scyllo*-inositol** (δ = 3,34 ppm, ρ = +0,99 et δ = 3,35 ppm, ρ = +0,98). La structure globale de ce plan factoriel rappelle celle obtenue par l'ingestion d'*Hypochœris radicata* seule (chapitre II).

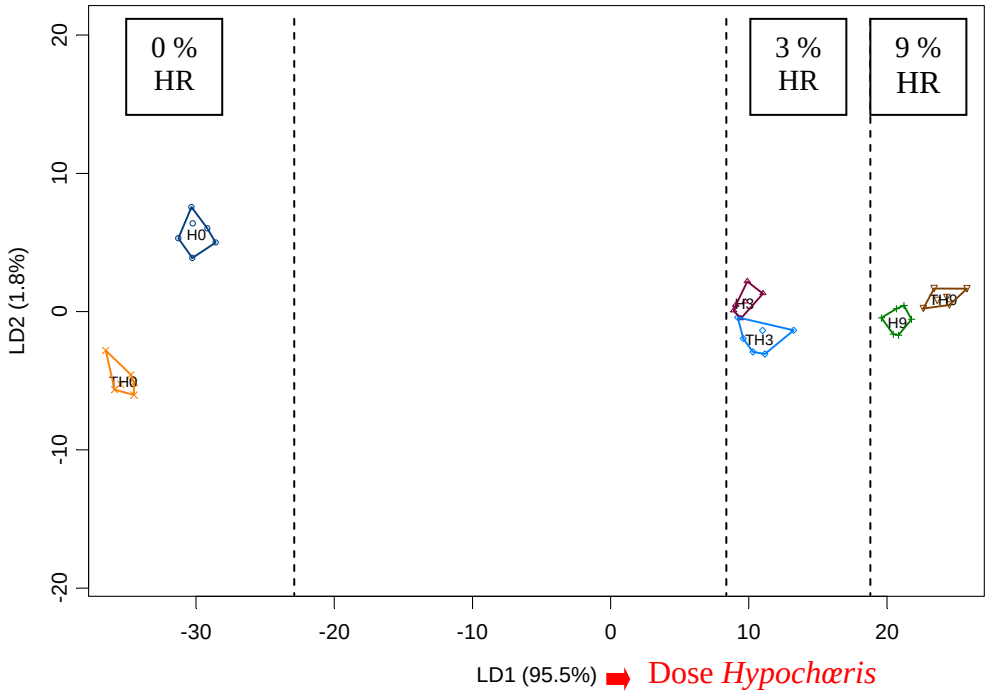


Figure IV.29 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante suivant le plan factoriel 1*2, obtenue sur 15 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des extraits hydrosolubles de cerveaux. L'axe 1 accapare la majorité de l'inertie où se projettent les lots en fonction du facteur dose d'*Hypochœris radicata* incorporée dans l'aliment. La projection des lots sur la seconde composante ne peut pas être interprétée du fait des distances faibles entre lots recevant une même dose d'*Hypochœris radicata*. Les groupes sont identifiés ainsi : H0 : animaux témoins, H3: animaux recevant 3% d'*Hypochœris radicata* (HR), H9 : animaux recevant 9% d'HR, TH0: animaux recevant 1% de taurine, TH3 : animaux recevant 1% de taurine et 3% d'HR, TH9: animaux recevant 1% de taurine et 9% d'HR.

Malgré la prédominance nette de l'axe 1 qui englobe la quasi-totalité de la variance, le second plan factoriel (2*3) a été analysé. En effet, les lots recevant les régimes contenant à la fois de l'*Hypochœris radicata* et de la taurine et ceux consommant de l'*Hypochœris radicata* seule se projettent de façon opposée sur l'axe 3 (*Figure IV.30*).

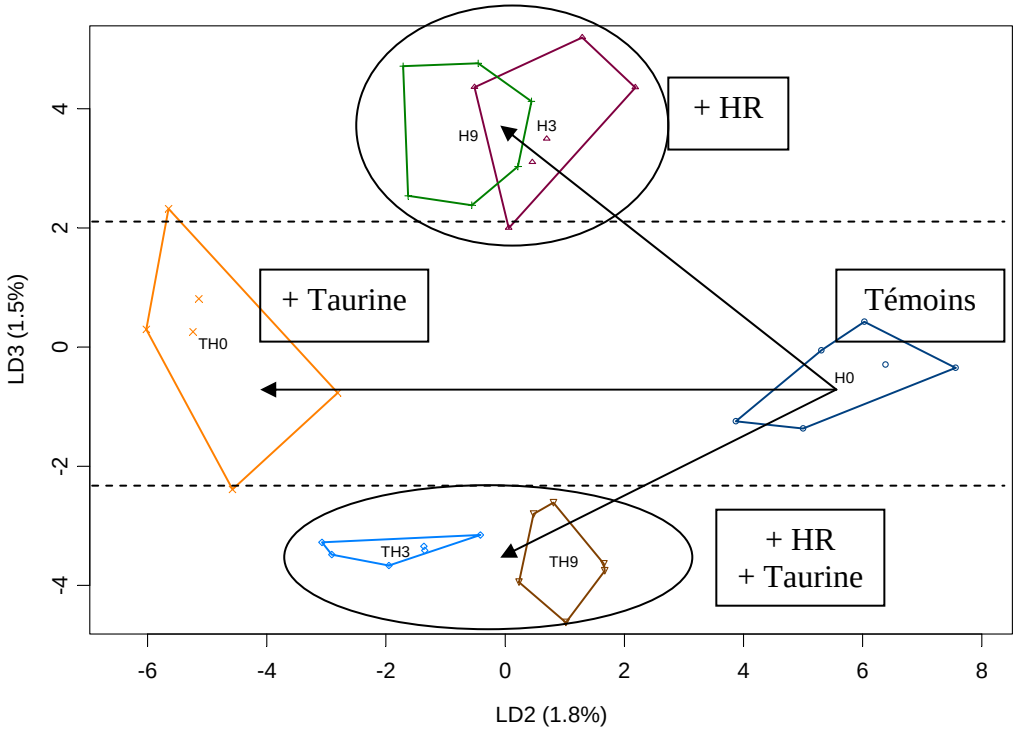


Figure IV.30 : Représentation graphique de l'analyse factorielle discriminante, suivant le second plan factoriel 2*3, obtenue sur 15 variables filtrées, à partir des données RMN du ^{1}H des extraits hydrosolubles de cerveau. La projection des lots sur l'axe 3 permet de visualiser une opposition entre les lots ingérant *Hypochœris radicata* seule de ceux consommant simultanément la plante et la taurine. Les groupes sont identifiés ainsi : H0 : animaux témoins, H3: animaux recevant 3% d'*Hypochœris radicata* (HR), H9 : animaux recevant 9% d'HR, TH0: animaux recevant 1% de taurine, TH3 : animaux recevant 1% de taurine et 3% d'HR, TH9: animaux recevant 1% de taurine et 9% d'HR.

Les variables rendant compte de cette différence métabolique sur l'axe 3 n'ont pas pu être identifiées.

3.3. Discussion

Pour conduire cette étude, nous avons émis l'**hypothèse** que l'administration d'une dose de **1% de taurine dans le régime** des animaux ingérant *Hypochœris radicata*, pouvait être **bénéfique,** soit en **comblant une éventuelle déficience métabolique** chez les animaux atteints, soit en **interférant** dans les voies métaboliques perturbées par l'ingestion d'*Hypochœris radicata*.

La première expérimentation conduite sur **rat** a été effectuée durant **21 jours.** Elle a permis de révéler, au niveau des **urines,** une orientation particulière du métabolisme des animaux consommant **simultanément la plante et la taurine**. En effet, la projection de ces individus sur la seconde composante est obtenue au **même niveau que celle des individus témoins** (*Figure IV.20*). En parallèle, dans l'analyse des extraits hépatiques, les individus consommant le régime taurine + *Hypochœris radicata* se retrouvent projetés au même niveau que celui des individus témoins et surtout ne présentent pas **d'évolution** de leur métabolisme au cours du temps, contrairement aux lots ne consommant que la plante (*Figure IV.23*). Ces conclusions nous ont laissé supposer qu'une administration de **taurine pourrait diminuer, voire annuler, les effets « disrupteurs » induits par l'ingestion de la plante**.

Or, cette observation n'a **pas** pu être **confortée** par l'analyse des données dans le **cerveau** dans lequel aucune « correction métabolique compensatrice » apportée par la taurine n'a pu être mise en évidence (*Figure IV.22*). Cette conclusion reste peu satisfaisante eu égard au fait que le cerveau est considéré dans cette étude comme un des tissus cibles.

De plus, l'utilisation dans le protocole expérimental d'**une seule dose** d'*Hypochœris radicata* ne **permet pas non plus de savoir** si ce « retour » à un état physiologique « similaire » à celui des individus témoins est dû véritablement à la taurine ou si cela résulte de l'interaction entre les doses choisies *d'Hypochœris radicata* et de taurine.

Aussi, une seconde expérimentation a été menée chez la **souris** afin de pouvoir utiliser les **deux doses** *d'Hypochœris radicata* **(3 et 9%)** sur une durée limitée de **15 jours** car les études précédentes ont montré qu'une telle durée était suffisante pour révéler les disruptions métaboliques. En effet, si la **taurine** constitue bien un **traitement** de l'intoxication, les déviations métaboliques observées devraient être similaires, à savoir que les individus devraient être **projetés dans la même zone sur la carte factorielle**, quelle que soit la dose de

taurine utilisée. Nous serions alors en présence d'un phénomène d'**interaction** (**cas a**) (*Figure IV.31* a). En revanche, s'il s'agit d'un **effet additif simple** (**cas b**), en présence de taurine, la déviation métabolique à 9% serait différente de celle à 3% (*Figure IV.31* b).

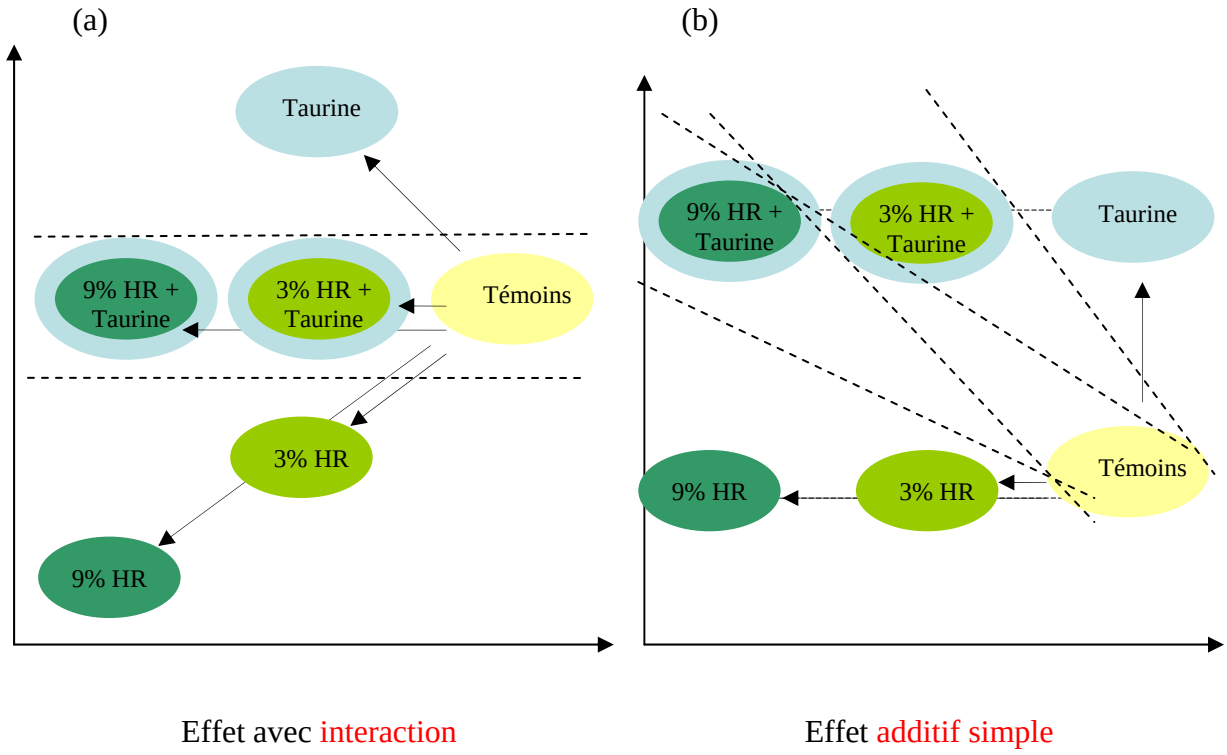


Figure IV.31 : Schéma explicitant l'utilité de la seconde expérimentation sur souris avec deux doses d'Hypochœris radicata. (a) Si le lot consommant simultanément la taurine et la plante à 3 ou 9% se retrouve sur la même zone de projection sur une composante factorielle (ici la seconde), cela pourrait conforter l'existence d'un effet direct de la taurine dans le processus d'intoxication par *Hypochœris radicata* avec présence d'une interaction forte entre *Hypochœris radicata* et la taurine sur le métabolisme général ou tissulaire. (b) En revanche, si ce même lot a une résultante différente après intoxication par 3 ou 9% d'*Hypochœris radicata*, cela peut signer un simple effet additif entre les réponses métaboliques induites par *Hypochœris radicata* et par la taurine.

Les résultats obtenus à partir des **urines** des souris (*Figure IV.25*) permettent d'associer **l'action de la taurine au cas b**, c'est-à-dire qu'il existe un **simple effet additif** entre l'effet lié à l'ingestion de la taurine et celui lié à l'ingestion d'*Hypochœris radicata*. En aucun cas, la taurine n'a eu d'effet direct sur le mécanisme d'intoxication induit par *Hypochœris radicata*. Il est vraisemblable que la réponse observée précédemment chez le rat, pour lequel une seule dose d'*Hypochœris radicata* avait été utilisée, ne révélait qu'un effet additif simple, même si la projection des individus ayant reçu *Hypochœris radicata* et la taurine avait lieu au même niveau que celle des témoins (*Figure IV.20*).

L'analyse des extraits hydrosolubles **hépatiques** (*Figure IV.27*) confirme également le **cas b** sur le plan factoriel 1*2, bien qu'une interaction faible mais significative existe entre les deux facteurs. Sur le plan factoriel 1*3, on constate l'existence d'une interaction plus importante entre la taurine et *Hypochœris radicata*. En effet, la projection des lots consommant la taurine et des doses de 3 et 9% d'*Hypochœris radicata* se fait dans une région très proche sur la composante 3 de celle des témoins ou des animaux consommant *Hypochœris radicata* (*Figure IV.28*).

Enfin, l'analyse **des extraits hydrosolubles de cerveau** de souris ne permet pas d'établir un profil de réponse spécifique due à une interaction ou un simple effet additif si l'on considère le premier plan factoriel (*Figure IV.29*) dans lequel le pourcentage de variance expliqué par le facteur *Hypochœris* (composante 1) est très important. En revanche, l'étude du plan factoriel 2*3, qui ne représente que 3,3 % de la variance inter-groupe (*Figure IV.30*), permet d'observer l'existence d'une interaction entre les deux facteurs étudiés : la direction des déviations métaboliques engendrées par l'ingestion d'*Hypochœris radicata* associée à une consommation de taurine est totalement différente et indépendante de celles consécutives à la consommation soit de taurine seule soit d'*Hypochœris radicata*.

En conclusion de cette étude exploratoire sur les possibilités d'interaction métabolique entre la taurine et le (ou les) composé(s) toxique(s) présent(s) dans *Hypochœris radicata*, il apparaît que **l'administration de taurine** à des rats et ou des souris intoxiqués avec *Hypochœris* pourrait engendrer des **améliorations partielles** si l'on se fonde sur certaines résultantes métaboliques observées. Ces améliorations seraient dues à des **interactions entre les voies métaboliques de la taurine et celles perturbées par l'ingestion de la plante**. Parmi les nombreux rôles joués par la taurine, certains pourraient rétablir des désordres tels que ceux répertoriés dans les discussions des chapitres précédents, en particulier ceux liés au contrôle tissulaire du **statut rédox** ou ceux permettant le **contrôle du métabolisme des seconds messagers tels que le Ca^{2+}.**

En effet, il a été montré précédemment que **l'effet thérapeutique de la taurine** dans le **diabète** était fondé sur sa capacité à **diminuer les concentrations cytosolique en Ca^{2+},** en stimulant le restockage mitochondrial, en inhibant le turnover des phosphoinositides, en diminuant les flux internes de Ca^{2+}, en s'interposant dans la liaison du Ca^{2+} aux phospholipides membranaires et en inhibant le glutamate excitotoxique (*7,41,43*). Or, dans les chapitres précédents, nous avons mentionné que les **concentrations intracellulaires en Ca^{2+}**

pouvaient être modifiées par l'action des **inositols** sur les récepteurs **sérotoninergiques** (*44*) mais également *via* les récepteurs **IP_3**, eux-mêmes étant obtenus à partir d'inositol (*45,46*). On peut donc supposer qu'un déséquilibre dans la concentration en inositol et donc un dérèglement dans la balance *myo*/*scyllo*-inositol peut entraîner des répercussions dans la concentration à terme en Ca^{2+} intracellulaire. En effet, au niveau fonctionnel, une augmentation en Ca^{2+} intracellulaire est responsable d'**apoptose**, d'**ischémie** (*47*) et **d'hyperexcitabilité neuronale**, ces dernières pouvant conduire à des symptômes de **douleur** (*7*), si elle concerne les neurones sensitifs mais également à des manifestations de type **épileptiforme**, si elle touche les neurones moteurs (*37,47*). Au niveau structural, une élévation en Ca^{2+} intracellulaire peut entraîner des **dégénérescences neuronales** visibles notamment dans la **maladie d'Alzheimer**, dans la **sclérose amyotrophique latérale** (*48,49*) ainsi que dans le **diabète** (*50*). Cette même augmentation peut également conduire, au niveau comportemental et psychique, à des **états dépressifs et anxiogènes** (*44,51*).

Parallèlement à son action sur les concentrations intracellulaires en Ca^{2+}, la taurine intervient en **améliorant la vitesse de conduction de l'influx nerveux** (*7,8*) et en **diminuant le stress oxydatif** (*39*), deux voies impliquées dans la pathogénie du harper.

Il apparaît donc que la **teneur en Ca^{2+} intracellulaire** constituent la **plaque tournante** de nombreuses voies métaboliques et son augmentation serait potentiellement responsable de nombreux troubles nerveux observés lors de diabète (*50*), de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique (*48,49*) et du harper (*12,52,53*).

En conclusion, **l'administration de taurine**, démontrée comme bénéfique dans toutes ces maladies (*37,54,55*), *via* les rôles précédemment répertoriés, serait également intéressante dans le harper en **atténuant certaines perturbations** engendrées par l'ingestion d'*Hypochœris radicata* comme un état de stress oxydatif et/ou l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} entraînant des dysfonctionnements au niveau de la conduction nerveuse. Cependant, même si la taurine interfère avec certaines voies métaboliques altérées par l'ingestion de la plante, la **taurine ne peut pas constituer un traitement spécifique du harper**.

Néanmoins, ce bénéfice d'un traitement avec de la taurine peut être estimé chez le cheval par les quelques données actuelles en notre possession après avoir traité quelques chevaux atteints ou non (*Tableau IV.8*). **6 chevaux** ont reçu une dose de **10 g/jour** durant des

périodes allant de 1 à 6 mois. Après traitement, parmi ceux-ci, 4 chevaux ont vu leurs **troubles moteurs atténués**, leur grade d'atteinte (en majorité grade 4 à 5) régressant ainsi au stade inférieur. Les animaux qui présentaient un comportement d'anxiété **prononcée, de crainte, de panique ou d'agressivité** vis-à-vis de l'homme ainsi que ceux présentant de l'**abattement** et une **diminution des interactions** avec leurs congénères ont vu leur **attitude incontestablement améliorée**. Les 2 animaux présentant des **troubles laryngés** ont recouvert tous deux leur faculté. Parmi eux, le cheval, initialement en dressage, qui, suite à une paralysie laryngée, ne pouvait plus assurer sa fonction, s'étouffant et paniquant lors du travail, a pu reprendre la monte. Enfin, les deux chevaux qui ont été traités à la taurine sans présenter aucun trouble n'ont pas révélé de changement ultérieurs que ce soit au niveau du comportement qu'au niveau de la clinique.

Tableau IV.8 : Caractéristiques et résultats obtenus après traitement avec de la taurine à raison de 10 g/jour sur 6 chevaux atteints de harper.

Nom cheval	Sexe	Localisation	Durée de traitement	Grade d'atteinte	Troubles moteurs	Troubles laryngés	Comportement
Poussy	Femelle	Gers (32)	6 mois	IV	–	–	+++
Lutèce	Femelle	Tarn-et-Garonne (82)	2 x 3 mois	IV-V	+	–	+
Néfrette	Femelle	Tarn-et-Garonne(82)	2 x 1 mois	III	+	–	+
Lershwin	Mâle castré	Haute-Garonne (31)	3 mois	?	–	++ **(paralysie laryngée)**	+
Proconsult	Mâle castré	Landes (40)	3 mois	I –III	++	++	+++
Yankee	Femelle	Haute-Garonne (31)	3 mois	IV	+	–	+++

+ : amélioration visible, ++ : amélioration importante, +++ : amélioration très importante.

Références :

(1) Faini, F., Labbé, C., and Coll, J., (1999) Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of Baccharis linearis. *Biochem. Syst. Ecol.*, *27*, 673-679.

(2) Rontein, D., Basset, G., and Hanson, A.D., (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng.*, *4*, 49-56.

(3) Ford, C.W., (1982) Accumulation of O-methyl-inositols in water-stressed Vigna species. *Phytochemistry*, *21*, 1149-1151.

(4) Loewus, F.A. and Murthy, P.P.N., (2000) *Myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.*, *150*, 1-19.

(5) Konarev, A.V., Anisimova, I.N., Gavrilova, V.A., Vachrusheva, T.E., Konechnaya, G.Y., Lewis, M., and Shewry, P.R., (2002) Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties. *Phytochemistry*, *59*, 279-291.

(6) Ichimura, K., Kohata, K., Yamaguchi, Y., Douzono, M., Ikeda, H., and Koketsu, M., (2000) Identification of L-inositol and scyllitol and their distribution in various organs in chrysanthemum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *64*, 865-868.

(7) Li, F., Obrosova, I.G., Abatan, O., Tian, D., Larkin, D., Stuenkel, E.L., and Stevens, M.J., (2005) Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, *288*, E29-36.

(8) Pop-Busui, R., Sullivan, K.A., Van Huysen, C., Bayer, L., Cao, X., Towns, R., and Stevens, M.J., (2001) Depletion of taurine in experimental diabetic neuropathy: implications for nerve metabolic, vascular, and functional deficits. *Exp. Neurol.*, *168*, 259-272.

(9) Kong, W.X., Chen, S.W., Li, Y.L., Zhang, Y.J., Wang, R., Min, L., and Mi, X., (2006) Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *83*, 271-276.

(10) Chen, S.W., Kong, W.X., Zhang, Y.J., Li, Y.L., Mi, X.J., and Mu, X.S., (2004) Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. *Life Sci.*, *75*, 1503-1511.

(11) Gouy, I., Egron, G., Leblond, A., and Cadoré, J.L., (2005) Etude de cas de harper australien après sa recrudescence dans la région lyonnaise. *Prat. Vét. Equine*, *37*, 53-60.

(12) Huntington, P.J., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., Luff, A.R., Finkelstein, D.I., and Flynn, R.J., (1989) Australian Stringhalt-epidemiological, clinical and neurological investigations. *Equine Vet. J.*, *21*, 266-273.

(13) Takahashi, T., Kitamura, M., Endo, Y, Eto, D., Aoki, O., Kusunose, R., Yoshihara, T., Kai, M., (2002) An outbreak of stringhalt resembling Australian stringhalt in Japan. *J. Equine Vet. Sci.*, *13*, 93-100.

(14) Plouvier, V., (1971) New study of scyllitol in some botanical groups: its broad distribution in the Compositae. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *273*, 1625-1628.

(15) Plouvier, V., (1971) Research of scyllitol, *myo*-inositol and dulcitol in some botanical divisions. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *272*, 141-144.

(16) Plouvier, V., (1972) New study of scyllitol, *myo*-inositol and dulcitol in some botanical groups. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *274*, 1735-1738.

(17) Narasimhan, B., Pliska-Matyshak, G., Kinnard, R., Carstensen, S., Ritter, M.A., Von Weymarn, L., and Murthy, P., (1997) Novel Phosphoinositides in Barley Aleurone Cells (Additional Evidence for the Presence of Phosphatidyl-scyllo-Inositol). *Plant Physiol.*, *113*, 1385-1393.

(18) Ohmura, K., Miyase, T., and Ueno, A., (1989) Sesquiterpene glucosides and a phenylbutanoid glycoside from *Hypochoeris radicata*. *Phytochemistry, 28*, 1919-1924.
(19) Bohlmann, F. and Bohlmann, R., (1980) Three guaianolides from *Hypochœris radicata*. *Phytochemistry, 19*, 2045-2046.
(20) Valverde, S., Frias, J., Doblado, R., Jimeno, M.L., and Vidal-Valverde, C., (2005) Inositol phosphate profiling of fermented cowpeas by ^{1}H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem., 53*, 4714-4721.
(21) Smith, S.E. and Durmuller, N., (1990) Inositolhexakisphosphate is convulsant in mice and rats in the nanomolar range. *Eur. J. Pharmacol., 191*, 337-343.
(22) Sun, M.K., Wahlestedt, C., and Reis, D.J., (1992) Inositol hexakisphosphate excites rat medullary sympathoexcitatory neurons in vivo. *Eur. J. Pharmacol., 215*, 9-16.
(23) Le Gall, G., Colquhoun, I.J., and Defernez, M., (2004) Metabolite profiling using ^{1}H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, Camellia sinensis (L.). *J. Agric. Food Chem., 52*, 692-700.
(24) Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J., 29*, 417-426.
(25) LeBlanc, J.G., Piard, J.-C., Sesma, F., and de Giori, G.S., (2005) Lactobacillus fermentum CRL 722 is able to deliver active [alpha]-galactosidase activity in the small intestine of rats. *FEMS Microbiology Letters, 248*, 177-182.
(26) Carrera-Silva, E.A., Silvestroni, A., LeBlanc, J.G., Piard, J.C., Savoy de Giori, G., and Sesma, F., (2006) A thermostable alpha-galactosidase from Lactobacillus fermentum CRL722: genetic characterization and main properties. *Curr. Microbiol., 53*, 374-378.
(27) Bonhomme-Florentin, A., (1986) *a*- and *ß*-galactosidase activities of protozoan and bacterial fractions isolated from horse caecum content. *Arch. Protistenkunde, 132*, 35-42.
(28) Pattanagul, W. and Madore, M.A., (1999) Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiol., 121*, 987-993.
(29) Gilbert, G.A., Wilson, C., and Madore, M.A., (1997) Root-Zone Salinity Alters Raffinose Oligosaccharide Metabolism and Transport in Coleus. *Plant Physiol., 115*, 1267-1276.
(30) Nelson, D.E., Koukoumanos, M., and Bohnert, H.J., (1999) *Myo*-inositol-dependent sodium uptake in ice plant. *Plant Physiol., 119*, 165-172.
(31) Keller, F. and Ludlow, M.M., (1993) Carbohydrate Metabolism in Drought-Stressed Leaves of Pigeonpea (Cajanus cajan). *J. Exp. Bot., 44*, 1351-1359.
(32) Wendell, O.S., Xiao-Ping Li, and Ong., N.-L., (1999) Preferential accumulation of D-pinitol in *Acrostichum aureum* gametophytes in response to salt stress. *Physiol. Plant., 105*, 51-57.
(33) Macrae, J.I., Acosta-Serrano, A., Morrice, N.A., Mehlert, A., and Ferguson, M.A., (2005) Structural characterization of NETNES, a novel glycoconjugate in Trypanosoma cruzi epimastigotes. *J. Biol. Chem., 280*, 12201-12211.
(34) Ostin, A., Kowalyczk, M., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G., (1998) Metabolism of indole-3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiol., 118*, 285-296.
(35) Stashenko, E.E. and Martinez, J.R., (2008) Sampling flower scent for chromatographic analysis. *J. Sep. Sci., 31*, 2022-2031.
(36) Brand, A., Leibfritz, D., Hamprecht, B., and Dringen, R., (1998) Metabolism of Cysteine in Astroglial Cells: Synthesis of Hypotaurine and Taurine. *J. Neurochem., 71*, 827-832.

