

Caractérisation métabolique de l'intoxication liée à l'ingestion d'*Hypochoeris radicata* chez le cheval

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement en 2009
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Mélinda, Jackie, Emilie COLLET

Née le 29 Septembre 1984, à TARBES (Hautes-Pyrénées)

Directeur de thèse : **Madame le Docteur Nathalie PRIYMENKO**

JURY

PRESIDENT :
M. Jean-Michel SENARD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
Mme Nathalie PRIYMENKO
M. Jean-Philippe JAEG

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE**

Directeur : M. A. MILON

Directeurs honoraires M. G. VAN HAVERBEKE.
M. P. DESNOYERS

Professeurs honoraires :

M. L. FALIU	M. J. CHANTAL	M. BODIN ROZAT DE MENDRES NEGRE
M. C. LABIE	M. JF. GUELFY	
M. C. PAVAUX	M. EECKHOUTTE	
M. F. LESCURE	M. D.GRIESS	
M. A. RICO	M. CABANIE	
M. A. CAZIEUX	M. DARRE	
Mme V. BURGAT	M. HENROTEAUX	

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. **BRAUN Jean-Pierre**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **DORCHIES Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
M. **TOUTAIN Pierre-Louis**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 1° CLASSE

M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 2° CLASSE

Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie et Thérapeutique*
M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistique, Modélisation*
M. **DUCOS Alain**, *Zootechne*
M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Réproduction, Endocrinologie*
M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

INGENIEUR DE RECHERCHE

- M. **TAMZALI Youssef**, *Responsable Clinique Equine*
M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine, Ophtalmologie*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, (DISPONIBILITE) *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie du Bétail*
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
M **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants.*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **MONNEREAU Laurent**, *Anatomie, Embryologie*
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
Mme **TROGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUEL

- Mlle **BUCK-ROUCH**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie du bétail*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie*
M. **SEGUELA Jérôme**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **GIN Thomas**, *Production et pathologie porcine*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales*
Mlle **TREVENNEC Karen**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*

Remerciements

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur Jean-Michel SENARD

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Pharmacologie

qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury.

Hommages respectueux.

Aux membres de notre jury de thèse,

Madame le Docteur Nathalie PRIYMENKO

Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Alimentation

qui nous a confié ce travail et son ordinateur.

Pour son appui, son enthousiasme et sa disponibilité.

Qu'elle trouve ici l'expression de notre vive gratitude et de notre profond respect.

Monsieur le Docteur Jean-Philippe JAEG,

Maître de Conférence de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pharmacie et Toxicologie

qui a aimablement accepté de participer à notre jury,

Sincères remerciements.

Dédicaces

A ma maman,

Pour avoir toujours cru en moi et m'avoir épaulée jusqu'au bout.
A toutes nos conversations téléphoniques interminables et tous ces commérages palpitants.
Avec tout mon amour.

A mon papa,

Pour s'être finalement décidé à faire des enfants... Pour s'être dévoué dans son travail malgré les grosses difficultés de la vie et me permettre ainsi de faire des études.
A tous nos bons moments passés au fond des océans des quatre coins du monde.
Je t'aime de tout mon cœur.

A mes frères et sœurs,

Parce que sans vous nous serions une famille banale et bien moins colorée.
A Florian qui m'a toujours critiquée et qui m'a appris à affronter la vie.
A Marina qui a si bien cassé ma Panda et sans qui toute la famille s'ennuierait... Ne gâche pas ta vie, grandit et va de l'avant. Tu vois, tu y arrives, le permis, un CAP et un nouvel apprentissage !
Au p'tit Gaël pour être le frère « beau gosse » dont j'avais toujours rêvé.
A Michèle pour s'être décidée à partir il y a déjà bien longtemps. J'espère que tu te portes bien.

A mon arrière grand-mère Anna,

Parce que tu as toujours admiré ce que j'étais devenue. Même si pour toi soigner des bêtes ne présente aucun intérêt et que je ferais mieux de faire du théâtre.
Je continue à danser pour toi. J'espère aimer la vie autant que toi.
J'entends encore tes rires m'envahir.

A ma moitié d'orange, Fabrice,

Parce qu'à tes côtés j'ai appris ce que c'était qu'aimer et que la vie pouvait être un conte de fée.
Pour m'avoir suivie dans mes périples et me suivre dans les suivants.
Pour m'avoir ramener dans mes Pyrénées natales et avoir fait re-surgir mon bel accent chantant.
A mon amour, je t'aime.

A mes beaux parents,

Pour votre accueil si chaleureux, pour votre gentillesse, et tous ces bons petits plats dont je me lèche encore les doigts.

J'espère un jour maîtriser aussi bien l'art culinaire

A Monsieur PICAVET et Madame CARRIERE,

Pour avoir rendu possible mon Erasmus à Dublin,

Pour m'avoir aménagé un emploi du temps spécial pour mes examens à mon retour,

Pour m'avoir rédigé une lettre pour mon dossier d'internat expliquant ma situation,

Pour les bourses pour mes nombreuses escapades.

A Stéphanie et Tonio,

Pour être le plus beau couple de rumeurs de l'école.

Pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles.

A nos moments de délires passés ensemble, j'espère qu'il y en aura d'autres...

Tonio, tu auras une spéciale dédicace des copilotes les plus sexys du Rallye des Gazelles...

Surveille ta télé !

A Sœur Marie-Yolande et son foyer Sahuc-Mazas, Laetitia, Marina, Cixsous et Hélène,

Pour m'avoir si bien accompagnée durant ces longues années de prépa,

Merci Sœur Marie-Yolande pour toutes ces libertés nous permettant de faire toutes nos bêtises.

A mes amies que je ne vois plus très souvent, mais qui restent présentes dans mes meilleurs souvenirs.

Sans vous je ne serais jamais parvenue à ce que mon rêve prenne vie.

A tous mes amis de l'école, Pauline, Mirentxu, Vincent R., Aurore, Pierre, Séb, Julien S., Marion G., Katia, Cricri, Emilie S., et tous les autres...

J'espère avoir des nouvelles de temps à autre.

Que la chance soit toujours près de vous,

Bon vent...

Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Mme Nathalie PRIYMENKO qui s'est pliée en quatre pour la réalisation de ma thèse et me permettre une soutenance en Juillet.

Céline DOMANGE qui m'a encadrée le temps d'un été et qui a répondu présente dans toutes mes difficultés. Je la remercie pour sa patience et son initiation aux logiciels de statistiques.

Mme Cécile CANLET qui a réalisé les spectroscopies RMN de mes échantillons et qui a reconverti mes variables et métabolites.

M. Alain PARIS qui a surveillé et guidé mes analyses statistiques.

Mes relecteurs et correcteurs : ma mère Jocelyne COLLET, mon frère Florian COLLET, ma belle-mère Viviane MARSALET, les personnes de passage chez mes parents le temps d'un paragraphe et enfin mon directeur de thèse Mme Nathalie PRIYMENKO. Sans eux, mon travail serait difficilement déchiffrable.

Mon conseiller informatique, Pierre BAL, qui a su me dépanner avec une patience divine lorsque mon ordinateur refusait de marcher au moment où j'en avais le plus besoin.

Table des matières

TABLE DES MATIERES.....	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	11
INTRODUCTION.....	15
INTRODUCTION DE L'ETUDE.....	17
MATERIEL ET METHODES.....	23
I. LE RECRUTEMENT DES SUJETS.....	23
II. LA REALISATION ET LE STOCKAGE DES PRELEVEMENTS.....	23
III. LES TRAITEMENTS.....	24
1) <i>La phénytoïne</i>	24
2) <i>La taurine</i>	24
IV. OBTENTION DES SIGNATURES BIOLOGIQUES DES ECHANTILLONS.....	25
1) <i>La métabonomique</i>	25
2) <i>La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire</i>	26
a/ Principes fondamentaux.....	26
b/ Principes physiques de la RMN.....	28
❖ Le spin nucléaire.....	28
❖ Notion de moment magnétique.....	29
❖ Phénomène de résonance.....	29
❖ La structure des spectres.....	30
➤ La fréquence de résonance et la notion de coefficient d'écran.....	31
➤ Le déplacement chimique.....	31
➤ Le couplage spin-spin.....	33
❖ La discrétisation des spectres.....	34
c/ Réalisation pratique.....	35
V. REPRESENTATION DES DONNEES :.....	36
ANALYSES STATISTIQUES MULTIVARIEES.....	36
1) <i>L'analyse en composantes principales</i>	36
2) <i>L'analyse factorielle discriminante</i>	37
3) <i>Les distances de Mahalanobis</i>	37
4) <i>Le T² de Hotelling</i>	38
5) <i>Orthogonal signal correction</i>	39
6) <i>Régression Partial Least Square</i>	39
7) <i>La démarche statistique de notre étude</i>	40
RESULTATS.....	43
I. CARACTERISATION DE L'ECHANTILLON.....	43
1) <i>Mode de vie des individus de l'étude</i>	43
2) <i>Répartition en fonction des écuries</i>	44
3) <i>Répartition en fonction de l'âge des chevaux</i>	44
4) <i>Répartition en fonction du sexe</i>	45
5) <i>Répartition en fonction du statut</i>	46
6) <i>Le suivi dans le temps</i>	47

7) Répartition en fonction du traitement.....	48
II. L'ETUDE STATISTIQUE.....	49
1) Analyse en composante principale (ACP).....	50
2) Analyse factorielle discriminante (AFD) et la sélection des variables.....	56
a/ Etude des 4 groupes notés A à D créés avec les ACP.....	57
❖ Analyse factorielle discriminante.....	57
❖ La sélection des variables.....	59
b/ Influence des statuts sur les profils métaboliques.....	61
❖ Analyse factorielle discriminante.....	61
❖ La sélection des variables.....	62
3) AFD obtenues après transformation OSC.....	65
a/ Influence des statuts sur les profils métaboliques.....	65
b/ Etude des profils métaboliques des individus malades.....	68
❖ Analyse factorielle discriminante.....	68
❖ La sélection des variables.....	70
c/ Effet du grade clinique et du traitement.....	72
❖ Analyse factorielle discriminante.....	72
❖ La sélection des variables.....	74
d/ Effet du traitement.....	76
❖ Analyse factorielle discriminante.....	76
❖ La sélection des variables.....	79
e/ Effet de la durée d'évolution de la maladie.....	81
❖ Analyse Factorielle Discriminante.....	82
❖ La sélection des variables.....	84
DISCUSSION	87
I. OBJECTIFS ET REALISATION	87
II. LES DIFFICULTES RENCONTREES SUR LE TERRAIN	88
III. PLASMA VERSUS URINE	89
IV. LES ANALYSES STATISTIQUES.....	90
1) La séparation des individus en deux groupes.....	90
2) Les traitements.....	91
a/ La phénytoïne.....	92
b/ La taurine.....	92
3) Le nombre d'individus de l'étude.....	94
a/ Evolution du Harper Australien au cours du temps.....	94
b/ L'effet traitement.....	95
4) L'AFD en fonction du statut des chevaux.....	95
5) Les individus suspects de l'étude.....	96
V. LES VARIABLES EXPLICATIVES ET METABOLITES CORRESPONDANTS	97
1) Influence des statuts sur les profils métaboliques.....	97
2) Etude des 4 groupes notés A à D créés avec les ACP.....	100
3) Profils métaboliques des individus malades.....	100
4) Effet du grade clinique et du traitement.....	102
5) Effet du traitement.....	103
6) Effet de la durée d'évolution de la maladie.....	104
CONCLUSION.....	105
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	107
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES	116

Table des illustrations

Figures :

<u>Figure 1:</u> Spectre RMN des protons de l'éthanol en phase liquide mesuré à 200MHz.....	27
<u>Figure 2:</u> Eclatement des niveaux d'énergie d'un spin $\frac{1}{2}$ par application d'un champ magnétique statique B_0	30
<u>Figure 3:</u> Echelles de déplacement chimique du proton pour $B_0 = 9.4$ Tesla (fréquence de résonance du proton 400 MHz).	32
<u>Figure 4:</u> Dédoublment du signal de deux protons voisins en spectroscopie RMN 1H	33
<u>Figure 5:</u> Répartition des chevaux de l'étude dans les différentes écuries et distinction d'un suivi ou non dans le temps.	44
<u>Figure 6:</u> Répartition des chevaux de l'étude en fonction de leur âge.	45
<u>Figure 7:</u> Répartition des sexes des chevaux de l'étude.	45
<u>Figure 8:</u> Répartition des chevaux de l'étude dans les trois groupes.	46
<u>Figure 9:</u> Répartition des chevaux malades en fonction du grade maximal atteint au cours du suivi.....	47
<u>Figure 10:</u> Suivi dans le temps des chevaux de l'étude.....	48
<u>Figure 11:</u> Répartition des chevaux de l'étude en fonction de l'existence et du type de traitement.....	49
<u>Figure 12:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas de tous les chevaux de l'étude.	50
<u>Figure 13:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas de tous les chevaux de l'écurie 1.	51
<u>Figure 14:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux de toutes les écuries, excepté la 1.....	52
<u>Figure 15:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux des groupes A et C.	53
<u>Figure 16:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux des groupes A et D.	53
<u>Figure 17:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux des groupes B et C.	54
<u>Figure 18:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux des groupes B et D.	54
<u>Figure 19:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des juments de l'étude.....	55
<u>Figure 20:</u> Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux mâles de l'étude.	56
<u>Figure 21:</u> Représentation de l'AFD des spectres RMN issus des plasmas des chevaux de l'étude selon un facteur arbitraire.	58
<u>Figure 22:</u> Représentation graphique de l'AFD des individus de l'étude en fonction de leur statut, malade, sain ou suspect, sans correction des données.	61
<u>Figure 23:</u> Variations de la moyenne et de l'écart type de la quantité de scyllo- inositol dans le plasma des chevaux sains et malades.....	64
<u>Figure 24:</u> Variations de la moyenne et de l'écart type de la quantité de Glutamate dans le plasma des chevaux sains et malades.....	64

<u>Figure 25:</u> Variations de la moyenne et de l'écart type de la quantité de glucose dans le plasma des chevaux sains et malades.....	64
<u>Figure 26:</u> Variations de la moyenne et de l'écart type de la quantité de 3-hydroxybutyrate dans le plasma des chevaux sains et malades.....	64
<u>Figure 27:</u> Représentation graphique de l'AFD des individus de l'étude en fonction de leur statut après correction par OSC avec le facteur statut.	66
<u>Figure 28:</u> Représentation PLS des individus sains (en bleu) et malades (en rouge) après avoir effectué une correction OSC avec le facteur statut.....	67
<u>Figure 29:</u> Représentation graphique de l'AFD des individus malades et de Polka en fonction de leur stade après correction par OSC des facteurs écurie, cheval et saison.....	69
<u>Figure 30:</u> Représentation graphique de l'AFD des individus en fonction des groupes 0 à 6 après correction par OSC avec le facteur groupe.	73
<u>Figure 31:</u> Représentation graphique de l'AFD (axes LD1 et LD2) des individus en fonction des groupes reflétant l'effet du traitement après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD.....	77
<u>Figure 32:</u> Représentation graphique (axes LD1 et LD3) de l'AFD des individus en fonction des groupes reflétant l'effet du traitement après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD.....	78
<u>Figure 33:</u> Représentation graphique de l'AFD des individus en fonction des groupes reflétant l'effet de la durée d'évolution de la maladie en opposition aux individus sains après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD.....	83

Tableaux :

<u>Tableau 1 :</u> Isotopes les plus courants : nombre de spin, rapport gyromagnétique et abondance naturelle.....	29
<u>Tableau 2:</u> Répartition des trois groupes de chevaux dans les différents types de prés.....	46
<u>Tableau 3 :</u> Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les groupes A à D.	58
<u>Tableau 4:</u> Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes A à D.	59
<u>Tableau 5:</u> Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les groupes A à D.....	60
<u>Tableau 6:</u> Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les statuts.....	62
<u>Tableau 7:</u> Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les statuts.....	62
<u>Tableau 8:</u> Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec le statut des animaux de l'étude.....	63
<u>Tableau 9:</u> Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les statuts après correction des données par une OSC avec le statut.....	66
<u>Tableau 10:</u> Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les statuts après correction des données par une OSC avec le statut.....	67
<u>Tableau 11:</u> Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les stades observés au moment du prélèvement chez les chevaux malades en incluant Polka, l'AFD avait été réalisée après correction par OSC des facteurs écurie, cheval et saison.....	69
<u>Tableau 12:</u> Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les stades observés au moment du prélèvement chez les chevaux malades en incluant Polka, l'AFD avait été réalisée après correction par OSC des facteurs écurie, cheval et saison.....	70

<u>Tableau 13:</u> Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les chevaux malades et Polka, seul individu sain traité à la taurine, après correction OSC avec les facteurs cheval, écurie, saison.....	71
<u>Tableau 14:</u> Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les groupes, l'AFD avait été réalisée après correction par OSC avec le facteur groupe.....	73
<u>Tableau 15:</u> Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes, l'AFD avait été réalisée après correction par OSC avec le facteur groupe.....	74
<u>Tableau 16:</u> Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les chevaux malades répartis selon leur grade et leur traitement, les individus sains et Polka, seul individu sain traité à la taurine. L'AFD avait été réalisée après correction OSC avec le facteur groupe.....	75
<u>Tableau 17:</u> Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les groupes de l'AFD des individus en fonction des groupes reflétant l'effet du traitement après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD.....	78
<u>Tableau 18:</u> Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes obtenus par l'AFD des individus en fonction des groupes reflétant l'effet du traitement après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD.....	79
<u>Tableau 19:</u> Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les chevaux malades répartis selon leur traitement, les individus sains et Polka, seul individu sain traité à la taurine. L'AFD avait été réalisée après correction OSC avec le même facteur que pour faire l'AFD.....	80
<u>Tableau 20:</u> Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les groupes obtenus par AFD, celle-ci avait été réalisée après correction par OSC avec le facteur durée.....	83
<u>Tableau 21:</u> Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes obtenus par AFD, celle-ci avait été réalisée après correction par OSC avec le facteur durée.....	84
<u>Tableau 22:</u> Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec la notion de durée d'évolution de la maladie. L'AFD avait été réalisée après correction OSC avec la " durée".....	85

Introduction

Le Harper Australien est une maladie qui concerne exclusivement les chevaux et qui serait provoquée par l'ingestion de porcelle enracinée (*Hypochaeris radicata* L.). Cependant, le rôle de la plante n'a toujours pas été formellement démontré, ni au cours de cette étude, ni même dans les publications antérieures.

Bien que le mouvement de harper soit connu depuis l'Antiquité — il a été évoqué à plusieurs reprises dans la littérature classique (Shakespeare en parlait déjà dans Henri VIII, acte 1 scène 3), la première publication Kendall sur le Harper Australien date de 1884. Le harper australien se différencie du harper classique par le fait qu'il concerne systématiquement les deux membres postérieurs, et serait dû à l'ingestion d'une plante toxique, *a priori* *Hypochaeris radicata*. Depuis cette première description, plusieurs études de cas ont été présentées mais la pathogénie de la maladie demeure encore largement inexpliquée.

A la suite de la canicule de 2003, qui a permis la prolifération de porcelle enracinée dans les prairies, une recrudescence des cas a été constatée, en France. Alors que jusqu'ici la maladie ne sévissait que de manière sporadique dans notre pays, ce phénomène a pu être qualifié d'épizootie (Collignon 2007). Cette étude épidémiologique a en outre révélé que le seul facteur commun mis en évidence était la présence d'*Hypochaeris radicata* dans l'alimentation des chevaux concernés.

Afin d'élucider la pathogénie du Harper Australien, Domange *et al.* (2008), ont réalisé une étude sur des rongeurs de laboratoire afin de mettre en évidence les métabolites intervenant dans l'intoxication à *Hypochaeris radicata*. Cette étude a été réalisée par la méthode dite de métabonomique qui est basée sur l'analyse d'échantillons biologiques — comme l'urine, le plasma ou les tissus — par des techniques telles que la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN), couplée à des études statistiques. Elle permet d'obtenir une description quantitative et sans *a priori* des métabolites endogènes présents dans le milieu étudié. Les signatures biologiques constituent ainsi un système d'approche des réponses métaboliques à différents stimuli, particulièrement intéressant pour les études de toxicité de xénobiotiques ou de processus pathologiques (Nicholson *et al.*, 1999). A partir des

résultats obtenus chez la souris, Domange *et al.* ont proposé des hypothèses quant à la pathogénie de la maladie.

L'objet de ce travail de thèse a été d'étudier l'état métabolique de chevaux atteints ou non par cette affection grâce à la métabonomique afin de décrire et caractériser l'intoxication à *Hypochaeris radicata* chez l'espèce cible, c'est-à-dire le cheval. Nos objectifs étaient de mettre en évidence un ou plusieurs métabolites liés à cette intoxication chez le cheval, et de comparer nos résultats à ceux obtenus dans l'étude réalisée sur les rongeurs (Domange *et al.*, 2008). En outre, nous souhaitons mettre en évidence un marqueur biologique de l'intoxication à *Hypochaeris radicata*, chez le cheval.

Après une synthèse bibliographique sur les connaissances acquises sur le Harper Australien du cheval, ce travail présente une étude expérimentale originale réalisée par la méthode dite de métabonomique sur des plasmas de chevaux sains ou malades du Sud-Ouest de la France, en vue de caractériser les troubles métaboliques liés à l'ingestion d'*Hypochaeris radicata*, dans l'espèce cible.

Introduction de l'étude

Le Harper Australien est une maladie touchant le cheval qui a été étudiée pour la première fois par Kendall en 1884. Les études ont donc débuté en Australie (Kendall, 1884 ; Pemberton, 1979, Pemberton et Caple, 1980) puis les publications montrent que des cas ont été observés en Nouvelle-Zélande, aux Etats-Unis, au Chili, au Brésil ou encore au Japon, et ceci, particulièrement après des étés chauds et secs (Huntington *et al.*, 1989 ; Gay *et al.*, 1993 ; Galey *et al.*, 1991 ; Gardner *et al.*, 2005 ; Araya *et al.*, 1998 ; Araùjo *et al.*, 2008 ; Takahashi *et al.*, 2002). Enfin, 29 cas ont été décrits en France lors d'une épizootie dans la région lyonnaise pendant l'été 2003 (Gouy *et al.*, 2005).

Le harper Australien apparaît de manière sporadique ou bien sous forme d'épizootique. On observe une recrudescence des cas à la fin de l'été ou à l'automne, chez des chevaux paissant sur des prairies pauvres contenant de grandes quantités de « mauvaises » herbes telles que *Hypochaeris radicata*, *Taraxacum officinale* ou *Malva parviflora* (Pemberton et Caple, 1980 ; Cahill *et al.*, 1985 ; Roberston-Smith *et al.*, 1985 ; Deblinger et Tnibar, 2003). Avant 2008, la maladie n'avait jamais été reproduite expérimentalement, cependant, la plante vraisemblablement en cause était *Hypochaeris radicata*, communément appelée « porcelle enracinée ». En outre, il avait été émis des hypothèses quant au rôle d'autres facteurs lors de cette intoxication : existence de carences, notamment en vitamines B, rôle de mycotoxines... (Kendall, 1884 ; Pemberton et Caple, 1980 ; Seddon et Belchner, 1926 ; Gay *et al.*, 1993 ; Deblinger et Tnibar, 2003).

En 2008, Araùjo *et al.* ont reproduit l'intoxication sur un poulain mâle de deux ans. Ce cheval a été nourri en partie avec de la porcelle enracinée (avec les tiges, les fleurs, les fruits et les feuilles) fraîchement cueillie à hauteur de 9,8 kg MB/jour pendant 50 jours. Cette plante était collectée sur des prairies où deux cas de Harper Australien avaient été recensés. Les premiers signes cliniques — réticence au reculer ou à la mise sur un cercle, hypermétrie et abduction des postérieurs — ont été observés au 19^{ème} jour de l'étude. Au 22^{ème} jour, les signes cliniques étaient plus marqués : le cheval bondissait des deux postérieurs au galop. Le cheval a ensuite été nourri avec de la porcelle enracinée provenant d'une autre prairie pendant 6 jours. Les auteurs ont alors observé une rapide guérison (*sic*). Les signes cliniques sont réapparus après 6 jours d'alimentation avec *Hypochaeris radicata* provenant de la première

prairie. Cette étude montre qu'il existe des variations de toxicité de la plante et pourrait expliquer l'échec des auteurs précédents à reproduire la maladie.

Cette maladie se caractérise par une hyperflexion involontaire d'un ou des deux postérieurs, l'atteinte étant quasiment toujours bilatérale lors de harper australien (Deblinger et Tnibar, 2003). Ce symptôme peut s'accompagner d'une amyotrophie des muscles de la cuisse et/ou d'une paralysie laryngée unilatérale (Mayhew, 1989).

Il a été montré que le Harper Australien était associé à des lésions sur les axones de fort diamètre des nerfs périphériques (Huntington *et al.*, 1989 ; Cahill *et al.*, 1986 ; Dixon et Stewart, 1969 ; Slocombe *et al.*, 1992 ; Collignon, 2007). Les muscles les plus affectés par la maladie sont ceux innervés par les plus longs nerfs du corps du cheval. Il s'agit donc, d'une part, du nerf laryngé récurrent innervant les muscles laryngés intrinsèques et, d'autre part, du *nervus tibialis* et *nervus peroneus communis* innervant les muscles distaux des membres pelviens. Ainsi, on comprend pourquoi les chevaux atteints présentent des dysfonctionnements laryngés ou de locomotion des postérieurs. Cependant, l'hyperflexion des membres postérieurs reste encore inexplicée bien que certains auteurs aient avancé des théories. Par exemple, Mayhew (1989) suggère que les mouvements anormaux des postérieurs proviendraient de lésions sur le système d'arcs réflexes qui maintient le tonus pour la posture et coordonne les contractions musculaires. A l'inverse, Cahill *et al.* (1986) ont évoqué la possibilité que les lésions du fuseau neuromusculaire des muscles distaux des membres postérieurs conduisent directement à cette flexion exagérée.

Néanmoins, l'amyotrophie observée provient directement des lésions des nerfs moteurs (Cahill et Goulden, 1992 ; Slocombe *et al.*, 1992 ; Collignon, 2007). De plus, d'après l'étude réalisée par Slocombe *et al.* en 1992 sur 9 chevaux, les lésions les plus sévères des muscles ont été observées sur les extenseurs long et latéral du doigt, le tibial cranial, le crico-arythénoïde dorsal, le gracile et le fléchisseur latéral profond du doigt, avec une atrophie extensive des fibres ainsi qu'une fibrose diffuse.

Il est à signaler qu'il existe différents stades de gravité pour l'hyperflexion. Elle peut en effet, aller d'une légère exagération du mouvement de flexion à une flexion violente du postérieur pendant laquelle le boulet vient au contact voire frappe l'abdomen. On peut observer certains chevaux galopants des deux postérieurs ou encore une impossibilité de reculer (Pemberton et Caple, 1980). Lors de cas sévères, une atteinte des membres antérieurs a été rapportée (Cahill et Goulden, 1992). L'euthanasie s'avère être la seule issue lorsque le cheval est en décubitus prolongé (Gouy *et al.*, 2005). La classification de Huntington (1989) a

permis de graduer l'atteinte des chevaux sur une échelle de I à V : par exemple, le grade I correspond à un harper observé seulement lorsque le cheval recule ou est stressé et le grade IV se caractérise alors par une hyperflexion sévère avec un ou les deux boulets venant heurter violemment l'abdomen. Enfin, au grade V, le cheval refuse de bouger, les postérieurs restent fléchis pendant plusieurs secondes, et, si le cheval se déplace, il sautille comme un lapin.

Une rémission est parfois observée dans certains cas sans aucun traitement dans les semaines, voire l'année qui suit l'apparition des symptômes (Cahill et Goulden, 1992 ; Pemberton, 1979). Cette rémission est permise grâce au potentiel de régénération axonale (Huntington *et al.*, 1989 ; Cahill *et al.*, 1986).

Dans tous les cas, le changement de pâture est recommandé de manière à éviter la consommation d'*Hypochaeris radicata*. Il est également conseillé de mettre le cheval au repos tout en lui gardant un peu d'exercice. Le pré est donc plus adapté pour cette convalescence.

Pour le traitement du Harper Australien, et bien qu'elle n'ait pas une efficacité de 100%, la phénytoïne est la molécule ayant donné les meilleurs résultats. En effet, lors de Harper, une hyperexcitabilité des motoneurones associés au muscle extenseur latéral du doigt a été mise en évidence. La phénytoïne diminue l'excitabilité de ces cellules nerveuses et rallonge la période réfractaire. Ainsi, on obtient une diminution de l'activité musculaire, visible sur l'électromyogramme, et du mouvement de Harper (Huntington *et al.*, 1991). La phénytoïne, à des doses de 10 à 25 mg/kg par voie orale, permet une régression en quelques jours. Un traitement tardif, notamment après l'apparition de l'amyotrophie, se révèle être moins efficace (Huntington *et al.*, 1991).

Enfin, la myoténectomie de l'extenseur latéral du doigt peut être envisagée dans les cas sévères de Harper Australien et devrait être réalisée avant l'apparition de l'amyotrophie (Cahill et Goulden, 1992). Une étude a récemment montré de bons résultats à la suite de cette intervention : 11 chevaux sur 13 ont récupéré totalement (Torre, 2005).

A l'inverse du Harper bilatéral dû à une intoxication végétale, il existe une forme dite classique de Harper observée de manière sporadique. La guérison s'obtient rarement sans intervention chirurgicale (Stashak, 1987 ; Cahill et Goulden, 1992). Certains chevaux atteints par cette forme ont reçu un traumatisme sur la face dorsale du métatarse, avec ou sans lésion de l'extenseur latéral du doigt. D'autres animaux atteints présentent une lésion au niveau de l'articulation du grasset ou du jarret, une luxation intermittente de la patelle, une douleur au

niveau du pied ou enfin une atteinte de la moelle spinale (encéphalomyélite à protozoaires) (Crabill *et al.*, 1994 ; Mayhew, 1989). Cette forme se caractérise donc souvent par une atteinte unilatérale sans rémission spontanée.

Lors de certains cas de Harper Australien, les vétérinaires ont pratiqué des analyses hématologiques et biochimiques sur les chevaux atteints. Les résultats n'ont montré aucune anomalie hématologique ou biochimique (créatine kinase, lactate déshydrogénase, urée sanguine, gamma-glutamyltransférase, phosphatase alcaline, aspartate transaminase, bilirubine, protéines totales, créatinine, électrolytes...) (Araya *et al.*, 1998 ; Pemberton, 1979 ; Galey *et al.*, 1991 ; Takahashi *et al.*, 2002). En 2005, Gardner *et al.* ont présenté le cas de deux juments de 8 et 13 ans atteintes de Harper Australien de grade IV et V, avec une amyotrophie. Les analyses sanguines (hématologiques et biochimiques) n'ont rien révélé d'anormal à part une concentration sérique en vitamine E (1.92 mg/L) légèrement en dessous des valeurs usuelles (2-4 mg/L) chez la jument de 8 ans, alors que celle de 13 ans présentait une concentration sérique élevée (6.03 mg/L) en vitamine E. En 2008, lors de la reproduction expérimentale de la maladie, Araujo *et al.*, ont réalisé des analyses biochimiques qui n'ont révélé aucune anomalie, si ce n'est une concentration sérique d'urée légèrement au dessus (53-59 mg/dl) des valeurs usuelles. Cependant il n'y a pas de lien apparent avec l'intoxication.

Les connaissances sur le ou les substances toxiques, sur la pathogénie de cette intoxication, restent ainsi très limitées, surtout chez l'espèce cible. Une étude (Domange *et al.*, 2008) a donc été réalisée sur des rongeurs afin d'étudier la réponse métabolique au niveau de différents organes ainsi que les métabolites impliqués lors d'une intoxication expérimentale avec *Hypochaeris radicata*. L'étude a été réalisée sur 72 souris (mâles et femelles) réparties en différents groupes dont certains ont reçu dans leur alimentation des fleurs d'*Hypochaeris radicata* à hauteur de 3 et 9%. Les urines et les tissus ont été étudiés par métabonomique. Cette méthode correspond à l'identification et à la quantification des perturbations du profil métabolique engendrées par des processus biologiques, au sein d'un système intégré, et en utilisant des méthodes spectrométriques (Nicholson *et al.*, 1999 et 2002). Cette étude a montré que l'ingestion d'*Hypochaeris radicata* a un effet significatif sur le métabolisme général (via l'exploration des urines) et sur celui du foie et de l'encéphale et ce, proportionnellement à la dose administrée et à la durée d'intoxication.

Le principal bio-marqueur métabolique de l'intoxication à *Hypochaeris radicata*

identifié chez la souris a été le *scyllo*-inositol. En effet, une augmentation significative de ce métabolite a été mesurée dans l'urine et les phases hydrosolubles des extraits de foie et d'encéphale avec un lien canonique très significatif entre les ces deux organes. De plus, les résultats de l'IRM du thalamus obtenus *in vivo* sur 12 souris mâles ont confirmé les données métabonomiques, à savoir la présence anormalement importante de *scyllo*-inositol, dans le cerveau des souris intoxiquées. Ces résultats indiquent l'implication du *scyllo*-inositol, un métabolite trouvé dans certaines maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, tumeur) et dans certaines perturbations métaboliques engagées dans des dysfonctions à la fois neuronales et gliales.

Une atteinte au niveau du système nerveux central a donc été mise en évidence chez la souris, puis confirmée, car les concentrations en N-acétyl-aspartate, en lactate et en choline étaient plus élevées chez les souris traitées par rapport aux souris témoins. Or, une concentration élevée en N-acétyl-aspartate est observée dans le cerveau de jeunes enfants affectés par le syndrome de Cavanan. Il s'agit d'une leucodystrophie rare, associée à une démyélinisation cérébrale progressive, ainsi qu'à une dégénération de la partie spongieuse de l'encéphale, ce qui peut donc rappeler les lésions observées chez les chevaux atteints de Harper Australien. De plus, le lactate n'est détecté dans l'encéphale que dans des conditions pathologiques. Enfin, une concentration élevée en choline pourrait être associée à des destructions ou renouvellements membranaires, ainsi qu'à une démyélinisation ou encore un processus inflammatoire et une prolifération des cellules gliales.

L'ensemble de ces travaux montrent que le harper australien est un trouble nerveux affectant le cheval mais qui, sans que la maladie soit reproductible chez l'animal de laboratoire, conduit à l'identification de métabolites signant une atteinte générale et nerveuse chez la souris, et caractérisée par l'augmentation de métabolites déjà décrits dans d'autres troubles nerveux, en particulier, le *scyllo*-inositol, l'aspartate, le lactate et la choline.

L'objectif de notre étude expérimentale a été d'utiliser la métabonomique afin de tenter de caractériser l'intoxication à *Hypochaeris radicata* chez l'espèce cible, c'est à dire le cheval. Nous souhaiterions donc mettre en évidence un ou plusieurs métabolites générés par cette intoxication, et éventuellement retrouver des métabolites mis en évidence lors de l'étude réalisée sur les souris. Enfin, nous aimerions mettre en évidence un marqueur biologique de l'intoxication à *Hypochaeris radicata*, chez le cheval.

Matériel et méthodes

I. Le recrutement des sujets

Les chevaux ont été référés par des vétérinaires de terrain ou bien les propriétaires de chevaux atteints se sont directement tournés vers l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse pour obtenir des conseils. Une enquête épidémiologique a été engagée à la suite de l'augmentation des cas après l'été 2003. Cette étude a été l'objet d'un travail de thèse publié par Collignon en 2007.

Grâce au questionnaire mis en place pour cette étude, certaines informations concernant l'animal ont été recueillies :

- Nom et coordonnées du propriétaire,
- Nom, âge et race du cheval,
- Moment de l'apparition des symptômes...

Au cours de cette étude épidémiologique, certains propriétaires ont accepté un suivi rapproché des chevaux malades ainsi qu'un suivi des chevaux sains vivant sur la même pâture. Des prises de sang et un suivi de l'évolution clinique ont ainsi été mis en place. Ainsi, nous avons recruté des chevaux malades et des chevaux sains paissant sur des prés contaminés dans différentes écuries.

Certains individus atteints de notre étude ont été traité avec de la phénytoïne ou de la taurine.

II. La réalisation et le stockage des prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés sur place et toujours par la même personne.

Les prélèvements ont donc été effectués, après désinfection à l'alcool, à la veine jugulaire avec un système de type « vacutainer ». Le sang est recueilli sur tube Hépariné de 10 mL. Les tubes ont ensuite été ramenés au laboratoire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse sous couverture du froid, puis centrifugés à 4000 tours/min pendant 10 minutes.

Enfin, le plasma a été placé dans deux tubes Ependorff, stockés dans un congélateur à -20°C, après identification.

III. Les traitements

Deux types de traitements ont été mis en place sur les chevaux, soit avec de la phénytoïne, soit avec de la taurine.

1) La phénytoïne

La phénytoïne est un anticonvulsivant à action centrale qui agit en réduisant les contractions musculaires tétaniques et l'activité électrique incoordonnée des nerfs périphériques, ce qui en fait un antiépileptique utilisé depuis longtemps en médecine humaine. Ainsi, cette molécule a été utilisée avec un certain succès dans le traitement de la rhabdomyolyse et de la myotonie chez le cheval et est, à ce jour, le traitement de référence du Harper épizootique (Huntington *et al.*, 1991).

2) La taurine

La taurine (acide 2-mainoéthanesulfonique) est un acide β -aminé semi essentiel possédant, comme son nom l'indique, un groupement d'acide sulfonique à la place du groupement d'acide carboxylique habituellement présent dans les acides aminés. Cet acide aminé n'est pas incorporé dans les protéines, mais reste sous forme libre ou contribue à former des peptides simples. D'après ces caractéristiques, la taurine n'est donc pas un acide aminé dans le sens biologique du terme (Taurine monograph (anonyme), 2001).

Sa synthèse a lieu principalement dans le foie et l'encéphale à partir de la méthionine (acide aminé essentiel) et de la cystéine (acide aminé non essentiel dérivant de la méthionine). Il y a trois voies connues de synthèse de la taurine à partir de la cystéine. Les trois voies

requièrent le pyridoxal-5'-phosphate, dont le précurseur est la vitamine B6. La synthèse se fait en partant de la méthionine, puis passe par la cystéine qui va ensuite donner de l'hypotaurine pour enfin arriver à la taurine (Birdsall, 1998).

IV. Obtention des signatures biologiques des échantillons

Les signatures biologiques se définissent comme l'interprétation des réponses des organismes vivants à des perturbations physiopathologiques grâce à une analyse multivariée de données biologiques issues du métabolisme.

1) La métabonomique

La métabonomique, ou méthode des « signatures biologiques », correspond à l'évaluation quantitative et dynamique des réponses métaboliques multiparamétriques des systèmes biologiques aux stimuli physiopathologiques et aux modifications géniques (Nicholson *et al.*, 1999).

Cette méthode, bien qu'introduite dans les années 1980, n'a commencé à jouer un rôle important que récemment en recherche et développement dans l'industrie pharmaceutique.

L'obtention de données métabonomiques implique une nouvelle génération d'instruments de mesure. Elle repose sur des méthodes spectrométriques, en particulier la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire à haute résolution (méthode employée lors de notre étude) ou encore la spectrométrie de masse. Ces méthodes spectrométriques fournissent une description exhaustive des métabolites présents dans les liquides biologiques, les cellules ou les tissus. Puis, en association avec des méthodes d'analyses statistiques multivariées, elles participent à la mise en évidence de "contrastes" biologiques. Ainsi, cette méthode permet d'observer le métabolisme sans *a priori* sur les variations attendues.