(37) listed, N.a., (2001) Taurine - monograph. *Altern. Med. Rev.*, *6*, 78-82.
(38) Shin, H.K. and Linkswiler, H.M., (1974) Tryptophan and methionine metabolism of adult females as affected by vitamin B-6 deficiency. *J. Nutr.*, *104*, 1348-1355.
(39) Redmond, H.P., Stapleton, P.P., Neary, P., and Bouchier-Hayes, D., (1998) Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition*, *14*, 599-604.
(40) Santa-Maria, I., Hernandez, F., Moreno, F.J., and Avila, J., (2007) Taurine, an inducer for tau polymerization and a weak inhibitor for amyloid-beta-peptide aggregation. *Neurosci. Lett.*, *429*, 91-94.
(41) Wu, H., Jin, Y., Wei, J., Jin, H., Sha, D., and Wu, J.Y., (2005) Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Res.*, *1038*, 123-131.
(42) Ikeda, H., (1977) Effects of taurine on alcohol withdrawal. *Lancet*, *2*, 509.
(43) Chen, W.Q., Jin, H., Nguyen, M., Carr, J., Lee, Y.J., Hsu, C.C., Faiman, M.D., Schloss, J.V., and Wu, J.Y., (2001) Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J. Neurosci. Res.*, *66*, 612-9.
(44) Tomiyoshi, R., Kamei, K., Muraoka, S., Muneoka, K., and Takigawa, M., (1999) Serotonin-induced platelet intracellular Ca^{2+} responses in untreated depressed patients and imipramine responders in remission. *Biol. Psychiatry*, *45*, 1042-1048.
(45) Lopez, J.R., Lyckman, A., Oddo, S., Laferla, F.M., Querfurth, H.W., and Shtifman, A., (2008) Increased intraneuronal resting [Ca^{2+}] in adult Alzheimer's disease mice. *J. Neurochem.*, *105*, 262-271.
(46) Stutzmann, G.E., (2005) Calcium dysregulation, IP_3 signaling, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*, *11*, 110-115.
(47) Kinouchi, H., Imaizumi, S., Yoshimoto, T., and Motomiya, M., (1990) Phenytoin affects metabolism of free fatty acids and nucleotides in rat cerebral ischemia. *Stroke*, *21*, 1326-1332.
(48) Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joo, F., and Appel, S.H., (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotropic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, *39*, 203-216.
(49) Pagani, M.R., Reisin, R.C., and Uchitel, O.D., (2006) Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J. Neurosci.*, *26*, 2661-2672.
(50) Hirano, F., Tanaka, H., Okamoto, K., Makino, Y., Inaba, M., Nomura, Y., Fukawa, E., Miura, T., Tani, T., and Makino, I., (1995) Natural course of diabetic peripheral neuropathy in spontaneous-onset diabetic Chinese hamsters. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, *28*, 151-159.
(51) Galeotti, N., Bartolini, A., and Ghelardini, C., (2006) Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Neuropharmacology*, *50*, 309-316.
(52) Cahill, J.I., Goulden, B.E., and Pearce, H.G., (1985) A review and some observations on stringhalt. *N. Z. Vet. J.*, *33*, 101-104.
(53) Slocombe, R.F., Huntington, P.J., Friend, S.C., Jeffcott, L.B., Luff, A.R., and Finkelstein, D.K., (1992) Pathological aspects of Australian Stringhalt. *Equine Vet. J.*, *24*, 174-183.
(54) Head, K.A., (2006) Peripheral neuropathy: pathogenic mechanisms and alternative therapies. *Altern. Med. Rev.*, *11*, 294-329.
(55) Birdsall, T.C., (1998) Therapeutic applications of taurine. *Altern. Med. Rev*, *3*, 128-136.

CHAPITRE V :

DISCUSSION GENERALE

&

CONCLUSION

V. Chapitre V : Discussion générale et conclusion

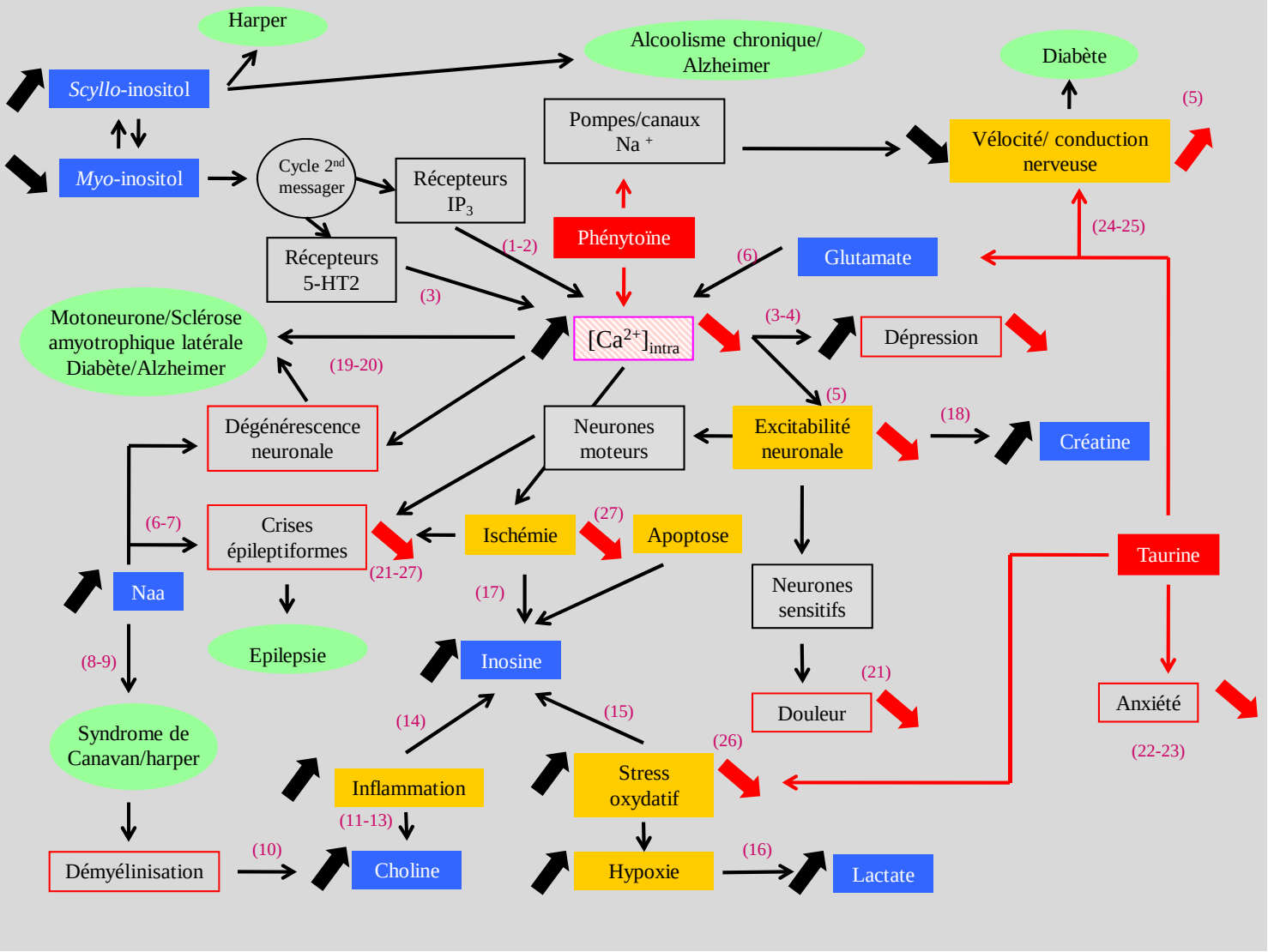
L'ensemble des études menées représente une démarche nouvelle et peu orthodoxe d'étude toxicologique. En effet, à **aucun moment** ces études n'ont mis en évidence de **symptôme clinique**. Les études de toxicologie au sens classique du terme s'attachent à recréer les conditions de perturbations d'un système biologique chez des animaux réceptifs ou sensibles pour « reproduire » les symptômes de la maladie. En métabonomique, comme d'ailleurs dans chacune des approches non conventionnelles en « omique », **l'absence de signes cliniques ou biochimiques** n'est **plus un handicap** pour étudier la réponse des systèmes biologiques à des perturbations de faible amplitude. Néanmoins, comme en témoigne ce travail, cette approche est **lourde** à mener. En effet, elle envisage, dans toutes les dimensions auxquelles nous donnent accès les outils spectroscopiques, à la fois la **réponse métabolique chez l'animal** et la **variabilité chez le végétal** des éléments à l'origine des disruptions métaboliques mesurées chez l'animal. Une discussion de ces deux niveaux de complexité sera envisagée dans ce qui suit, ainsi que les atouts et les limites que revêt cette approche renouvelée de la toxicologie.

A. Les éléments de disruption métabolique analysés chez l'animal et les orientations toxiques : ces éléments permettent d'expliquer le mode d'action des molécules thérapeutiques utilisées chez le cheval

Ce travail de thèse a permis de révéler la présence d'un **biomarqueur du harper chez l'animal de laboratoire** tant au niveau urinaire, plasmatique qu'au niveau hépatique et surtout cérébral, le ***scyllo*-inositol.** La teneur de ce dernier augmente de façon **dose-dépendante** dans l'encéphale à la suite de **l'ingestion d'*Hypochœris radicata***. En parallèle, la concentration en *myo*-inositol, son stéréoisomère, tendrait à diminuer. Les conclusions respectives de chaque chapitre ont souligné le fait que **l'encéphale** pourrait jouer un **rôle central** dans la pathogénie de cette maladie chez le cheval. Elles ont permis de révéler progressivement les voies métaboliques cérébrales préférentiellement affectées qui sont aussi atteintes lors d'autres maladies présentant des symptômes comparables (*Figure V.1*). Il semble qu'une **augmentation de la concentration en calcium intracellulaire** soit l'élément commun à toutes ces voies. L'impact probable des dérèglements de la balance *myo*-inositol/*scyllo*-inositol sur la concentration en Ca^{2+} se ferait soit *via* les **récepteurs IP_3** (*1,2*), soit *via* les récepteurs **sérotoninergiques** (*3*) après incorporation du *myo*-inositol dans le cycle des seconds messagers. **L'augmentation de la teneur en Ca^{2+}** pourrait alors favoriser la survenue de troubles psychiques tels que la « **dépression »** (*3,4*) ainsi qu'une **augmentation de l'excitabilité neuronale (*5*).** Cette augmentation en Ca^{2+} serait liée aussi à un dérèglement de la balance glutamate/glutamine, observée après analyse PLS2 (*Figure II.33*). En effet, de par ses propriétés **excitatrices, le glutamate** agit en favorisant l'accumulation intracellulaire en ions Ca^{2+} et donc en stimulant les neurones (*6*). Cette augmentation de l'excitabilité neuronale serait susceptible d'engendrer une augmentation de la **douleur** (action sur les neurones sensitifs) et l'apparition de **crises épileptiformes** (action sur les neurones moteurs). Ce type de crise a été mis en évidence, associé à une **élévation** assez inhabituelle de la teneur en ***N*-acétyl-aspartate (NAA)** (*6,7*), dans la pathogénie de la **maladie de Canavan chez l'homme,** comme chez la souris après ingestion d'*Hypochœris radicata* (*Figure II.33*). Dans la maladie de Canavan, l'augmentation en NAA est associée à la **démyélinisation** des neurones (*8,9*) qui peut être mesurée par une élévation de la teneur en **choline** au niveau cérébral (*10*). Cette observation a également été faite chez les souris dans la présente étude. Cependant, outre la démyélinisation, la choline peut aussi signer un **état inflammatoire** (*11-13*), lui-même pouvant engendrer une augmentation en **inosine** (*14*). Ce dernier métabolite fait partie de ceux que nous avons répertoriés dans le cerveau de souris ayant ingéré *Hypochœris*.

L'inosine peut aussi résulter d'une augmentation du **stress oxydatif** (*15*), vraisemblablement présent chez les animaux atteints de harper. Cette induction du stress oxydatif pourrait générer l'augmentation du métabolisme anaérobie donc une augmentation en **lactate** (*16*), comme l'observation faite chez les souris consommant *Hypochœris*.

L'**apoptose** et l'**ischémie** peuvent aussi conduire aussi à une augmentation en inosine (*17*). L'ischémie est initiée par une augmentation en Ca^{2+} et peut s'accompagner de manifestations épileptiques. Par ailleurs, il a pu être montré que l'**hyperexcitabilité neuronale** pouvait engendrer une augmentation de la teneur en **créatine** (*18*), métabolite dont les teneurs augmentent chez les animaux ayant ingéré la plante. Enfin, les mécanismes impliqués dans la **dégénérescence neuronale** retrouvée dans les maladies telles que la maladie de Canavan, la maladie d'Alzheimer, les maladies du motoneurone, les complications du diabète sucré, la sclérose latérale amyotrophique et, chez le cheval, dans le harper australien, pourraient s'expliquer par l'élévation en NAA et aussi, plus directement par l'augmentation de la teneur en calcium intracellulaire (*19,20*).



Légende :

: manifestations cellulaires

: molécules thérapeutiques

: structures biologiques

: symptômes/lésions

: maladies/syndromes

: métabolites

(15) : références

Figure V.1 : Schéma synthétique des voies, des disruptions métaboliques cérébrales et des symptômes principaux relevés lors de harper chez le cheval et d'autres maladies ayant des symptômes en commun avec le harper.

L'étude réalisée sur l'impact d'une administration en **taurine** sur le métabolisme général a montré qu'une **interférence** était possible entre les voies métaboliques perturbées par l'ingestion d'*Hypochœris* et les voies métaboliques de la taurine. En effet, la littérature mentionne que cette dernière entraîne une **« restauration physiologique** » **apparente** et une **diminution de certains symptômes**, notamment en **améliorant la vitesse de conduction nerveuse** et en **diminuant le niveau d'anxiété et de stress oxydatif.** La **taurine** agit principalement en **réduisant l'élévation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} induite par le glutamate,** soit en inhibant les influx de calcium extracellulaire via différents types de canaux à calcium, soit en inhibant le relargage de calcium à partir des citernes internes du réticulum endoplasmique. De ce fait, elle rétablit les concentrations intracellulaires en Ca^{2+} dans des valeurs physiologiques, permettant une **diminution de l'excitabilité neuronale**, une **diminution de la douleur** et des manifestations épileptiformes (*21*) et agit sur le niveau de motivation et/ou de résignation de l'animal. La taurine agit également en diminuant **l'état anxiogène** de l'animal (*22,23*) et en **rétablissant la vitesse de conduction nerveuse précédemment altérée**, comme cela a pu être montré dans les études sur la polyneuropathie sensorimotrice distale périphérique (*24,25*). Enfin, son action **antioxydante combat** l'état de stress oxydatif (*26*).

Un autre traitement qui est utilisé chez le cheval est l'administration *per os* de phénytoïne. En effet, la **phénytoïne** agit en tant qu'**anticonvulsivant**, principalement sur l'excitabilité et la vitesse de conduction neuronale *via* les **pompes à sodium** et en **bloquant les canaux Ca^{2+}**. En inhibant le relargage en ions Ca^{2+}, elle **limite** les phénomènes d'**ischémie** et donc les **états épileptiformes** qui en découlent (*27*). En établissant une **hyperpolarisation, e**n augmentant le potentiel de seuil, en diminuant le pic de potentiel d'action et en stabilisant l'état des membranes neuronales, la phénytoïne permet de **diminuer cet état d'hyperexcitabilté et de minimiser l'activité électromyographique exacerbée** des animaux atteints de harper (*5*).

Cette analyse synthétique permet ainsi d'expliquer de façon plus précise mais aussi de recréer le fil directeur, non seulement de la pathogénie et des perturbations métaboliques engendrées par l'ingestion d'Hypochœris radicata, mais également des voies métaboliques impliquées dans la pathogénie d'autres maladies neurologiques. De plus, l'effet bénéfique observé lors de l'administration de deux molécules à visée thérapeutique : la taurine et la phénytoïne, s'explique grâce à de possibles mécanismes susceptibles d'être impliqués. Ces

deux molécules diminuent certaines manifestations symptomatologiques mais ne constituent pas un traitement spécifique du harper.

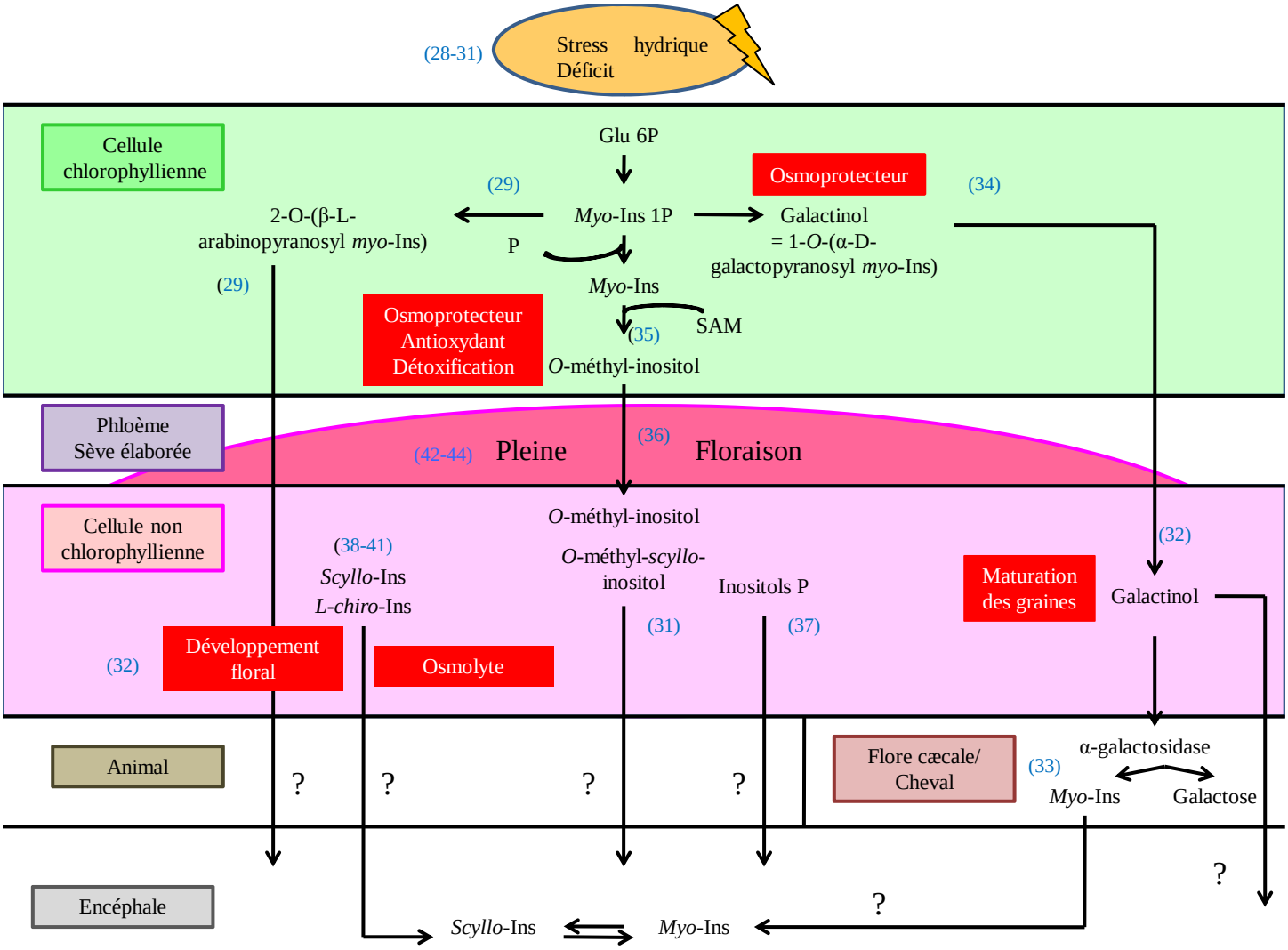
B. Les éléments recherchés chez le végétal à l'origine de disruptions métaboliques induites chez l'animal qui l'ingère

L'exploration d'*Hypochœris radicata* conduite pour étudier l'impact de son ingestion chez l'animal permet aussi **d'émettre certaines hypothèses** sur les voies métaboliques du végétal impliquées dans les effets toxiques observés chez l'animal (*Figure V.1*). En effet, les **végétaux,** soumis à des **stress** variés, **hydriques ou osmotiques** par exemple, lors de sècheresse ou de dessiccation, sont susceptibles de **synthétiser**, à partir du glucose puis du *myo*-inositol, certains **métabolites secondaires** aux propriétés **osmoprotectrices et antioxydantes** (*28-31*). Parmi ces composés, le **galactinol** ou 1-*O*-(*α*-D-galactopyranosyl)-*myo*-inositol, est un **glycoside**, c'est-à-dire un composé présentant une conjugaison entre une molécule de galactose et une molécule de *myo*-inositol. Il est produit dans les cellules chlorophylliennes lors de **période de sècheresse** et est partiellement exporté vers les cellules constitutives de l'appareil reproducteur lors du processus de **maturation des graines** (*32*). Ce galactinol peut être scindé en galactose et en *myo*-inositol sous l'action **d'α-galactosidases**. Or ces enzymes, absentes de l'appareil digestif chez la plupart des monogastriques, sont présentes exceptionnellement au sein de la **flore cæcale des chevaux** (*33*). On peut ainsi émettre l'hypothèse que les galactosides sont ingérés puis métabolisés spécifiquement chez cette espèce avec libération de *myo*-inositol. L'observation des disruptions présentes chez le rongeur pourrait être expliquée par la présence d'une flore c**æ**cale, certes différente mais existante également dans ces espèces. Aussi, le 1-*O*-(*α*-D-galactopyranosyl)-*myo*-inositol et le **2-*O*-(*β*-L-arabinopyranosyl)-*myo*-inositol** pourraient constituer des précurseurs en *myo*-inositol synthétisés lors de conditions de stress et pouvant ainsi fournir des molécules de *myo*-inositol (*34*).

Outre le galactinol, des ***O*-méthyl-inositols** peuvent être produits lors de conditions de **stress** (*35*). Toujours issus du *myo*-inositol, ces métabolites aux propriétés **antioxydantes**, **osmoprotectrices** permettent de **détoxifier** les cellules végétales en stockant des groupements méthyles. Leur facilité à rejoindre et **parcourir le phloème** où circule la sève élaborée afin **d'alimenter l'appareil reproducteur** en molécules organiques est une de leurs particularités (*36*). Parmi ces *O*-méthyl-inositol, le ***O*-méthyl-*scyllo*-inositol** (*31*) pourrait constituer un éventuel précurseur du *scyllo*-inositol retrouvé à forte concentration au sein de l'encéphale des animaux.

Enfin, d'autres métabolites secondaires végétaux sont retrouvés de façon récurrente au sein des végétaux tels que **des inositols phosphates** (*37*) ou d'autres inositols comme **le L-*chiro*- (*38*) ou le *scyllo*-inositol (*39-41*).** Les inositols phosphates sont des facteurs **anti-nutritionnels,** comme l'acide phytique, mais leur pouvoir toxique spécifique et direct reste peu probable. En revanche, le ***scyllo*-inositol** joue un rôle dans le **développement floral**. Ce fait est à mettre en parallèle avec les observations épidémiologiques publiées (*42-44*) et avec les observations métabonomiques et analytiques que nous avons obtenues.

Même si ces données ne sont que des éléments d'observation permettant de formuler certaines hypothèses, il apparaît assez clairement que l'apparition de cas de harper est liée, d'une part, à la **synthèse de métabolites secondaires** à la suite de **stress hydriques et/ou osmotiques** et, d'autre part, à la mise en place de l'appareil reproducteur avec un pic de synthèse de composés à fort pouvoir de disruption métabolique pour l'animal, lors de la période de **pleine floraison**. Ces **métabolites secondaires** sont **vraisemblablement** des **sucres conjugués à des polyols et** plus précisément des **inositols natifs, conjugués ou méthylés.**



Légende :

: fonction (32) : références

: localisation ? : hypothèses

Figure V.2 : Schéma synthétique présentant les voies métaboliques pouvant être impliquées dans la synthèse de métabolites secondaires, chez le végétal.

C. L'exploration globale du métabolisme chez l'animal et le végétal et sa contribution dans les études de toxicologie

Dans une étude toxicologique telle que la conçoit l'approche globale en « omique », l'observation de signes cliniques peut faciliter l'interprétation des expérimentations mais n'est pas forcément indispensable. Dans les études que nous avons conduites, les rats comme les souris n'ont jamais présenté de **diminution de leurs performances zootechniques,** ni n'ont manifesté de **signe lésionnel**. Pourtant, une étude toxicologique a pu être menée afin de recueillir de nombreuses informations sur une maladie.

Cette étude se fonde en fait sur un **principe d'orthologie (du grec ορθος : droit, et λογος : discours)** qui signifie ici que les **disruptions métaboliques** induites par la même perturbation **ne varient qualitativement pas d'un modèle animal à l'autre**, même si les manifestations cliniques qui apparaissent secondairement et qui traduisent des conséquences physiologiques sont différentes. En effet, l'approche métabonomique en toxicologie ne peut être envisagée que si l'on considère que toute source de variation entraînant des modifications métaboliques chez une espèce possède un potentiel disrupteur voisin mais de même nature chez une autre espèce animale dite modèle de la première. La différence réside dans **l'impact phénoménologique**, ici physiologique, de ces disruptions métaboliques. Dans certains cas, les disruptions métaboliques affectant l'espèce cible peuvent être plus longues à s'installer ou peuvent montrer une amplitude plus forte, ce qui aboutit à la rupture de l'équilibre homéostatique de l'organisme, du fait de l'incapacité des voies métaboliques à compenser les perturbations toxiques. Ceci peut se traduire alors par des **manifestations cliniques, biochimiques ou lésionnelles** qui peuvent apparaître plus tardivement. Parfois, ces disruptions métaboliques restent **ténues.** Elles sont incapables d'engendrer alors des troubles cliniques.

Il est dès lors indispensable de raisonner en terme de fonctionnement des **systèmes biologiques.** Dans le cas qui nous intéresse, ces systèmes se modélisent en un ensemble de **voies métaboliques**, un réseau organisé de façon plus ou moins complexe, dont les liens entre les métabolites (nœuds) décrivent un système en « étoile » dit invariant d'échelle, qui est gouverné fondamentalement par les lois de la physique statistique et de la thermodynamique (*45*). Ces systèmes peuvent se déformer, subir une perturbation jusqu'à un seuil spécifique propre à chaque espèce, où la **flexibilité et les mécanismes compensatoires** sont dépassés, entraînant alors une **rupture (ou disruption)**, réversible ou irréversible, avec apparition consécutive de signes cliniques ou lésionnels. Dans le cas de l'étude menée ici, les rongeurs

sont « aptes » à révéler ces disruptions métaboliques « orthologues », sans pour autant présenter de signes cliniques, tout du moins sur la durée de traitement utilisée. Un avantage non négligeable des approches en « omique » réside donc dans la possibilité de réaliser des études de toxicologie sans pour autant concevoir des expérimentations devant se dérouler durant plusieurs mois, voire une ou deux années. En effet, les **disruptions métaboliques minimales** sont **visualisables,** même en absence de symptôme.

Cependant, les changements dans la nature et dans la quantité de métabolites présents au sein des différentes matrices biologiques, peuvent parfois ne pas être suffisants pour permettre la caractérisation d'une maladie, ni l'individualisation des voies métaboliques affectées par un composé toxique car :

1) les **bases de données** restent encore **incomplètes** et certains métabolites biomarqueurs peuvent demeurer non identifiés,

2) en général, **certaines voies métaboliques sont plus fréquemment affectées** que d'autres comme les voies du métabolisme énergétique avec le lactate,

3) des **confusions ou interactions** avec les voies métaboliques propres à la flore intestinale peuvent générer des métabolites, tels l'hippurate, qui signent plutôt des états de changement alimentaire,

4) dans certains cas, le **faible nombre de métabolites significatifs** peut être un handicap pour décrire l'état de disruption métabolique, d'où l'intérêt de **confronter, conforter, étayer les données par d'autres approches convergentes,** comme ici les études de comportement ou celles réalisées par imagerie cérébrale.

Le ***scyllo*-inositol** apparaît comme le métabolite significatif prépondérant au sein du **cerveau** des animaux traités, ce qui nous a conduits à explorer cet organe avec deux approches complémentaires : **l'imagerie et les études de comportement**. Certes, l'IRM est basée sur la même technique que celle utilisée en métabonomique : la résonance magnétique nucléaire du proton, mais les **conditions (*in vivo*)** ainsi que les **paramètres d'acquisition en IRM** sont différents de ceux de la RMN effectuée sur échantillon liquide. L'approche **comportementale** utilise la physiologie comme voie d'intégration fonctionnelle de l'effet des différents niveaux de disruption métabolique. Tout comme les approches en omique, l'approche comportementale permet de détecter d'infimes perturbations, non plus au niveau du métabolisme et des métabolites mesurés, mais au niveau **des fonctions physiologiques**. Dans notre étude, les données initiales acquises sur l'espèce équine n'étaient que des éléments d'observation clinique, histologique et épidémiologique. **L'utilisation conjointe de ces trois**

méthodes a permis d'obtenir, **sans signe toxicologique au sens classique de l'approche**, **sans *a priori*** et **sans travailler sur l'espèce cible**, des informations quant aux **métabolites impliqués dans les disruptions des voies métaboliques, à l'organe cible et aux fonctions potentiellement altérées**. Il s'agit bien là d'une **reconsidération en profondeur de l'approche en toxicologie.**

Notre démarche de recherche toxicologique a été **validée** dans notre étude à différents niveaux. En effet, outre l'utilisation en parallèle de ces **trois méthodes** qui ont permis d'aboutir à des conclusions s'imbriquant les unes dans les autres, le fait de réaliser cette étude sur **deux espèces animales différentes**, en utilisant **différentes doses**, en accédant à **différents organes** et en mettant en parallèle des données obtenues sur l'**animal et** sur le **végétal** constitue une **validation et une garantie des résultats obtenus.**

Les connaissances initiales du harper faisaient mention d'une maladie affectant uniquement le système nerveux périphérique et mentionnaient une **axonopathie distale périphérique**. Les travaux conduits ici montrent, qu'outre les répercussions mesurées chez le cheval au niveau périphérique, le **système nerveux central** peut être affecté, et ceci relativement tôt. N'étant pas en mesure d'appréhender le système nerveux périphérique qui est trop complexe et d'approche délicate, *a fortiori* sur les souris, nous ne sommes pas en mesure de dire quel système nerveux, périphérique ou central, est affecté en premier lieu ou même si les deux sont affectés de manière conjointe. Il s'agirait pourtant d'un élément primordial dans la connaissance de la pathogénie de la maladie. De plus, les trois approches ont abouti aux mêmes conclusions quant à la nature des **perturbations observées au niveau du système nerveux central,** que ce soit au niveau **métabolique** (RMN métabonomique et IRM), qu'au niveau **fonctionnel** (comportement).

Les résultats conjoints issus de ces études ont donc montré que :

- Un **lien existe entre** l'ingestion de fleurs **d'*Hypochœris radicata*** et la survenue de **perturbations nerveuses au niveau central**. La potentialité de disruption métabolique présente au sein de la plante serait principalement reliée à une **réponse au stress hydrique** de la part du végétal et au **développement de l'appareil reproducteur**. La **synthèse de métabolites secondaires spécifiques** serait initiée par une période sèche avec **déficit hydrique** particulièrement intense lors de **l'épanouissement floral**, les deux processus étant ou non reliés entre eux.

- Le parallèle fait entre les analyses phénotypiques chez le **végétal** et les analyses métabonomiques chez l'animal semblent souligner que les sucres et/ou les **inositols** végétaux sont impliqués, (la ou les formes : **natives ou méthylées, conjuguées ou phosphorylées,** restent encore à préciser).
- Ces perturbations se traduisent surtout au niveau **métabolique** par une **élévation cérébrale en *scyllo*-inositol** associée à une diminution en *myo*-inositol, le lien entre les teneurs et les fluctuations de ces deux composés n'étant pas encore compris. Des augmentations en **N-acétyl-aspartate**, en **lactate**, en **inosine**, en **choline**, et l'altération de la balance **glutamate/glutamine** sont également retrouvées.
- Au niveau **comportemental et fonctionnel**, une **augmentation de l'activité** associée à une **diminution** d'une **anxiété révélée dans un contexte spécifique** et une **altération de la balance résignation/motivation** ont pu être mises en évidence, chez l'animal de laboratoire.
- La **taurine** n'apparaît **pas** être **le traitement de choix pour** contrecarrer les effets de l'ingestion d'*Hypochoeris radicata*, comme les études métabonomiques réalisées ont pu le montrer. Cependant, ses actions anti-oxydantes, neuroprotectrices, osmorégulatrices et son rôle dans la transduction du signal cellulaire nerveux **interfèrent avec les voies métaboliques** impliquant le *myo*-inositol et le complexe glutamate/glutamine. De même, la **phénytoïne**, de par son pouvoir anticonvulsivant, interfère au niveau de certaines voies contrôlant la conduction nerveuse et l'excitabilité neuronale. Toutes ces voies possèdent comme **plaque tournante la concentration intracellulaire en calcium**. De ce fait, un traitement à base de taurine peut contribuer à masquer ou à atténuer certains troubles cliniques. De façon similaire, le traitement à base de phénytoïne permet de compenser certaines défaillances métaboliques, en réduisant l'excitabilité nerveuse et en corrigeant la transmission neuronale.

L'utilisation de **l'approche globale** est un moyen de faire naître des **hypothèses fonctionnelles et de proposer des mécanismes expliquant les disruptions observées**. Elle a du être complétée par d'autres approches, l'IRM et les études de comportement. La **complémentarité de ces méthodes** transparaît également dans la capacité à relier ces différentes approches entre elles par des outils statistiques tels que **l'analyse canonique**

associée à la PLS2. La **confrontation de jeux de données** a été réalisée dans cette étude à différents niveaux : entre le foie et le cerveau, d'un même organisme par l'analyse PLS2 et entre les données obtenues par RMN du ^{1}H *in vitro* et les données d'imagerie obtenues *in vivo*. Dans les deux cas, cette analyse canonique a permis de **valider les résultats** mais aussi de révéler **des informations complémentaires**. En effet, certains métabolites comme le NAA, le complexe glutamine/glutamate, le lactate et la choline sont apparus comme métabolites impliqués significativement dans les disruptions cérébrales. La confrontation et l'interprétation des résultats issus de ces différentes méthodes ne peuvent être **fiables** que si le **matériel végétal** est identique et que les **animaux** proviennent des mêmes souches au cours des expérimentations. En effet, les souches de souris et leur provenance sont susceptibles d'influer sur les caractères et les profils comportementaux des animaux. Ainsi, l'utilisation des mêmes souches a permis d'effectuer des comparaisons sûres entre les différentes expérimentations, notamment entre l'approche métabonomique et l'approche comportementale.

L'application de telles méthodes nécessite de concevoir des **protocoles rigoureux.** Comme les disruptions peuvent être infimes, les plans expérimentaux doivent être conçus afin de rendre possible la visualisation de celles-ci. Le tout nécessite donc un **nombre minimal d'animaux** par groupe, le contrôle d'un certain **nombre de facteurs** afin de permettre l'utilisation des outils de statistiques multidimensionnelles et d'être capable d'interpréter les effets relatifs de ces mêmes facteurs.

La métabonomique appréhende **les systèmes vivants** sous leur dimension physiologique et sous des **règles homéostatiques** qui permettent de les décrire au travers de métriques issues de l'analyse quantitative des variations du métabolome. Il s'agit de savoir comment utiliser de façon réfléchie la **variabilité biologique**, (ici, celle accessible au niveau végétal). Cette variabilité doit être considérée comme un **atout** pour obtenir des informations sur le système vivant, (ici, celles accessibles au niveau de l'animal) plutôt que comme un handicap. Bien sûr, l'utilisation de **l'outil statistique multidimensionnel** se révèle être incontournable. De plus, la métabonomique ne peut se révéler efficace qu'en confrontant systématiquement les informations obtenues ainsi avec d'autres approches, d'autres données et/ou d'autres travaux. Après l'identification des métabolites d'intérêt, il convient de **replacer et de reconsidérer** ces renseignements au sein des contextes physiopathologiques à l'origine de la reformulation

des hypothèses de travail. L'hypothèse initiale **« d'orthologie métabolique »** permet de compléter les données par une approche de **physiopathologie comparée** entre les différentes espèces ou entre maladies voisines. Le but est de visualiser la nature éventuelle des perturbations, leur localisation et les liens qui peuvent exister entre elles.

Dans cette étude, ce sont les différentes **voies d'approche utilisées** qui, combinées, ont apporté des éléments complémentaires et indispensables à une meilleure compréhension globale d'un mécanisme à l'origine de perturbations métaboliques et physiologiques qui caractérisent le harper. L'établissement de liens entre ces différentes méthodes (ces allers-retours entre animal et végétal), ainsi que l'analyse comparée des pathologies (cette prise en compte **holistique** de l'organisme, du toxique et de l'ensemble des facteurs et paramètres environnants) sont autant d'éléments propres à constituer une **nouvelle approche toxicologique,** à la fois originale et puissante.

Outre le fait d'apporter des éléments de réponse à une problématique vétérinaire spécifique, cette étude a permis aussi de souligner, de conforter et d'étayer les avantages intrinsèques d'une telle approche. Plus généralement, les études toxicologiques utilisant cette démarche permettront d'explorer plus en détail les mécanismes d'intoxication, **l'innocuité de certains mélanges médicamenteux ou alimentaires, l'étude de faibles doses**, les **propriétés thérapeutiques ou toxiques de plantes**…

Finalement, dans ce travail de thèse, une question de clinique à traiter a permis de dévoiler une **vision renouvelée de la recherche en toxicologie**.

Ces premiers travaux ont permis d'obtenir de très précieuses informations sur le harper. Cependant, le principe toxique végétal n'a pas été encore pu être identifié. Les analyses menées sur le **végétal** n'ont conduit qu'à **poser certaines hypothèses** de voies mécanistiques impliquées et de métabolites synthétisés. De ce fait, des expérimentations supplémentaires sont nécessaires. Celles-ci consisteraient à **tester des fractions végétales de polarités différentes** chez l'animal, pour remonter progressivement au(x) principe(s) actif(s) présents dans la plante. Certes, nous avons travaillé uniquement avec des inflorescences d'*Hypochœris radicata* car cet organe est préférentiellement consommé par les animaux. Cependant, il serait intéressant de **prospecter d'autres organes du végétal** et de déterminer, suivant une approche toxicologique « plus conventionnelle », sous quelle(s) forme(s) et à quel niveau se localise(nt) les métabolites toxiques. Enfin, de la même manière que nous avons essayé un traitement des chevaux atteints avec de la taurine, la connaissance des voies métaboliques « disruptées » **grâce à la métabonomique** permettront de **tester,** tout comme nous avons pu le réaliser sur des animaux de laboratoire**, d'autres molécules thérapeutiques** sur l'espèce cible.

Références

(1) Lopez, J.R., Lyckman, A., Oddo, S., Laferla, F.M., Querfurth, H.W., and Shtifman, A., (2008) Increased intraneuronal resting [Ca^{2+}] in adult Alzheimer's disease mice. *J. Neurochem.*, *105*, 262-271.

(2) Stutzmann, G.E., (2005) Calcium dysregulation, IP_3 signaling, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*, *11*, 110-115.

(3) Tomiyoshi, R., Kamei, K., Muraoka, S., Muneoka, K., and Takigawa, M., (1999) Serotonin-induced platelet intracellular Ca^{2+} responses in untreated depressed patients and imipramine responders in remission. *Biol. Psychiatry*, *45*, 1042-1048.

(4) Galeotti, N., Bartolini, A., and Ghelardini, C., (2006) Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Neuropharmacology*, *50*, 309-316.

(5) Huntington, P.J., Seneque, S., Slocombe, R.F., Jeffcott, L.B., McLean, A., and Luff, A.R., (1991) Use of phenytoin to treat horses with Australian stringhalt. *Aust. Vet. J.*, *68*, 221-224.

(6) Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y., Kondo, A., Maihara, T., Yokoi, N., Kuramoto, T., Sasa, M., and Serikawa, T., (2000) Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J. Neurochem.*, *74*, 2512-2519.

(7) Schildkraut, J.J., (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*, *122*, 509-522.

(8) Austin, S.J., Connelly, A., Gadian, D.G., Benton, J.S., and Brett, E.M., (1991) Localized ^1H NMR spectroscopy in Canavan's disease: a report of two cases. *Magn. Reson. Med.*, *19*, 439-445.

(9) Grodd, W., Krageloh-Mann, I., Petersen, D., Trefz, F.K., and Harzer, K., (1990) In vivo assessment of N-acetylaspartate in brain in spongy degeneration (Canavan's disease) by proton spectroscopy. *Lancet*, *336*, 437-438.

(10) Tartaglia, M.C., Narayanan, S., De Stefano, N., Arnaoutelis, R., Antel, S.B., Francis, S.J., Santos, A.C., Lapierre, Y., and Arnold, D.L., (2002) Choline is increased in pre-lesional normal appearing white matter in multiple sclerosis. *J. Neurol.*, *249*, 1382-1390.

(11) Brenner, R.E., Munro, P.M., Williams, S.C., Bell, J.D., Barker, G.J., Hawkins, C.P., Landon, D.N., and McDonald, W.I., (1993) The proton NMR spectrum in acute EAE: the significance of the change in the Cho:Cr ratio. *Magn. Reson. Med.*, *29*, 737-745.

(12) MacKay, S., Meyerhoff, D.J., Constans, J.M., Norman, D., Fein, G., and Weiner, M.W., (1996) Regional gray and white matter metabolite differences in subjects with AD, with subcortical ischemic vascular dementia, and elderly controls with ^1H magnetic resonance spectroscopic imaging. *Arch. Neurol.*, *53*, 167-174.

(13) Kaiser, E., Chiba, P., and Zaky, K., (1990) Phospholipases in biology and medicine. *Clin. Biochem.*, *23*, 349-370.

(14) Yang, J.H., Luo, X., Nie, Y., Su, Y., Zhao, Q., Kabir, K., Zhang, D., and Rabinovici, R., (2003) Widespread inosine-containing mRNA in lymphocytes regulated by ADAR1 in response to inflammation. *Immunology*, *109*, 15-23.

(15) Litsky, M.L., Hohl, C.M., Lucas, J.H., and Jurkowitz, M.S., (1999) Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia. *Brain Res., 821*, 426-432.
(16) Ross, A.J. and Sachdev, P.S., (2004) Magnetic resonance spectroscopy in cognitive research. *Brain Res. Brain. Res. Rev., 44*, 83-102.
(17) Hsiao, G., Lin, K.H., Chang, Y., Chen, T.L., Tzu, N.H., Chou, D.S., and Sheu, J.R., (2005) Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 25*, 1998-2004.
(18) Bluml, S., Zuckerman, E., Tan, J., and Ross, B.D., (1998) Proton-decoupled ^{31}P magnetic resonance spectroscopy reveals osmotic and metabolic disturbances in human hepatic encephalopathy. *J. Neurochem., 71*, 1564-1576.
(19) Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joo, F., and Appel, S.H., (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotropic lateral sclerosis. *Ann. Neurol., 39*, 203-216.
(20) Pagani, M.R., Reisin, R.C., and Uchitel, O.D., (2006) Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J. Neurosci., 26*, 2661-2672.
(21) Chen, W.Q., Jin, H., Nguyen, M., Carr, J., Lee, Y.J., Hsu, C.C., Faiman, M.D., Schloss, J.V., and Wu, J.Y., (2001) Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J. Neurosci. Res., 66*, 612-9.
(22) Kong, W.X., Chen, S.W., Li, Y.L., Zhang, Y.J., Wang, R., Min, L., and Mi, X., (2006) Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacol. Biochem. Behav., 83*, 271-276.
(23) Chen, S.W., Kong, W.X., Zhang, Y.J., Li, Y.L., Mi, X.J., and Mu, X.S., (2004) Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. *Life Sci., 75*, 1503-1511.
(24) Li, F., Obrosova, I.G., Abatan, O., Tian, D., Larkin, D., Stuenkel, E.L., and Stevens, M.J., (2005) Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 288*, E29-36.
(25) Pop-Busui, R., Sullivan, K.A., Van Huysen, C., Bayer, L., Cao, X., Towns, R., and Stevens, M.J., (2001) Depletion of taurine in experimental diabetic neuropathy: implications for nerve metabolic, vascular, and functional deficits. *Exp. Neurol., 168*, 259-272.
(26) listed, N.a., (2001) Taurine - monograph. *Altern. Med. Rev., 6*, 78-82.
(27) Kinouchi, H., Imaizumi, S., Yoshimoto, T., and Motomiya, M., (1990) Phenytoin affects metabolism of free fatty acids and nucleotides in rat cerebral ischemia. *Stroke, 21*, 1326-1332.
(28) Faini, F., Labbé, C., and Coll, J., (1999) Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of Baccharis linearis. *Biochem. Syst. Ecol., 27*, 673-679.
(29) Rontein, D., Basset, G., and Hanson, A.D., (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng., 4*, 49-56.
(30) Loewus, F.A. and Murthy, P.P.N., (2000) *Myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci., 150*, 1-19.
(31) Ford, C.W., (1982) Accumulation of O-methyl-inositols in water-stressed Vigna species. *Phytochemistry, 21*, 1149-1151.
(32) Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J., 29*, 417-426.

(33) Bonhomme-Florentin, A., (1986) *a*- and *ß*-galactosidase activities of protozoan and bacterial fractions isolated from horse caecum content. *Arch. Protistenkunde*, *132*, 35-42.
(34) Le Gall, G., Colquhoun, I.J., and Defernez, M., (2004) Metabolite profiling using ^{1}H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, Camellia sinensis (L.). *J. Agric. Food Chem.*, *52*, 692-700.
(35) Pattanagul, W. and Madore, M.A., (1999) Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiol.*, *121*, 987-993.
(36) Gilbert, G.A., Wilson, C., and Madore, M.A., (1997) Root-Zone Salinity Alters Raffinose Oligosaccharide Metabolism and Transport in Coleus. *Plant Physiol.*, *115*, 1267-1276.
(37) Valverde, S., Frias, J., Doblado, R., Jimeno, M.L., and Vidal-Valverde, C., (2005) Inositol phosphate profiling of fermented cowpeas by ^{1}H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, *53*, 4714-4721.
(38) Ichimura, K., Kohata, K., Yamaguchi, Y., Douzono, M., Ikeda, H., and Koketsu, M., (2000) Identification of L-inositol and scyllitol and their distribution in various organs in chrysanthemum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *64*, 865-868.
(39) Plouvier, V., (1971) New study of scyllitol in some botanical groups: its broad distribution in the Compositae. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *273*, 1625-1628.
(40) Plouvier, V., (1971) Research of scyllitol, *myo*-inositol and dulcitol in some botanical divisions. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *272*, 141-144.
(41) Plouvier, V., (1972) New study of scyllitol, *myo*-inositol and dulcitol in some botanical groups. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *274*, 1735-1738.
(42) Gouy, I., Egron, G., Leblond, A., and Cadoré, J.L., (2005) Etude de cas de harper australien après sa recrudescence dans la région lyonnaise. *Prat. Vét. Equine*, *37*, 53-60.
(43) Huntington, P.J., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., Luff, A.R., Finkelstein, D.I., and Flynn, R.J., (1989) Australian Stringhalt-epidemiological, clinical and neurological investigations. *Equine Vet. J.*, *21*, 266-273.
(44) Takahashi, T., Kitamura, M., Endo, Y, Eto, D., Aoki, O., Kusunose, R., Yoshihara, T., Kai, M., (2002) An outbreak of stringhalt resembling Australian stringhalt in Japan. *J. Equine Vet. Sci.*, *13*, 93-100.
(45) Ravasz, E., Somera, A.L., Mongru, D.A., Oltvai, Z.N., and Barabasi, A.L., (2002) Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, *297*, 1551-1555.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

Adams, O.R., (1966) Lameness in Horses. *Lea and Febiger, Philadelphia*, 313-316.

Araya, O., Krause, A., and Solis de Ovando, M., (1998) Outbreaks of stringhalt in southern Chile. *Vet. Rec.*, *142*, 462-463.

Arters, J., Hohmann, C.F., Mills, J., Olaghere, O., and Berger-Sweeney, J., (1998) Sexually dimorphic responses to neonatal basal forebrain lesions in mice: I. Behavior and neurochemistry. *J. Neurobiol.*, *37*, 582-94.

Atack, J.R. and Schapiro, M.B., (2002) Inositol monophosphatase activity in normal, Down syndrome and dementia of the Alzheimer type CSF. *Neurobiol. Aging*, *23*, 389-396.

Austin, S.J., Connelly, A., Gadian, D.G., Benton, J.S., and Brett, E.M., (1991) Localized ^{1}H NMR spectroscopy in Canavan's disease: a report of two cases. *Magn. Reson. Med.*, *19*, 439-445.

Avgustinovich, D.F., Lipina, T.V., Bondar, N.P., Alekseyenko, O.V., and Kudryavtseva, N.N., (2000) Features of the genetically defined anxiety in mice. *Behav. Genet.*, *30*, 101-109.

Barkai, A.I., Dunner, D.L., Gross, H.A., Mayo, P., and Fieve, R.R., (1978) Reduced *myo*-inositol levels in cerebrospinal fluid from patients with affective disorder. *Biol. Psychiatry*, *13*, 65-72.

Barry, W.C., (1956) The incidence of Australian Stringhalt in horses in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, *4*, 26-27.

Barshop, B.A., (2004) Metabolomic approaches to mitochondrial disease: correlation of urine organic acids. *Mitochondrion*, *4*, 521-527.

Bersudsky, Y., Einat, H., Stahl, Z., and Belmaker, R.H., (1999) *Epi*-inositol and inositol depletion: two new treatment approaches in affective disorder. *Curr. Psychiatry Rep.*, *1*, 141-147.

Bluml, S., Zuckerman, E., Tan, J., and Ross, B.D., (1998) Proton-decoupled ^{31}P magnetic resonance spectroscopy reveals osmotic and metabolic disturbances in human hepatic encephalopathy. *J. Neurochem.*, *71*, 1564-1576.

Boissier, J.R., Simon, P., and Lwoff, J.M., (1964) Use of a Particular Mouse Reaction (Hole Board Method) for the Study of Psychotropic Drugs. *Therapie*, *19*, 571-583.

Bonhomme-Florentin, A., (1986) *a*- and *ß*-galactosidase activities of protozoan and bacterial fractions isolated from horse caecum content. *Arch. Protistenkunde*, *132*, 35-42.

Braun, K.P., Gooskens, R.H., Vandertop, W.P., Tulleken, C.A., and van der Grond, J., (2003) ^{1}H magnetic resonance spectroscopy in human hydrocephalus. *J. Magn. Reson. Imaging*, *17*, 291-299.

Brenner, R.E., Munro, P.M., Williams, S.C., Bell, J.D., Barker, G.J., Hawkins, C.P., Landon, D.N., and McDonald, W.I., (1993) The proton NMR spectrum in acute EAE: the significance of the change in the Cho:Cr ratio. *Magn. Reson. Med.*, *29*, 737-745.

Brindle, J.T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J.K., Bethell, H.W., Clarke, S., Schofield, P.M., McKilligin, E., Mosedale, D.E., and Grainger, D.J., (2002) Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^{1}H-NMR-based metabonomics. *Nat. Med.*, *8*, 1439-1444.

Burtscher, I.M., Skagerberg, G., Geijer, B., Englund, E., Stahlberg, F., and Holtas, S., (2000) Proton MR spectroscopy and preoperative diagnostic accuracy: an evaluation of intracranial mass lesions characterized by stereotactic biopsy findings. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, *21*, 84-93.

Cahill, J.I. and Goulden, B.E., (1992) Stringhalt-current thoughts on aetiology and pathogenesis. *Equine Vet. J.*, *24*, 161-162.

Cahill, J.I., Goulden, B.E., and Jolly, R.D., (1986) Stringhalt in horses: a distal axonopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, *12*, 459-475.

Cahill, J.I., Goulden, B.E., and Pearce, H.G., (1985) A review and some observations on stringhalt. *N. Z. Vet. J.*, *33*, 101-104.

Chen, S.W., Kong, W.X., Zhang, Y.J., Li, Y.L., Mi, X.J., and Mu, X.S., (2004) Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. *Life Sci.*, *75*, 1503-1511.

Chen, W.Q., Jin, H., Nguyen, M., Carr, J., Lee, Y.J., Hsu, C.C., Faiman, M.D., Schloss, J.V., and Wu, J.Y., (2001) Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J. Neurosci. Res.*, *66*, 612-9.