En conclusion, la métabonomique correspond à l'identification et à la quantification

des perturbations du profil métabolique engendrées par des processus biologiques au sein d'un système intégré (Nicholson *et al.*, 2002 ; Lindon *et al.*, 2003).

Une étude métabonomique se déroule en trois étapes, la première consistant à obtenir des biofluides et/ou des biopsies contenant les marqueurs métaboliques : pour notre étude, nous avons retenu le plasma. La seconde étape consiste à extraire ces données métaboliques en analysant le plasma (ici, nous avons retenu la résonance magnétique nucléaire) et enfin, lors de la dernière étape, une analyse des jeux de données est réalisée. La dernière de ces trois étapes utilise des outils statistiques visant principalement à isoler un nombre restreint et significatif de paramètres parmi tous ceux mis en évidence par l'étude expérimentale.

2) La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

La spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique directement applicable à l'étude de milieux moléculaires complexes. Elle n'endommage pas les échantillons et constitue la seule technique permettant d'analyser des tissus intacts (Nicholson *et al.*, 2002).

La spectroscopie par RMN permet d'extraire les données métaboliques de nos échantillons : elle constitue donc la deuxième étape de l'étude métabonomique.

a/ Principes fondamentaux

Il est apparu, très peu de temps après la découverte du phénomène de la résonance magnétique nucléaire, que les noyaux de même nature isotopique (par exemple : les protons), appartenant à une même molécule, donnaient naissance à une succession de multiplets. On observe par exemple que le spectre de l'éthanol se compose d'un triplet (trois pics), d'un quadruplet (quatre pics) et d'un singulet (un pic) attribués respectivement aux groupements CH_3 , CH_2 et OH de cette molécule (figure 1).

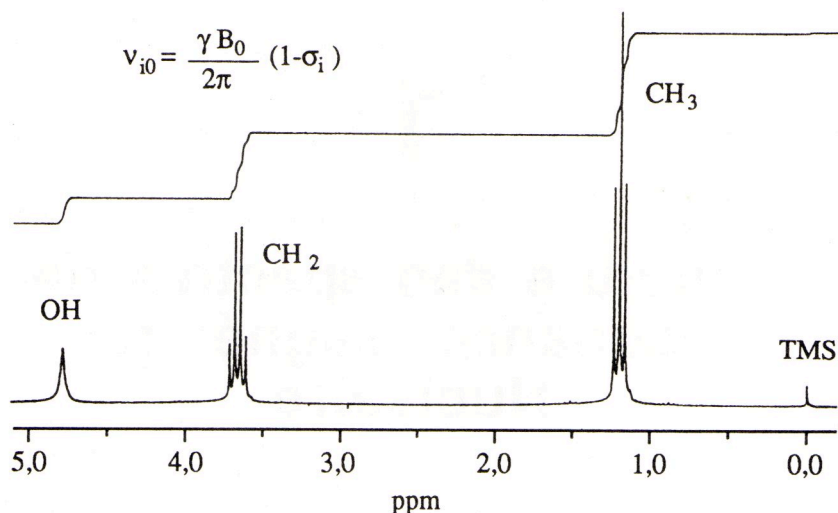


Figure 1: Spectre RMN des protons de l'éthanol en phase liquide mesuré à 200MHz. Le signal le plus à droite est celui d'une substance de référence communément utilisée, le Tétraméthylsilane. La formule relie la fréquence de résonance de chaque type de proton ν_{i0} , à son coefficient d'écran. Le tracé en escalier représente l'aire des différents signaux (d'après Canet, 1999).

Cette technique peut donc constituer un moyen d'investigation structurale extrêmement puissant dans la mesure où les déplacements des différents massifs, ainsi que leur structure fine, sont corrélés à la nature des différents groupements chimiques constituant la molécule.

A l'heure actuelle, la résonance magnétique nucléaire permet de déterminer la structure de molécules aussi complexes que des protéines et est largement utilisée lors d'études métabonomiques (Canet, 1999).

D'un point de vue pratique, la spectroscopie de RMN est basée sur la mesure de l'absorption d'ondes électromagnétiques dans le domaine des fréquences radio qui s'étend approximativement de 4 à 1000 MHz.

En effet, comme évoqué précédemment, un certain nombre de noyaux – notamment le proton (^1H), le carbone 13 (^{13}C) ou le phosphore 31 (^{31}P), trois noyaux parmi les plus représentés dans les macromolécules du vivant – possèdent des propriétés magnétiques. Lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique intense, ces noyaux sont capables, via ce que l'on appelle leur spin, d'absorber de l'énergie et d'entrer en résonance (Canet *et al.*, 2002).

b/ Principes physiques de la RMN

❖ Le spin nucléaire

La structure des spectres RMN, et par conséquent les structures moléculaires qu'ils permettent de déterminer, provient de l'étagement des niveaux d'énergie du système de spins nucléaires. La notion de spin est familière puisqu'elle intervient lors du dénombrement et la caractérisation des états électroniques des atomes et des molécules : le principe de Pauli fait appel au spin de l'électron. Le proton (^1H) possède, lui aussi, un spin. Cette propriété est à l'origine de la RMN dite protonique dont l'intérêt est bien évidemment lié à l'omniprésence de l'hydrogène. Le neutron est également doté d'un spin. Il peut y avoir annihilation entre spins des protons et des neutrons, ce qui explique l'absence de spin global pour certains isotopes comme le carbone 12 par exemple.

Le spin est donc une propriété quantique intrinsèque associée à chaque particule. Il est ainsi caractéristique de la nature de la particule au même titre que sa masse et sa charge électrique.

Chaque spin est caractérisé par un nombre ℓ , dit «nombre de spin» : il s'agit d'un entier ou d'un demi-entier qui permet de définir le nombre des états distincts dans lesquels le spin peut se trouver.

En effet, la composante ℓ_z du spin nucléaire suivant une direction de référence z est quantifiée et ne peut prendre que certaines valeurs définies par l'équation :

$$\ell_z = m_\ell \cdot \frac{h}{2\pi}$$

Où m_ℓ , nombre quantique magnétique de spin, peut prendre les valeurs $\frac{1}{2}$, $(\ell - 1)$, et ℓ .

Par exemple, le nombre de spin du proton, du neutron ou de l'électron est égal à $\frac{1}{2}$. Il existe donc pour ces particules deux états de spin correspondant à $m_\ell = -\frac{1}{2}$ et $m_\ell = +\frac{1}{2}$.

Le spin nucléaire dépend de la forme spatiale, de la charge du noyau et du nombre de nucléons:

- Si le nombre de masse A est impair, le spin nucléaire est un demi-entier ;
- Si le nombre de masse A et la charge Z sont pairs, le spin est nul ;

- Si le nombre de masse A est pair et la charge Z impaire, le spin est un entier.

La contribution collective des nucléons engendre un moment cinétique intrinsèque pour le noyau. Ce moment cinétique $\vec{\ell}$ est donc propre à chaque particule. Il est par ailleurs associé à la rotation de cette particule sur elle-même.

❖ Notion de moment magnétique

Il est important pour la compréhension du phénomène de résonance magnétique nucléaire de connaître l'existence simultanée d'un moment magnétique $\vec{\mu}$ colinéaire au moment cinétique $\vec{\ell}$.

Ils sont liés par la relation :

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{\ell}$$

où \hbar est la constante de Planck divisée par 2π ($\hbar = 1,054 \cdot 10^{-34}$ J.s) ; la constante γ , caractéristique de chaque isotope, est appelée rapport gyromagnétique.

Le rapport gyromagnétique du proton est égal à $26,75 \cdot 10^7$ rad.T⁻¹.s⁻¹. Le Tesla, symbole T, étant l'unité de mesure d'induction magnétique.

Le nombre de spin ainsi que le rapport gyromagnétique des isotopes les plus souvent utilisés sont donnés dans le tableau 1.

Noyau	Spin ℓ	Rapport gyromagnétique γ (rad.T ⁻¹ .s ⁻¹)	Abondance naturelle (%)
¹ H	1/2	26,75.10 ⁷	99,8
¹³ C	1/2	6,72.10 ⁷	1,108
¹⁴ N	1	1,93.10 ⁷	99,63
³¹ P	1/2	10,83.10 ⁷	100
¹⁹ F	1/2	25,16.10 ⁷	100

Tableau 1 : Isotopes les plus courants : nombre de spin, rapport gyromagnétique et abondance naturelle (d'après Canet, 1999).

❖ Phénomène de résonance

Grâce à l'existence d'un moment magnétique associé, un spin $\ell = 1/2$ peut donc être considéré comme une aiguille aimantée microscopique dont l'orientation est quelconque sauf

si elle est placée dans un champ magnétique \vec{B}_0 ; elle peut alors s'orienter soit parallèlement à celui-ci (position la plus stable), soit antiparallèlement (position la moins stable). On crée ainsi deux niveaux d'énergie distincts dont l'écart $\Delta E = \gamma \hbar B_0$ se calcule à partir de l'énergie d'interaction $-\vec{\mu} \cdot \vec{B}$ entre moment et champ magnétiques (figure 2).

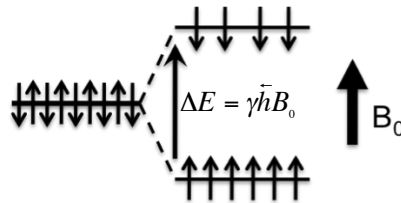


Figure 2: Eclatement des niveaux d'énergie d'un spin $\frac{1}{2}$ par application d'un champ magnétique statique B_0 . L'intensité de la transition qui peut avoir lieu entre ces deux niveaux est proportionnelle à l'excès de population du niveau le plus bas (d'après Canet, 1999).

Comme pour toute spectroscopie, une transition peut avoir lieu entre ces deux niveaux si le système est soumis à une radiation électromagnétique de fréquence obéissant à la relation de Bohr $\Delta E = h\nu$ moyennant un dispositif expérimental adéquat.

Une des originalités de la RMN tient au fait que la fréquence à laquelle a lieu la transition, $\nu_0 = \gamma \frac{B_0}{2\pi}$, appelée encore fréquence de résonance, est proportionnelle au champ appliqué.

❖ La structure des spectres

Les considérations précédentes ne permettent pas d'expliquer la structure du spectre de l'éthanol (figure 1). En effet, la séparation de massifs correspondant aux différents groupements de cette molécule relève du phénomène de déplacement chimique. Par ailleurs, la structure fine de chaque massif provient du couplage spin-spin. Ce sont ces deux propriétés qui vont être considérées après avoir envisagé tous les facteurs susceptibles de modifier la fréquence de résonance.

➤ La fréquence de résonance et la notion de coefficient d'écran

Le champ B_0 appliqué extérieurement à l'échantillon ne présente pas nécessairement la même valeur au niveau des différents noyaux (et de leur spin) qui appartiennent à une même molécule ; le « nuage électronique » local peut apporter un effet perturbateur, qui se traduit, au niveau du noyau, par une valeur du champ légèrement différente de B_0 et qui s'écrit $[B_0 (1 - \sigma)]$. Où σ , appelé coefficient d'écran, est un nombre sans dimension.

Il s'ensuit que la fréquence de résonance n'est plus exactement égale à $\nu_0 = \gamma \frac{B_0}{2\pi}$ mais à :

$$\nu_0 = \gamma(1 - \sigma) \frac{B_0}{2\pi}$$

Ceci revient à corriger le rapport gyromagnétique du facteur $(1 - \sigma)$ et conduit à une différenciation des fréquences de résonance en fonction de l'environnement électronique du noyau considéré, donc de la nature du groupement chimique auquel il appartient.

Cet effet est connu sous le nom de déplacement chimique (développé un peu plus bas dans l'exposé). Il s'agit d'un effet fin (σ est de l'ordre de 10^{-6}) qui ne peut être observé qu'au moyen d'un champ B_0 aussi homogène que possible sur tout le volume utile de l'échantillon. Il s'avère donc indispensable de corriger l'homogénéité naturelle du champ B_0 principal au moyen de bobines annexes (appelées « shims » en anglais) qui produisent des champs correctifs selon le développement de B_0 par rapport aux coordonnées spatiales.

Le rôle de « shims » est de créer des gradients qui compensent aussi exactement que possible les gradients naturels. Ces opérations s'avèrent particulièrement critiques si l'on a affaire à des échantillons hétérogènes, notamment dans le cas de la spectroscopie *in vivo*.

➤ Le déplacement chimique

Les constantes d'écran ne sont pas mesurées. On préfère déterminer des différences de constante d'écran entre les noyaux d'une molécule servant de référence (notée $\sigma_{\text{réf}}$) et ceux de l'échantillon observé ($\sigma_{\text{éch}}$) selon la relation :

$$\delta = (\sigma_{\text{réf}} - \sigma_{\text{éch}}) \cdot 10^6$$

où δ est appelé déplacement chimique et s'exprime en particules par million (ppm).

Le déplacement chimique est caractéristique de l'environnement électronique, donc de la fonction chimique, dans lequel est impliqué le noyau considéré. Dans la pratique, il est mesuré par une différence de fréquence entre le signal de l'échantillon (de fréquence $\nu_{\text{éch}}$) et le signal d'une référence (de fréquence de résonance $\nu_{\text{réf}}$). En écrivant $(\sigma_{\text{réf}} - \sigma_{\text{éch}})$ en fonction des fréquences de résonance, on obtient :

$$\delta = \frac{\nu_{\text{éch}} - \nu_{\text{réf}}}{\nu_0} \cdot 10^6$$

avec ν_0 , la fréquence de résonance théorique pour l'échantillon considéré.

Traditionnellement, les spectres sont représentés de sorte que les fréquences croissent de la droite vers la gauche (Figure 3). La référence utilisée est une substance étalon dissoute dans l'échantillon (référence dite interne) : on utilise couramment le TMS (tétraméthylsilane, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) qui produit un pic unique à une extrémité du spectre, pour l'analyse en RMN du proton.

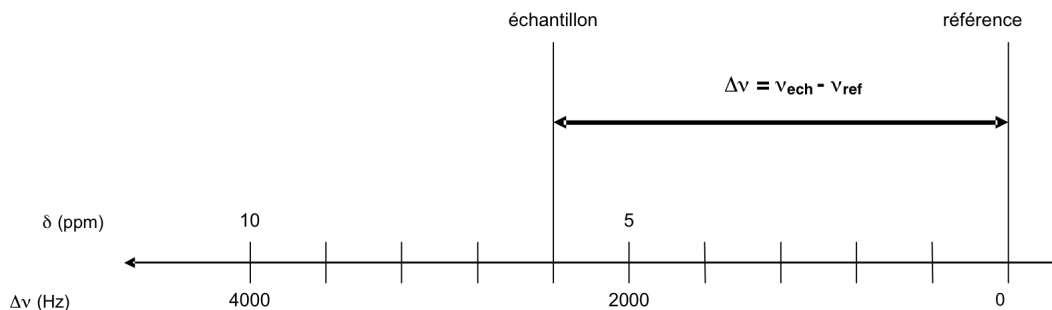


Figure 3: Echelles de déplacement chimique du proton pour $B_0 = 9.4$ Tesla (fréquence de résonance du proton 400 MHz) (d'après Canet *et al.*, 2002).

➤ Le couplage spin-spin

Les structures fines qui apparaissent sur les spectres sont attribuées à des interactions intramoléculaires entre spins nucléaires. Cette interaction s'établit via les spins des électrons de liaison : on parle de couplage indirect ou de couplage J. Ces couplages sont responsables de dédoublements de la résonance des atomes en une succession de raies distinctes dite « multiplet ».

Pour schématiser ce processus, considérons la formation du signal de deux hydrogènes voisins (H_A et H_X), situés sur des carbones adjacents, en RMN du proton. Deux configurations (parallèle ou antiparallèle) peuvent être envisagées pour les spins des protons A et X. A chacune de ces situations va être associé, pour H_A et H_X , un léger déplacement des fréquences de résonance par rapport à A et X, où apparaîtraient les signaux s'il n'existait aucun couplage entre les deux protons. Ceci entraîne l'apparition, pour chaque proton, d'un « doublet » d'écartement J_{AX} (Figure 4). Le couplage J est indépendant de B_0 et s'exprime en hertz. Il diminue lorsque la distance entre les noyaux considérés augmente.

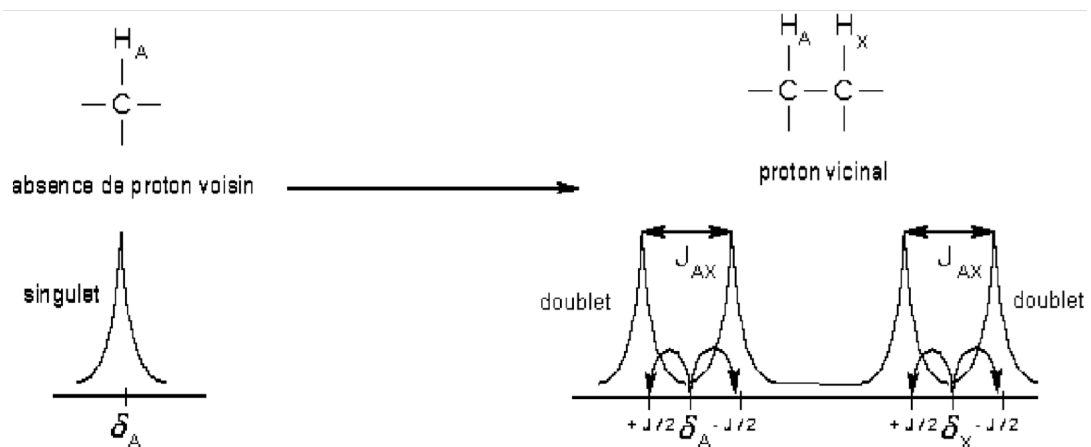


Figure 4: Dédoublement du signal de deux protons voisins en spectroscopie RMN 1H . δ_A et δ_X , déplacements chimiques des signaux de résonance des protons H_A et H_X isolés ; J_{AX} écartement entre les deux éléments des doublets de résonance des protons H_A et H_X lorsqu'ils sont couplés.

D'une manière plus générale, le signal d'un noyau X couplé avec n noyaux de spin $1/2$ apparaît sous la forme d'un multiplet à n+1 branches.

❖ La discrétisation des spectres

L'analyse en spectroscopie RMN de liquides biologiques – urine, plasma ou liquide céphalorachidien – ou de produits d'extraction tissulaire conduit à l'obtention de spectres complexes comportant des milliers de pics. La distribution et l'intensité de ces pics sont déterminées par les concentrations relatives de solutés et, dans certains cas, par leurs interactions moléculaires.

En fonction des rôles biologiques qu'ils remplissent, la composition des échantillons analysés varie au cours du temps : chaque échantillon biologique est caractérisé à un instant « t » par une "empreinte" en RMN.

La mesure traditionnelle des principaux signaux de résonance magnétique peut être utilisée pour détecter des changements biochimiques, mais la complexité des spectres et la présence de variations naturelles rendent difficile la détection *de visu* des variations. Ainsi, il est en général nécessaire d'utiliser des techniques de réduction des données, puis d'analyses statistiques multivariées, afin d'accéder aux perturbations spectrales significatives.

La réduction des données passe par une discrétisation des spectres, c'est-à-dire leur traduction en une série de valeurs discrètes pouvant être comparées par des analyses statistiques. Pour cela, l'aire sous la courbe spectrale peut être divisée en 250 à 1000 portions d'intégrations successives correspondant à des intervalles de déplacement chimique de quelques dixièmes de ppm.

Par ailleurs, le plus souvent dans les études métabonomiques, seule la concentration relative des différents composés est importante. Aussi, des valeurs d'intégrales relatives (rapport entre l'aire sous une portion de courbe et l'aire totale) sont utilisées pour évaluer les variations de composition des milieux analysés. Il est néanmoins possible d'obtenir des valeurs quantitatives concernant les concentrations en métabolites. En effet, l'aire sous la courbe d'un pic est directement proportionnelle au nombre de noyaux qui lui ont donné naissance. Dès lors, si le pic d'identification d'un composé ne chevauche pas les pics des autres constituants, son aire peut être utilisée pour déterminer directement la concentration de ce constituant, à condition que l'on connaisse l'aire du signal d'un proton dans une molécule donnée. Ce paramètre peut être déterminé par exemple à partir d'un étalon interne de concentration connue.

c/ Réalisation pratique

Les échantillons de plasma ont été analysés grâce à la spectroscopie par ^1H RMN. Le protocole suivi fut 100 μL de plasma par injection directe. Les spectres ont été obtenus grâce à un spectromètre Bruker Avance DRX 600 (Bruker, Karlsruhe, Allemagne) opérant à une fréquence de résonance du proton de 600,13 MHz et équipé d'une sonde cryogénique triple noyau ^1H - ^{13}C - ^{15}N . Les spectres ont été obtenus en utilisant la séquence « Improved Watergate » (Water Gradient Tailored Excitation) permettant de supprimer le signal de l'eau. Le signal a été acquis en accumulant 128 FIDs (signaux de précession libre) sur 32 K points mémoire pour une fenêtre spectrale de 12 ppm. Une fonction exponentielle équivalente à un nivellement de 0,3 Hz de la ligne de base a été appliquée avant la transformée de Fourier. Le zéro a été attribué au pic du TMSP.

Un spectre a ainsi été obtenu pour chaque échantillon.

Des intégrations relatives ont été réalisées sur chaque spectre avec le logiciel Amix (Analysis of Mixtures, version 3.6.4) de Bruker Analytische Messtechnik (Karlsruhe, Allemagne). La région du spectre de 0.5 à 10 ppm a été segmentée en intervalles (ou buckets) consécutifs et ne se recoupant pas de 0.04 puis de 0.01 ppm, découpant ainsi le spectre respectivement en 238 et 952 régions intégrées. La région de déplacement chimique 4.5 à 5 ppm a été ramenée à zéro pour supprimer l'effet de résonance de l'eau.

Les matrices ainsi obtenues pour les analyses statistiques, comportaient donc 224 colonnes pour les buckets de 0.04 ppm et 896 colonnes pour les buckets de 0.01 ppm après suppression des colonnes correspondant à l'eau.

Chaque colonne a été utilisée comme variable.

V. Représentation des données :

Analyses Statistiques Multivariées

1) L'analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales est une technique de représentation des données, ayant un caractère optimal selon certains critères algébriques et géométriques, et que l'on utilise en général sans référence à des hypothèses de nature statistiques ou à un modèle particulier.

En effet, l'analyse en composantes principales (ACP) est une méthode mathématique d'analyse de données qui consiste à rechercher les directions de l'espace qui représentent le mieux les corrélations entre n variables aléatoires, qui dans notre cas, sont les données RMN. Cette ACP va déterminer les axes qui expliquent le mieux la dispersion du nuage de point et va les ordonner par inertie expliquée. Ainsi, si on décide de ne retenir que les deux premiers axes de l'ACP, on pourra alors projeter notre nuage de dimension 238 (ici, en bucket 0,04 ppm, nous avons 238 variables) sur un plan, et le visualiser.

Ainsi, dans notre étude, nous sommes en possession d'un tableau de mesures dont les colonnes figurent des variables à valeurs numériques continues (données RMN) et les lignes représentent les individus sur lesquels ces variables ont été mesurées.

Les représentations géométriques entre les lignes et les colonnes du tableau de données obtenues grâce à l'ACP permettent de représenter visuellement les proximités entre les individus et entre les variables. En ce qui concerne les individus, la distance entre deux points est une distance euclidienne classique. Ainsi, deux points sont très proches si, dans l'ensemble, leurs coordonnées sont très proches. Les deux individus concernés sont alors caractérisés par des valeurs presque égales pour chaque variable. Enfin, lorsque l'on s'intéresse aux variables, si les valeurs de deux variables particulières sont très voisines pour tous les individus, ces variables sont représentées par deux points très proches. Cela signifie que les variables mesurent une même chose ou qu'elles sont liées par une relation particulière (Lebart *et al.*, 2004 ; Morineau et Aluja-Banet, 1998).

Lors de la réalisation d'une ACP, l'inertie ou le pourcentage de la variance expliquée servent d'outil d'évaluation globale de la qualité d'une représentation. Cependant, leur

signification statistique est délicate à interpréter et peuvent donner lieu à des interprétations erronées.

L'inertie de chaque axe correspond à un «pouvoir explicatif» des facteurs. Son appréciation doit cependant tenir compte du nombre de variables et du nombre d'individus : un taux d'inertie (relatif à un axe) égal à 10% peut être une valeur importante si le tableau possède 100 variables et très faible s'il n'y en a que 10 (Lebart *et al.*, 2004).

2) L'analyse factorielle discriminante

L'analyse factorielle discriminante (AFD) est une technique de statistique descriptive et explicative qui travaille sur un ensemble d'observations décrites par n variables, réparties en x groupes. Elle donne lieu comme l'ACP à des calculs d'axes principaux.

L'AFD vise à produire un nouvel espace de représentation qui permet de distinguer au mieux les différents groupes. La démarche est de produire une suite de variables discriminantes, non corrélées deux à deux, de manière à ce que les individus du même groupe projetés sur ces axes soient les plus proches possibles les uns des autres, et que les individus de groupes différents soient les plus éloignés possibles.

Ainsi, l'AFD consiste à rechercher les combinaisons linéaires de variables explicatives, généralement continues (ce qui est le cas dans notre étude), qui permettent de séparer au mieux les x groupes.

La première combinaison linéaire est celle dont la variance entre les groupes (inter-groupes) est maximale, afin d'exalter les différences entre les groupes, et dont la variance à l'intérieur des groupes (intra-groupes) est minimale, pour que l'étendue des groupes soit délimitée. Puis, parmi les combinaisons linéaires non corrélées à la première, celle qui discrimine ensuite le mieux les classes sera recherchée, etc. (Lebart *et al.*, 2004).

3) Les distances de Mahalanobis

La comparaison des distances de Mahalanobis permet d'analyser les proximités entre les groupes obtenus lors de la représentation graphique de l'AFD.

Lors du calcul des distances euclidiennes entre deux points d'un graphique, toutes les composantes observées sur x ou y contribuent de la même manière au calcul de la distance entre x et y.

La distance euclidienne entre deux points x et y de coordonnées :

$x = (x_1, \dots, x_i, \dots, x_n)$ et $y = (y_1, \dots, y_i, \dots, y_n)$ est calculée avec la formule :

$$d_{E(x,y)} = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + \dots + (x_n - y_n)^2}$$

Dans le cas des distances de Mahalanobis, le calcul prend en compte la variabilité de chaque variable afin de donner plus de poids aux variables ayant une faible variabilité.

La distance de Mahalanobis entre deux points est ainsi définie par :

$$d_{M(x,y)} = \sqrt{\left(\frac{x_1 - y_1}{s_1}\right)^2 + \dots + \left(\frac{x_n - y_n}{s_n}\right)^2}$$

avec s_i la variance de $(x_i; y_i)$.

Pour calculer les distances entre deux groupes, la moyenne de chaque groupe est calculée, puis c'est cette distance qui va être prise en compte.

Si on calculait la distance entre deux groupes en utilisant les distances euclidiennes, on aurait la distance entre les valeurs moyennes de chaque groupe mais cela signifierait que chaque point du groupe serait considéré à une distance isotrope de la moyenne. Alors qu'en utilisant la matrice de Mahalanobis, on prend en compte la répartition géométrique des points autour de cette moyenne.

Ce seront donc les distances de Mahalanobis qui seront prise en compte lors de notre analyse statistique.

4) Le T^2 de Hotelling

Ce test va nous permettre de savoir si les distances de Mahalanobis entre deux groupes sont significatives.

Le T^2 de Hotelling constitue une généralisation du test de Student. Plus précisément, si le test t de Student permet de comparer les moyennes de deux variables aléatoires, le test T^2

de Hotelling permet de comparer globalement les moyennes de 2 groupes de plusieurs variables aléatoires (Falissard, 2005).

5) Orthogonal signal correction

Les données obtenues lors de notre étude sont sujettes à de fortes variations induites par différents facteurs (alimentation, sexe, âge, race...). Des méthodes de prétraitement peuvent donc être utilisées afin de mettre en exergue l'information pertinente et obtenir ainsi un modèle plus simple de l'étude pour une interprétation plus aisée. La filtration par «Orthogonal Signal Correction» (OSC) a été développée pour enlever la variation orthogonale de Y dans X (Trygg, 2002). Dans notre cas, X représente toutes les variables, et Y, les facteurs choisis pour la réalisation des OSC.

Ainsi, l'OSC permet de s'affranchir de la variation de facteurs qui ne sont pas intéressants dans l'étude et qui viennent compliquer la représentation graphique des données.

6) Régression Partial Least Square

La régression «Partial Least Square» (PLS) est une extension du modèle de régression linéaire multiple.

Elle est utilisée lorsque l'on cherche à réaliser une régression d'une ou plusieurs variables à expliquer sur des variables explicatives x_1, \dots, x_p qui peuvent être fortement corrélées entre elles (Tenenhaus, 1998). La présence de données manquantes est acceptée et il peut y avoir un grand nombre de variables explicatives, même supérieur au nombre d'observations. Par ailleurs, les coefficients de régression doivent être interprétables. C'est-à-dire que l'on souhaite prendre en compte le fait que le chercheur mesure la contribution de la variable x_j à la construction de la variable Y à l'aide du coefficient de régression (Wold, 1983).

La PLS permet donc de trouver les relations fondamentales entre deux matrices notées X et Y (dans notre cas, X représente toutes les variables et Y le statut des chevaux de l'étude).

7) La démarche statistique de notre étude

Après obtention des données de la RMN, des analyses statistiques multidimensionnelles (ACP et AFD) ont été effectuées avec le logiciel Splus 2000® version 2.0 (Insightful Corp, Seattle, WA) avec les bibliothèques de fonction *Mass* et *Multidim*.

Une ACP a d'abord été réalisée pour observer la dispersion des individus et voir si certaines tendances au regroupement apparaissaient parmi les échantillons.

Ensuite, des AFD ont été effectuées, toujours avec Splus 2000®, sur la base de classes établies selon le statut, le stade, le traitement, l'écurie... Ces analyses ont été réalisées sur les données transformées en log (fonction logarithmique en base 10).

Cependant, le nombre de variables générées par RMN est généralement nettement supérieur au nombre d'échantillons. Cette redondance d'informations empêche l'inversion des matrices de variances - covariances. Afin de retirer les variables redondantes, une double filtration a été réalisée, correspondant à une analyse successive de la variance et des corrélations issues du plan expérimental (Dumas *et al.*, 2002).

La première filtration est basée sur une ANOVA (ANalysis Of VAriance) en utilisant un facteur d'intérêt. Cette étape va nous permettre de révéler les variables significativement affectées par le plan expérimental. Lors de cette ANOVA, les variables non significatives sont écartées avec un seuil $p = 0.05$ (quand $p > 0,05$, la variable est écartée de la sélection). Ce seuil correspond à la valeur de la probabilité associée de l'analyse de variance et est fixé par l'opérateur.

Ensuite, une deuxième filtration est effectuée. Il s'agit d'un processus de sélection «pas-à-pas» de variables, en utilisant les variables préalablement sélectionnées par l'ANOVA. Cette deuxième filtration de variables correspond en fait à une introduction de variables. En effet, à chaque «pas», le coefficient de corrélation partielle entre chaque variable candidate encore en lice et la variable de classe est calculé. Il code pour la distribution des individus en groupes. La variable dont la valeur prédictive de l'espace d'information restant est la plus élevée est sélectionnée tandis que les variables linéairement corrélées au sous-espace déjà sélectionné sont rejetées. Ainsi, la filtration sélectionne les variables très prédictives de l'espace d'information restant, qui est orthogonal à l'espace d'information modelé par les variables déjà sélectionnées.

Cette sélection se termine lorsque toutes les variables sont sélectionnées ou lorsque les coefficients de corrélation sont tous inférieurs à un seuil final de 10^{-4} (valeur par défaut).

La double filtration effectuée nous permet donc d'obtenir une combinaison unique de variables informatives et indépendantes.

Enfin, les variables sélectionnées au terme de l'analyse pas-à-pas, ont été exportées sous SAS® version 8.01 (SAS Institute Inc, Cary, NC) pour calculer les corrélations canoniques et les distances de Mahalanobis entre les groupes.

Les corrélations canoniques correspondent aux coefficients de corrélation par projection orthogonale des variables sélectionnées selon chacune des directions factorielles discriminantes.

Les distances de Mahalanobis permettent d'analyser les proximités entre les groupes par comparaison des distances entre ces groupes tout en prenant en compte la variabilité de chaque variable (Trygg, 2002).

Par ailleurs, les données recueillies étaient sujettes à de fortes variations dues à un grand nombre de sources (environnement, mode de vie, alimentation, climat...), certaines d'entre elles ont subi des OSC avec différents facteurs grâce au logiciel Simca-P 11.0 (Umea, Sweden). En effet, les OSC permettent de souligner les informations réellement utiles afin de simplifier le modèle et d'en faciliter son interprétation.

Ensuite, des PLS (Partial Least Square) ont pu être réalisées avec différents facteurs comme le statut des chevaux, animaux traités ou non, type de traitement...

Résultats

I. Caractérisation de l'échantillon

Cette étude a porté sur 58 chevaux de la région Midi-Pyrénées suivis de Février 2005 jusqu'en Avril 2008. Aucun critère de race ou d'âge n'a été retenu. Pour certains animaux, le suivi a été difficile, voire impossible, à cause d'un propriétaire non conciliant ou de la vente inattendue de l'animal.

Les chevaux ont été répartis en trois groupes. Le premier groupe concerne 16 chevaux présentant les symptômes de Harper Australien. Ils se sont vus attribuer des grades selon la classification de Huntington (1989), et ceci, à chaque prélèvement. Le second groupe est celui des chevaux sains, au nombre de 37, qui ont servis de témoins. Ils ont été choisis dans les écuries ou près où des chevaux atteints étaient présents. Enfin, un troisième groupe a été créé pour 5 chevaux dits suspects. Ce sont des chevaux dont le Harper n'a pas pu être clairement défini à partir des symptômes observés.

Le plasma de ces 58 chevaux a été collecté à plusieurs reprises, donnant alors 267 échantillons.

1) Mode de vie des individus de l'étude

Les chevaux de notre étude ont tous un mode de vie similaire. En effet, la plupart d'entre eux vivent au pré. 20% des individus alternent entre prairie et box, avec généralement un rythme classique avec mise au pré le jour et box la nuit. Un cheval de l'étude est passé du pré au box lorsqu'il a été malade.

A chaque prélèvement, nous avons noté si le cheval avait accès ou non à un pré contaminé. Il est à noter que la présence de porcelle enracinée a été décelée, mais il nous est

impossible d'affirmer que la plante a été ingérée par les chevaux ayant eu accès à des prés contaminés.

Certains chevaux étaient sur des prés contaminés lors des premiers prélèvements. Ces prés ont été traités par la suite sur nos conseils.

D'autres étaient sur des prés dépourvus d'*Hypochaeris radicata* lors du premier prélèvement puis n'ont jamais eu accès à des prés contaminés pendant l'étude. Cette situation concerne dix chevaux. Ces chevaux peuvent appartenir aux trois groupes cités précédemment (malades, sains ou suspects).

2) Répartition en fonction des écuries

Au cours de notre étude, les cas ont été observés dans 16 écuries différentes. Parmi ces écuries, 10 ont été suivies dans le temps. Pour les 6 écuries restantes, un seul prélèvement a été réalisé sur les chevaux. Ces prélèvements uniques concernent 13 chevaux (figure 5).

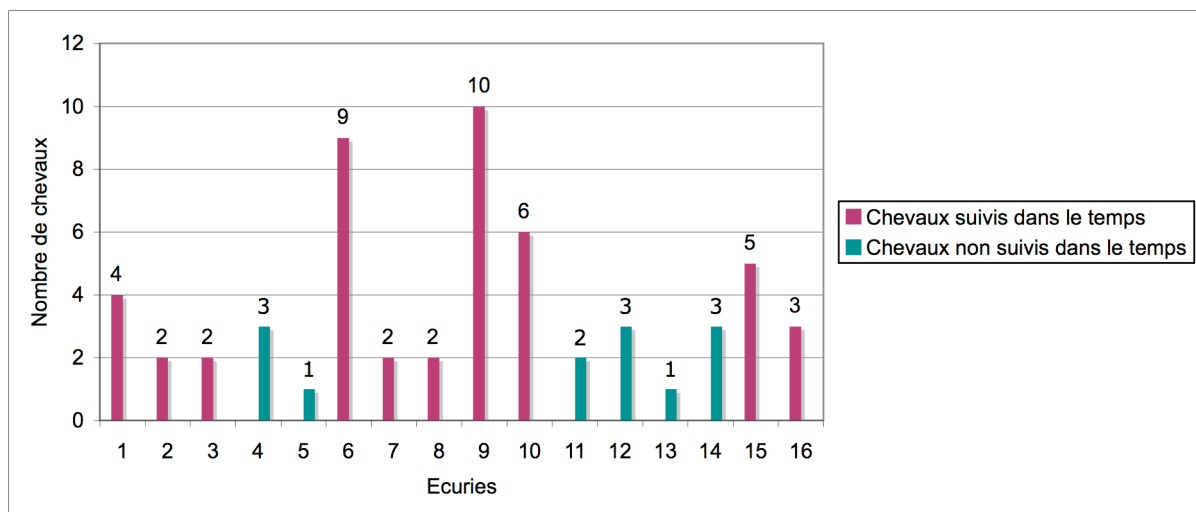


Figure 5: Répartition des chevaux de l'étude dans les différentes écuries et distinction d'un suivi ou non dans le temps.

3) Répartition en fonction de l'âge des chevaux

L'âge des chevaux reporté dans les analyses est celui qu'ils avaient lors de leur premier prélèvement (figure 6). Les âges des chevaux s'échelonnent de 2 à 25 ans avec une

répartition régulière des individus entre ces deux extrêmes. Cependant, les vieux chevaux (15 à 25 ans) sont sous représentés par rapport aux jeunes adultes (5 à 13 ans).

En ce qui concerne les sujets en croissance, nous n'avons pas eu de prélèvements sur des chevaux âgés de moins de deux ans, par contre nous avons une bonne répartition des sujets de 2 à 5 ans.

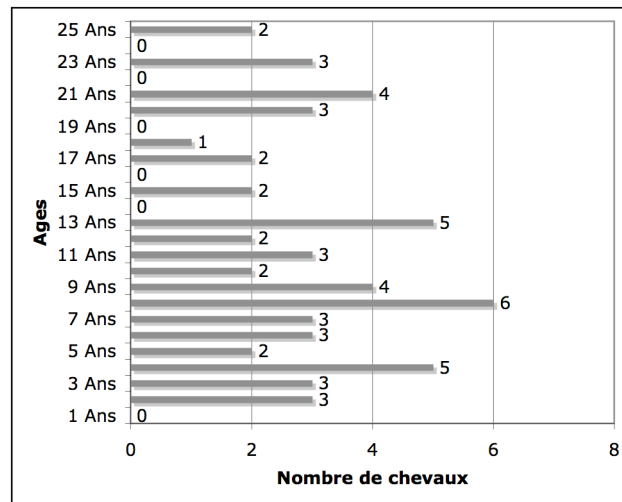


Figure 6: Répartition des chevaux de l'étude en fonction de leur âge.