Coen, M., O'Sullivan, M., Bubb, W.A., Kuchel, P.W., and Sorrell, T., (2005) Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics for rapid diagnosis of meningitis and ventriculitis. *Clin. Infect. Dis.*, *41*, 1582-1590.

Cohen, H., Kotler, M., Kaplan, Z., Matar, M.A., Kofman, O., and Belmaker, R.H., (1997) Inositol has behavioral effects with adaptation after chronic administration. *J. Neural. Transm.*, *104*, 299-305.

Collignon, G., (2007) Contribution à l'étude épidémiologique de l'enzootie de harper australien en France depuis 2003 chez le cheval. *Thèse Vétérinaire-Toul 3-4071*.

Danbolt, N.C., (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, *65*, 1-105.

Dedeoglu, A., Choi, J.K., Cormier, K., Kowall, N.W., and Jenkins, B.G., (2004) Magnetic resonance spectroscopic analysis of Alzheimer's disease mouse brain that express mutant human APP shows altered neurochemical profile. *Brain Res.*, *1012*, 60-65.

Delguste, C., de Moffarts, B., Kirschvink, N., Art, T., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Amory, H., and Lekeux, P., (2007) Change in blood antioxidant status of horses moved from a

stable following diagnosis of equine motor neuron disease. *Can. Vet. J.*, *48*, 1165-1167.

Dixon, R.T. and Stewart, G.A., (1969) Clinical and pharmacological observations in a case of equine stringhalt. *Aust. Vet. J.*, *45*, 127-130.

Dumas, M.E., Canlet, C., Andre, F., Vercauteren, J., and Paris, A., (2002) Metabonomic assessment of physiological disruptions using ^{1}H-^{13}C HMBC-NMR spectroscopy combined with pattern recognition procedures performed on filtered variables. *Anal. Chem.*, *74*, 2261-2273.

Dunckley, T., Coon, K.D., and Stephan, D.A., (2005) Discovery and development of biomarkers of neurological disease. *Drug Discov. Today*, *10*, 326-334.

Einat, H. and Belmaker, R.H., (2001) The effects of inositol treatment in animal models of psychiatric disorders. *J. Affect. Disord.*, *62*, 113-121.

Einat, H., Clenet, F., Shaldubina, A., Belmaker, R.H., and Bourin, M., (2001) The antidepressant activity of inositol in the forced swim test involves 5-HT(2) receptors. *Behav. Brain Res.*, *118*, 77-83.

Einat, H., Karbovski, H., Korik, J., Tsalah, D., and Belmaker, R.H., (1999) Inositol reduces depressive-like behaviors in two different animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl.)*, *144*, 158-162.

Einat, H., Elkabaz-Shwortz, Z., Cohen, H., Kofman, O., and Belmaker, R.H., (1998) Chronic *epi*-inositol has an anxiolytic-like effect in the plus-maze model in rats. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, *1*, 31-34.

Faini, F., Labbé, C., and Coll, J., (1999) Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of Baccharis linearis. *Biochem. Syst. Ecol.*, *27*, 673-679.

Farag, A.T., Goda, N.F., Shaaban, N.A., and Mansee, A.H., (2007) Effects of oral exposure of synthetic pyrethroid, cypermethrin on the behavior of F1-progeny in mice. *Reprod. Toxicol.*, *23*, 560-567.

Faubert, D., Paul, G.J.C., Giroux, J., and Bertrand, M.J., (1993) Selective fragmentation and ionization of organic compounds using an energy-tunable rare-gas metastable beam source. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, *124*, 69-77.

Fenili, D., Brown, M., Rappaport, R., and McLaurin, J., (2007) Properties of *scyllo*-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. *J. Mol. Med.*, *85*, 603-611.

Fernando, K.T., McLean, M.A., Chard, D.T., MacManus, D.G., Dalton, C.M., Miszkiel, K.A., Gordon, R.M., Plant, G.T., Thompson, A.J., and Miller, D.H., (2004) Elevated white matter *myo*-inositol in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Brain*, *127*, 1361-1369.

Fisher, S.K., Novak, J.E., and Agranoff, B.W., (2002) Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.*, *82*, 736-754.

Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J.A., and Le, B.N., (1951) Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.*, *191*, 833-841.

Ford, C.W., (1982) Accumulation of O-methyl-inositols in water-stressed Vigna species. *Phytochemistry*, *21*, 1149-1151.

Furuoka, H., Hasegawa, M., Kobayashi, Y., and Matsui, T., (1999) Peripheral nerve lesions in a case of equine motor neuron disease. *J. Vet. Med. Sci.*, *61*, 557-560.

Galanaud, D., Nicoli, F., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Ranjeva, J.P., Viola, A., Girard, N., and Cozzone, P.J., (2007) Indications for cerebral MR proton spectroscopy in 2007. *Rev. Neurol. (Paris)*, *163*, 287-303.

Galanaud, D., Nicoli, F., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Dormont, D., Girard, N., Ranjeva, J., and Cozzone, P., (2007) Brain magnetic resonance spectroscopy. *J. Radiol.*, *88*, 483-496.

Galeotti, N., Bartolini, A., and Ghelardini, C., (2006) Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Neuropharmacology*, *50*, 309-316.

Galey, F.D., Hullinger, P.J., and McCaskill, J., (1991) Outbreaks of stringhalt in northern California. *Vet. Hum. Toxicol.*, *33*, 176-177.

Galvan, V., Zhang, J., Gorostiza, O.F., Banwait, S., Huang, W., Ataie, M., Tang, H., and Bredesen, D.E., (2008) Long-term prevention of Alzheimer's disease-like behavioral deficits in PDAPP mice carrying a mutation in Asp664. *Behav. Brain Res.*, *191*, 246-255.

Gardner, S.Y., Cook, A.G., Jortner, B.S., Troan, B.V., Sharp, N.J.H., Campbell, N.B., and Brownie, C.F., (2005) Stringhalt associated with a pasture infested with *Hypochoeris radicata*. *Equine vet. Educ.*, *17*, 118-122.

Gatewood, J.D., Wills, A., Shetty, S., Xu, J., Arnold, A.P., Burgoyne, P.S., and Rissman, E.F., (2006) Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. *J. Neurosci.*, *26*, 2335-2342.

Gay, C.C., Fransen, S., Richards, J., and Holler, S., (1993) *Hypochoeris*-associated stringhalt in North America. *Equine Vet. J.*, *25*, 456-457.

Gilbert, G.A., Wilson, C., and Madore, M.A., (1997) Root-Zone Salinity Alters Raffinose Oligosaccharide Metabolism and Transport in Coleus. *Plant Physiol.*, *115*, 1267-1276.

Gouy, I., Egron, G., Leblond, A., and Cadoré, J.L., (2005) Etude de cas de harper australien après sa recrudescence dans la région lyonnaise. *Prat. Vét. Equine*, *37*, 53-60.

Griffin, J.L., Cemal, C.K., and Pook, M.A., (2004) Defining a metabolic phenotype in the brain of a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia 3. *Physiol. Genomics*, *16*, 334-340.

Griffith, H.R., den Hollander, J.A., Stewart, C.C., Evanochko, W.T., Buchthal, S.D., Harrell, L.E., Zamrini, E.Y., Brockington, J.C., and Marson, D.C., (2007) Elevated brain *scyllo*-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed.*, *20*, 709-716.

Griffiths, J.R. and Stubbs, M., (2003) Opportunities for studying cancer by metabolomics: preliminary observations on tumors deficient in hypoxia-inducible factor 1. *Adv. Enzyme Regul.*, *43*, 67-76.

Grodd, W., Krageloh-Mann, I., Petersen, D., Trefz, F.K., and Harzer, K., (1990) In vivo assessment of N-acetylaspartate in brain in spongy degeneration (Canavan's disease) by proton spectroscopy. *Lancet*, *336*, 437-438.

Grover, V.P., Dresner, M.A., Forton, D.M., Counsell, S., Larkman, D.J., Patel, N., Thomas, H.C., and Taylor-Robinson, S.D., (2006) Current and future applications of magnetic resonance imaging and spectroscopy of the brain in hepatic encephalopathy. *World J. Gastroenterol.*, *12*, 2969-2978.

Handley, S.L. and Mithani, S., (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, *327*, 1-5.

Hattingen, E., Raab, P., Franz, K., Lanfermann, H., Setzer, M., Gerlach, R., Zanella, F.E., and Pilatus, U., (2008) Prognostic value of choline and creatine in WHO grade II gliomas. *Neuroradiology*.

Hausberger, M., Roche, H., Henry, S., and Visser, E.K., (2008) A review of the human-horse relationship. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, *109*, 1-24.

Hayashi, Y., Shima, H., Miyashita, K., Kinoshita, M., Nakada, M., Kida, S., and Hamada, J., (2008) Unusual angiographic changes in an internal carotid artery pseudoaneurysm after infection in the deep neck space. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, *48*, 216-219.

Helleu, C., (1957) Elimination urinaire du mésoinositol en relation avec le système digestif. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, *39*, 633-640.

Hennebeg, W. and Stohmann, F., (1859) Uber das Erhaltungsfutter volljahrigen Rindviehs. *J. Landwirtsch*, *34*, 485-551.

Hirano, F., Tanaka, H., Okamoto, K., Makino, Y., Inaba, M., Nomura, Y., Fukawa, E., Miura, T., Tani, T., and Makino, I., (1995) Natural course of diabetic peripheral neuropathy in spontaneous-onset diabetic Chinese hamsters. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, *28*, 151-159.

Hollingworth, W., Medina, L.S., Lenkinski, R.E., Shibata, D.K., Bernal, B., Zurakowski, D., Comstock, B., and Jarvik, J.G., (2006) A systematic literature review of magnetic

resonance spectroscopy for the characterization of brain tumors. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, *27*, 1404-1411.

Holmes, E., Tsang, T.M., and Tabrizi, S.J., (2006) The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. *NeuroRx*, *3*, 358-372.

Hsiao, G., Lin, K.H., Chang, Y., Chen, T.L., Tzu, N.H., Chou, D.S., and Sheu, J.R., (2005) Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *25*, 1998-2004.

Hudson, N., Mayhew, I., and Pearson, G., (2002) Presence of in vitro electrical activity in the ileum of horses with enteric nervous system pathology: equine dysautonomia (grass sickness). *Auton. Neurosci.*, *99*, 119-126.

Huntington, P.J., Seneque, S., Slocombe, R.F., Jeffcott, L.B., McLean, A., and Luff, A.R., (1991) Use of phenytoin to treat horses with Australian stringhalt. *Aust. Vet. J.*, *68*, 221-224.

Huntington, P.J., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., Luff, A.R., Finkelstein, D.I., and Flynn, R.J., (1989) Australian Stringhalt-epidemiological, clinical and neurological investigations. *Equine Vet. J.*, *21*, 266-273.

Ichimura, K., Kohata, K., Yamaguchi, Y., Douzono, M., Ikeda, H., and Koketsu, M., (2000) Identification of L-inositol and scyllitol and their distribution in various organs in chrysanthemum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, *64*, 865-868.

Jakovcevski, M., Schachner, M., and Morellini, F., (2008) Individual variability in the stress response of C57BL/6J male mice correlates with trait anxiety. *Genes Brain Behav.*, *7*, 235-243.

John, H.A., Marrs, J., and Laffling, A.J., (2000) Investigation of the susceptibility of equine autonomic neuronal cell lines, clonally derived from the same paravertebral ganglion, to toxic plasma from equine dysautonomia (grass sickness) cases. *Toxicol. in Vitro*, *14*, 459-465.

Kaiser, E., Chiba, P., and Zaky, K., (1990) Phospholipases in biology and medicine. *Clin. Biochem.*, *23*, 349-370.

Kannegieter, N.J., Malik, R., (1992) The use of baclofen in the treatment of stringhalt. *Aust. Equine Vet.*, *10*, 90.

Kastrup, O., Wanke, I., and Maschke, M., (2005) Neuroimaging of infections. *NeuroRx*, *2*, 324-332.

Kendall, W.T., (1884) The diseases of Australian Horses. *Cameron Laing and Co., Melbourne*, 183-185.

Kerrigan, J., (1917) So-called Australian Stringhalt of horses. *New Zealand Journal of Agriculture*, *15*, 20-23.

Khanna, P.C., Godinho, S., Patkar, D.P., Pungavkar, S.A., and Lawande, M.A., (2006) MR spectroscopy-aided differentiation: "giant" extra-axial tuberculoma masquerading as meningioma. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, *27*, 1438-1440.

Kinouchi, H., Imaizumi, S., Yoshimoto, T., and Motomiya, M., (1990) Phenytoin affects metabolism of free fatty acids and nucleotides in rat cerebral ischemia. *Stroke*, *21*, 1326-1332.

Kirvell, S.L., Esiri, M., and Francis, P.T., (2006) Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, *98*, 939-950.

Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y., Kondo, A., Maihara, T., Yokoi, N., Kuramoto, T., Sasa, M., and Serikawa, T., (2000) Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J. Neurochem.*, *74*, 2512-2519.

Kofman, O., Agam, G., Shapiro, J., and Spencer, A., (1998) Chronic dietary inositol enhances locomotor activity and brain inositol levels in rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, *139*, 239-242.

Kong, W.X., Chen, S.W., Li, Y.L., Zhang, Y.J., Wang, R., Min, L., and Mi, X., (2006) Effects of taurine on rat behaviors in three anxiety models. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, *83*, 271-276.

Lee S.C., Prosky L., and J.W., V., (1992) Fiber in foodsenzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer : collaborative study. *J. Assoc. Anal. Chem.*, *75*, 395-416.

Le Gall, G., Colquhoun, I.J., and Defernez, M., (2004) Metabolite profiling using ^{1}H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, Camellia sinensis (L.). *J. Agric. Food Chem.*, *52*, 692-700.

Lenz, E.M., Bright, J., Wilson, I.D., Hughes, A., Morrisson, J., Lindberg, H., and Lockton, A., (2004) Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ^{1}H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, *36*, 841-849.

Levine, J., (1997) Controlled trials of inositol in psychiatry. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, *7*, 147-155.

Li, F., Obrosova, I.G., Abatan, O., Tian, D., Larkin, D., Stuenkel, E.L., and Stevens, M.J., (2005) Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signaling in sensory neurons of STZ-D rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, *288*, E29-36.

Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K., (2007) Metabonomics in pharmaceutical R&D. *FEBS J.*, *274*, 1140-1151.

Lindon, J.C., Holmes, E., and Nicholson, J.K., (2006) Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm. Res.*, *23*, 1075-1088.

listed, N.a., (2001) Taurine - monograph. *Altern. Med. Rev.*, *6*, 78-82.

Litsky, M.L., Hohl, C.M., Lucas, J.H., and Jurkowitz, M.S., (1999) Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia. *Brain Res.*, *821*, 426-432.

Loewus, F.A. and Murthy, P.P.N., (2000) *Myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.*, *150*, 1-19.

Lofstedt, J. and Ikede, B.O., (1994) Motor neuron disease in a quarter horse from Nova Scotia. *Can. Vet. J.*, *35*, 507-509.

Lopez, J.R., Lyckman, A., Oddo, S., Laferla, F.M., Querfurth, H.W., and Shtifman, A., (2008) Increased intraneuronal resting [Ca^{2+}] in adult Alzheimer's disease mice. *J. Neurochem.*, *105*, 262-271.

Lundbom, J.O., Vuori, K.E., Gaily, E.K., Granstrom, R.I., Blomstedt, G.C., Hakkinen, A.M., Heikkinen, S.M., and Lundbom, N.M., (2005) Metabolite phantom correction of the nonuniform volume-selection profiles in MR spectroscopic imaging: application to temporal lobe epilepsy. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, *26*, 1072-1077.

MacKay, S., Meyerhoff, D.J., Constans, J.M., Norman, D., Fein, G., and Weiner, M.W., (1996) Regional gray and white matter metabolite differences in subjects with AD, with subcortical ischemic vascular dementia, and elderly controls with ^{1}H magnetic resonance spectroscopic imaging. *Arch. Neurol.*, *53*, 167-174.

Manhaes, A.C., Guthierrez, M.C., Filgueiras, C.C., and Abreu-Villaca, Y., (2008) Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.*

Mattos, J.P., Marenco, H.A., Campos, J.M., Faria, A.V., Queiroz, L.S., Borges, G., and Oliveira, E., (2006) Cerebellar glioblastoma multiforme in an adult. *Arq. Neuropsiquiatr.*, *64*, 132-135.

McCutcheon, J.E., Fisher, A.S., Guzdar, E., Wood, S.A., Lightman, S.L., and Hunt, S.P., (2008) Genetic background influences the behavioural and molecular consequences of neurokinin-1 receptor knockout. *Eur. J. Neurosci.*, *27*, 683-690.

McPhie-Lalmansingh, A.A., Tejada, L.D., Weaver, J.L., and Rissman, E.F., (2008) Sex chromosome complement affects social interactions in mice. *Horm. Behav.*, *54*, 565-570.

Miller, S.P., McQuillen, P.S., Hamrick, S., Xu, D., Glidden, D.V., Charlton, N., Karl, T., Azakie, A., Ferriero, D.M., Barkovich, A.J., and Vigneron, D.B., (2007) Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. *N. Engl. J. Med.*, *357*, 1928-1938.

Moffett, J.R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C.N., and Namboodiri, A.M., (2007) N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.*, *81*, 89-131.

Mohammed, H.O., Divers, T.J., Summers, B.A., and de Lahunta, A., (2007) Vitamin E deficiency and risk of equine motor neuron disease. *Acta Vet. Scand.*, *49*, 17.

Moore, C.M., Breeze, J.L., Kukes, T.J., Rose, S.L., Dager, S.R., Cohen, B.M., and Renshaw, P.F., (1999) Effects of *myo*-inositol ingestion on human brain *myo*-inositol levels: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Biol. Psychiatry*, *45*, 1197-1202.

Moore, A., Collatos, C., Ortenburger, A., Illanes, O., and Ikede, B., (1994) Motor neuron disease in a horse. *Can. Vet. J.*, *35*, 522.

Mora, S., Dussaubat, N., and Diaz-Veliz, G., (1996) Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, *21*, 609-620.

Moussa, C.E., Rusnak, M., Hailu, A., Sidhu, A., and Fricke, S.T., (2008) Alterations of striatal glutamate transmission in rotenone-treated mice: MRI/MRS in vivo studies. *Exp. Neurol.*, *209*, 224-233.

Nicholls, A.W., Mortishire-Smith, R.J., and Nicholson, J.K., (2003) NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats. *Chem. Res. Toxicol.*, *16*, 1395-1404.

Nicholson, J.K., Connelly, J., Lindon, J.C., and Holmes, E., (2002) Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov.*, *1*, 153-161.

Nicholson, J.K., Lindon, J.C., and Holmes, E., (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, *29*, 1181-1189.

Normalisation, A.f.d., (1993) Produits agricoles et alimentaires. Détermination de la cellulose brute. Méthode générale. Norme NF V03-040. *Assoc. Franç. Normal., Paris France.*

Normalisation, A.F.d., (1977) Aliments des animaux. Dosage de l'azote en vue du calcul de la teneur en protéines brutes (EQV ISO 5983). Norme NF V18-100. *Assoc. Franç. Normal., Paris France.*

O'Connor, J.J., (1950) Dollar's Veterinary surgery. *Bailliere, Tindall and Cox; 4th ed., London*.

Odunsi, K., Wollman, R.M., Ambrosone, C.B., Hutson, A., McCann, S.E., Tammela, J., Geisler, J.P., Miller, G., Sellers, T., Cliby, W., Qian, F., Keitz, B., Intengan, M., Lele, S., and Alderfer, J.L., (2005) Detection of epithelial ovarian cancer using ^{1}H-NMR-based metabonomics. *Int. J. Cancer*, *113*, 782-788.

Pagani, M.R., Reisin, R.C., and Uchitel, O.D., (2006) Calcium signaling pathways mediating synaptic potentiation triggered by amyotrophic lateral sclerosis IgG in motor nerve terminals. *J. Neurosci.*, *26*, 2661-2672.

Pattanagul, W. and Madore, M.A., (1999) Water Deficit Effects on Raffinose Family Oligosaccharide Metabolism in Coleus. *Plant Physiol.*, *121*, 987-993.

Pears, M.R., Cooper, J.D., Mitchison, H.M., Mortishire-Smith, R.J., Pearce, D.A., and Griffin, J.L., (2005) High resolution ^{1}H NMR-based metabolomics indicates a neurotransmitter cycling deficit in cerebral tissue from a mouse model of Batten disease. *J. Biol. Chem.*, *280*, 42508-42514.

Pemberton, D.H. and Caple, I.W., (1980) Australian Stringhalt in horses. *Vet. Annu.*, *20*, 167-171.

Pemberton, D.H.a.C., I.W., (1979) Investigation of a recent outbreak of stringhalt in horses in East Gippsland. *Vic. Vet. Proc.*, *16*, 16.

Perlbarg, V. and Marrelec, G., (2008) Contribution of Exploratory Methods to the Investigation of Extended Large-Scale Brain Networks in Functional MRI: Methodologies, Results, and Challenges. *Int. J. Biomed. Imaging*, *2008*, 218519.

Petit-Demouliere, B., Chenu, F., and Bourin, M., (2005) Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl.)*, *177*, 245-255.

Phipps, A.N., Stewart, J., Wright, B., and Wilson, I.D., (1998) Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica*, *28*, 527-537.

Pirie, R.S., (2006) Grass Sickness. *Clin. Tech. Equine Pract.*, *5*, 30-36.

Pivawer, G., Law, M., and Zagzag, D., (2007) Perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging in differentiating necrotizing cerebritis from glioblastoma multiforme. *Magn. Reson. Imaging*, *25*, 238-243.

Plouvier, V., (1972) New study of scyllitol, *myo*-inositol and dulcitol in some botanical groups. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *274*, 1735-1738.

Plouvier, V., (1971) New study of scyllitol in some botanical groups: its broad distribution in the Compositae. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *273*, 1625-1628.

Plouvier, V., (1971) Research of scyllitol, *myo*-inositol and dulcitol in some botanical divisions. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D, Sci. Nat.*, *272*, 141-144.

Pop-Busui, R., Sullivan, K.A., Van Huysen, C., Bayer, L., Cao, X., Towns, R., and Stevens, M.J., (2001) Depletion of taurine in experimental diabetic neuropathy: implications for nerve metabolic, vascular, and functional deficits. *Exp. Neurol.*, *168*, 259-272.

Porsolt, R.D., Bertin, A., and Jalfre, M., (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, *229*, 327-336.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., and Jalfre, M., (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, *266*, 730-732.

Poxton, I.R., Hunter, L., Lough, H., and Miller, K., (1999) Is Equine Grass Sickness (Mal Seco?) a Form of Botulism? *Anaerobe*, *5*, 291-293.

Prabakaran, S., Swatton, J.E., Ryan, M.M., Huffaker, S.J., Huang, J.T., Griffin, J.L., Wayland, M., Freeman, T., Dudbridge, F., Lilley, K.S., Karp, N.A., Hester, S., Tkachev, D., Mimmack, M.L., Yolken, R.H., Webster, M.J., Torrey, E.F., and Bahn, S., (2004) Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Mol. Psychiatry*, *9*, 684-97, 643.

Prakash, T., Rao, N.R., and Viswanatha Swamy, A.H., (2008) Neuropharmacological studies on *Wedelia calendulacea Less* stem extract. *Phytomedicine*, in press.

Prut, L. and Belzung, C., (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.*, *463*, 3-33.

Raizer, J.J., Koutcher, J.A., Abrey, L.E., Panageas, K.S., DeAngelis, L.M., Lis, E., Xu, S., and Zakian, K.L., (2005) Proton magnetic resonance spectroscopy in immunocompetent patients with primary central nervous system lymphoma. *J. Neurooncol.*, *71*, 173-180.

Ravasz, E., Somera, A.L., Mongru, D.A., Oltvai, Z.N., and Barabasi, A.L., (2002) Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science*, *297*, 1551-1555.

Read, D.J.a.K., J., (1983) Outbreak of Stringhalt. *An. Health Div. N Z Surv.*, *10*, 22-23.

Reakes, C.J., (1916) Notes on a form of nerve derangement in horses. *New Zealand Journal of Agriculture*, *12*, 364-368.

Robertson-Smith, R.G., Jeffcott, L.B., Friend, S.C., and Badcoe, L.M., (1985) An unusual incidence of neurological disease affecting horses during a drought. *Aust. Vet. J.*, *62*, 6-12.

Rontein, D., Basset, G., and Hanson, A.D., (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab. Eng.*, *4*, 49-56.

Ross, A.J. and Sachdev, P.S., (2004) Magnetic resonance spectroscopy in cognitive research. *Brain Res. Brain. Res. Rev.*, *44*, 83-102.

Ross, B. and Bluml, S., (2001) Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Anat. Rec.*, *265*, 54-84.

Rudick, C.N., Bryce, P.J., Guichelaar, L.A., Berry, R.E., and Klumpp, D.J., (2008) Mast cell-derived histamine mediates cystitis pain. *PLoS ONE*, *3*, e2096.

Sabatine, M.S., Liu, E., Morrow, D.A., Heller, E., McCarroll, R., Wiegand, R., Berriz, G.F., Roth, F.P., and Gerszten, R.E., (2005) Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation*, *112*, 3868-3875.

Sasaki, N., Yamada, M., Morita, Y., Furuoka, H., Itoh, M., Satoh, M., and Yamada, H., (2006) A case of equine motor neuron disease (EMND). *J. Vet. Med. Sci.*, *68*, 1367-1369.

Schildkraut, J.J., (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*, *122*, 509-522.

Schildkraut, J.J., Gordon, E.K., and Durell, J., (1965) Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. *J. Psychiatr. Res.*, *3*, 213-228.

Scott, H.L., Pow, D.V., Tannenberg, A.E., and Dodd, P.R., (2002) Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, *22*, RC206.

Seddon, H.R. and Belschner, H.G., (1926) Stringhalt in horses. *Agr. Gaz. New S. Wales*, *37*, 381-382.

Sherman, W.R., Stewart, M.A., Kurien, M.M., and Goodwin, S.L., (1968) The measurement of *myo*-inositol, *myo*-inosose-2 and *scyllo*-inositol in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, *158*, 197-205.

Sherman, W.R., Stewart, M.A., Simpson, P.C., and Goodwin, S.L., (1968) The identification of *myo*-inosose-2 and *scyllo*-inositol in mammalian tissues. *Biochemistry*, *7*, 819-824.

Shetty, H.U., Holloway, H.W., and Schapiro, M.B., (1996) Cerebrospinal fluid and plasma distribution of *myo*-inositol and other polyols in Alzheimer disease. *Clin. Chem.*, *42*, 298-302.

Shimon, H., Agam, G., Belmaker, R.H., Hyde, T.M., and Kleinman, J.E., (1997) Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *Am. J. Psychiatry*, *154*, 1148-1150.

Siklos, L., Engelhardt, J., Harati, Y., Smith, R.G., Joo, F., and Appel, S.H., (1996) Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotropic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, *39*, 203-216.