4) Répartition en fonction du sexe

Notre échantillon comprend surtout des juments et des hongres (figure 7).

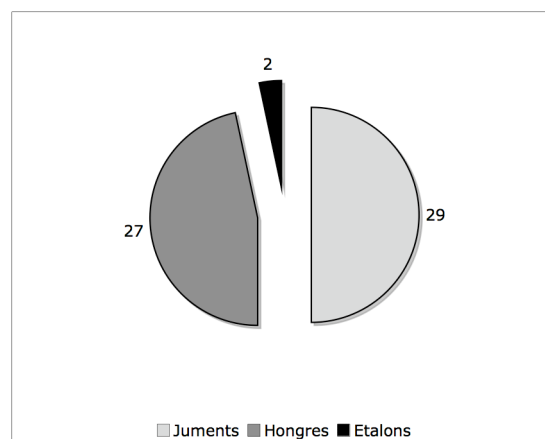


Figure 7: Répartition des sexes des chevaux de l'étude.

On note un nombre égal de femelles et de mâles, le terme mâle incluant ici les entiers et les hongres. Cette répartition est la même que dans la population équine en général.

5) Répartition en fonction du statut

Comme il a été évoqué précédemment, les chevaux ont été répartis dans trois groupes. Les effectifs de chaque groupe sont décrits sur la figure 8.

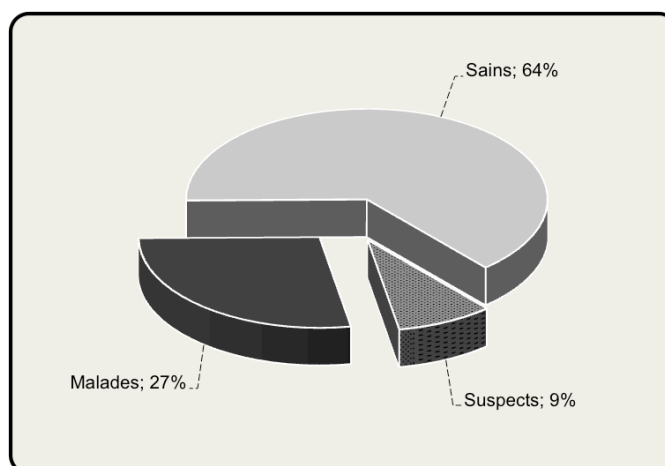


Figure 8: Répartition des chevaux de l'étude dans les trois groupes.

Dans les trois groupes de chevaux, certains pâturaient au départ des prés contaminés par *Hypochoeris radicata* puis certains de ces prés ont été assainis par les propriétaires. La répartition des chevaux sur les trois types de prés est donnée dans le tableau suivant (tableau 2).

	Prés			Total
	Contaminés	Non contaminés	Contaminés puis assainis	
Malade	8	4	4	16
Sains	29	6	2	37
Suspects	4	0	1	5
Total	41	10	7	58

Tableau 2: Répartition des trois groupes de chevaux dans les différents types de prés. Les prés sont dits contaminés lorsque l'on peut trouver de la porcelle enracinée, ceux-ci ayant été systématiquement contrôlés au moment des prélèvements sanguins des chevaux.

A la lecture de ce tableau, on s'aperçoit que quatre chevaux malades étaient sur des prés non contaminés. Ceci fait référence à la situation des chevaux lors des prélèvements mais n'exclut pas qu'ils aient eu accès à des pâtures contaminées auparavant.

Pour les chevaux malades, la classification de Huntington (1989) a été utilisée pour noter leur état clinique au jour du prélèvement. En effet, lors de chaque visite, les animaux ont été évalués cliniquement. Le grade qui apparaît dans le diagramme suivant correspond au grade maximal observé durant le suivi des chevaux. Les chevaux sains n'apparaissent donc pas (figure 9).

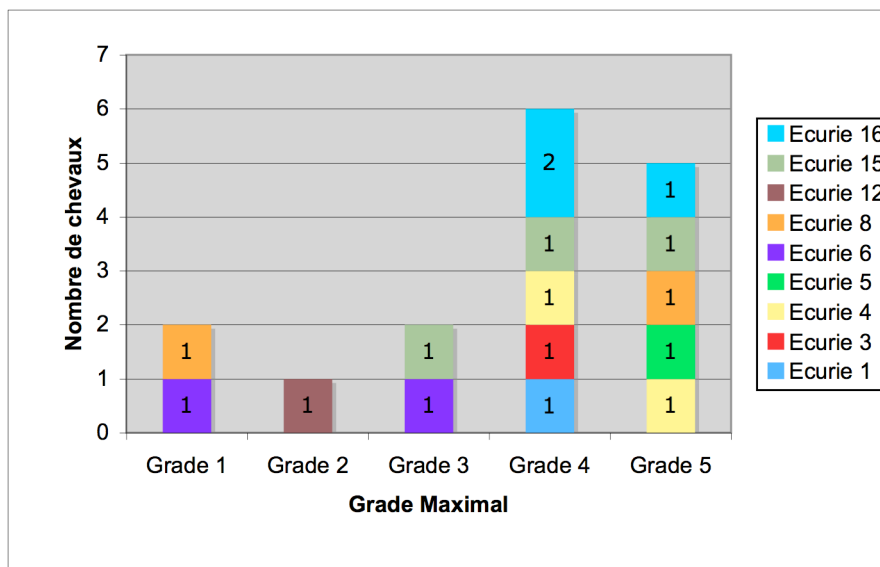


Figure 9: Répartition des chevaux malades en fonction du grade maximal atteint au cours du suivi.

6) Le suivi dans le temps

Certains chevaux de l'étude ont eu plusieurs prises de sang au cours d'un suivi de l'évolution de la maladie, de l'état des pâtures et de l'approche thérapeutique des différents cas rencontrés. D'autres chevaux n'ont pas pu être suivis par manque de coopération du propriétaire. Dans la figure suivante (figure 10), nous nous sommes intéressés uniquement aux chevaux qui ont été suivis dans le temps.

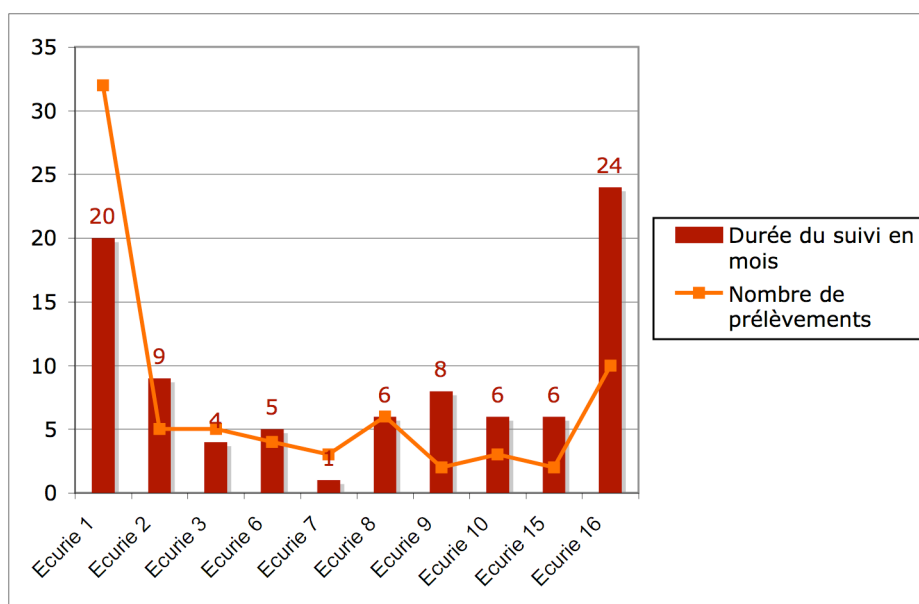


Figure 10: L'histogramme représente la durée du suivi réalisé dans chaque écurie, c'est-à-dire le temps écoulé entre la première et la dernière prise de sang. La courbe représente le nombre de prélèvements réalisés sur chaque cheval de l'écurie désignée. Les prises de sang ont été réalisées de façon aléatoire dans le temps.

Ce graphique montre que deux écuries principales ont été très suivies car ces écuries étaient proches de l'école vétérinaire et les propriétaires motivés pour participer à l'expérimentation. Les autres écuries ont été relativement suivies à l'exception de l'écurie 7 où il n'y a eu qu'un mois de suivi.

7) Répartition en fonction du traitement

Au cours de l'étude, dix chevaux ont été traités et, parmi ces individus, 7 étaient malades, 2 étaient considérés comme suspects et un cheval était sain.

Ce facteur traitement a été pris en compte lorsqu'il a été réalisé pendant la période de prélèvement sur les chevaux. En effet, certains chevaux de l'étude avaient reçu un traitement, mais ce dernier étant très antérieur aux prélèvements, il n'a donc pas été pris en compte.

Les deux types de traitements employés ont été évoqués précédemment : il s'agit de la taurine (10 g *in toto* par jour *per os* pendant 60 jours) et de la phénytoïne (12 mg/kg *per os*), administrées à 5 et 3 chevaux malades, respectivement. Les individus ayant reçu de la

phénytoïne étaient tous atteints, ils ont été traités sur des périodes s'étalant de 15 jours à 2 mois. Un cheval atteint fut traité avec de la phénytoïne pendant une durée de 6 mois, puis a reçu de la taurine après un «wash-out» de 2 mois.

Par ailleurs, un des chevaux sains de l'étude a reçu de la taurine.

Ces données ont été schématisées sur la figure 11.

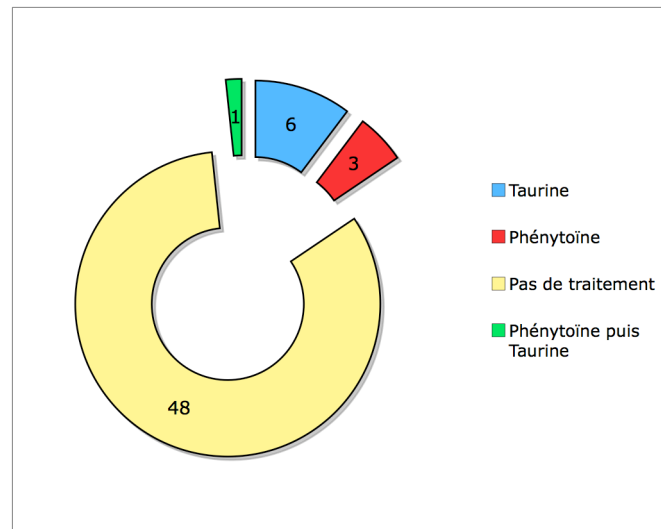


Figure 11: Répartition des chevaux de l'étude en fonction de l'existence et du type de traitement.

II. L'étude statistique

Les données obtenues par spectroscopie RMN des plasmas sont contenues dans un tableau qui comporte 268 lignes, une pour chacun des 268 prélèvements réalisés sur 58 chevaux, et 224 colonnes, correspondant aux intégrations relatives, avec un pas de 0,04 ppm de l'aire sous le spectre. Ces intégrations sont utilisées comme variables. Ce nombre de variables est obtenu après avoir retiré les colonnes correspondant à l'eau.

Ces variables ont été soit directement analysées en ACP, soit analysées en AFD après filtration pas à pas.

1) Analyse en composante principale (ACP)

La représentation graphique par ACP des plasmas obtenus chez tous les individus de l'étude, sans choix de facteur particulier, fait apparaître une disposition des points suivant deux groupes clairement définis (figure 12). L'un se projetant sur les quadrants gauches et l'autre sur les quadrants droits. Les deux groupes sont donc clairement séparés en fonction de l'axe 1.

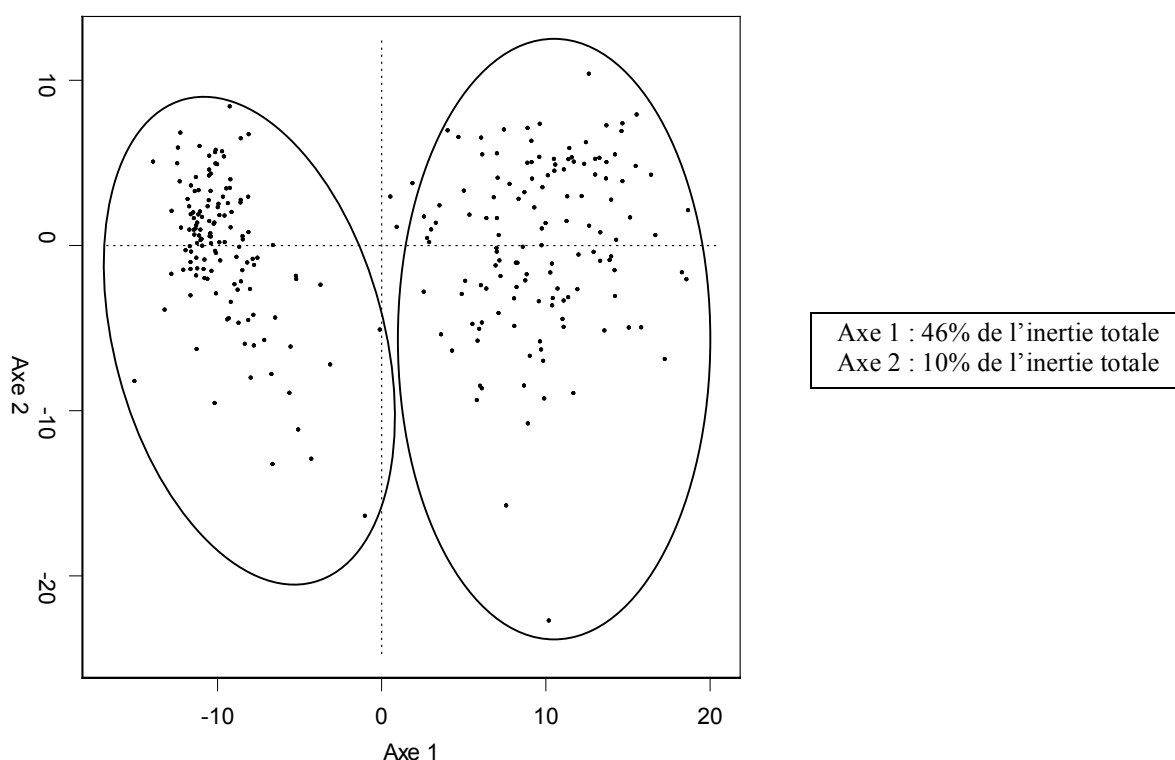


Figure 12: Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas de tous les chevaux de l'étude.

Le nombre de variables étant trop important, il est impossible pour le logiciel Splus 2000® d'identifier les points lors de la représentation graphique de l'ACP (figure 12) On a donc créé deux groupes au sein du tableau de données en séparant l'écurie 1 de toutes les autres écuries.

Lors de la représentation graphique de l'écurie 1 (figure 13), deux groupes déjà observés sur la figure précédente (figure 12) apparaissent et sont répartis comme

précédemment. L'un se projetant sur les quadrants gauches et l'autre sur les quadrants droits, nous observons donc une séparation des animaux selon l'axe 1.

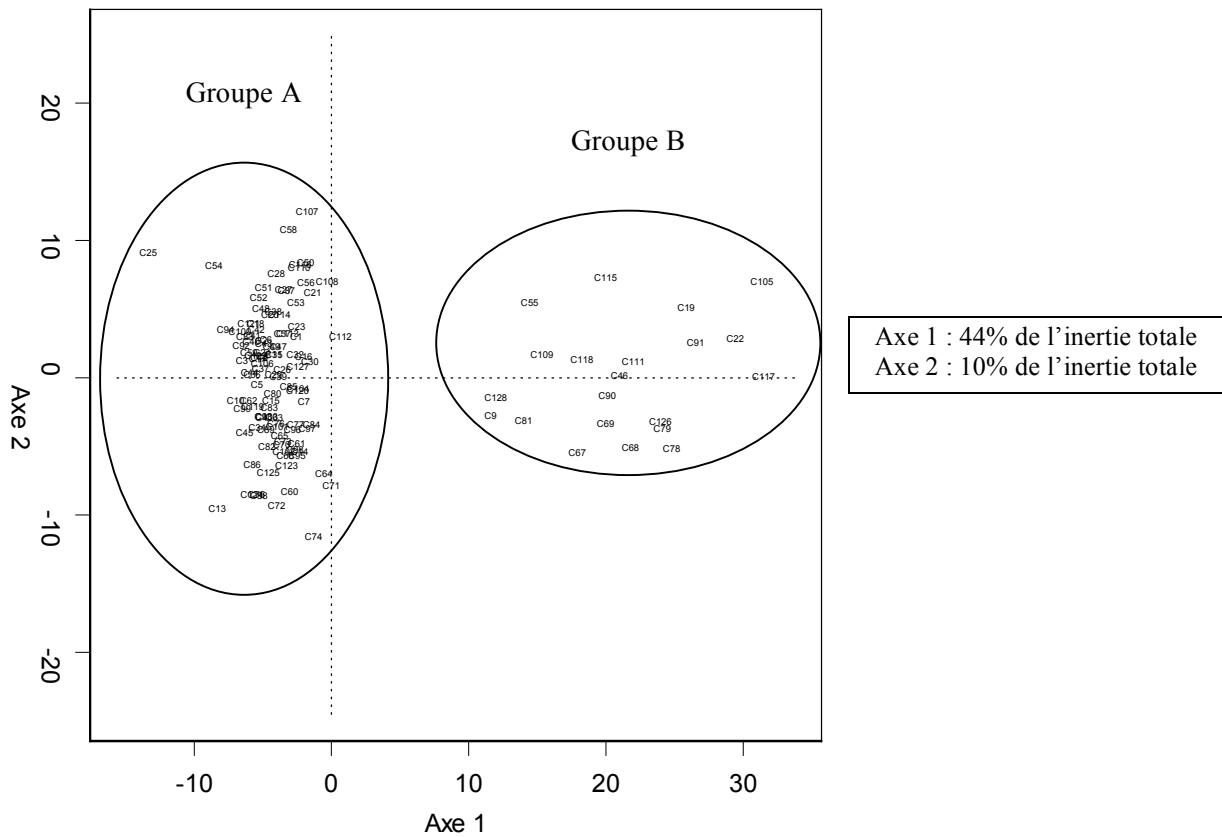


Figure 13: Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas de tous les chevaux de l'écurie 1.

L'identification des individus étant alors possible, une recherche de facteurs pouvant induire cette séparation a été faite selon le sexe, l'individu, la qualité du pré (contaminé ou non par *Hypochoeris radicata*), la réalisation d'un traitement sur le cheval au moment de la prise de sang, la date du prélèvement ou encore le statut du cheval (malade, sain ou suspect). Aucun de ces facteurs ne nous a permis d'expliquer la répartition graphique des individus de l'étude.

De même, nous retrouvons une répartition similaire en faisant une ACP avec les résultats obtenus à partir des chevaux appartenant à toutes les autres écuries sans pouvoir mettre en évidence un facteur pouvant expliquer un tel résultat (figure 14). Le facteur

« écurie » a été exploré dans ce groupe-ci puisque nous avons 15 écuries différentes.