Slocombe, R.F., Huntington, P.J., Friend, S.C., Jeffcott, L.B., Luff, A.R., and Finkelstein, D.K., (1992) Pathological aspects of Australian Stringhalt. *Equine Vet. J.*, *24*, 174-183.

Stewart, M.A., Kurien, M.M., Sherman, W.R., and Cotlier, E.V., (1968) Inositol changes in nerve and lens of galactose fed rats. *J. Neurochem.*, *15*, 941-946.

Stewart, M.A., Sherman, W.R., Kurien, M.M., Moonsammy, G.I., and Wisgerhof, M., (1967) Polyol accumulations in nervous tissue of rats with experimental diabetes and galactosaemia. *J. Neurochem.*, *14*, 1057-1066.

Stutzmann, G.E., (2005) Calcium dysregulation, IP_3 signaling, and Alzheimer's disease. *Neuroscientist*, *11*, 110-115.

Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K., (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, *29*, 417-426.

Takahashi, T., Kitamura, M., Endo, Y, Eto, D., Aoki, O., Kusunose, R., Yoshihara, T., Kai, M., (2002) An outbreak of stringhalt resembling Australian stringhalt in Japan. *J. Equine Vet. Sci.*, *13*, 93-100.

Tartaglia, M.C., Narayanan, S., De Stefano, N., Arnaoutelis, R., Antel, S.B., Francis, S.J., Santos, A.C., Lapierre, Y., and Arnold, D.L., (2002) Choline is increased in pre-lesional normal appearing white matter in multiple sclerosis. *J. Neurol.*, *249*, 1382-1390.

Timoney, P.J. and Wernery, U., (2003) International Conference on Equine Grass Sickness, Dubai, United Arab Emirates September 22-23, 2001. *Vet. J.*, *165*, 7-10.

Tkac, I., Dubinsky, J.M., Keene, C.D., Gruetter, R., and Low, W.C., (2007) Neurochemical changes in Huntington R6/2 mouse striatum detected by in vivo ^{1}H NMR spectroscopy. *J. Neurochem.*, *100*, 1397-1406.

Tomiyoshi, R., Kamei, K., Muraoka, S., Muneoka, K., and Takigawa, M., (1999) Serotonin-induced platelet intracellular Ca^{2+} responses in untreated depressed patients and imipramine responders in remission. *Biol. Psychiatry*, *45*, 1042-1048.

Tourbah, A., Stievenart, J.L., Edan, G., Abanou, A., Dormont, D., and Lyon-Caen, O., (2005) Acute demyelination: an insight into the effect of mitoxantrone on CNS lesions. *J. Neuroradiol.*, *32*, 63-66.

Uchida, S., Hirai, K., Hatanaka, J., Hanato, J., Umegaki, K., and Yamada, S., (2008) Antinociceptive effects of St. John's wort, *Harpagophytum procumbens* extract and Grape seed proanthocyanidins extract in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, *31*, 240-245.

Valverde, S., Frias, J., Doblado, R., Jimeno, M.L., and Vidal-Valverde, C., (2005) Inositol phosphate profiling of fermented cowpeas by ^{1}H NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, *53*, 4714-4721.

Vangala, S. and Tonelli, A., (2007) Biomarkers, metabonomics, and drug development: can inborn errors of metabolism help in understanding drug toxicity? *AAPS J.*, *9*, E284-297.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., and Lewis, B.A., (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, *74*, 3583-3597.

Van Soest, P.J. and H., W.R., (1967) Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV Determination of plant cell wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 50-50.

Viola, A., Nicoli, F., Denis, B., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Ranjeva, J.P., Viout, P., and Cozzone, P.J., (2004) High cerebral *scyllo*-inositol: a new marker of brain metabolism disturbances induced by chronic alcoholism. *MAGMA*, *17*, 47-61.

Von Kienlin, M., Kunnecke, B., Metzger, F., Steiner, G., Richards, J.G., Ozmen, L., Jacobsen, H., and Loetscher, H., (2005) Altered metabolic profile in the frontal cortex of PS2APP transgenic mice, monitored throughout their life span. *Neurobiol. Dis.*, *18*, 32-39.

Wang, Y., Holmes, E., Nicholson, J.K., Cloarec, O., Chollet, J., Tanner, M., Singer, B.H., and Utzinger, J., (2004) Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni*: an approach for biomarker identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *101*, 12676-12681.

Waters, N.J., Holmes, E., Waterfield, C.J., Farrant, R.D., and Nicholson, J.K., (2002) NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with [alpha]-naphthylisothiocyanate. *Biochem. Pharmacol.*, *64*, 67-77.

Wijnberg, I.D., Back, W., and van der Kolk, J.H., (2000) The use of electromyographic examination as a diagnostic tool and phenytoin sodium as treatment in a case of classic springhalt in a Dutch warmblood horse. *Tijdschr Diergeneeskd*, *125*, 743-747.

Wood, J.L.N., Milne, E.M., and Doxey, D.L., (1998) A case-control study of grass sickness (equine dysautonomia) in the United Kingdom. *Vet. J.*, *156*, 7-14.

Xie, J., Chen, X.Z., Jiang, T., Li, S.W., Li, Z.X., Zhang, Z., Dai, J.P., and Wang, Z.C., (2008) Preoperative blood oxygen level-dependent functional magnetic resonance imaging in patients with gliomas involving the motor cortical areas. *Chin. Med. J.*, *121*, 631-635.

Xu, Q., Pan, Y., Yi, L.T., Li, Y.C., Mo, S.F., Jiang, F.X., Qiao, C.F., Xu, H.X., Lu, X.B., Kong, L.D., and Kung, H.F., (2008) Antidepressant-like effects of psoralen isolated from the seeds of Psoralea corylifolia in the mouse forced swimming test. *Biol. Pharm. Bull.*, *31*, 1109-1114.

Yang, J., Xu, G., Zheng, Y., Kong, H., Pang, T., Lv, S., and Yang, Q., (2004) Diagnosis of liver cancer using HPLC-based metabonomics avoiding false-positive result from hepatitis and hepatocirrhosis diseases. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, *813*, 59-65.

Yang, J., Xu, G., Hong, Q., Liebich, H.M., Lutz, K., Schmulling, R.M., and Wahl, H.G., (2004) Discrimination of Type 2 diabetic patients from healthy controls by using metabonomics method based on their serum fatty acid profiles. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, *813*, 53-58.

Yang, J.H., Luo, X., Nie, Y., Su, Y., Zhao, Q., Kabir, K., Zhang, D., and Rabinovici, R., (2003) Widespread inosine-containing mRNA in lymphocytes regulated by ADAR1 in response to inflammation. *Immunology*, *109*, 15-23.

Zagrosek, A., Wassmuth, R., Abdel-Aty, H., Rudolph, A., Dietz, R., and Schulz-Menger, J., (2008) Relation between myocardial edema and myocardial mass during the acute and convalescent phase of myocarditis-a CMR study. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.*, *10*, 19.

Zhang, Y.Z., Li, Y.F., Yu, N.J., Yuan, L., Zhao, Y.M., Xiao, W.B., and Luo, Z.P., (2007) Antidepressant-like effects of the ethanolic extract of Xiaobuxin-Tang, a traditional Chinese herbal prescription in animal models of depression. *Chin. Med. J.*, *120*, 1792-1796.

ANNEXES

Chemical Research in Toxicology

Subscriber access provided by INRA Institut National de la Recherche Agronomique

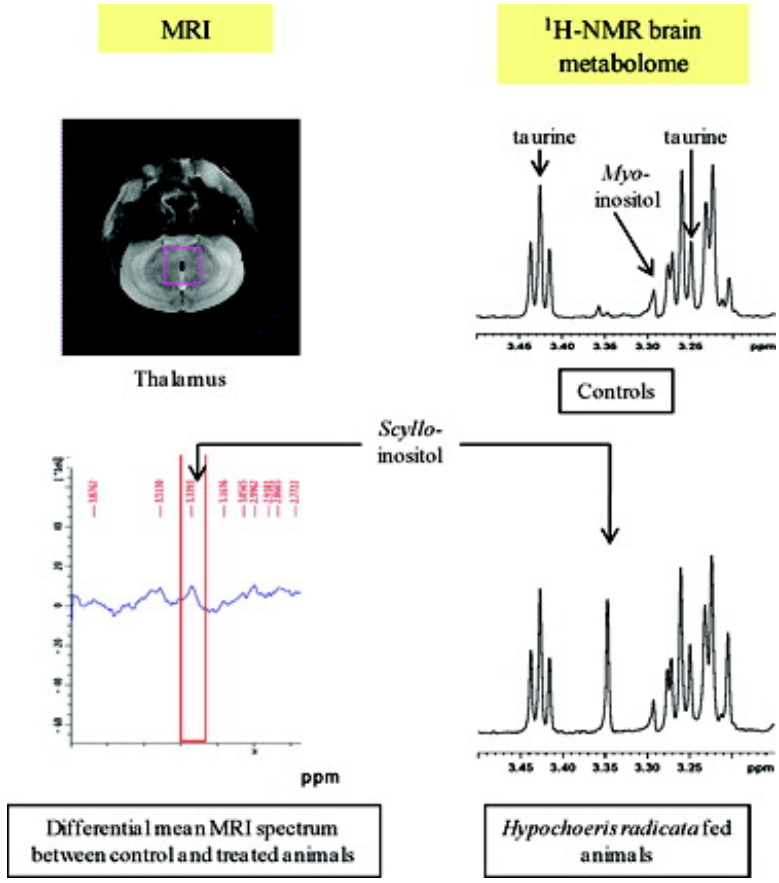
Article

Orthologous Metabonomic Qualification of a Rodent Model Combined with Magnetic Resonance Imaging for an Integrated Evaluation of the Toxicity of *Hypochœris radicata*

Ce#line Domange, Ce#cile Canlet, Amidou Traore#, Guy Bie#licki, Ce#cile Keller, Alain Paris, and Nathalie Priymenko

Chem. Res. Toxicol., **2008**, 21 (11), 2082-2096 • Publication Date (Web): 11 September 2008

Downloaded from http://pubs.acs.org on November 24, 2008



More About This Article

ACS Publications
High quality. High impact.

Chemical Research in Toxicology is published by the American Chemical Society.
1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036

Chemical Research in Toxicology

Subscriber access provided by INRA Institut National de la Recherche Agronomique

Additional resources and features associated with this article are available within the HTML version:

- Supporting Information
- Access to high resolution figures
- Links to articles and content related to this article
- Copyright permission to reproduce figures and/or text from this article

View the Full Text HTML

ACS Publications
High quality. High impact.

Chemical Research in Toxicology is published by the American Chemical Society.
1155 Sixteenth Street N.W., Washington, DC 20036

Orthologous Metabonomic Qualification of a Rodent Model Combined with Magnetic Resonance Imaging for an Integrated Evaluation of the Toxicity of *Hypochœris radicata*

Céline Domange,[†] Cécile Canlet,[†] Amidou Traoré,[‡] Guy Biélicki,[‡] Cécile Keller,[‡] Alain Paris,[†] and Nathalie Priymenko*[,†,§]

UMR 1089 INRA/ENVT, 180 Chemin de Tournefeuille, BP 3, F-31931 Toulouse, INRA Clermont-Ferrand/Theix QuaPA STIM, F-63122 St. Genès Champanelle, and Department of Nutrition and Botanic and Vegetal Toxicology, ENVT, 23 Chemin des Capelles, F-31300 Toulouse, France

Received May 6, 2008

In the present study, we have used metabonomics combined with magnetic resonance imaging (MRI) to investigate an orphan neurological disease, Australian stringhalt, described in horse-ingesting inflorescences of *Hypochoeris radicata* (HR), without any knowledge on the toxic principle and without any practical possibility to perform experiments on the target species. To get valuable candidate biomarkers, we have chosen the mouse species as a "metabolically competent" laboratory animal model. Metabonomics has been applied as a holistic approach to obtain some pertinent metabolic information about the target organs and biomarker metabolites involved in the HR-induced disruptive events. From urine, liver, and brain metabolic fingerprints, HR ingestion induced a very significant effect on the general metabolism, which is proportional to the HR dose administered and to the HR intoxication duration. The main metabolic biomarker in the mouse model of an intoxication specifically induced by HR feeding has been unambiguously identified as *scyllo*-inositol. A significant increase of this metabolic marker has been measured in urine and in hydrosoluble liver or brain extracts with a very significant canonical link between these two organs. MRI results obtained in the thalamus have confirmed the involvement of *scyllo*-inositol, a metabolite found in many neurodegenerative diseases, in some specific metabolic disruptions involved in both neuronal and glial dysfunctions as awaited from etiology of this horse disease. This brain metabolic biomarker has been clearly associated with changes in *N*-acetyl-aspartate, lactate, and choline cerebral concentration found in both neuronal and glial dysfunctions. *Scyllo*-inositol is a valuable candidate biomarker of the Australian stringhalt disease that needs now to be clinically validated in the target species.

Introduction

Because of its intrinsic properties that come within the domain of physical chemistry and thermodynamics, metabonomics, which designs the quantitative metabolomic exploration necessarily processed throughout a factorial design by multivariate statistics (*1*), is a highly versatile methodology. Indeed, it could help to better characterize quantitatively the progression of metabolic disruptions induced by physiological, pathological, genetic, nutritional, or toxic factors. In this latter case, metabonomics is able to reveal some specific or generic signatures of toxic perturbation of organisms and hence to draw the true perimeter of what should be relevant in defining a convenient biological model for tracking such metabolic disruptions through the metabotype concept (*1*−*4*). In nutritional toxicology, this strategy is crucial to access candidate metabolic biomarkers when etiologic factors are not well-characterized and when the target species is a domestic species on which animal experimentation is very expensive or may be unethical.

This is the case for equine species, which displays Australian stringhalt, a neurological horse disease that has been recognized for centuries (the first observations were made in 1848) and is provoked by *Hypochœris radicata* (HR), a plant of the Compositae family (*5*−*9*). Typically, this plant intoxicates horses, which seem to be the only target animal species. Intoxication appears in late summer or early autumn, after a prolonged dry period, when such climatic conditions enable HR to colonize pastures and to become the major plant species available as herbivore feeding. It seems that the number of recently recorded cases increases every year, and that may be related to the global climate change. In 2003, an epizooty with a few tens of duly recorded cases happened in France (*10*). Intoxicated horses display an involuntary exaggerated hyperflexion of hindlimbs and a delayed extension of hocks during forward movement (*11*). Marked atrophy of the hindlimb musculature, particularly in the distal muscles, is associated with this gait. At the present time, HR etiology still remains obscure except for the fact that symptoms need a chronic intoxication for a few months to develop (*8*).

So, the link between this disease and HR toxicity remains poorly investigated, and the pathophysiology is still unknown due to too few epidemiological studies. Moreover, no prior knowledge in pharmacochemistry and pharmacognosy of this plant exists. Last, no toxicity test has been achieved in the target animal species, which is explained mainly by the critical approach concerning the nervous system investigation but also by ethical issues.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 05.61.19.39.07. Fax: 05.61.28.52.44. E-mail: n.priymenko@envt.fr.
[†] UMR 1089 INRA/ENVT.
[‡] INRA Clermont-Ferrand/Theix QuaPA STIM.
[§] ENVT.

10.1021/tx800159x CCC: $40.75 © 2008 American Chemical Society
Published on Web 09/11/2008

As a seemingly deconvoluted method of the HR-induced pathological progression phenomenon, metabonomics performed on laboratory animals can help to track some relevant metabolic biomarkers if the toxicants present in HR possess, as far as the intermediate metabolism is concerned, the same disruptive properties in the same or in comparable target organs. This should be true even though the animal model does not develop the same pathophysiological end events as the target species. As well-exemplified in many instances until now, ^{1}H NMR spectroscopy has been highly effective in the identification of novel biomarkers that may be indicative of specific organ damages (*12*) but also of pharmacokinetics of a toxic insult or a drug response or the progression of diseases such as neurological diseases (*13*), diabetes (*14*), or coronary heart diseases (*15*). Nevertheless, in the absence of any knowledge on the responsible toxicant present in the plant, metabonomics has still not be used in an a priori "metabolically competent" animal model to generate candidate metabolic biomarkers, which could be pivotal in characterizing the progression of pathology in the target species. In the present study, by combining high-throughput metabolic ^{1}H NMR fingerprinting and multivariate statistic analyses, we show that metabonomics possesses per se this metabolic biomarking potential. Indeed, this exploratory metabolomic study is powerful enough (i) to reveal in urine and in tissues like liver or brain some specific signatures of HR-induced metabolic deviations, these signatures being dependent on the HR dose administered and on the HR intoxication duration, and (ii) to generate a major candidate biomarker, which was in vivo validated in the brain of HR-treated mice by magnetic resonance imaging (MRI).

Materials and Methods

Vegetal Materials. Flowers of HR were collected from eight different pastures colonized by this weed, between August 2005 and November 2005, in the south of France (Pyrénées-Atlantique and Haute-Garonne) and near Paris (Yvelines) and were freeze-dried by Lyophal (Salon-de-Provence, France). The flowers were hand-picked to discard undesirable vegetal materials, and vegetal samples were powdered in a grinder and then stored in opaque airtight vials and frozen at −20 °C. A dietary composition analysis of HR powder samples with determination of crude fiber, crude protein, and methionine concentration as well as measurement of fat and nitrogen-free contents was achieved by Lara Europe Analyses (Toulouse, France) to adjust energy and protein contents of the HR-containing diets.

Diets. The powder of flowers was incorporated in a commercial UAR 210 rodent food (Augy, France) to obtain the two final HR concentrations of 3 and 9% incorporated in feed. To ensure a complete covering of nutritional requirements, casein and rapeseed oil were added to the diet, after measuring the nutritional values of the flowers. Finally, all diets containing 0, 3, and 9% HR were stored in hermetically sealed bags and frozen at −20 °C until use.

Animal Handling and Tissue Preparation. All experiments were conducted under European Union Guidelines for the use and care of laboratory animals and were approved by the institutional ethics committee. Seventy-two 5 week old mice C57BL/6J (The Jackson Laboratory), weighing about 20 g (36 males and 36 females), were purchased from Janvier laboratories (Le Genest Saint Isle, France) and identified by permanent marks on the tails. They were randomly distributed in 18 different groups defined according to gender, HR dose (control, 3, and 9%), and sacrifice date (eighth, 15th, or 21st day). They were housed in plastic cages (one cage per batch of four animals) and maintained at 21 ± 2 °C and 50 ± 10% of relative humidity on a 12 h light/dark cycle. Water was given ad libitum. After a 5 day acclimatization period (all groups were fed with UAR 210 rodent diet), mice received either UAR 210 only (control group, 5 g/animal/day, $n = 24$) or a diet containing either 3 or 9% HR (treated groups: 5 g/animal/day, $n = 48$). The body weight was measured weekly, and diet consumption was recorded daily. Urine collection was realized above a Parafilm sheet two times per week by compressing the bladder of mice. Each sample was immediately frozen at −20 °C.

Animals were sacrificed by exsanguination. At each sacrifice time, six groups of mice were sacrificed (control, 3, and 9% HR groups for both genders). The brains were excised behind the optic nerve section and removed. Brains, livers, and kidneys were weighed and immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at −80 °C until NMR spectroscopic analysis.

^{1}H NMR Spectroscopy of Urine Samples. Urine samples were prepared by mixing urine (80−100 μL) with phosphate buffer (600−620 μL, pH 7.4, 0.2 M) containing 10% D_2O as a field frequency lock and 0.05% sodium 3-trimethylsilyl-propionate-2,2,3,3-d_4 (TMSP, internal standard) as a chemical shift reference. Buffered urine samples were then centrifuged at 13000*g* for 10 min to remove any precipitates, and aliquots of 0.6 mL were transferred to 5 mm NMR tubes for ^{1}H NMR analysis.

All ^{1}H NMR spectra were acquired at 300 K on a Bruker DRX-600 Avance NMR spectrometer operating at 600.13 MHz for ^{1}H resonance frequency, using an inverse detection 5 mm ^{1}H−^{13}C−^{15}N cryoprobe attached to a cryo-platform (the preamplifier cooling unit). The 1D "Improved Watergate" sequence was used for suppression of water resonance. For each sample, 128 transients were accumulated with a spectral width of 12 ppm typically collecting 64k data points. Data were apodized with an exponential function using a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. All ^{1}H NMR spectra were phased, and the baseline was corrected and then submitted to a bucketing procedure (see below).

^{1}H NMR Spectroscopy of Brain Tissue Extracts. The organ extraction method used here, which derives from the Folch procedure (*16*) and is adapted from the one described by Waters et al. (*17*), allowed us to prepare lipophilic and hydrophilic extracts. Samples of liver or brain, the latter being taken from the hemiencephalon of a mouse without either olfactory bulbs or the cerebellum, were processed as follows. After approximately 100 mg of tissue was thawed and weighed, each sample was homogenized in 2 mL of acetonitrile/water (50/50, v/v) in an ice/water bath for 30 s with a Kinematica Polytron homogenizer and then centrifuged at 3000*g* for 10 min at 4 °C. The supernatant (aqueous extract) was removed and freeze-dried before reconstitution in 600 μL of D_2O and then frozen at −20 °C until NMR analysis. The pellet was treated with 2 mL of chloroform/methanol (75/25, v/v) and then homogenized again for 30 s with a Kinematica Polytron homogenizer and centrifuged at 3000*g* at 4 °C for 15 min. The supernatant (lipophilic extract) was removed with a Pasteur pipet and dried under a stream of nitrogen and reconstituted in 600 μL of $CDCL_3$, and finally frozen at −20 °C until analysis. All along the extraction procedure, all samples were preserved in an ice/water bath. The reconstituted solutions were transferred to 5 mm NMR tubes.

^{1}H NMR spectra of brain tissue extracts were acquired at 300 K on a Bruker DRX-600 Avance spectrometer at 600.13 MHz with 1D ^{1}H "Improved Watergate" for achieving satisfactory water suppression on aqueous extracts. For lipophilic extracts, the standard ^{1}H pulse sequence was used. For each

sample, 128 transients were collected into 64K data points with a relaxation delay of 2 s. A 12 ppm spectral width was used. The data were apodized with an exponential function using a line broadening of 0.3 Hz prior to Fourier transformation. All NMR spectra were phased, and the baseline was corrected and then submitted to a bucketing procedure (see hereafter).

To confirm the chemical structure of interesting metabolic biomarkers present in the brain, a 2D $^{1}H-^{13}C$ HSQC (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) NMR experiment giving the chemical shifts of the carbon atoms to which the protons are attached was used. It was performed from a pool of three brain aqueous extracts of mice treated with 9% HR that were freeze-dried and reconstituted in deuterated water.

Data Reduction and Multivariate Statistic Processing. Urine and brain extract spectra were data-reduced prior to statistical analysis using AMIX software (Analysis of Mixtures v 3.6.4) from Bruker Analytische Messtechnik (Karlsruhe, Germany). The spectral region δ 0.5−10.0 ppm was segmented into consecutive nonoverlapping regions of 0.01 ppm (buckets). The region δ 4.5−6.5 ppm in the urine spectra was excluded from the recognition analysis to eliminate artifacts of residual water and urea resonances. For the NMR spectra of aqueous extracts, the region δ 4.5−5.0 ppm, which includes the water resonance, and the region containing a residual acetonitrile signal (δ 2.0−2.10 ppm) were also removed. For the chloroform/methanol extracts, the regions δ 3.30−3.40 ppm (residual methanol) and δ 6.5−7.5 ppm (chloroform) were removed from all spectra. The area of each segmented region was expressed as an integral value resulting in an intensity distribution of the whole spectrum with 751 variables per urine NMR spectrum acquired on urine or 901 variables per spectrum acquired on aqueous or lipophilic extract prepared from brain or hepatic tissue prior to principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA).

Multidimensional statistical analyses of fingerprint data were achieved on log-transformed variables as published previously (*18*). Briefly, to remove redundant variables, a double filtration was done corresponding first to a one-way ANOVA-based filtration using the factor "group", which is the combination between gender, HR dose, and HR treatment duration factors. This preliminary step was carried out first to remove nonsignificant variables with a threshold p value at 0.05 and to select variables by a step-by-step process from the set of ANOVA-preselected variables. In this selection algorithm, a filtering function was used to iteratively discard any candidate variable that is highly correlated to an already selected variable and to select one more variable that is highly predictive of the remaining information space, which is orthogonal to the information space modeled by the set of already selected variables at this step.

PCA that assumes no previous knowledge of sample class was performed in a first stage to reveal any aberrant individual sample. Then, to maximize separation between groups, LDA was performed by using the factor "group" as a dummy variable, and complementary canonical analyses were done to calculate Mahalanobis distances and to perform multivariate statistical tests. Finally, clustering methods were applied to investigate the information redundancy due to the presence of highly correlated variables. Alternatively, partial least-squares regression-based discriminant analyses (PLS-DA) were performed on NMR data submitted in a prior stage to a PLS-driven orthogonal signal correction (OSC-PLS). Complementary canonical analyses between two matrices corresponding to two sets of NMR fingerprint data were performed on OSC-PLS corrected data using PLS2-based canonical analyses. All statistical analyses were performed by using SPlus 2000 v2.0 (Insightful Corp., Seattle, WA) including Mass and Multidim (www.lsp.ups-tlse.fr/Carlier/Logiciel.html) libraries, Simca-P 11.0 (Umea, Sweden), and SAS v8.01 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

In Vivo MRI. Animals. A total of 12 males (six male mice given a 9% HR diet and six control mice) were used for in vivo metabolite quantification using ^{1}H NMR localized spectroscopy. All experiments were performed at 9.4 T on a Bruker Avance DRX 400 microimaging system with a wide-bore vertical magnet and a Micro 2.5 gradient system (Bruker, Ettlingen, Germany).

Magnetic Resonance Localized Spectroscopy. Animals were anaesthetized through a mask by spontaneous inhalation of 1−3% isoflurane and air (300 mL/min) using a Univentor 400 anesthesia unit (Univentor, Malta). They were carefully secured in a Bruker Micro AHS/RF animal handling system with the head centered in a 20 mm diameter birdcage radiofrequency coil used for excitation and signal reception. The air temperature surrounding the mouse chamber was maintained at 39 °C by warm air circulation. Mice were left to breathe freely during the MR acquisition (1 h) and were monitored for changes in their respiratory rate to adjust the anesthetic concentration. High-resolution T2 weighted axial images were acquired using a TurboRARE (rapid acquisition with relaxation enhancement) pulse sequence (TEeffective = 36 ms, TR = 4.5 s, RARE factor = 8, and nine contiguous 2 mm thick slices). The spectroscopic volume of interest (VOI) was positioned in the thalamus. The size of the VOI was set to 18 μL (3.00 mm × 3.00 mm × 2.00 mm). Magnetic field homogeneity was optimized for the VOI by manual shimming of first order (X-Y-Z) shims to the unsuppressed water peak until the spectra exhibited a full-width, half-height (fwhh) less than 20 Hz. ^{1}H magnetic resonance spectroscopy (MRS) was performed using a point-resolved spectroscopy (PRESS) sequence used for localized signal acquisition (TE = 8.8 ms, TR = 2000 ms, and spectral width = 5 kHz). The water signal from the VOI was suppressed by variable power RF pulses with optimized relaxation delays (VAPOR) (*19*). Each spectrum represented an average of 1024 scans for a total acquisition time of 17 min.