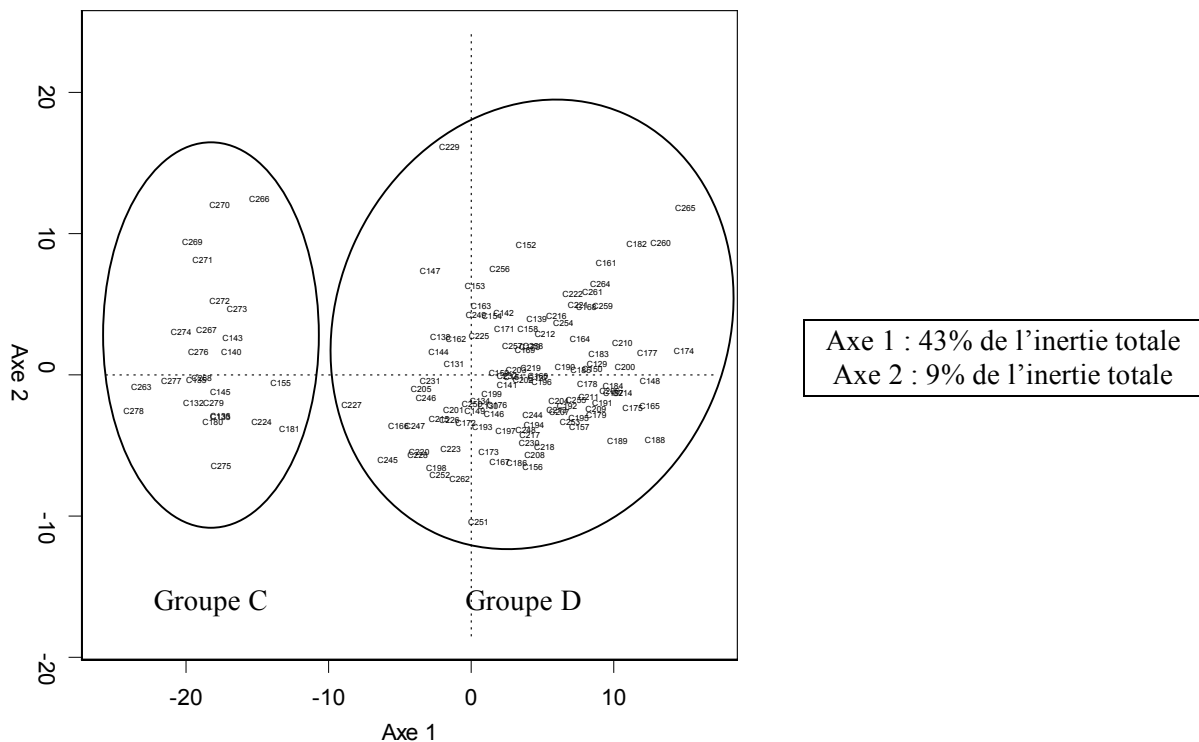


Figure 14: Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux de toutes les écuries, excepté la 1.

Ensuite, afin de s'assurer que ce soit toujours le même facteur qui sépare les groupes dans les deux ACP précédentes (avec, d'une part, l'écurie 1 et, d'autre part, les autres écuries), nous avons réalisé quatre ACP regroupant les groupes deux à deux.

Ainsi, dans les figures 15 à 18, nous avons nommé les quatre groupes qui se discernent en utilisant les lettres de A à D. Les ACP des groupes deux à deux montrent que les groupes A et C se projettent au même endroit, et il en est de même pour les groupes B et D. De plus, les groupes A et B apparaissent clairement séparés en fonction de l'axe 1 et nous obtenons le même type de représentation graphique avec les groupes C et D.

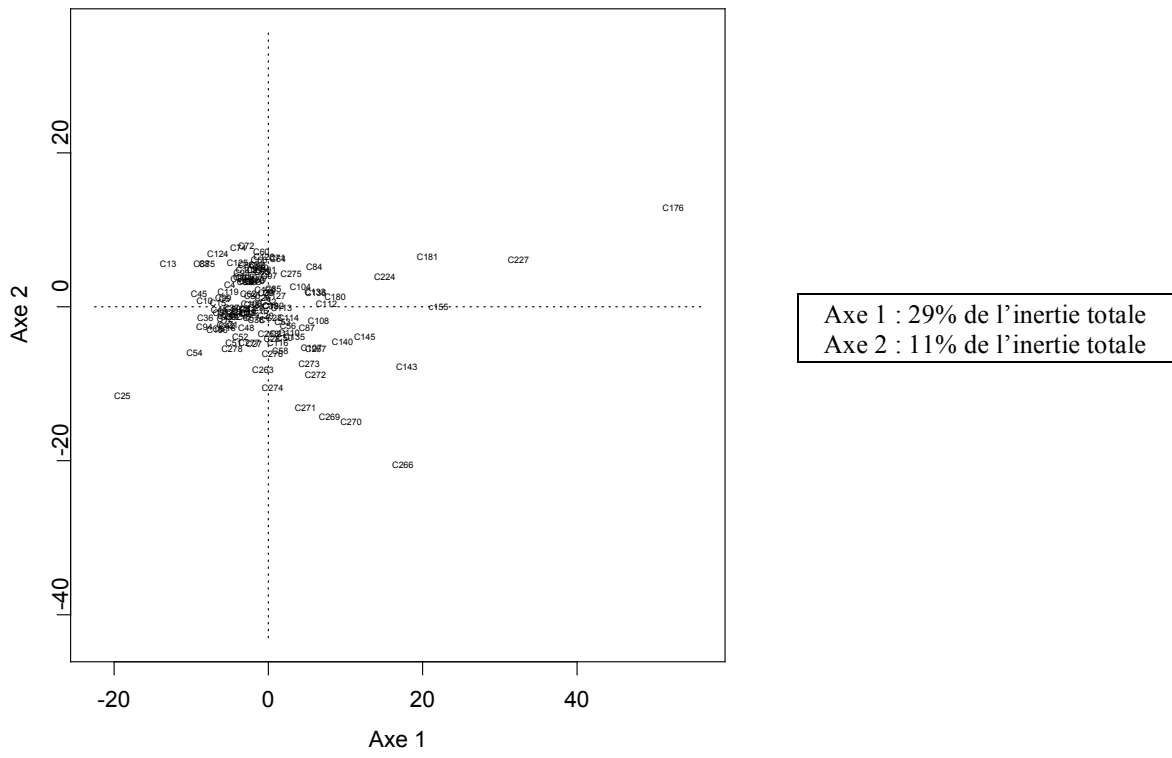


Figure 15: Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux des groupes A et C.

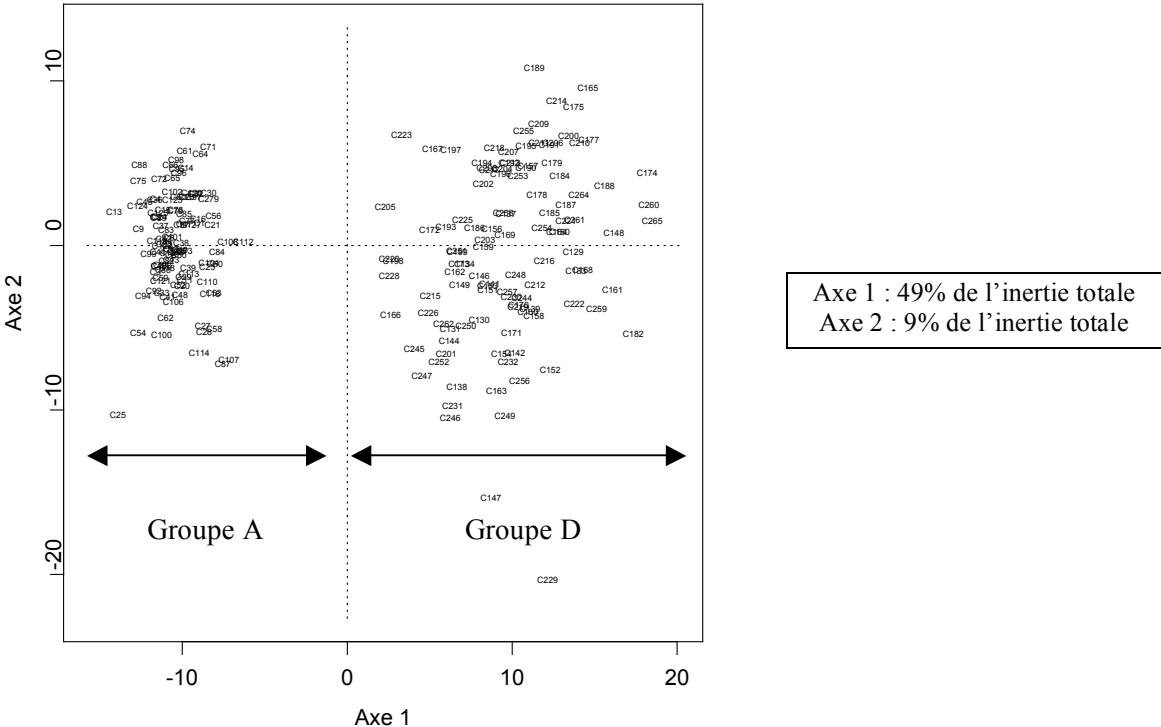


Figure 16: Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux des groupes A et D.

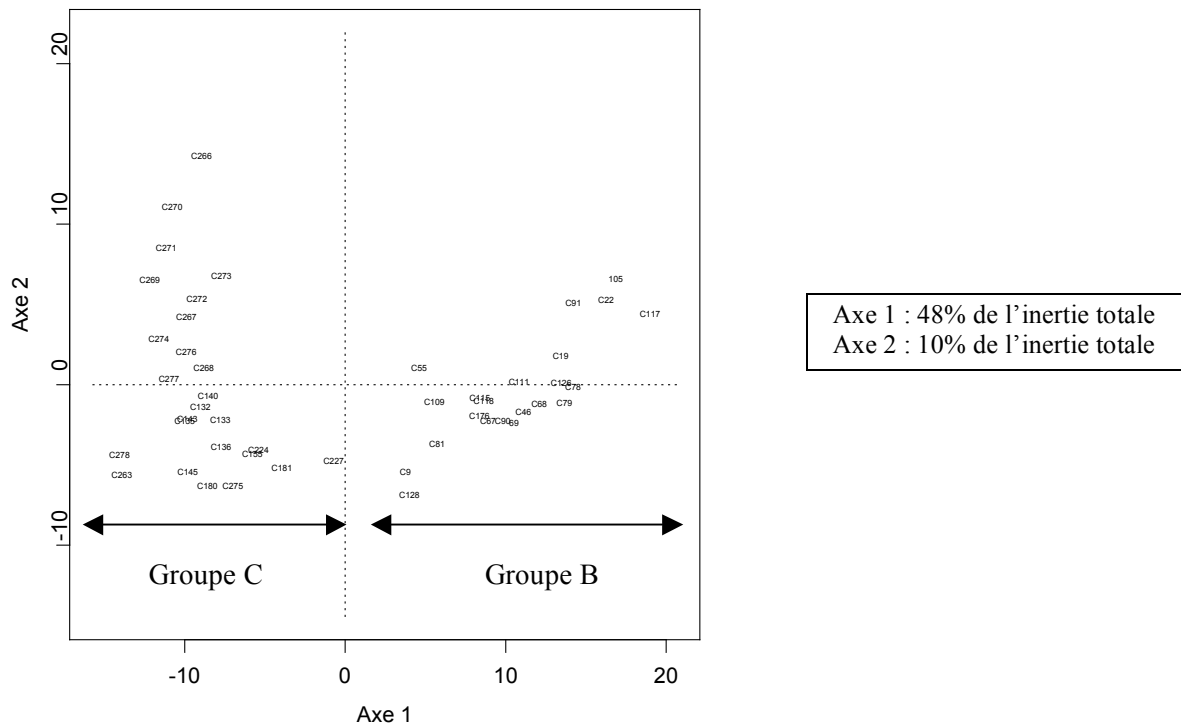


Figure 17: Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux des groupes B et C.

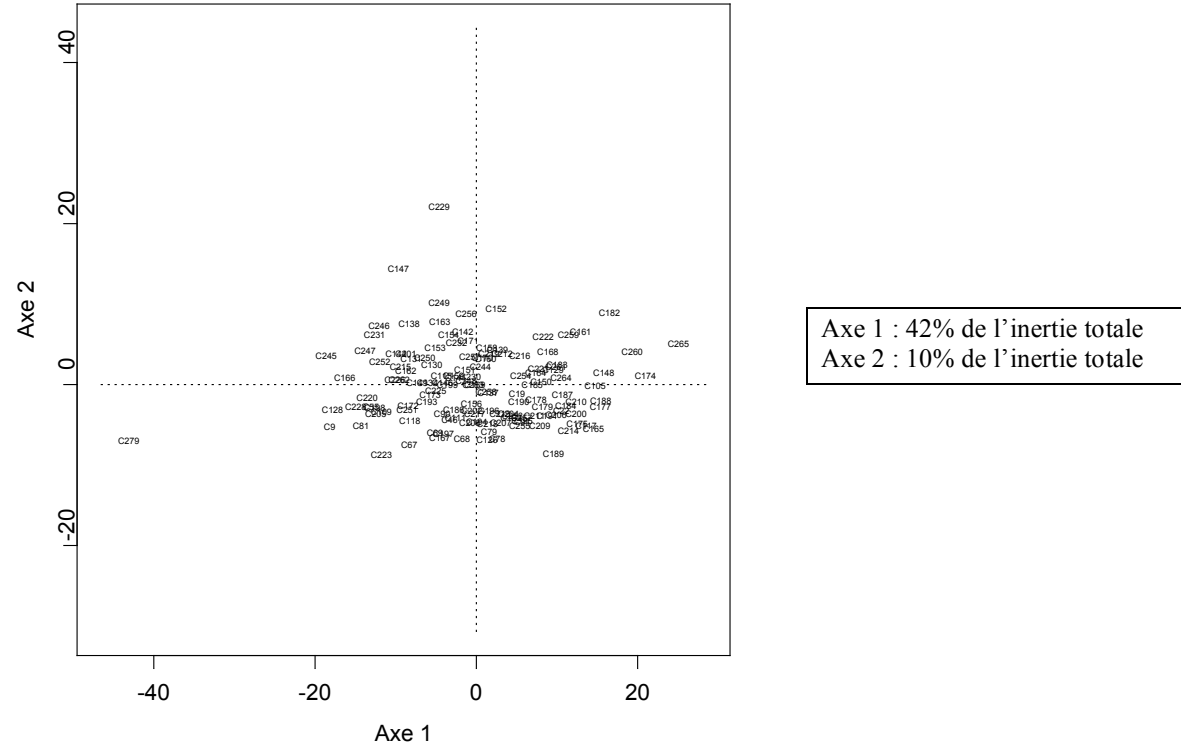


Figure 18: Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux des groupes B et D.

Les figures 15 à 18 montrent qu'il s'agit bien du même facteur ou du même groupe de facteurs qui interviennent dans la séparation graphique des individus, que ce soit dans l'écurie 1 ou dans les autres écuries.

Aussi, devant l'importance du facteur « sexe » en métabonomique (Domange *et al*, 2008), nous avons lancé une étude plus approfondie. Les individus ont été réarrangés en deux groupes séparant les mâles (hongres et étalons), des femelles. De nouvelles ACP ont été réalisées (figures 19 et 20). Les représentations graphiques montrent à nouveau deux groupes clairement séparés. En identifiant les individus, nous nous sommes aperçus que la séparation était la même que celle déjà obtenue avec la totalité des individus de l'étude.

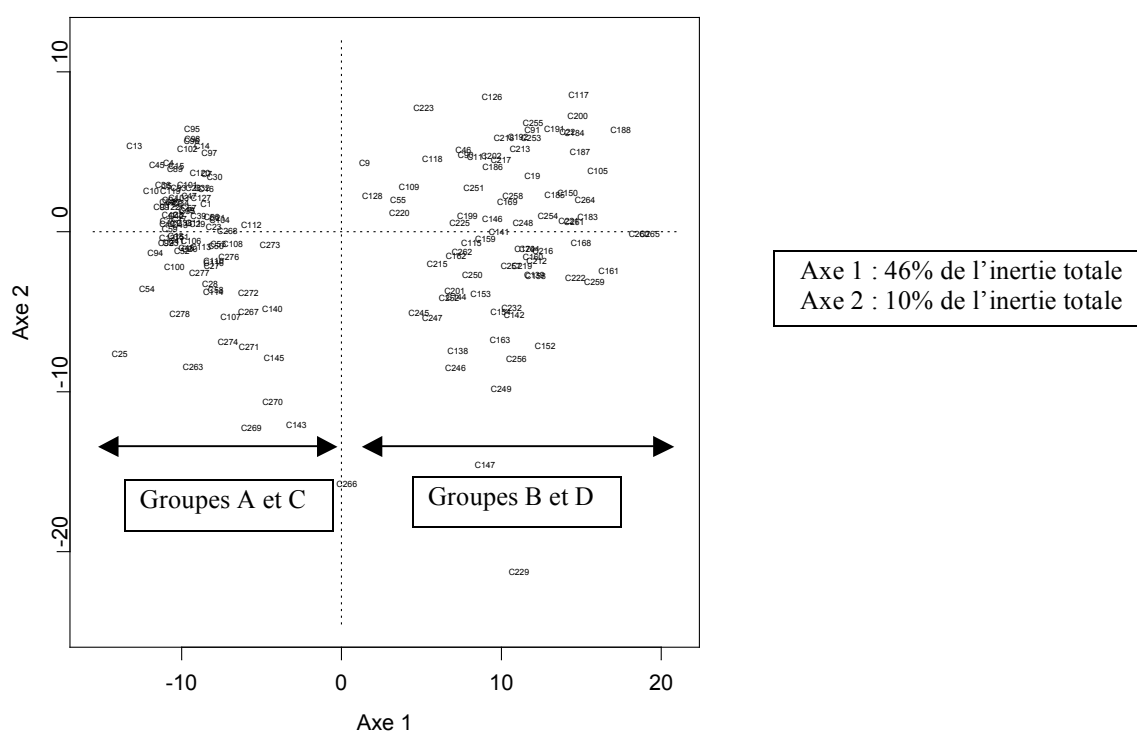


Figure 19: Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des juments de l'étude.

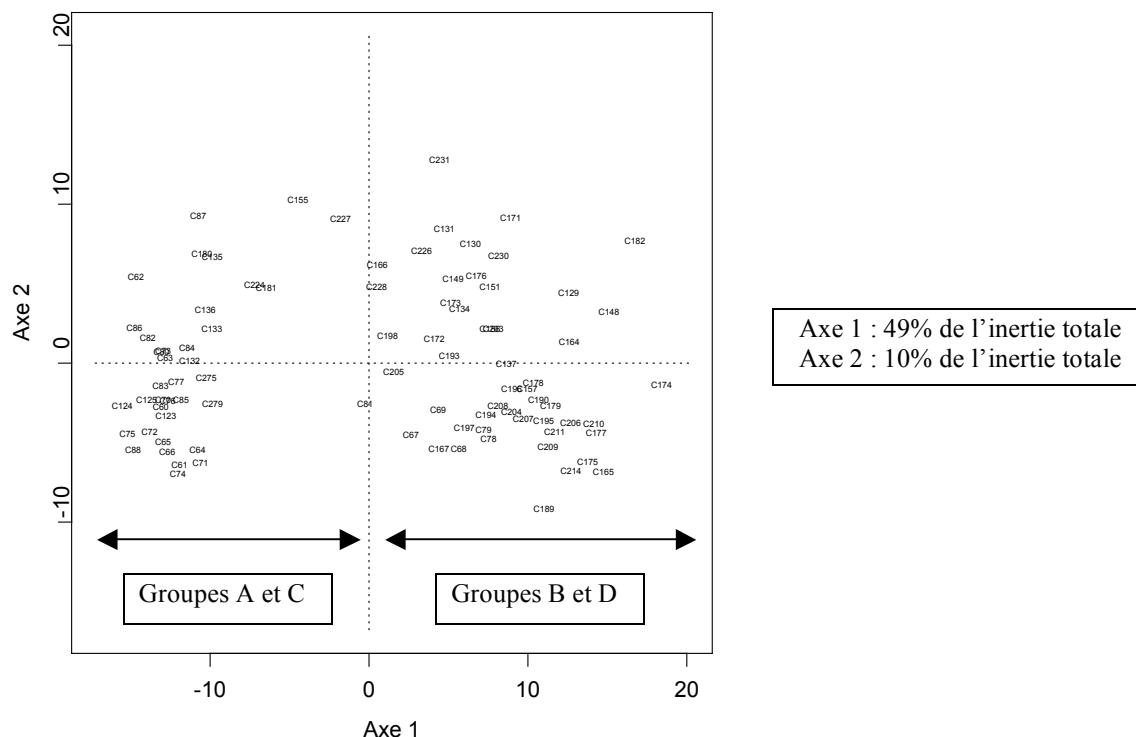


Figure 20 : Représentation en ACP des spectres RMN issus des plasmas des chevaux mâles (hongres et étalons) de l'étude.

Le facteur ou la combinaison de facteurs séparant les individus de l'étude en deux groupes restent ainsi inexpliquée. Il ne s'agit ni de l'écurie, ni du sexe, ni de la qualité du pré (contaminé ou non par la porcelle enracinée), ni du traitement, ni de la période du prélèvement (hiver ou été).

2) Analyse factorielle discriminante (AFD) et la sélection des variables

Dans ce paragraphe, les AFD ont été réalisées avec la totalité des individus de l'étude.

Ensuite, après la réalisation des AFD, nous nous sommes intéressés de plus près aux résultats de ces dernières. En effet, la complexité des spectres RMN et la grande variété des facteurs de variations mis en jeu rendent difficile la comparaison *de visu*. Or, les variables sélectionnées par AFD correspondent à des portions d'intégration spectrale dont on connaît la

position par le biais du déplacement chimique. L'étude des variables les plus fortement impliquées dans les différents types de ségrégation testés permet donc d'accéder aux zones du spectre significativement modifiées. L'importance relative de chaque variable dans la séparation des groupes est évaluée à partir des corrélations canoniques avec les directions factorielles. Le logiciel nous permettant d'obtenir ces corrélations canoniques est SAS® version 8.01 (SAS Institute Inc, Cary, NC).

Ainsi, les contributions des variables des AFD apparaissant comme les plus intéressantes pour notre étude ont été obtenues. Nous nous sommes ensuite concentrés sur les variables dont les corrélations canoniques étaient les plus fortes (c'est-à-dire proches de 1 en valeur absolue).

Enfin, certaines molécules responsables de la séparation des groupes des différentes AFD ont pu être identifiées.

a/ Etude des 4 groupes notés A à D créés avec les ACP

Un facteur arbitraire a été créé afin de séparer les individus en reprenant les quatre groupes formés précédemment et notés de A à D.

❖ Analyse factorielle discriminante

La représentation graphique (figure 21) de l'AFD montre une séparation des groupes d'individus selon le premier axe de discrimination factorielle (LD 1), portant 78,8% de la variabilité de l'échantillonnage. En effet, on observe que les groupes A et C sont corrélés négativement à LD1, alors que les groupes B et D le sont positivement ; ceci conforte les résultats obtenus précédemment par ACP (figures 12 et 15 à 18).

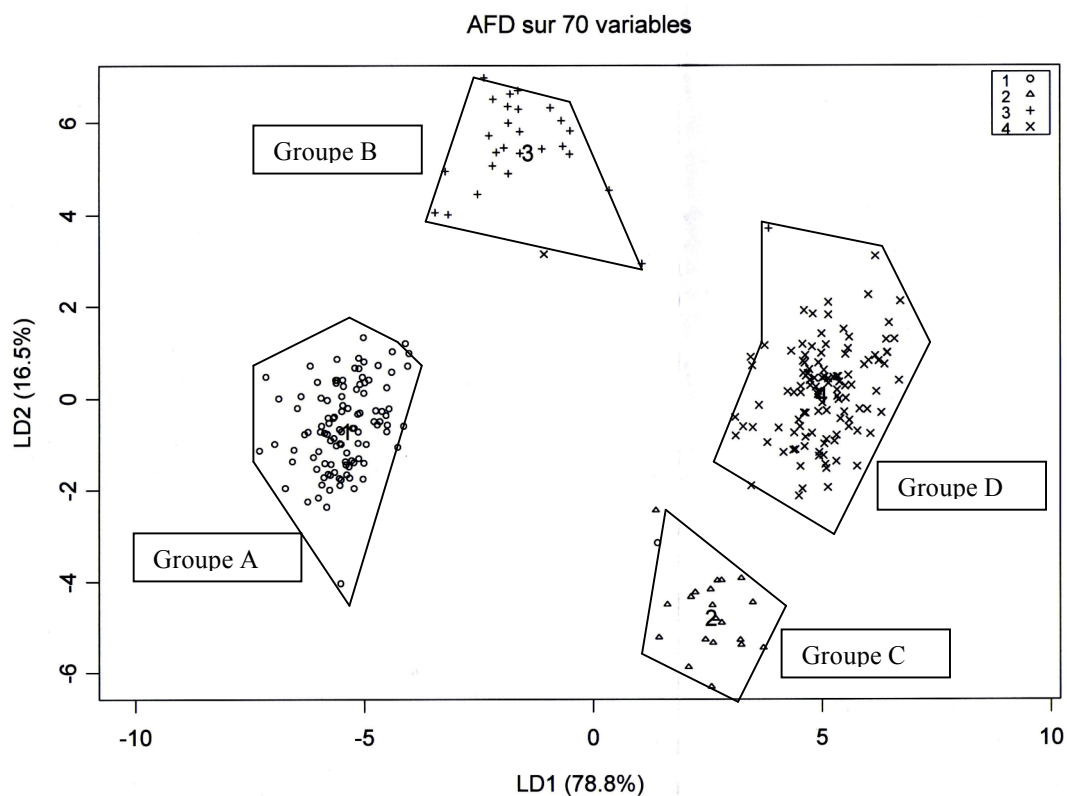


Figure 21: Représentation de l'AFD des spectres RMN issus des plasmas des chevaux de l'étude selon un facteur arbitraire.

Le tableau 3 rapporte les distances de Mahalanobis entre les groupes.

	A	B	C	D
A	0	13,18	16,62	62,91
B	13,18	0	14,58	17,32
C	16,62	14,58	0	7,89
D	62,91	17,32	7,89	0

Tableau 3 : Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les groupes A à D.

Certaines distances entre les groupes sont significatives (probabilités de Mahalanobis très inférieures à 0,05), (tableau 4).

	A	B	C	D
A	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001
B	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001
C	<0.0001	<0.0001	1	<0.0001
D	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1

Tableau 4: Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes A à D.

❖ La sélection des variables

Lors de l'AFD, les quatre groupes créés pouvaient être séparés selon les deux premiers axes de discrimination factorielle (LD1 et 2). Auparavant, nous avons montré par ACP que les groupes A et C semblaient être séparés des groupes B et D. De ce fait, nous sommes surtout intéressés par le deuxième axe de discrimination de l'AFD.

Nous nous sommes donc concentrés sur les variables ayant la plus grande corrélation avec les deux axes de discrimination de l'AFD.

Quelques composés correspondant à ces variables ont pu être identifiés à partir du déplacement chimique correspondant au centre de l'intervalle d'intégration associé à chaque variable (Tableau 5). Concernant l'axe LD 2, dans certains cas, plusieurs composés correspondant au même déplacement chimique ont été proposés, et certaines variables n'ont pas pu être identifiées.

Sur l'axe 1, les variables ayant une forte corrélation ne correspondent qu'à du « bruit », c'est-à-dire à aucune partie intéressante du spectre.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Var.	Métabolites	Axe LD 1		Axe LD 2		Evolution	
			Can	Rang	Can	Rang	C	B
5,54	V7	Bruit	0,99883	1	-0,26	—	—	—
7,18	V70	Bruit	0,99534	2	-0,09	—	—	—
7,14	V12	Bruit	0,99259	3	-0,12	—	—	—
6,86	V19	Bruit	0,99197	4	0,12	—	—	—
5,62	V28	Bruit	0,99179	5	-0,13	—	—	—
0,5	V37	Bruit	0,99	6	-0,13	—	—	—
8,26	V44	Bruit	0,98925	7	-0,15	—	—	—
8,34	V29	Bruit	0,98851	8	-0,15	—	—	—
8,66	V60	Bruit	0,98756	9	-0,16	—	—	—
7,98	V62	Bruit	0,98668	10	-0,16	—	—	—
9,98	V1	Bruit	0,98649	11	-0,16	—	—	—
9,66	V59	Bruit	0,98574	12	-0,17	—	—	—
8,14	V68	Bruit	0,98570	13	-0,17	—	—	—
0,7	V38	Bruit	0,98410	14	-0,11	—	—	—
6,74	V69	Bruit	0,98365	15	-0,18	—	—	—
7,86	V61	Bruit	0,98165	16	-0,19	—	—	—
1,14	V23	Bruit	-0,15	—	0,98747	1	—	—
1,7	V48	Leucine/Lysine	0,14	—	0,96388	2	↘	↗
0,98	V55	Valine	0,91	—	0,90895	3	↘	↗
4,06	V10	Créatinine	0,44	—	0,89042	4	↘	↗
1,46	V27	Alanine	-0,22	—	0,88525	5	↘	↗
2,14	V34	Glutamate	0,56	—	0,82196	6	↘	↗
5,22	V41	α -glucose	-0,57	—	-0,79898	7	↗	↘
1,94	V3	Acétate	0,6	—	0,79785	8	↘	↗
0,82	V20	Lipides	0,62	—	0,76818	9	↘	↗
2,18	V39	?	-0,57	—	-0,76456	10	↗	↘
1,18	V25	3-hydroxybutyrate	0,64	—	0,76456	11	↘	↗
1,22	V21	3-hydroxybutyrate	0,65	—	0,75240	12	↘	↗
3,82	V42	Glucose	-0,65	—	-0,75087	13	↗	↘
2,5	V53	Bruit	0,64	—	0,74033	14	—	—
0,94	V5	Leucine	0,69	—	0,72281	15	↘	↗

Tableau 5: Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les groupes A à D.

Avec $\delta^1\text{H}$: le déplacement chimique ; **Var** : le nom des variables ; **Can** : les corrélations canoniques ; **Rang** : le rang de la variable lors du classement par ordre décroissant des valeurs absolues des corrélations canoniques ; ↗, ↘ : l'augmentation ou la diminution des concentrations du composé dans le plasma des chevaux du groupe B (**B**) et du groupe C (**C**) par rapport aux groupes A et D.

b/ Influence des statuts sur les profils métaboliques

❖ Analyse factorielle discriminante

Une AFD en fonction du statut des individus, c'est-à-dire malades, sains ou suspects, a été réalisée après filtration des variables.

Pour une meilleure précision des variables explicatives, nous avons utilisé le fichier avec les buckets en 0,01 ppm pour effectuer cette représentation graphique par AFD.

Cette représentation graphique de l'AFD (figure 22) montre une séparation des individus sains et malades selon le premier axe de discrimination factorielle (LD 1), portant 62,3% de la variabilité. Les individus suspects sont opposés aux malades et aux sains selon le deuxième axe de discrimination factorielle (LD2), portant 45,6% de la variabilité.

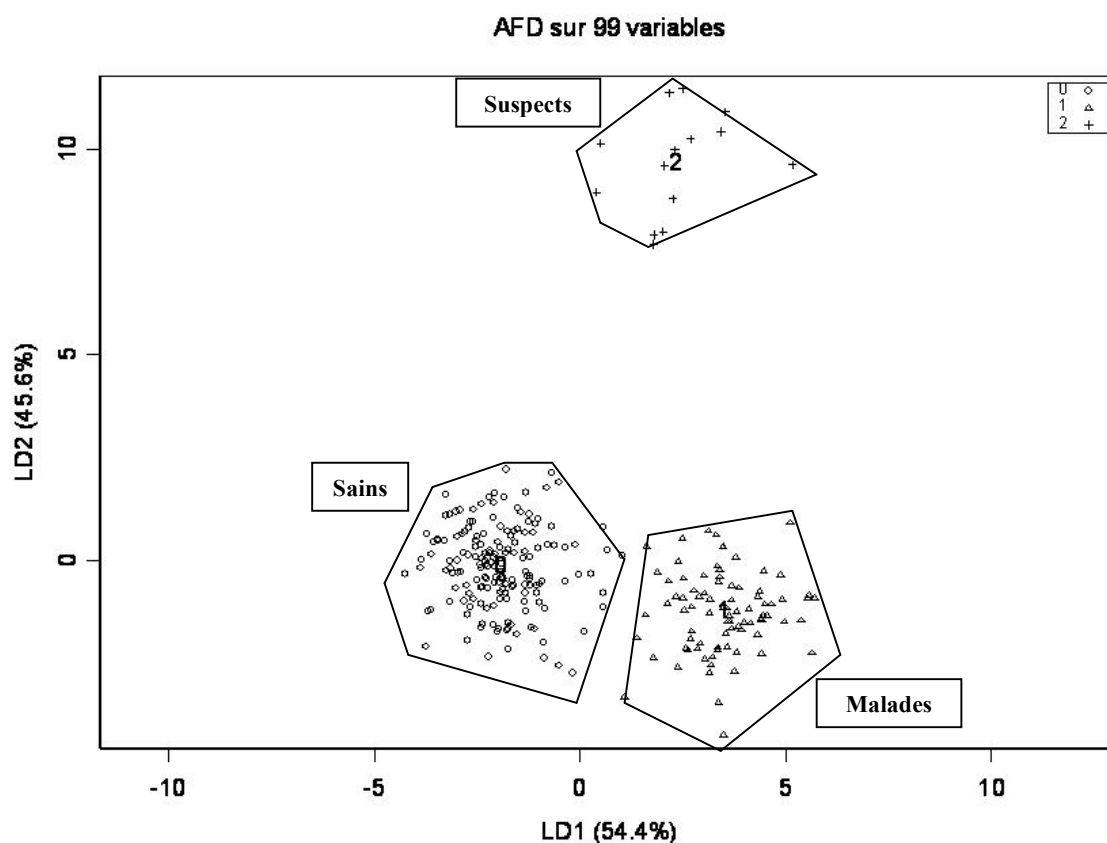


Figure 22: Représentation graphique de l'AFD des individus de l'étude en fonction de leur statut, malade, sain ou suspect, sans correction des données.

Le tableau 6 rapporte les distances de Mahalanobis entre les groupes.

	0	1	2
0	0	30,43	114,36
1	30,43	0	120,26
2	114,36	120,26	0

Tableau 6: Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les statuts, avec 0, les individus sains, 1, les chevaux malades et 2, les suspects.

Les distances entre les différents groupes sont toutes significatives (probabilités de Mahalanobis très inférieures à 0,05), (tableau 7).

	0	1	2
0	1	<0.0001	<0.0001
1	<0.0001	1	<0.0001
2	<0.0001	<0.0001	1

Tableau 7: Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les statuts, avec 0, les individus sains, 1, les chevaux malades et 2, les suspects.

❖ La sélection des variables

Les variables responsables de la ségrégation entre les individus suspects et les autres (malades et sains), ont des corrélations canoniques importantes avec le deuxième axe de discrimination factorielle (LD 2) alors que les variables intéressantes pour la ségrégation entre les individus sains et malades ont des corrélations canoniques importantes avec le premier axe de discrimination factorielle (LD 1).

Les composés qui ont pu être identifiés sont répertoriés dans le tableau 8. Concernant l'axe 2, nous n'obtenons quasiment que du bruit à l'exception de la lysine et du 4-aminohippurate.

Légende tableau 8 ci-contre : $\delta^1\text{H}$: le déplacement chimique ; **Var** : le nom des variables ; **Can** : les corrélations canoniques ; **Rang** : le rang de la variable lors du classement par ordre décroissant des valeurs absolues des corrélations canoniques ; \nearrow , \searrow : l'augmentation ou la diminution des concentrations du composé dans le plasma des chevaux malades (**Mal**) et suspects (**Susp**) par rapport aux groupes A et D.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Var.	Métabolites	Axe LD 1		Axe LD 2		Evolution	
			Can	Rang	Can	Rang	Mal	Susp
0,875	V43	Lipides	-0,99996	1	0,01	—	↘	
3,125	V78	?	-0,99996	2	0,01	—		
3,375	V41	Scyllo-inositol	-0,99962	3	0,03	—	↘	
8,455	V15	Formate	0,99954	4	0,03	—	↗	
0,895	V13	Lipides	-0,99927	5	0,04	—	↘	
4,175	V23	3-hydroxybutyrate	0,99903	6	-0,04	—	↗	
3,135	V77	Citrulline	-0,99841	7	-0,06	—	↘	
3,505	V47	Glucose	-0,99840	8	0,06	—	↘	
3,485	V80	Glucose	-0,99834	9	0,06	—	↘	
2,805	V17	Aspartate	-0,99819	10	0,06	—	↘	
1,035	V76	Valine	0,99754	11	0,07	—	↗	
1,215	V16	3-hydroxybutyrate	0,99721	12	-0,07	—	↗	
3,815	V86	Glucose	-0,99711	13	-0,08	—	↘	
1,795	V34	?	-0,99612	14	0,09	—	↘	
2,725	V73	Leucine/lysine	0,99611	15	-0,09	—	↗	
3,065	V53	Bruit	0,99575	16	0,09	—		
4,145	V66	Lactate	0,99527	17	0,1	—	↗	
2,015	V33	Glutamate	-0,99514	18	-0,1	—	↘	
1,655	V96	?	0,99512	19	0,1	—	↗	
1,705	V1	Leucine/lysine	0,99512	20	0,1	—	↗	
1,285	V49	Lipides	-0,99389	21	0,11	—	↘	
3,075	V52	bruit	0,99187	22	0,13	—		
1,685	V95	Leucine/lysine	0,99028	23	-0,14	—	↗	
3,875	V9	glucose	-0,98998	24	0,14	—	↘	
1,515	V38	Bruit	-0,98801	25	0,15	—		
1,925	V37	Acétate	0,98795	26	-0,15	—	↗	
7,025	V79	Bruit	0,98793	27	-0,15	—		
1,805	V29	?	-0,98767	28	0,16	—	↘	
7,655	V19	Bruit	-0,98274	29	0,19	—		
2,465	V35	Bruit	0,97822	30	-0,21	—		
5,435	V90	Bruit	-0,97702	31	0,21	—		
5,375	V55	?	-0,97603	32	0,22	—	↘	
2,505	V30	Bruit	0,97433	33	0,23	—		
1,855	V84	?	0,97196	34	0,24	—	↗	
4,225	V40	Bruit	0,96625	35	-0,26	—		
1,525	V60	Bruit	-0,96492	36	0,26	—		
1,825	V28	?	-0,96472	37	0,26	—	↘	
1,865	V85	?	0,9646	38	0,26	—	↗	
2,235	V65	Acétoacetate	0,96324	39	0,27	—	↗	
2,735	V42	Aspartate	0,95828	40	0,29	—	↗	
2,385	V32	Glutamate	-0,95285	41	-0,3	—	↘	
3,395	V68	glucose	-0,95031	42	0,31	—	↘	
3,005	V4	Lysine	-0,25	—	-0,96853	1		↘
9,815	V20	Bruit	0,26	—	-0,96438	2		
0,575	V70	Bruit	0,31	—	-0,95087	3		
0,545	V51	Bruit	0,33	—	-0,94245	4		
6,955	V27	4-aminohippurate	-0,37	—	0,92899	5		↗
3,295	V22	?	0,39	—	0,91878	6		↗
9,255	V58	Bruit	0,41	—	-0,91263	7		
8,165	V88	Bruit	0,41	—	-0,91160	8		
0,675	V72	Bruit	0,41	—	-0,91037	9		
6,625	V45	Bruit	0,42	—	-0,90763	10		

Tableau 8: Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec le statut des animaux de l'étude.

Ce tableau montre qu'il existe une différence entre les concentrations plasmatiques du *scyllo*-inositol et du glutamate, entre les chevaux sains et malades. Ces différences avaient déjà été observées chez les souris nourries ou non avec *Hypochoeris radicata* dans l'étude de Domange *et al.* en 2008. Cependant, les concentrations plasmatiques sont plus faibles en *scyllo*-inositol et en glutamate chez les chevaux malades par rapport aux individus sains.