Metabolite Quantification. All spectra were analyzed in the spectrum domain using the software curve integration PeakFit (Systat Software Inc., San Jose, CA). The relative contribution of each metabolite was obtained by an integration of the area under each peak. The mathematical model used for NMR signal integration was the sum of lorentzien and gaussien areas. The results of integration were expressed in percentage of the sum of the 14 metabolites selected, and the so-expressed variables were submitted to the arsin ($\sqrt{x}$) transformation, which is usually applied to percentage-expressed variables to get homogeneous variances before achieving statistical analyses. Differences in relative metabolite measurements between control and HR-treated mice were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Tukey posthoc test for achieving the comparison of the means.

Results

Animal Breeding Parameters and Clinical and Postmortem Data. No clinical symptom was observed, even on mice sacrificed after a HR treatment administered for 21 days. None of the different animal breeding parameters examined (i.e., animal weight, consumption index, mean daily weight gain) was different between control and treated animals. Moreover, at sacrifice time, no macroscopic modification or lesion of tissue

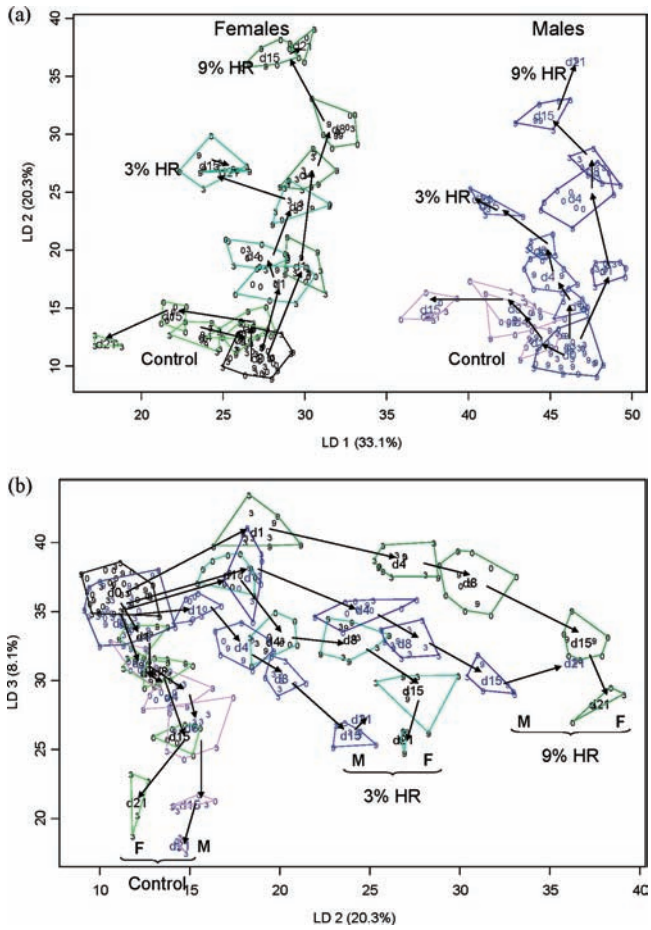


Figure 1. LDA performed on 150 metabolic variables selected from fingerprints obtained by ^{1}H NMR performed at 600.13 MHz on 332 urinary samples. The dummy variable selected is the "group" factor. A 61.5% amount of the total metabolic information is projected on the factorial plan LD1 × LD2 (a) and the factorial plan LD2 × LD3 (b). Arrows stand for metabolic trajectories throughout the study followed by every group fed either a control or a 3 or 9% HR diet. Barycenters give the dates for organ collection and correspond to the duration of HR intoxication (d8, day8; d15, day15; and d21, day21).

was observed, and no significant difference in the weights of brain, liver, and kidney was reported between the different groups of animals.

Urinary Trajectories Reveal from ^{1}H NMR Fingerprints a HR-Induced Metabolic Disruption. The setting up of metabolic disruptions provoked by an ingestion of 3 or 9% HR incorporated in the diet can be easily obtained from metabonomic exploration performed on ^{1}H NMR on urine samples collected on both male and female mice at different time points for 3 weeks (Figure 1). No prior data treatment such as an OSC taking into account the dummy variables describing both the gender and the HR dose factors was necessary to reveal a variance-based hierarchy between the different factors studied here. From the LDA performed on 332 urinary samples and 150 variables selected by the prior robust algorithm of variables preselection used here, the first four resulting linear discriminant (LD) axes are all highly significant and account for 66.2% of the variance calculated between the groups. The first LD summarizes 33.1% of the variance calculated between the different groups and gives a clear discrimination between genders with, in addition for both male and female control groups, a significant variation with age of animals in the metabolic urinary fingerprint (Figure 1a). Indeed, with such a multidimensional analysis, it is possible from the fourth day to detect subtle but significant metabolic variations such as those revealing an age effect with a discretization step of only few days, and every treated group denotes a metabolic fingerprint at a given age that is statistically different from all others as revealed by the analysis of Mahalanobis distances calculated between the different groups, which all are very significant ($p > 0.0001$, data not shown). This latter characteristic is better revealed by the LD3, which summarizes 8.1% of the between-group variance and shows a parallel variation with age of the general metabolism for both male and female control animals (Figure 1b). Unfortunately, only few variables that explain the LD1 building are unambiguously characterized from the NMR signal. The variable detected at $\delta = 1.21$ ppm, which is the variable the most correlated to LD1, can not be identified, and only valine, trimethylamine (TMA), and dimethylamine (DMA) have been shown to be responsible for the gender-based discrimination, when putrescine has been tentatively identified as the second most important canonical variable correlated to the first LD (Table 1).

The second discriminant axis accounts for 20.3% of the between-group variance and reveals the metabolic adjustment to HR intoxication, the metabolic trajectory with 3% HR diet ingestion being of lower amplitude than the one obtained with 9% HR diet ingestion (Figure 1a). Moreover, with 3% HR diet ingestion, an inflection of the metabolic trajectories detected at day 15 and prolonged to day 21 is perceptible, with a tendency of these trajectories to become parallel to LD1. This intermediate metabolic situation obtained in response to ingestion of 3% HR in the diet is evidently present on the second factorial plan (LD2 × LD3) (Figure 1b) and is better exemplified for females than males. This transitory metabolic pattern is not seen for animals fed a 9% HR diet for which the metabolic disruption is more intense. On this factorial plan, we can notice also that treated males display a less intense metabolic response to HR intoxication than females, whatever the HR dose incorporated in the diet. Therefore, it seems that HR-treated females are metabolically more responsive than HR-treated males, when no gender effect is denoted for control animals (Figure 1b).

The main identified urinary metabolite, which is canonically linked to LD2, is hippurate (3.96, 7.64, 7.84 ppm) (Table 1). A second biomarker of HR intoxication positively correlated to LD2 displays a ^{1}H chemical shift at 3.35 ppm and corresponds to *scyllo*-inositol (*s*-Ins) (Figure 2), as confirmed by ^{1}H NMR with a reference compound. This second metabolic biomarker of HR intoxication is observed on the spectrum of urine collected on 9% HR-treated mice but is quite indiscernible from the baseline in the urine spectrum of control animals. Although of lower intensity, this metabolite is also observed on 3% HR-treated mouse urine spectra. The first metabolite canonically linked to LD3 is identified as creatinine ($\delta = 4.03$ ppm), but most other variables are left unidentified (Table 1).

Metabolic Disruptive Events in Liver. No clear structuring of the metabolic information coming from lipophilic hepatic extracts by discriminant analysis can emerge from mining ^{1}H NMR fingerprint data. Similarly, LDA or PLS-DA directly performed on raw ^{1}H NMR fingerprint data acquired from hydrosoluble liver extracts failed to reveal any specific structuring between groups of animals, and this data treatment drawback reveals in fact that HR ingestion has a low to very moderate impact on the general metabolism. However, when an oriented correction of NMR data based on several controlled factors is achieved, either LDA or PLS-DA is successfully performed on the data set obtained from hydrosoluble liver extracts and gives a hierarchy between the different factors studied here. Indeed, for efficiently achieving the correction of ^{1}H NMR data, it is

Table 1. Summary of Major Urinary Metabolites Involved in Building of LD Axes Assigned According to Their ^{1}H Chemical Shift δ (ppm) by Comparison with NMR Chemical Shift Assignment Tables[a]

^{1}H Chemical shift δ (ppm), multiplicity[b]	LD1		LD2		LD3		Metabolites	Change with HR treatment
	ρ	rank	ρ	rank	ρ	rank		
1.21	0.98	1	-0.05		-0.11		unassigned	↗
1.79,br	0.90	2	0.01		-0.32		putrescine	↗
1.04,d	0.88	3	0.40		-0.14		valine	↗
2.87,s	0.81	14	0.01		-0.36		trimethylamine	↗
3.03,s	-0.68	21	0.25		-0.48	20	creatine	↗
3.05,s	0.57	25	-0.71	7	0.05		creatinine	↘
2.71,s	-0.49	30	-0.37		0.50	14	dimethylamine	↘
3.36,s	0.33	35	0.54		0.49	15	*scyllo*-inositol	↗
7.64,t	-0.08		0.87	5	0.27		hippurate	↗
2.72,s	-0.06		-0.43		0.60	6	dimethylamine	↘
3.35,s	0.05		0.91	2	0.25		*scyllo*-inositol	↗
7.83,d	-0.03		0.89	4	0.29		hippurate	↗
7.84,d	-0.01		0.90	3	0.28		hippurate	↗
3.96,s	0.00		0.95	1	0.26		hippurate	↗

[a] The correlation sign of each metabolite enables us to explain changes of direction in response to the HR treatment. [b] Key: d, doublet; t, triplet; s, singlet; br, broad; and m, multiplet.

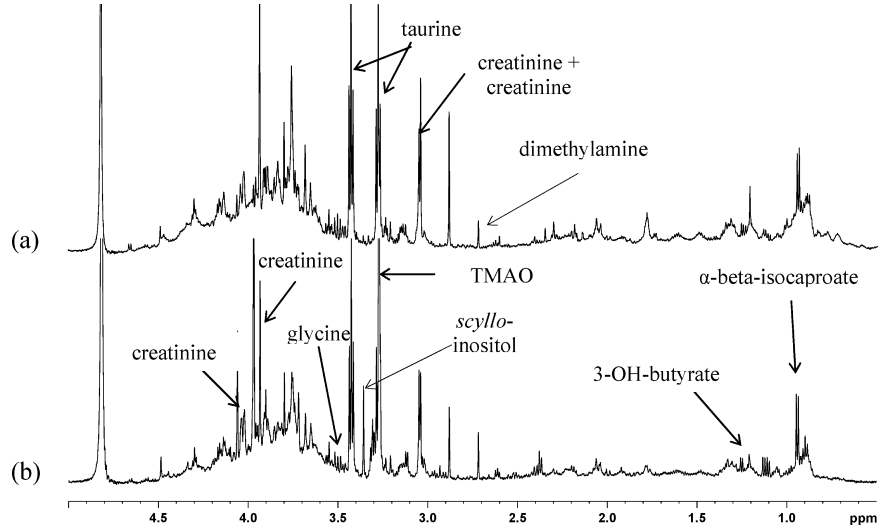


Figure 2. Fingerprint comparison of urine collected on a control mouse (a) and on a mouse fed a diet containing 9% HR (b). A peak displaying a ^{1}H chemical shift at $\delta = 3.35$ ppm is present in the urine spectrum of the HR-treated mouse but is quite indiscernible from basal line in the urine spectrum of a control mouse. This signal has been unequivocally assigned to *scyllo*-inositol thanks to an authentic standard used to spike a HR 9% urinary sample. *Scyllo*-inositol is the second metabolic biomarker of the HR intoxication.

possible first to discard by ANOVA a specific although unexplained block effect corresponding to both the date of euthanasia of animal and the duration of HR ingestion (i.e., 8, 15, and 21 days), this block effect being clearly detectable by LDA in control animals euthanized 15 days after the onset of experimentation when compared to animals euthanized 8 and 21 days after the onset of experimentation. Then, an OSC-PLS procedure is necessary to discard a large part of the variance,

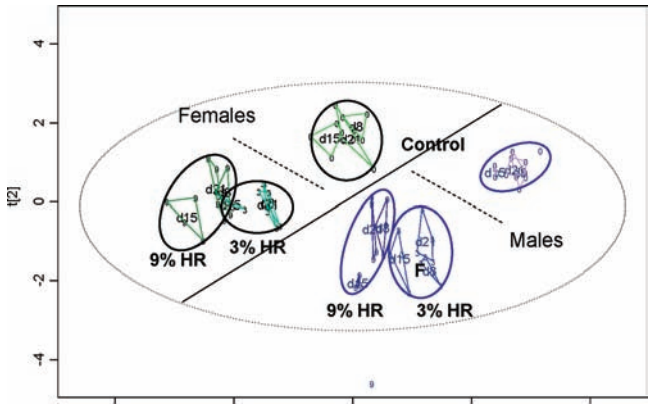


Figure 3. Projection on the plan $t[1] \times t[2]$ of scores calculated from the PLS-DA performed on the 40.6% variance kept after a data correction consisting first of an ANOVA used to discard a specific block effect between the different HR treatment durations and dates of euthanasia and then of an OSC-PLS procedure of NMR raw fingerprints acquired on liver aqueous extracts prepared from male and female mice. Barycenters give the dates for organ collection and correspond to the duration of HR intoxication (d8, day8; d15, day15; and d21, day21).

which is not modeled by a gender effect or by an effect taking into account the HR treatment (dose, duration). So, from the 40.6% variance kept after such a global correction of ^{1}H NMR raw data, it is possible by PLS-DA to discriminate first males from females on the first component but also, inside each gender, control animals from 3% HR- or 9% HR-treated animals (Figure 3). The second component reveals a clear discrimination between control animals and HR-treated animals. Besides, when a LDA is performed on the 30 most important variables among the 68 variables susceptible to predict the initial information space throughout the different groups, these variables being preselected in a prior step from the 309 most important variables used in the projection of scores on the factorial map given by PLS-DA, it gives a similar projection of individuals on the factorial plan 1×2 (data not shown), with LD1 and LD2 representing 43.8 and 25.2% of the between-group variance, respectively. When Mahalanobis distances between the different male and female groups are computed from this LDA, the progression of the metabolic disruption is more important in females than in males (Table 2a). Indeed, even with a prior ANOVA correction taking into account the block effect existing between the different animal groups euthanized either 15 days or 8 and 21 days after the onset of the experimentation, it seems that in males, the maximal intensity in the metabolic disruption observed in aqueous liver extracts is already observable on the 15th day when mice were fed a diet containing either 3 or 9% HR, the Mahalanobis distances between these different groups being not significantly different from zero. By contrast, in females, the metabolic disruption in liver is more intense in the group of animals fed a 9% HR diet for 8−21 days than in animals fed a 3% HR diet.

The first component, which explains a significant hepatic metabolic contrast between males and females but also a HR dose−effect relationship for both genders, is complex. Only two variables were identified as follows: nicotinamide at $\delta = 8.74$ ppm and inosine at $\delta = 8.26$ ppm, which are, respectively, positively and negatively correlated to the first component. Among variables that are highly correlated to the second component, only one variable has been identified; it displays a chemical shift at 3.34 ppm and corresponds to *s*-Ins (Table 3a).

Metabolic Disruptive Events in Brain. As for liver, no significant structuring of the metabolic information coming from ^{1}H NMR fingerprints of lipophilic brain extracts can result from multivariate treatment. On the contrary, metabolic deviations proportional to the HR dose ingested and to the duration of intoxication are well-demonstrated in the brain aqueous extracts of either males or females (Figure 4a). Whatever the gender considered, the first LD, which accounts for 90.3% of the between-group variance, is mainly explained by a HR dose effect. In addition, within each HR concentration group, we can notice from the projection of individuals on LD1 a gradient in the metabolic disruption explained by the HR feeding duration (Figure 4a). For a given gender, all Mahalanobis distances between different groups for a given HR treatment duration are highly significant ($p < 0.0001$), except for males fed a 3% HR diet for either 15 or 21 days, which display a very similar brain metabolic deviation (Table 2b). In brain hydrosoluble extracts, the first variable mainly involved in the building of LD1 stands for the metabolite identified as *s*-Ins with a characteristic ^{1}H chemical shift at $\delta = 3.34$ ppm ($\rho > 0.99$). The 2D ^{1}H−^{13}C HSQC NMR experiment achieved on three pooled samples, which have been concentrated by freeze-drying, confirmed this assignment (data not shown). Indeed, on the spectrum, we could notice a correlation between the signal at 3.34 ppm (^{1}H chemical shift) and the signal at 76.3 ppm (^{13}C chemical shift), which unambiguously correspond to *scyllo*-inositol. Interestingly, the variation in the relative concentrations of *s*-Ins is opposed to the one of *myo*-inositol (*m*-Ins) ($\delta = 3.60$ ppm, $\rho = -0.70$), which is the second more important variable canonically linked to LD1. This contrasted metabolic fingerprint in the spectral region at $\delta = 3.34$ ppm (*s*-Ins) is easily observable in ^{1}H NMR spectra of brain extracts prepared from animals treated with 9% HR (Figure 5). Some other variables are canonically linked to LD1: valine ($\delta = 1.05$ ppm, $\rho = -0.31$), alanine ($\delta = 1.49$ ppm, $\rho = -0.30$), and inosine ($\delta = 6.06$ ppm, $\rho = 0.16$) (Table 3b).

Analysis of the variation of *m*-Ins/creatine and *s*-Ins/creatine ratios according to HR concentration present in the diet has been performed using for the calculation of the *m*-Ins variable the geometric mean of the two variables corresponding to two among the four chemical shifts of *m*-Ins found as canonical variables in LDA (Figure 4b). Contrarily to *s*-Ins/creatine concentrations, which significantly increase with HR dose ($p < 10^{-6}$) whatever the mice gender considered, *m*-Ins/creatine ones are weakly but significantly decreased by the HR treatment ($p = 3 \times 10^{-5}$), and no additional difference is further explained by a dose effect being detected between 3 and 9% HR-treated animals (Figure 4b). So, in brain, the relative increase in *s*-Ins concentrations seems to be a valuable biomarker of the metabolic disruption induced by HR ingestion.

Although it is highly significant, the second LD, which accounts for only 2.8% of the modeled variance, is not easily explainable when considering the controlled factors used in this study. Biomarkers correlated to this LD are identified as alanine, *m*-Ins, glutamine, and glutamic acid (Table 3b). Because of the seemingly "size" factor displayed by the first LD and the difficulty to correlate the second LD to any controlled factor, a data preprocessing has been performed, which consists in sequential OSC-based PLS regressions, considering first the gender factor, then the HR dose factor, and last the group factor. At each step, three orthogonal components have been calculated, and the initial metabolic information, which decreases successively to 33.5, 23.8, and 20.7%, has been corrected efficiently according to these factors. After such an OSC-PLS-driven data correction, the first component modeled by PLS-DA gives a significant discrimination between control animals and HR-treated animals with, in addition, a clear distinction between

Table 2. Summary of *p* Values for Mahalanobis Distances between Either Different Female (Lower Left Triangular Matrix) or Male Groups (Upper Right Triangular Matrix), Which Are Calculated from LDA Performed on the 30 Most Important Metabonomic Variables Selected from Aqueous Liver Extracts (a) and Aqueous Brain Extracts (b), Are Not Significantly Different from Zero[a]

a. Aqueous liver extract fingerprints

		HR-3%			HR-9%			Control				Males
		8	15	21	8	15	21	8	15	21	Groups	
HR-3%	8		0.0404	0.4228	0.0214	0.0053	0.1808	0.0003	0.0002	<0.0001	8	
	15	0.0079		0.3365	0.0876	0.0775	0.1746	<0.0001	0.0002	<0.0001	15	HR-3%
	21	0.0174	<0.0001		0.2122	0.0770	0.5568	0.0002	0.0010	<0.0001	21	
HR-9%	8	0.0042	<0.0001	0.0096		0.0868	0.3605	<0.0001	0.0002	<0.0001	8	
	15	0.0160	0.0534	0.0002	0.0010		0.3101	<0.0001	<0.0001	<0.0001	15	HR-9%
	21	0.1704	0.0005	0.0493	0.0285	0.0213		<0.0001	0.0005	<0.0001	21	
Control	8	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		0.034	0.0003	8	
	15	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0465		0.0035	15	Control
	21	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0080	0.0719		21	
	Groups	8	15	21	8	15	21	8	15	21		
Females		HR-3%			HR-9%			Control				

b. Aqueous brain extract fingerprints

		HR-3%			HR-9%			Control				Males
		8	15	21	8	15	21	8	15	21	Groups	
HR-3%	8		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	8	
	15	<0.0001		0.1051	0.0082	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	15	HR-3%
	21	<0.0001	0.0627		0.0081	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	21	
HR-9%	8	<0.0001	0.0004	0.0024		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	8	
	15	<0.0001	<0.0001	0.0015	<0.0001		0.0003	<0.0001	<0.0001	<0.0001	15	HR-9%
	21	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0111		<0.0001	<0.0001	<0.0001	21	
Control	8	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		0.0548	0.0073	8	
	15	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.3321		0.0168	15	Control
	21	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0303	0.0007		21	
	Groups	8	15	21	8	15	21	8	15	21		
Females		HR-3%			HR-9%			Control				

[a] Nonsignificant *p* values are in dark gray. The first diagonal (cells in light grey) corresponds to the physical separation between the female (lower) and male (upper) distance matrices.

animals fed a 3% HR diet from animals fed a 9% HR diet (data not shown). Additionally, the second component gives a significant separation between males and females. This PLS-DA is very comparable to the one obtained from fingerprint data acquired on liver hydrosoluble extracts of the same animals.

Canonical Relationships between Brain and Liver Metabolic Signatures. A parallel structuring of metabolic information in liver and brain collected from the same treated animals is a preliminary requirement to search a more global view in metabolic disruptive events that may appear simultaneously in different organs. For establishing such a global correlation between some specific tissular metabolic signatures, a PLS2 analysis has been performed, which is fundamentally a canonical analysis and corresponds to the projection of one first principal component obtained on a given *X* matrix (here, ^{1}H NMR spectra coming from hydrosoluble liver extract fingerprints) on another first principal component obtained on a given *Y* matrix (here, ^{1}H NMR spectra coming from hydrosoluble brain extract fingerprints), these two matrices being obtained on the same individuals. Raw fingerprint data were preprocessed as described above by ANOVA and/or OSC-PLS-driven correction procedures to discard some existing block effect and the variance, which cannot be modeled by any controlled factor studied here. A significant correlation between the two first PLS2 components calculated between hydrosoluble brain and liver metabolomes has been established and gives on the resulting biplot an opposition between males and females and, orthogonally, an opposition between control and HR-treated animals (Figure 6). Variables explaining this information structuring with a norm above 0.5 have been projected on the same plot. From this global regression between ^{1}H NMR fingerprint data acquired from liver aqueous extracts and from brain aqueous extracts, a close proximity between the two respective more informative biomarkers of HR intoxication, that is, *s*-Ins in liver and in brain, is

Table 3. Summary of Major Metabolites in Liver (a) and Brain (b) Aqueous Extracts Involved in the Building of LD1, LD2, and LD3 Assigned According to their ^{1}H Chemical Shift δ (ppm) by Comparison with NMR Chemical Shift Assignment Tables[a]

(a) Aqueous liver extract

^{1}H Chemical shift δ (ppm), multiplicity[b]	LD1 ρ	LD1 *rank*	LD2 ρ	LD2 *rank*	LD3 ρ	LD3 *rank*	Metabolites	Change with HR treatment
8.74,d	0.80	*4*	0.44		-0.25		nicotinamide	↗
8.26,s	-0.60		-0.00		-0.12		inosine	↘
3.34,s	0.45		0.65	*3*	0.29	*7*	*scyllo*-inositol	↗

(b) Aqueous brain extract

^{1}H Chemical shift δ (ppm), multiplicity[b]	LD1 ρ	LD1 *rank*	LD2 ρ	LD2 *rank*	LD3 ρ	LD3 *rank*	Metabolites	Change with HR treatment
3.34,s	0.99	*1*	0.01		-0.00		*scyllo*-inositol	↗
3.60,t	-0.69	*2*	0.33	*4*	0.29		*myo*-inositol	↘
1.05,d	-0.31	*3*	0.28		0.47	*2*	valine	↘
1.49,d	-0.30	*9*	0.39	*2*	0.37	*5*	alanine	↘
6.06,d	0.15		0.20		0.05		inosine	↗
2.36,m	-0.06		-0.14		-0.31	*6*	glutamine	↘
4.09,q	0.01		-0.00		0.43	*4*	lactate	↗
2.08,m	-0.01		-0.47	*1*	-0.00		glutamate	↘
3.93,s	0.00		0.04		-0.01		creatine	↗

[a] The correlation sign of each metabolite enables us to explain changes of direction in response to the HR treatment. [b] Key: d, doublet; t, triplet; s, singlet; br, broad; m, multiplet; and q, quadruplet.

clearly established (Figure 6). Interestingly, the brain variable named B3.60 corresponding to *m*-Ins (δ = 3.60 ppm) is projected at the opposite part of these two metabolic biomarkers but not the corresponding liver variable named L3.60, the variation in the relative hepatic *m*-Ins content being linked to a gender effect, whatever the HR treatment used (dose and duration). Additionally, among the main informative variables involved in describing HR intoxication in brain, glutamate has also been identified at δ = 3.38 ppm.

In Vivo MRI in Brain of 9% HR-Treated Mice. Spectra have been obtained from ^{1}H NMR data acquired by in vivo MRI using a VOI positioned in the thalamus of control and 9% HR-treated male mice (Figure 7a). In vivo preliminary MRI studies using a VOI positioned in the cortex of HR-treated mice did not enable us to easily display a ^{1}H resonance, which was attributed to *s*-Ins, contrarily to what we have detected in the thalamus. In this region, only the 9% HR-treated mice display a significant although minor signal found at a chemical shift of 3.34 ppm corresponding to *s*-Ins but not the control mice (Figure 7b). A one-way ANOVA has been performed for every other assigned variable quantified at the same time from raw integrated spectra coming from in vivo MRI and enables us to give significant results only for *s*-Ins (p = 0.0013). Nevertheless, a PLS2-based canonical regression between this set of brain metabolites and the ^{1}H NMR fingerprints of hydrosoluble brain extracts performed on the same animals has been obtained after correcting the two data sets by an OSC-PLS-driven correction procedure. More precisely, for ^{1}H NMR fingerprints acquired on hydrosoluble brain extracts, the raw data set has been submitted to an OSC-based PLS correction, which rejects 49.6% of the initial metabolomic variance. For the different 14 brain metabolites quantified from the raw integrated spectra issued from in vivo MRI, the arsin ($\sqrt{p}$) transformation of every variable expressed in percent is necessary to get a better variance homogeneity. Data have then been corrected by an OSC-based PLS regression, which discards up to 55.6% of the initial variance, which cannot be explained by the HR treatment factor. The canonical analysis obtained by the PLS2 analysis between these two so-corrected data sets showed that the ^{1}H NMR variable named B3.34 is again projected where scores of HR-treated animals are found (Figure 7c). Besides, the relative content in the following MRI variables corrected as described above, that is, *N*-acetyl-aspartate, lactate, and choline, is increased after HR treatment ($p < 10^{-5}$, p = 0.02, and p = 0.03, respectively) when the relative glutamine concentration is lowered in response to HR treatment (p = 0.04) (Figure 7c).

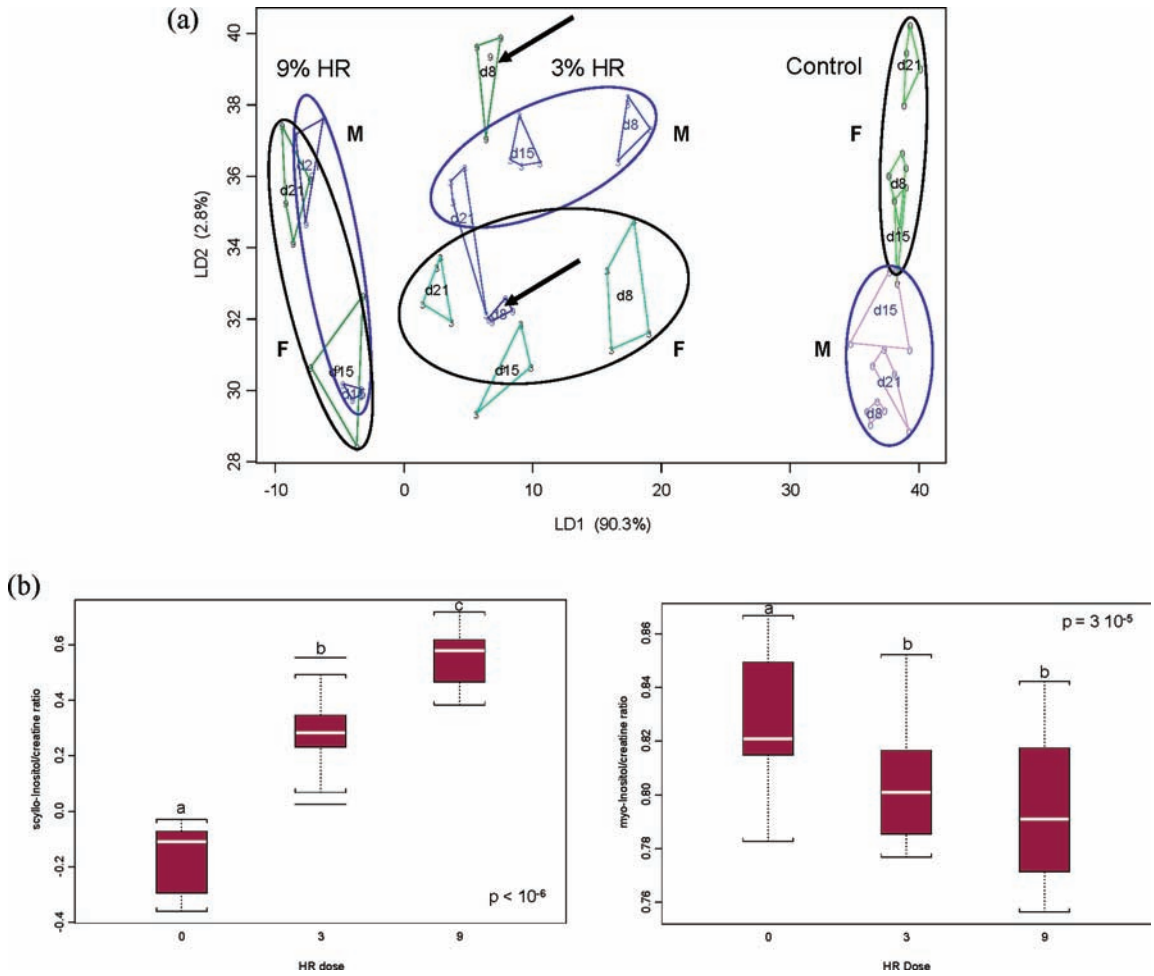


Figure 4. (a) LDA performed on 20 variables filtered from 600 MHz ^{1}H NMR data of brain aqueous extracts from male and female mice according to groups and in accordance with the two first components. Barycenters give the dates for organ collection and correspond to the duration of HR intoxication (d8, day8; d15, day15; and d21, day21). The two arrows marked on female (green) and male (blue) mice euthanized on the eighth day HR postadministration were fed a 9% HR diet for 8 days and displayed an incomplete progression toward a full established toxicity when compared to animals groups treated with the same dose for 15 or 21 days. (b) Variation of mean value of *scyllo*-inositol/creatine and *myo*-inositol/creatine ratios according to the HR dose incorporated in the diet. Multiple comparisons between the doses have been performed after a one-way ANOVA by Tukey's test.

Discussion

In the present study, we have used the scrutiny power of metabonomics to find putative metabolic biomarkers of an orphan neurological disease in horse, the Australian stringhalt, which results from ingestion of inflorescences of HR. Without having any prior knowledge on the toxic principle or having any practical possibility to perform experiments on the target species but by only tracking some hypothetical orthologous metabolic disruptions in a supposedly target organ, the brain, we showed that mouse was a convenient laboratory animal model. Indeed, our previous experimental investigations performed on laboratory species like rat or mouse fed a diet containing 1−3% HR for a few weeks did not enable us to reproduce any symptom of the disease, and as a consequence, we were unable to find any direct explanation for the neurotoxicological mechanism really involved. To get valuable candidate biomarkers, we have chosen to find a "metabolically competent" laboratory animal model like mouse, even though it does not seem to be an animal model usable for easily reproducing the neurological disease, and we have tried to apply an holistic approach to obtain some pertinent metabolic information about the target organs and metabolites involved in some HR-induced disruptive events. Indeed, from urine and liver metabolic signatures, we were able to quantify a HR-induced effect on the general metabolism, which was proportional to the HR dose administered and to the HR intoxication duration. From the metabonomic examination of brain hydrosoluble extracts, we were able to access meaningful metabolically driven disruptive events in the nervous system, which is a probable target tissue in the laboratory animal model given the symptomatology established in horses. Indeed, in horses, the disease affects the peripheral nervous system, leading to an abnormal gait due to an ascending peripheral distal axonopathy involving long myelinated nerve fibers of the hind limbs (*5, 9, 20*).

Using such a pragmatic approach, our results show that mouse displays a metabolic disruption after HR ingestion, which is proportional to the HR dose ingested and to the length of HR exposure, with an increase in *scyllo*-inositol found in urine and in hydrosoluble extracts prepared from liver or brain. Besides, these two latter matrices display an interesting global statistical correlation.

Indeed, in urine, even though a large part of the metabolic information is explained by the gender factor as revealed by the first LD (Figure 1), the HR response is unequivocally revealed by the second LD in both genders, with a more pronounced metabolic response for females than males after HR ingestion displayed on the third one, which may result from a well-established metabolic sexual dimorphism (*21*). Our results

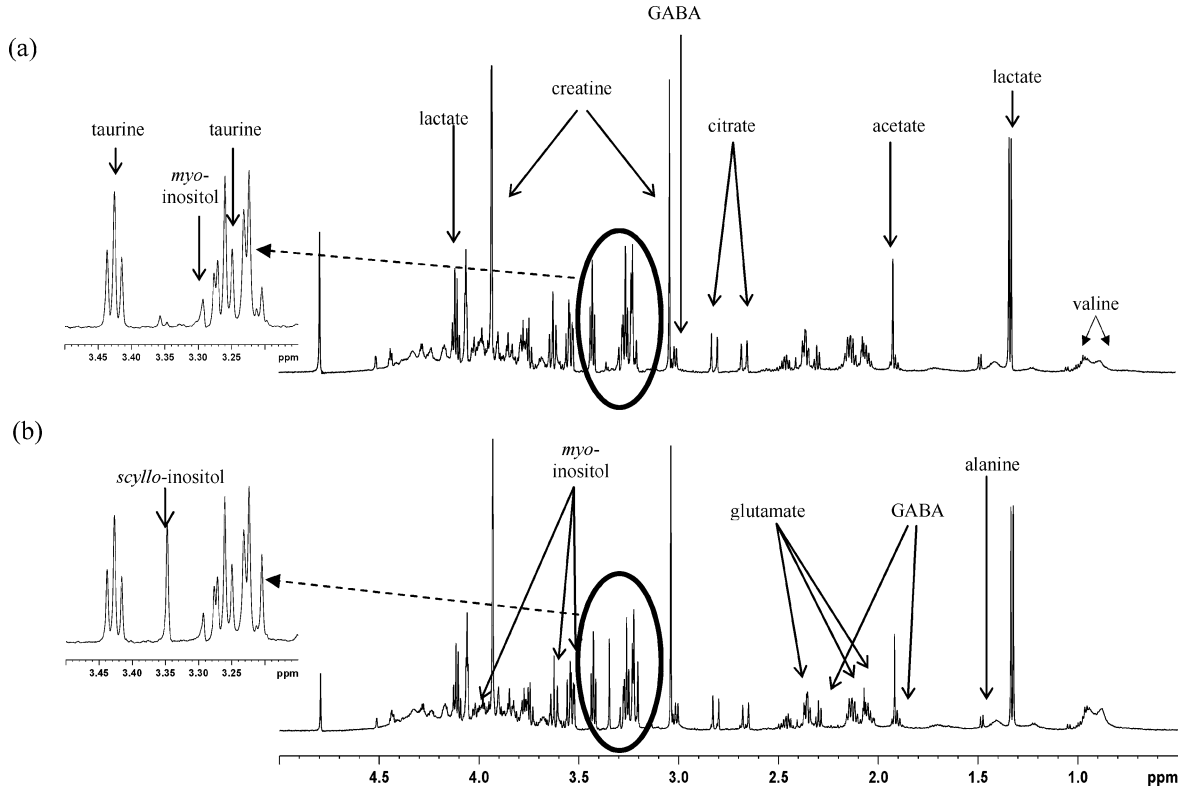


Figure 5. Comparison of fingerprints acquired on brain aqueous extracts prepared from a control mouse (a) and a mouse fed a diet containing 9% HR (b). Note the significant ^{1}H chemical shift present at $\delta = 3.34$ ppm in the spectrum coming from a treated male mouse, which is quite indiscernible from basal line in the spectrum of a control male mouse.

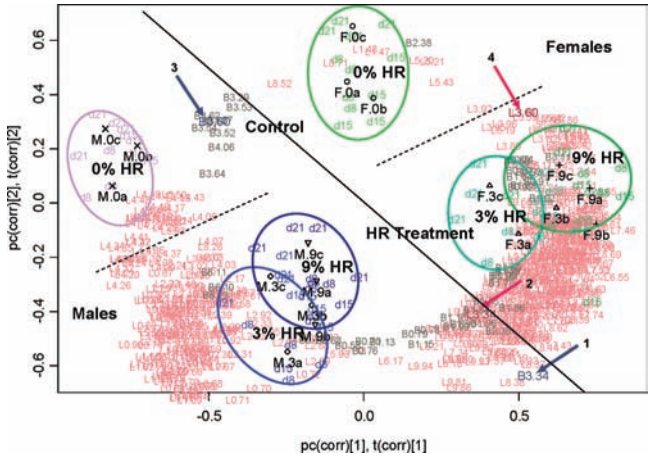


Figure 6. Resulting biplot performed on the two first PLS2 components calculated between hydrosoluble brain and liver metabolomes. Raw fingerprint data were preprocessed as described for aqueous liver and brain extract fingerprinting by an ANOVA and/or OSC-PLS-driven correction procedures. A loadings projection is given for metabonomic variables having a norm above 0.5 (light gray for brain loadings and light red for liver ones). The brain variable is named B3.34 (arrow numbered 1) corresponding to *scyllo*-inositol detected at $\delta = 3.34$ ppm, and the corresponding liver variable is named L3.34 (arrow numbered 2). The brain variable is named B3.60 (arrow numbered 3) corresponding to *myo*-inositol detected at $\delta = 3.60$ ppm, and the corresponding liver variable is named L3.60 (arrow numbered 4).

based on robust multidimensional statistical procedures show that HR ingestion leads in males as well as in females to a specific metabolic answer, which is detectable at the urinary level with only few biomarkers highly related to the HR intoxication process (Table 1), hippurate and *scyllo*-inositol belonging to these most informative biomarkers explaining this LD.

In fact, the first LD, which reveals gender differences, is built from ubiquitous metabolic variables. Putrescine has been identified as the second most important canonical variable correlated to the first LD and may underline one marked sexual dimorphism of arginine metabolism in mice as shown previously (*22*). Arginine is the main precursor of ornithine, which gives putrescine by decarboxylation. Ruzafa et al. (*22*) have found that there is a marked renal sexual dimorphism in rodents, especially in mice, and the higher utilization of arginine by the male kidney might affect arginine homeostasis and contribute to a gender-dependent dimorphism in arginine content in kidney, muscle, plasma, and urine as observed in mice. The other metabolites involved in gender-based discrimination are valine, TMA, and DMA. Concentration variations of DMA and TMA, which are coprocessed from degradation of dietary choline by symbiotic gut microbiota and mammalian enzyme systems (*23, 24*) and are involved in osmotic pressure balance between extra and intracellular fluid (*25*), may reveal an adjustment of the urine osmolality according to a sexual dimorphism.

Among the most important identified variables involved in LD2, which explain the HR-induced metabolic response, are found some ubiquitous metabolic variables such as creatinine and hippurate. Creatinine is highly negatively correlated to LD2, but this creatinine decrease in treated mice is not associated with increased levels of glucose, this latter situation being clearly a sign of nephrotoxicity (*26*). So, this creatinine decrease is not susceptible to be related to any HR-induced toxicity. Among the few other main metabolites canonically linked to LD2, hippurate is the most important. The increased excretion of urinary hippurate, a product resulting from conjugation of glycine to benzoic acid, is generally associated with an intestinal microbiota disturbance linked to a change in the gavage vehicle used in pharmacological studies in the diet composition when nutritional or toxicological studies are performed (*27, 28*).

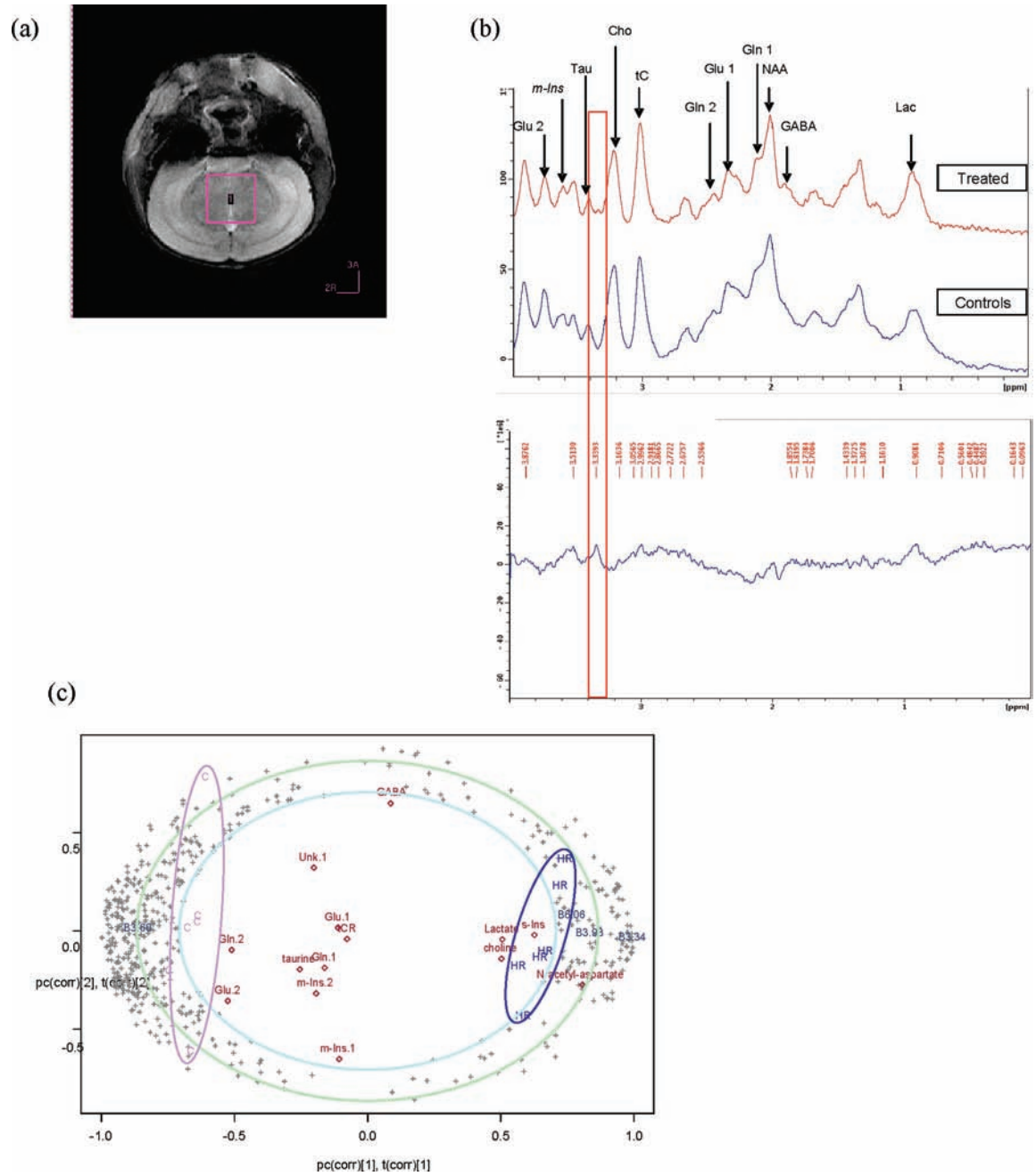


Figure 7. (a) MRI performed at 9.4 T on a Bruker Avance DRX 400 microimaging system positioned in the thalamus region with an in vivo parallel metabolite quantification using ^{1}H NMR localized spectroscopy (VOI, 12 mm^3). (b) Spectrum comparison between the sum of six ^{1}H NMR spectra acquired on control male mice and the sum of six ^{1}H NMR spectra acquired on 9% HR-treated male mice with the deduced difference spectrum revealing unambigously (red lines) the presence of *scyllo*-inositol having a chemical shift detected at $\delta = 3.34$ ppm. (c) PLS2 between MRI quantitative data [*Y*, transformed in arsin ($\sqrt{p}$) and corrected by an OSC-based PLS regression] and ^{1}H NMR data (*X*, transformed in log and corrected by OSC-based PLS regression). A loadings projection is given for metabonomic variables having a norm above 0.5 (pale blue circle) or above 0.75 (pale green circle). The purple and the dark blue ellipses, respectively, correspond to the scores of control and 9% HR-treated mice. Among the main MRI loadings having a positive correlation with HR treatment are *scyllo*-inositol (*s*-Ins), *N*-acetyl-aspartate, lactate, and choline, when MRI variables having a negative correlation with HR treatment are glutamate (Glu.2, second chemical shift) and glutamine (Gln.2, second chemical shift). Uninformative MRI loadings [*myo*-inositol, *m*-Ins.1 and *m*-Ins.2; glutamate, Glu.1 (first chemical shift); glutamine, Gln.1 (first chemical shift); GABA; taurine; and unknown.1, Unk.1] are projected in the center of the biplot.

Moreover, benzoic acid may derive from aromatic amino acids or plant phenolic compounds through the action of intestinal bacteria. The breakdown of dietary plant phenolic compounds by gut microflora may lead to the production of phenylpropionic acid, which is absorbed by the intestinal tract and may be excreted in urine as hippuric acid following one β-oxidation cycle. Here, the increased urinary hippurate is suggested to be due mainly to dietary precursors present in the HR-containing diet. However, as secondary metabolites, such plant precursors like the phenolic compounds are also responsible for a gut microflora redistribution, which results in modification of hippurate production without any associated toxicity (*29*). In addition, we cannot totally discard a complementary hypothesis linked to the presence of antinutrients in HR that would result in a decreased nutritional efficiency and, correlatively, in a relative increase in hippurate excreted in urine, even though the composition of the HR-based feeding was systematically corrected for energy and protein parameters by taking into account the characterization of energy and protein content of HR prior to animal experiments. Thus, hippurate and creatinine

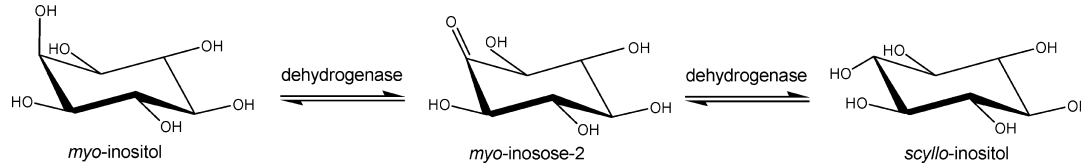


Figure 8. Structure of two among the nine possible isomers of hexahydroxycylcohexane: *scyllo*-inositol, detected in traces in the brain of normal subject, and *myo*-inositol, the major isomer, viewed in their favored chair configuration. Conversion between the two metabolites occurs by dehydrogenation of *myo*-inositol to *myo*-inosose-2, and reduction of the inosose to *scyllo*-inositol is postulated.

for LD2, and DMA and TMA for LD1, which stand for widespread urinary metabolites found in metabolic profiles, would not represent specific markers of HR intoxication (*4, 23, 24, 30*−*32*).

Although the HR fingerprint in secondary metabolites is unknown, and hence, it is not possible to really access the resulting urinary excretion profile in mice, it is highly improbable that some ^{1}H NMR signals assigned to plant secondary metabolites would be directly detected and, hence, would appear as discriminant variables, because of the too low sensitivity of NMR-based detection technique as compared to mass spectrometric techniques. In the present study, this relative drawback may rather represent an advantage in the sense that we were able to get information about the animal metabolic disruptions but not about the plant composition, which would appear otherwise only as a signature of diet change, not a toxicological one.

Contrary to these ubiquitous variables, which are useful metabolic tracers of age and diet factors, the second urinary variable the most involved in explanation of the HR-induced metabolic response held by the second LD has been identified as *s*-Ins. This biomarker is revealed here for the first time by a metabonomic approach, but it was quantified in rat brain by short echo time ^{1}H NMR 10 years ago (*33*). Until now, this isomer of *myo*-inositol has not been revealed in urinary metabolic profiles even though it has already been identified and measured out by conventional methods in human or porcine urine (*34, 35*). The importance of *s*-Ins found as a HR intoxication marker in urine is reinforced by analysis of hepatic metabolic profiles.

Indeed, even though fingerprinting results obtained from hydrosoluble hepatic extracts do not give directly any structuring results contrarily to those obtained from urine data, that is, without any data preprocessing, we are able to confirm, after an efficient data correction procedure, the existence for both genders of a parallel evolution of the metabolism in response to the ingestion of the plant with the involvement of *s*-Ins as a major biomarker. However, the dose−response effect is not clear enough because of the prevailing contribution of the gender effect on data. Indeed, sex differences and hormonal influences play a significant part in drug-induced metabolic response in treated animals and are still causative factors in metabolite composition variation of biofluids and organs, which reflects general metabolism (*36, 37*).

s-Ins is one of the nine possible isomers of inositol. *m*-Ins and *s*-Ins are the main inositols found in organisms and are identified and measured in many tissues (*38, 39*). *m*-Ins is the most ubiquitous inositol form and is present in brain, liver, and kidney. It contributes more than 90% to the total inositol content of mammalian cells. Among its main roles, *m*-Ins is a precursor for synthesis of inositides and particularly phosphatidylinositol, an important phospholipid found in membranes and a second messenger found in neural receptor signaling systems (via its phosphorylated derivatives). In its free form, *m*-Ins is also involved in osmoregulatory processes (*40*). *s*-Ins is the second largest isomer after *m*-Ins found in brain, and the majority of the literature supports the role of *m*-Ins as a precursor of *s*-Ins after isomerization via the *myo*-inosose (*35, 39, 41*) (Figure 8).

The scarce epidemiologic data in the target species and our metabonomic results indicate that the central nervous system needs to be more specifically investigated concerning the possible effects of *s*-Ins. Indeed, involvement of *s*-Ins as a metabolically valuable intoxication biomarker can be confirmed from metabonomic explorations performed on hydrosoluble brain extracts, and its presence in the brain is unequivocally magnified by MRI investigations. Physiologically and compared to *m*-Ins concentrations, *s*-Ins are very low in peripheral and central nervous systems. Contrary to *m*-Ins, functions of *s*-Ins in brain are still unknown. Yet, many previous studies have already shown that changes in *s*-Ins concentrations are observed in several neuropathological diseases. Indeed, a *s*-Ins increase is often associated with central nervous system disturbances or complications. In some clinical studies, *s*-Ins was revealed as a new biomarker of brain metabolism disturbances induced by chronic alcoholism (*42*), and a significant increase in this metabolite has also been found in the brain of patients with Alzheimer's disease (*43*). In the case of cerebral damage induced by a tumor, the gliomatosis cerebri, authors have shown that neurological improvement induced by Temozolomide, an antineoplastic drug, was associated with a marked reduction in *s*-Ins content (*44*). Thus, the *s*-Ins concentration increase in brain is linked to a neuropathological status or an evolution toward a neuropathological state. Generally, evolution in concentrations of *s*-Ins and *m*-Ins is parallel in physiological cases but also in several pathological cases as in chronic alcoholism and in Alzheimer's dementia (*42*). In our study, multidimensional analyses like factial analyses or hierarchical classification tree analysis (data not shown), but also analysis of relative concentrations corrected to those of creatine, show together that only *s*-Ins concentrations in brain are increased when *m*-Ins ones are significantly decreased, suggesting that the mechanism that leads to such a result displays an uncoupling between *s*-Ins and *m*-Ins concentrations and might be relatively specific of this short-term HR-mediated intoxication process. Probably, the underlined mechanism should be different from those involved in other nervous pathologies.

After having tested synthetic *m*-Ins free diets and synthetic diets containing added *m*-Ins on rats and rabbits, Sherman et al. concluded that dietary *m*-Ins and *s*-Ins do not contribute appreciably to the tissue levels of these inositols and could not be the unique source of variations in *s*-Ins observed (*39*). Moreover, Moore et al. underlined the time-limited increases in *m*-Ins in brain after *m*-Ins ingestion in humans (*45*). In our study, the increase in *s*-Ins was not really time-limited and suggests that it is not only a transient consequence of a dietary factor but probably results from disturbance in the *s*-Ins ↔ *m*-Ins equilibrium (Figure 8), underlining a disruption in cerebral metabolic homeostatic mechanisms and in inositol pathways.

Further information that allows thinking about a real intoxication process and not only a dietary impact coming from HR

ingestion is the rise in inosine associated with an increase in *s*-Ins concentrations measured in brain extracts (Table 3b). After an extracellular release of adenosine, a potent vascular mediator, inosine was shown to preserve both neuronal and glial cell viability during neurodegenerative disorders and during hypoxia (*46*), ischemia−reperfusion brain injury (*47*), or inflammation (*48*). Therefore, such an increase in brain inosine content might reveal here one coordinated protective mechanism against oxidative stress arising in response to HR-induced intoxication. The increase in creatine may also reflect some brain osmoregulation disruptions (*49*). It is linked to an increased metabolic activity coupled to a higher level of excitatory neurotransmission, and as a consequence, a higher concentration in creatine may be suggestive of a redistribution of cerebral osmolytes (*50*). Last, the relative decrease in alanine and valine concentrations observed here by ^{1}H NMR-based metabonomics and in glutamate concentrations observed by in vivo MRI may also be the sign of HR-induced neurotoxicity, as it could be found in the brain of rat after the application of a neurotoxin (*51*). In the PLS2 analysis combining quantitative data coming from in vivo MRI performed at the thalamus site and ^{1}H NMR fingerprint data obtained from aqueous brain extracts, we can notice that MRI variables like *N*-acetyl-aspartate (NAA) and glutamine are, respectively, increased and decreased in response to HR treatment. NAA is an amino acid derivative, which exists predominantly in the central nervous system and is present in high concentrations in the mammalian brain. It has been shown that its concentrations may provide a mean for estimating the extent of neurodegeneration and neuroexcitation properties (*52, 53*). However, its function in the nervous system is not still really known (*54*). Disruptions of NAA biosynthesis usually described in disease state evoke neuronal loss where NAA concentrations are decreased. The only disease where NAA is known to be increased is Cavanan's syndrome, a rare leukodystrophy affecting young children with a mutation in aspartoacyclase, an enzyme that cleaves NAA to the acetyl moiety and aspartate (*55, 56*). This disease is associated with a progressive demyelinating cerebral atrophy and spongy degeneration, which may have some similar characteristics with Australian stringhalt where primary lesions reported myelin degeneration of nerves (*5*) with segmental demyelination and remyelination (*20*) and, in some cases, lesions characterized by cavitation and leucoencephalomalacia (*57*). The measured levels of NAA are highly sensitive to brain injury or disease, so our results suggest that increased levels of NAA in the central nervous system may be linked to the cerebral metabolic disruption induced by a short-term HR exposure. The change in glutamine concentrations associated with modifications in glutamate enables us to confirm the presence of a dysfunction in brain too. Indeed, glutamate is the most abundant excitatory amino acid transmitter found in the CNS. Moreover, glutamate-mediated excitotoxicity and dysfunction of glutamate transmission have been hypothesized to play a major role in various neurodegenerative diseases, including Alzheimer disease (*58*−*60*). Changes in the glutamate−glutamine pool may be indicative of a modification in the glutamate−glutamine cycle, which is a major metabolic pathway in glutamate production and detoxification in the cell (*61*). The changes in metabolism of glutamate and glutamine may additionally underline disruptions in pathways between glial cells and neurons (*62*). The increase in lactate concentrations detected in the same PLS2 analysis (Figure 7c), which had also been previously revealed by ^{1}H NMR-based metabonomics, gives us some complementary elements that might fit in with inosine results. Indeed, in brain, lactate is usually only detected under pathologic conditions when energy metabolism is severely affected. When the oxygen supply is reduced, aerobic mitochondrial energy production is reduced and a compensatory anaerobic energy production by glycolysis increases (*63*). Last, choline, another variable issued in the present study from in vivo MRI, also seems to be increased in the brain of mice treated by 9% HR. Usually associated with myelin, the choline signal includes phosphorylcholine, glycerophosphocholine, and free choline. Choline is involved in the synthesis of insoluble membrane phospholipids, and glycerophosphocholine is a product of membrane degradation (*63*). So, a relative increase in choline concentrations could be associated with an increase in membrane breakdown or its turnover or with a demyelination (*64, 65*). However, elevated choline may also reflect prelesional changes in myelin without any concomitant demyelination (*66*) and may be associated with an inflammatory state and a glial cell proliferation (*67*) and in acute biochemical disorders as it was shown in the inflammatory state present in Alzheimer disease (*68*) (*69*). In these cases, such an increase is due to an increased turnover of membranes (*70*). Besides, because free choline is a precursor for the biosynthesis of acetylcholine, a dysfunction of the cholinergic pathway may also be associated with an increase in the choline biomarker.

All of these data concerning cerebral metabolites changes suggested that HR ingestion might lead to an original metabolic fingerprint indicative of both neuronal and glial dysfunctions associated with disruption in energetic metabolism, energy homeostasis, and osmoregulation (*49*), even though the link between all of these metabolic disruptions is still unclear and needs further investigations.

The discovery of *s*-Ins as a main brain metabolite involved in the HR-induced toxicity enables us to go back on some features characterizing the HR-induced horse disease. *m*-Ins and *s*-Ins contents in nerve cells are linked to sodium pump activity and nerve conduction velocity, as shown in peripheral neuropathies. Diabetic neuropathy is also a particularly common form of peripheral neuropathy with primary axonopathy, which preferentially involves longer myelinated axons (*71*). Such neuropathological observations have also been done on horses with Australian stringhalt (*5, 6, 20*), and in this case, the abnormal gait is due to an ascending peripheral distal axonopathy involving long myelinated nerve fiber of the hind limbs. Study of analogies between such diseases would require evidently further clinical, histological, and biochemical investigations.

In addition to neurodegenerative diseases, alterations in the brain and cerebrospinal fluid (CSF) of inositol concentrations have been reported in a number of studies on Down's syndrome and psychiatric or behavior disorders (*43, 72, 73*). Indeed, the CSF inositol concentration has been reported to be significantly lower in unipolar and bipolar depressed patients (*74*) but also in suicide victims (*75*). These first results led Moore et al. to suggest that *m*-Ins may be decreased in the brain of subjects with affective disorders, leading to a decrease in the efficiency of the phosphatidyl inositol second messenger system and in important changes in neuronal signal transduction. Additionally, *m*-Ins has been suggested to have antidepressant effects on humans (*45*). According to all of these observations issued from the past decade literature and from our own results, the involvement of *s*-Ins in several neurological and behavior disorders should be investigated by specific behavioural studies performed in mice in which ingestion of HR may have a measurable effect that could parallel the induced metabolic disruption established here. These complementary studies are currently performed, and this promising behavioral characterization will be useful to better define the mouse as a valuable

metabolic model of the HR-mediated intoxication described in horse given that a functional link between metabolic disorders and physiological disruptions can therefore emerge. Finally, taking advantage that a disruptive metabolic event induced by the same toxicological perturbation may appear orthologously in different animal species, this study enabled us to obtain a putative marker of Australian stringhalt that needs now to be validated in horse breeding conditions to assess its clinical relevance.

Acknowledgment. We gratefully acknowledge the excellent technical support during metabonomic studies of Florence Blas Y Estrada and Raymond Gazel for technical assistance and their contribution in the animal experimentation.

References

(1) Nicholson, J. K., Lindon, J. C., and Holmes, E. (1999) 'Metabonomics': Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica 29*, 1181–1189.

(2) Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C., and Holmes, E. (2002) Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discovery 1*, 153–161.

(3) Gavaghan, C. L., Holmes, E., Lenz, E., Wilson, I. D., and Nicholson, J. K. (2000) An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: Application to the C57BL10J and Alpk:ApfCD mouse. *FEBS Lett. 484*, 169–174.

(4) Gavaghan, C. L., Wilson, I. D., and Nicholson, J. K. (2002) Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: Use of orthogonal signal correction and PLS-DA. *FEBS Lett. 530*, 191–196.

(5) Slocombe, R. F., Huntington, P. J., Friend, S. C., Jeffcott, L. B., Luff, A. R., and Finkelstein, D. K. (1992) Pathological aspects of Australian Stringhalt. *Equine Vet. J. 24*, 174–183.

(6) Huntington, P. J., Jeffcott, L. B., Friend, S. C., Luff, A. R., Finkelstein, D. I., and Flynn, R. J. (1989) Australian Stringhalt—Epidemiological, clinical and neurological investigations. *Equine Vet. J. 21*, 266–273.

(7) Araya, O., Krause, A., and Solis de Ovando, M. (1998) Outbreaks of stringhalt in southern Chile. *Vet. Rec. 142*, 462–463.

(8) Gay, C. C., Fransen, S., Richards, J., and Holler, S. (1993) Hypochoeris-associated stringhalt in North America. *Equine Vet. J. 25*, 456–457.

(9) Gardner, S. Y., Cook, A. G., Jortner, B. S., Troan, B. V., Sharp, N. J. H., Campbell, N. B., and Brownie, C. F. (2005) Stringhalt associated with a pasture infested with *Hypochoeris radicata*. *Equine Vet. Educ. 17*, 118–122.

(10) Gouy, I., Egron, G., Leblond, A., and Cadoré, J. L. (2005) Study of Australian Harper disease after an outbreak in the Lyon area. *Prat. Vét. Equine 37*, 53–60.

(11) Cahill, J. I., and Goulden, B. E. (1992) Stringhalt-current thoughts on aetiology and pathogenesis. *Equine Vet. J. 24*, 161–162.

(12) Lindon, J. C., Holmes, E., and Nicholson, J. K. (2003) So what's the deal with metabonomics? *Anal. Chem. 75*, 384A–391A.

(13) Holmes, E., Tsang, T. M., and Tabrizi, S. J. (2006) The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. *NeuroRx 3*, 358–372.

(14) Hodavance, M. S., Ralston, S. L., and Pelczer, I. (2007) Beyond blood sugar: the potential of NMR-based metabonomics for type 2 human diabetes, and the horse as a possible model. *Anal. Bioanal. Chem 387*, 533–537.

(15) Brindle, J. T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J. K., Bethell, H. W., Clarke, S., Schofield, P. M., McKilligin, E., Mosedale, D. E., and Grainger, D. J. (2002) Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ^{1}H-NMR-based metabonomics. *Nat. Med. 8*, 1439–1444.

(16) Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A., and Le, B. N. (1951) Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem. 191*, 833–841.

(17) Waters, N. J., Holmes, E., Waterfield, C. J., Farrant, R. D., and Nicholson, J. K. (2002) NMR and pattern recognition studies on liver extracts and intact livers from rats treated with [alpha]-naphthyl-isothiocyanate. *Biochem. Pharmacol. 64*, 67–77.

(18) Dumas, M. E., Canlet, C., Andre, F., Vercauteren, J., and Paris, A. (2002) Metabonomic assessment of physiological disruptions using 1H 13C HMBC-NMR spectroscopy combined with pattern recognition procedures performed on filtered variables. *Anal. Chem. 74*, 2261–2273.

(19) Tkac, I., Starcuk, Z., Choi, I. Y., and Gruetter, R. (1999) In vivo ^{1}H NMR spectroscopy of ratbrain at 1 ms echo time. *Magn. Reson. Med. 41*, 649–656.

(20) Cahill, J. I., Goulden, B. E., and Jolly, R. D. (1986) Stringhalt in horses: a distal axonopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol. 12*, 459–475.

(21) Stanley, E. G., Bailey, N. J., Bollard, M. E., Haselden, J. N., Waterfield, C. J., Holmes, E., and Nicholson, J. K. (2005) Sexual dimorphism in urinary metabolite profiles of Han Wistar rats revealed by nuclear-magnetic-resonance-based metabonomics. *Anal. Biochem. 343*, 195–202.

(22) Ruzafa, C., Monserrat, F., Cremades, A., and Penafiel, R. (2003) Influence of dietary arginine on sexual dimorphism of arginine metabolism in mice. *J. Nutr. Biochem. 14*, 333–341.

(23) Dumas, M. E., Barton, R. H., Toye, A., Cloarec, O., Blancher, C., Rothwell, A., Fearnside, J., Tatoud, R., Blanc, V., Lindon, J. C., Mitchell, S. C., Holmes, E., McCarthy, M. I., Scott, J., Gauguier, D., and Nicholson, J. K. (2006) Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103*, 12511–12516.

(24) Gavaghan, C. L., Holmes, E., Lenz, E., Wilson, I. D., and Nicholson, J. K. (2000) An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences: Application to the C57BL10J and Alpk:ApfCD mouse. *FEBS Lett. 484*, 169–174.

(25) Heilig, C. W., Stromski, M. E., and Gullans, S. R. (1989) Methylamine and polyol responses to salt loading in renal inner medulla. *Am. J. Physiol. 257*, F1117–F1123.

(26) Dieterle, F., Schlotterbeck, G., Binder, M., Ross, A., Suter, L., and Senn, H. (2007) Application of metabonomics in a comparative profiling study reveals N-acetylfelinine excretion as a biomarker for inhibition of the farnesyl pathway by bisphosphonates. *Chem. Res. Toxicol. 20*, 1291–1299.

(27) Nicholls, A. W., Mortishire-Smith, R. J., and Nicholson, J. K. (2003) NMR spectroscopic-based metabonomic studies of urinary metabolite variation in acclimatizing germ-free rats. *Chem. Res. Toxicol. 16*, 1395–1404.

(28) Wang, Y., Holmes, E., Nicholson, J. K., Cloarec, O., Chollet, J., Tanner, M., Singer, B. H., and Utzinger, J. (2004) Metabonomic investigations in mice infected with Schistosoma mansoni: An approach for biomarker identification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101*, 12676–12681.

(29) Phipps, A. N., Stewart, J., Wright, B., and Wilson, I. D. (1998) Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica 28*, 527–537.

(30) Williams, R. E., Lenz, E. M., Lowden, J. S., Rantalainen, M., and Wilson, I. D. (2005) The metabonomics of aging and development in the rat: An investigation into the effect of age on the profile of endogenous metabolites in the urine of male rats using ^{1}H NMR and HPLC-TOF MS. *Mol. Biosyst. 1*, 166–175.

(31) Cloarec, O., Dumas, M. E., Craig, A., Barton, R. H., Trygg, J., Hudson, J., Blancher, C., Gauguier, D., Lindon, J. C., Holmes, E., and Nicholson, J. (2005) Statistical total correlation spectroscopy: An exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ^{1}H NMR data sets. *Anal. Chem. 77*, 1282–1289.

(32) Miyataka, H., Ozaki, T., and Himeno, S. (2007) Effect of pH on ^{1}H-NMR spectroscopy of mouse urine. *Biol. Pharm. Bull. 30*, 667–670.

(33) Pfeuffer, J., Tkac, I., Provencher, S. W., and Gruetter, R. (1999) Toward an in vivo neurochemical profile: Quantification of 18 metabolites in short-echo-time (1)H NMR spectra of the ratbrain. *J. Magn. Reson. 141*, 104–120.

(34) Fleury, P. F., Courtois, J. E., and Jouannet, A.L. (1951) Présence de scyllitol et autres alcools cycliques polyhydriques dans les urines. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 33*, 1885–1893.

(35) Helleu, C. (1957) Elimination urinaire du mésoinositol en relation avec le système digestif. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris) 39*, 633–640.

(36) Roth, M. E., Cosgrove, K. P., and Carroll, M. E. (2004) Sex differences in the vulnerability to drug abuse: A review of preclinical studies. *Neurosci. Biobehav. Rev. 28*, 533–546.

(37) Valle, A., Guevara, R., Garcia-Palmer, F. J., Roca, P., and Oliver, J. (2007) Sexual dimorphism in liver mitochondrial oxidative capacity is conserved under caloric restriction conditions. *Am. J. Physiol. Cell Physiol. 293*, C1302–1308.

(38) Sherman, W. R., Stewart, M. A., Simpson, P. C., and Goodwin, S. L. (1968) The identification of myo-inosose-2 and scyllo-inositol in mammalian tissues. *Biochemistry 7*, 819–824.

(39) Sherman, W. R., Stewart, M. A., Kurien, M. M., and Goodwin, S. L. (1968) The measurement of myo-inositol, myo-inosose-2 and scyllo-inositol in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta 158*, 197–205.

(40) Fisher, S. K., Novak, J. E., and Agranoff, B. W. (2002) Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem. 82*, 736–754.

(41) Fenili, D., Brown, M., Rappaport, R., and McLaurin, J. (2007) Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. *J. Mol. Med. 85*, 603–611.
(42) Viola, A., Nicoli, F., Denis, B., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Ranjeva, J. P., Viout, P., and Cozzone, P. J. (2004) High cerebral scyllo-inositol: A new marker of brain metabolism disturbances induced by chronic alcoholism. *Magma 17*, 47–61.
(43) Griffith, H. R., den Hollander, J. A., Stewart, C. C., Evanochko, W. T., Buchthal, S. D., Harrell, L. E., Zamrini, E. Y., Brockington, J. C., and Marson, D. C. (2007) Elevated brain scyllo-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease. *NMR Biomed. 20*, 709–716.
(44) Lodi, R., Setola, E., Tonon, C., Ambrosetto, P., Franceschi, E., Crino, L., Barbiroli, B., and Cortelli, P. (2003) Gliomatosis cerebri: clinical, neurochemical and neuroradiological response to Temozolomide administration. *Magn. Reson. Imaging 21*, 1003–1007.
(45) Moore, C. M., Breeze, J. L., Kukes, T. J., Rose, S. L., Dager, S. R., Cohen, B. M., and Renshaw, P. F. (1999) Effects of myo-inositol ingestion on human brain myo-inositol levels: A proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. *Biol. Psychiatry 45*, 1197–1202.
(46) Litsky, M. L., Hohl, C. M., Lucas, J. H., and Jurkowitz, M. S. (1999) Inosine and guanosine preserve neuronal and glial cell viability in mouse spinal cord cultures during chemical hypoxia. *Brain Res. 821*, 426–432.
(47) Hsiao, G., Lin, K. H., Chang, Y., Chen, T. L., Tzu, N. H., Chou, D. S., and Sheu, J. R. (2005) Protective mechanisms of inosine in platelet activation and cerebral ischemic damage. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 25*, 1998–2004.
(48) Yang, J. H., Luo, X., Nie, Y., Su, Y., Zhao, Q., Kabir, K., Zhang, D., and Rabinovici, R. (2003) Widespread inosine-containing mRNA in lymphocytes regulated by ADAR1 in response to inflammation. *Immunology 109*, 15–23.
(49) Ross, B., and Bluml, S. (2001) Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *Anat. Rec. 265*, 54–84.
(50) Bluml, S., Zuckerman, E., Tan, J., and Ross, B. D. (1998) Proton-decoupled ^{31}P magnetic resonance spectroscopy reveals osmotic and metabolic disturbances in human hepatic encephalopathy. *J. Neurochem. 71*, 1564–1576.
(51) Khandelwal, P., Beyer, C. E., Lin, Q., Schechter, L. E., and Bach, A. C. (2004) Studying rat brain neurochemistry using nanoprobe NMR spectroscopy: A metabonomics approach. *Anal. Chem. 76*, 4123–4127.
(52) Kitada, K., Akimitsu, T., Shigematsu, Y., Kondo, A., Maihara, T., Yokoi, N., Kuramoto, T., Sasa, M., and Serikawa, T. (2000) Accumulation of N-acetyl-L-aspartate in the brain of the tremor rat, a mutant exhibiting absence-like seizure and spongiform degeneration in the central nervous system. *J. Neurochem. 74*, 2512–2519.
(53) Chung, Y. L., Barr, J., Bhakoo, K., Williams, S. C., Bell, J. D., and Fraser, J. R. (2003) *N*-Acetyl aspartate estimation: A potential method for determining neuronal loss in the transmissible spongiform encephalopathies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol. 29*, 445–450.
(54) Moffett, J. R., Ross, B., Arun, P., Madhavarao, C. N., and Namboodiri, A. M. (2007) *N*-Acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol. 81*, 89–131.
(55) Austin, S. J., Connelly, A., Gadian, D. G., Benton, J. S., and Brett, E. M. (1991) Localized ^{1}H NMR spectroscopy in Canavan's disease: A report of two cases. *Magn. Reson. Med. 19*, 439–445.
(56) Grodd, W., Krageloh-Mann, I., Petersen, D., Trefz, F. K., and Harzer, K. (1990) In vivo assessment of *N*-acetylaspartate in brain in spongy degeneration (Canavan's disease) by proton spectroscopy. *Lancet 336*, 437–438.
(57) Robertson-Smith, R. G., Jeffcott, L. B., Friend, S. C., and Badcoe, L. M. (1985) An unusual incidence of neurological disease affecting horses during a drought. *Aust. Vet. J. 62*, 6–12.
(58) Scott, H. L., Pow, D. V., Tannenberg, A. E., and Dodd, P. R. (2002) Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. 22*, RC206.
(59) Kirvell, S. L., Esiri, M., and Francis, P. T. (2006) Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurochem. 98*, 939–950.
(60) Moussa, C. E., Rusnak, M., Hailu, A., Sidhu, A., and Fricke, S. T. (2008) Alterations of striatal glutamate transmission in rotenone-treated mice: MRI/MRS in vivo studies. *Exp. Neurol. 209*, 224–233.
(61) Danbolt, N. C. (2001) Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol. 65*, 1–105.
(62) Pears, M. R., Cooper, J. D., Mitchison, H. M., Mortishire-Smith, R. J., Pearce, D. A., and Griffin, J. L. (2005) High resolution ^{1}H NMR-based metabolomics indicates a neurotransmitter cycling deficit in cerebral tissue from a mouse model of Batten disease. *J. Biol. Chem. 280*, 42508–42514.
(63) Ross, A. J., and Sachdev, P. S. (2004) Magnetic resonance spectroscopy in cognitive research. *Brain Res. Brain Res. Rev. 44*, 83–102.
(64) Roser, W., Hagberg, G., Mader, I., Brunnschweiler, H., Radue, E. W., Seelig, J., and Kappos, L. (1995) Proton MRS of gadolinium-enhancing MS plaques and metabolic changes in normal-appearing white matter. *Magn. Reson. Med. 33*, 811–817.
(65) Davie, C. A., Hawkins, C. P., Barker, G. J., Brennan, A., Tofts, P. S., Miller, D. H., and McDonald, W. I. (1994) Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions. *Brain 117* (Part 1), 49–58.
(66) Tartaglia, M. C., Narayanan, S., De Stefano, N., Arnaoutelis, R., Antel, S. B., Francis, S. J., Santos, A. C., Lapierre, Y., and Arnold, D. L. (2002) Choline is increased in pre-lesional normal appearing white matter in multiple sclerosis. *J. Neurol. 249*, 1382–1390.
(67) Brenner, R. E., Munro, P. M., Williams, S. C., Bell, J. D., Barker, G. J., Hawkins, C. P., Landon, D. N., and McDonald, W. I. (1993) The proton NMR spectrum in acute EAE: The significance of the change in the Cho:Cr ratio. *Magn. Reson. Med. 29*, 737–745.
(68) MacKay, S., Meyerhoff, D. J., Constans, J. M., Norman, D., Fein, G., and Weiner, M. W. (1996) Regional gray and white matter metabolite differences in subjects with AD, with subcortical ischemic vascular dementia, and elderly controls with 1H magnetic resonance spectroscopic imaging. *Arch. Neurol. 53*, 167–174.
(69) Kaiser, E., Chiba, P., and Zaky, K. (1990) Phospholipases in biology and medicine. *Clin. Biochem. 23*, 349–370.
(70) Rae, C., Scott, R. B., Thompson, C. H., Dixon, R. M., Dumughn, I., Kemp, G. J., Male, A., Pike, M., Styles, P., and Radda, G. K. (1998) Brain biochemistry in Duchenne muscular dystrophy: A ^{1}H magnetic resonance and neuropsychological study. *J. Neurol. Sci. 160*, 148–157.
(71) Hirano, F., Tanaka, H., Okamoto, K., Makino, Y., Inaba, M., Nomura, Y., Fukawa, E., Miura, T., Tani, T., and Makino, I. (1995) Natural course of diabetic peripheral neuropathy in spontaneous-onset diabetic Chinese hamsters. *Diabetes Res. Clin. Pract. 28*, 151–159.
(72) Shetty, H. U., Holloway, H. W., and Schapiro, M. B. (1996) Cerebrospinal fluid and plasma distribution of myo-inositol and other polyols in Alzheimer disease. *Clin. Chem. 42*, 298–302.
(73) Atack, J. R., and Schapiro, M. B. (2002) Inositol monophosphatase activity in normal, Down syndrome and dementia of the Alzheimer type CSF. *Neurobiol. Aging 23*, 389–396.
(74) Barkai, A. I., Dunner, D. L., Gross, H. A., Mayo, P., and Fieve, R. R. (1978) Reduced myo-inositol levels in cerebrospinal fluid from patients with affective disorder. *Biol. Psychiatry 13*, 65–72.
(75) Shimon, H., Agam, G., Belmaker, R. H., Hyde, T. M., and Kleinman, J. E. (1997) Reduced frontal cortex inositol levels in postmortem brain of suicide victims and patients with bipolar disorder. *Am. J. Psychiatry 154*, 1148–1150.

TX800159X

Metabolic disruption study in rodents after Hypochoeris radicata (L.) ingestion, a plant responsible for Australian Stringhalt, a horse neurological disease. Validation of metabonomic approach by behavioural studies and brain Magnetic Resonance Imaging (MRI).

Abstract

Hypochoeris radicata (L.) (HR) ingestion leads to a horse neurological disease: Australian Stringhalt. Using metabonomics we investigated the HR-induced metabolic disruptions in laboratory rodents. We showed that mouse displays a HR dose-dependant metabolic disruption with an increase in *scyllo*-inositol found in urine and brain and liver hydrosoluble extracts. Complementary behavioural approach and cerebral magnetic resonance imaging enabled us to investigate the brain, a target organ. We validated the method, find a biomarker and the disrupted metabolic network sharing some common pathways with chronic alcoholism, Alzheimer's and Cavanan's diseases. Changes in choline, creatine, lactate and N-acetyl-aspartate would explain the clinical troubles in horse. Taurine and phenytoïne would interfere with some altered metabolic pathways in Stringhalt but don't represent specific treatment. This study is not only an answer to a clinic issue but a new slant of the research in toxicology.

Key words: Metabonomics, *Hypochœris radicata* (L.), *scyllo*-inositol, cerebral magnetic resonance imaging, behaviour, taurine, Australian Stringhalt, neurotoxicity

Etude des disruptions métaboliques provoquées chez le modèle murin par l'ingestion d'Hypochoeris radicata (L.), plante toxique pour l'espèce équine. Validation de l'approche métabonomique par des études comportementales et par imagerie cérébrale.

Résumé

L'ingestion d'*Hypochœris radicata* (L.) (HR) conduit à une maladie neuromusculaire du cheval, l'Australian Stringhalt. La toxicité de HR a été étudiée sur rongeurs par métabonomique et une augmentation dose-dépendante en *scyllo*-inositol a pu être révélée dans les urines, le foie et le cerveau, organe cible, exploré complémentairement par imagerie cérébrale et approche comportementale. Ceci a permis de valider la méthode, révéler un biomarqueur et le réseau métabolique perturbé, possédant des voies communes avec la polyneuropathie diabétique, l'alcoolisme, la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Cavanan. Les variations de concentrations en choline, créatine, lactate, N-acétyl-aspartate et inosine expliqueraient les troubles cliniques du cheval. La taurine et la phénytoïne interfèreraient dans certaines des voies mais ne constitueraient pas des traitements spécifiques. Plus qu'une réponse à une question de clinique, ce travail est une reconsidération de l'approche toxicologique.

Mots clés :
Métabonomique, *Hypochœris radicata* (L.), *scyllo*-inositol, imagerie cérébrale, comportement, taurine, Australian stringhalt, neurotoxicité