Par ailleurs, nous retrouvons plus de lysine et moins de 4-aminohippurate chez les chevaux suspects par rapport aux autres individus de l'étude.

Les figures suivantes (23 à 26) présentent les quantités de certains métabolites entre les chevaux sains et les chevaux malades.

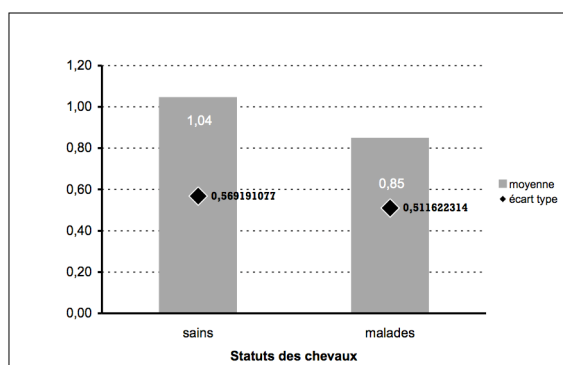


Figure 23: Variations de la moyenne et de l'écart type de la quantité de *scyllo*-inositol dans le plasma des chevaux sains et malades.

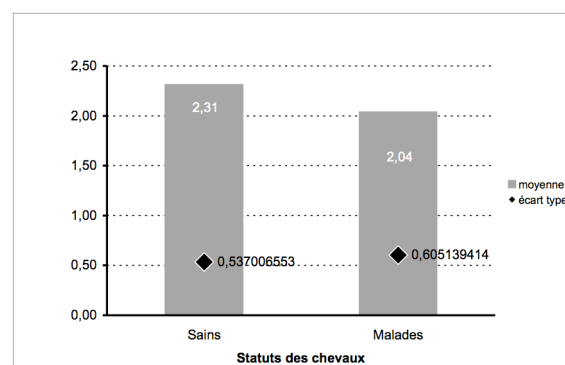


Figure 24: Variations de la moyenne et de l'écart type de la quantité de Glutamate dans le plasma des chevaux sains et malades.

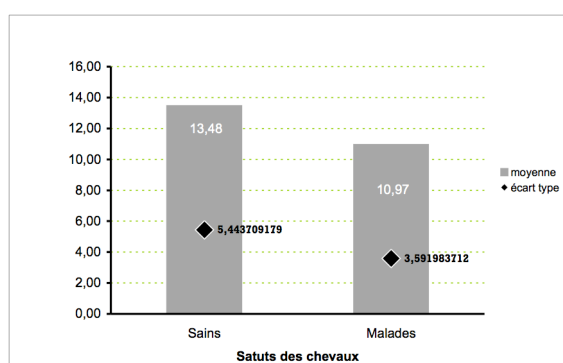


Figure 25: Variations de la moyenne et de l'écart type de la quantité de glucose dans le plasma des chevaux sains et malades.

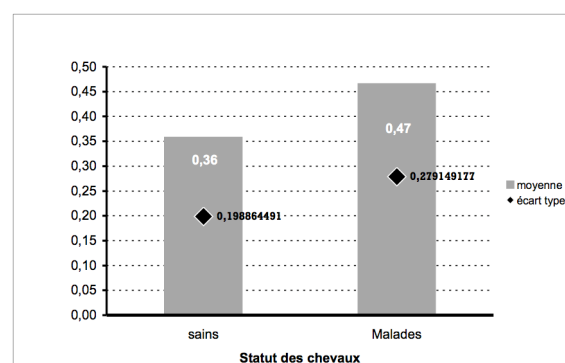


Figure 26: Variations de la moyenne et de l'écart type de la quantité de 3-hydroxybutyrate dans le plasma des chevaux sains et malades.

3) AFD obtenues après transformation OSC

Afin de mettre en exergue les facteurs d'intérêt de notre étude, des Orthogonal Signal Corrections (OSC) en fonction de différents facteurs descriptifs ont été réalisées sous Simca-P 11.0 (Umea, Sweden). En effet, en mettant en avant ces facteurs d'intérêt, nous espérons améliorer notre modèle statistique qui subit les désagréments liés à l'hétérogénéité inévitable de nos individus.

D'une manière générale, lors de la réalisation de ces OSC, seules les deux premières composantes ont été gardées, car les suivantes n'étaient pas significatives.

Les fichiers corrigés par OSC ainsi obtenus ont été reconvertis pour être exploités dans le logiciel Splus 2000® afin de réaliser de nouvelles AFD.

a/ Influence des statuts sur les profils métaboliques

Afin d'essayer d'améliorer la représentation graphique de l'AFD en fonction des statuts des individus (figure 22), nous avons réalisé une première OSC avec le facteur «statut» (individu sain, malade ou suspect).

Une nouvelle AFD en fonction du statut des individus a ensuite été réalisée dans Splus 2000® après filtration des nouvelles variables obtenues après correction OSC. La représentation graphique de cette AFD, en comparaison avec la précédente (figure 27), montre une répartition similaire des individus. Une séparation des statuts selon le premier axe de discrimination factorielle (LD 1), portant 57,4% de la variabilité de l'échantillonnage, peut être observée. On peut noter, en outre, que les individus suspects sont toujours opposés aux individus sains et malades selon le deuxième axe de discrimination factorielle (LD 2), portant 42,6% de la variabilité de l'échantillonnage. Ce modèle n'a donc rien amélioré puisqu'on avait 62 et 45 % de la variabilité expliquée sur l'axe 1 et 2, respectivement, sans transformation OSC en fonction du statut. C'est pourquoi nous avons retenu la première AFD pour l'interprétation des axes de discrimination factorielle.

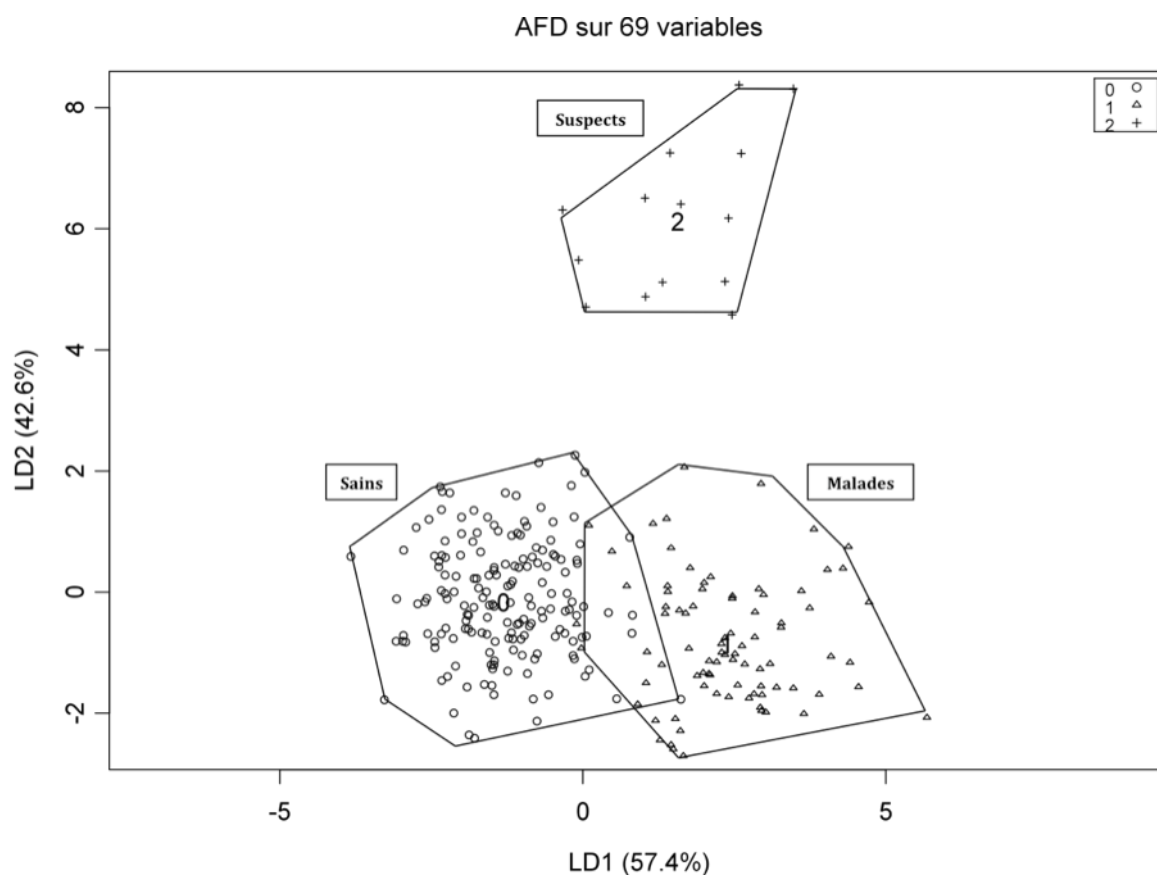


Figure 27: Représentation graphique de l'AFD des individus de l'étude en fonction de leur statut après correction par OSC avec le facteur statut.

Le tableau 9 rapporte les distances de Mahalanobis entre les groupes.

	0	1	2
0	0	14,01	47,81
1	14,01	0	49,38
2	47,81	49,38	0

Tableau 9: Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les statuts après correction des données par une OSC avec le statut.

Les distances entre les différents groupes sont significatives (probabilités de Mahalanobis très inférieures à 0,05), (tableau 10).

	0	1	2
0	1	<0.0001	<0.0001
1	<0.0001	1	<0.0001
2	<0.0001	<0.0001	1

Tableau 10: Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les statuts après correction des données par une OSC avec le statut.

Par ailleurs, nous avons souhaité représenter les individus sains et malades en écartant les suspects de l'étude statistique. Ainsi, une correction OSC a été réalisée sur les individus de l'étude, mis à part les suspects, à l'aide de Simca-P 11.0 (Umea, Sweden). Le facteur pris en compte lors de la correction du tableau de données était le facteur « statut ».

Les deux premières composantes ont été retenues, car significatives.

A partir de ce fichier obtenu après OSC, une PLS (Partial Least Square) a été réalisée en prenant comme facteur le statut des chevaux, les suspects n'étant toujours pas concernés dans cette étape de notre étude.

La représentation graphique de la PLS selon la première composante montre que les individus sains et malades tendent à être séparés selon l'axe des abscisses.

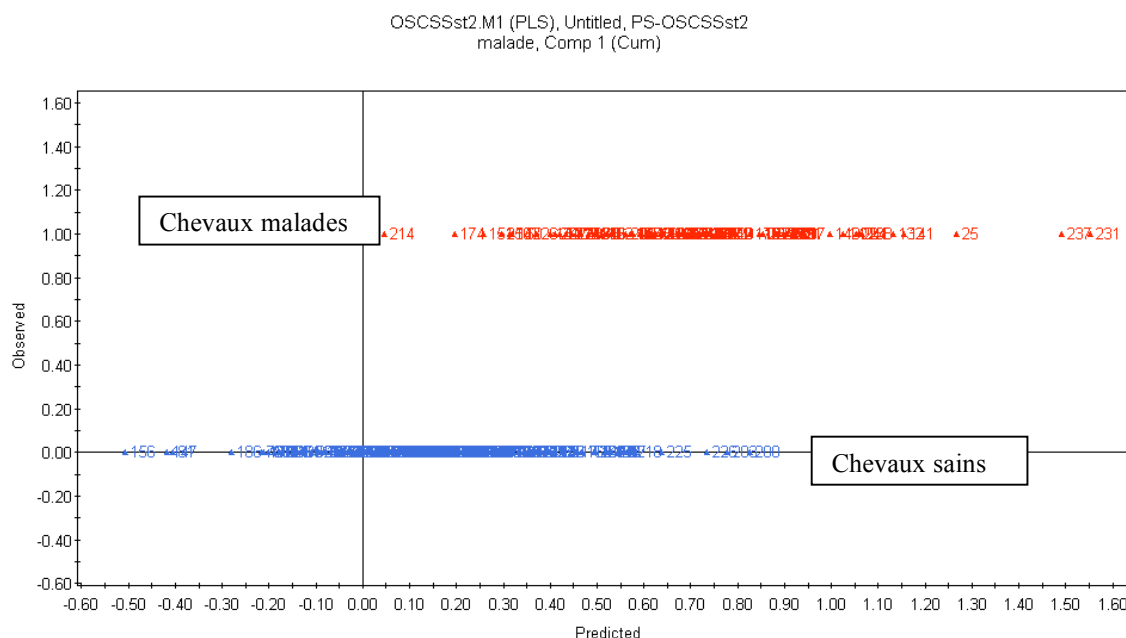


Figure 28: Représentation PLS des individus sains (en bleu) et malades (en rouge) après avoir effectué une correction OSC avec le facteur statut.

Nous observons ainsi, grâce à la figure précédente, une différence entre les individus sains et malades. Nous retrouvons donc les résultats obtenus lors de la réalisation de l'AFD en fonction du statut des individus (figure 22).

b/ Etude des profils métaboliques des individus malades

Nous allons, dans cette partie de l'exposé, nous intéresser uniquement aux individus malades, et intégrer Polka, seul individu sain traité avec de la taurine.

Les individus malades ont été notés en fonction du grade de Huntington (1989) observé au moment du prélèvement. Les stades vont de 0 (cheval ayant été malade mais guéri) à 5 (cheval très atteint). Polka s'est vue attribuer une note de 6 de façon arbitraire afin d'être séparée des individus malades.

Une OSC a été réalisée en fonction des facteurs «cheval», «écurie» et «saison». Puis, une AFD en fonction du stade des chevaux malades au moment de la prise de sang a été réalisée après filtration des variables corrigées par OSC.

❖ Analyse factorielle discriminante

La représentation graphique de l'AFD des stades des individus après correction OSC des facteurs «écurie, cheval et saison» montre une séparation de ces stades selon les deux premiers axes de discrimination factorielle (LD 1 et 2), portant respectivement 33,7% et 28,1% de la variabilité de l'échantillon.

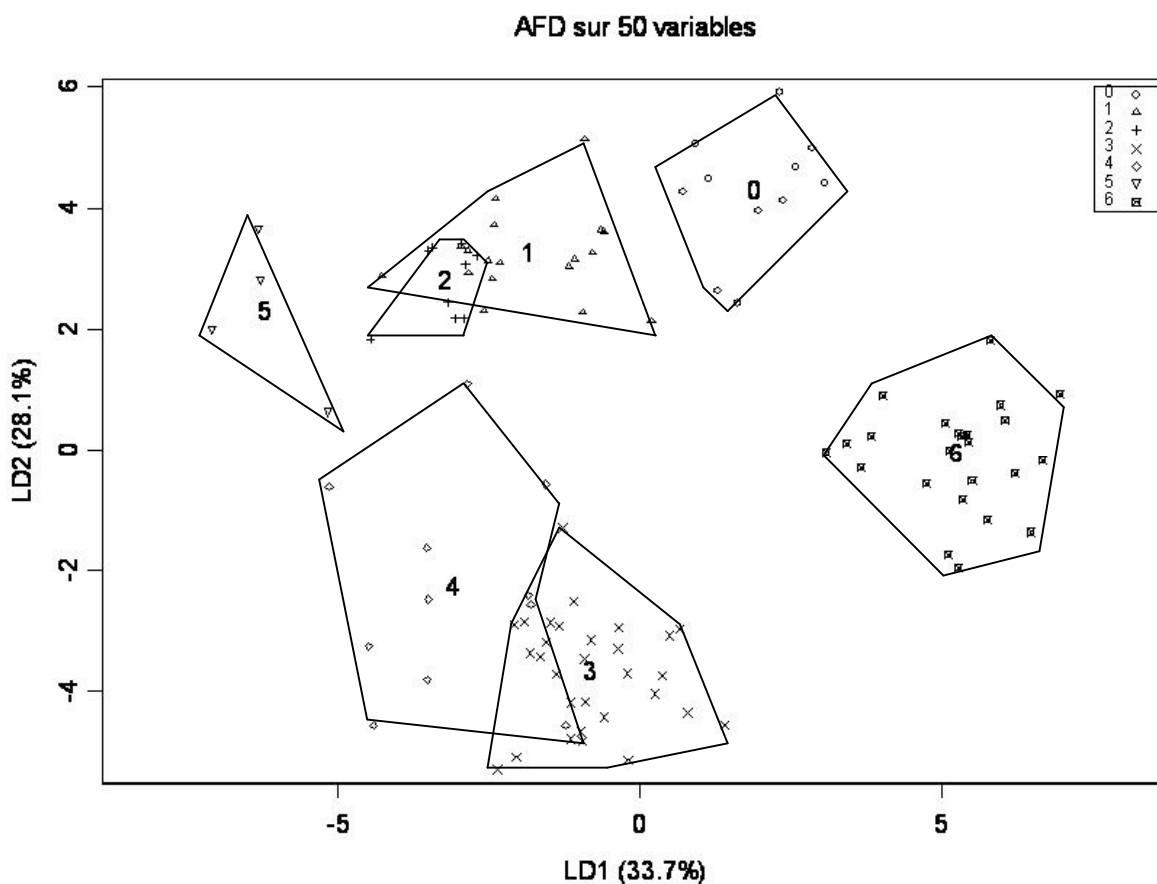


Figure 29: Représentation graphique de l'AFD des individus malades et de Polka en fonction de leur stade après correction par OSC des facteurs écurie, cheval et saison.

Avec 0, les malades en rémission clinique ; 1 à 5, le grade des chevaux malades ; 6, Polka.

Le tableau 11 rapporte les distances de Mahalanobis entre les groupes.

	0	1	2	3	4	5	6
0	0	3171	5420	2182	2873	3139	3807
1	3171	0	3455	741,27	3140	4319	1536
2	5420	3455	0	3838	6694	6911	2825
3	2182	741,27	3838	0	2285	2947	1836
4	2873	3140	6694	2285	0	6747	4074
5	3139	4319	6911	2947	6747	0	6007
6	3807	1536	2825	1836	4074	6007	0

Tableau 11: Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les stades observés au moment du prélèvement chez les chevaux malades en incluant Polka, l'AFD avait été réalisée après correction par OSC des facteurs écurie, cheval et saison.

Les distances entre les différents groupes sont toutes significatives (probabilités de Mahalanobis très inférieures à 0,05), (tableau 12).

	0	1	2	3	4	5	6
0	1	<0.0001	<0.0001	0.0002	0.0003	0.0020	<0.0001
1	<0.0001	1	<0.0001	0.0028	<0.0001	0.0004	0.0003
2	<0.0001	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.0002
3	0.0002	0.0028	<0.0001	1	0.0002	0.0013	<0.0001
4	0.0003	<0.0001	<0.0001	0.0002	1	0.0001	<0.0001
5	0.0020	0.0004	0.0001	0.0013	0.0001	1	0.0001
6	<0.0001	0.0003	0.0002	<0.0001	<0.0001	0.0001	1

Tableau 12: Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les stades observés au moment du prélèvement chez les chevaux malades en incluant Polka, l'AFD avait été réalisée après correction par OSC des facteurs écurie, cheval et saison.

❖ La sélection des variables

La représentation graphique de l'AFD des stades des individus après correction OSC avec les facteurs «écurie, cheval et saison» montre une séparation de ces stades selon les deux premiers axes de discrimination factorielle (LD 1 et 2).

Les variables les plus fortement corrélées à ces axes, ainsi que leurs métabolites correspondants, ont pu être répertoriées dans le tableau 13.

Légende de tableau 13 ci-contre : δ ¹H : le déplacement chimique ; **Var** : le nom des variables ; **Can** : les corrélations canoniques ; **Rang** : le rang de la variable lors du classement par ordre décroissant des valeurs absolues des corrélations canoniques ; \blacktriangleright , \blacktriangleleft : l'augmentation ou la diminution des concentrations du composé correspondant dans le plasma ; **1-5/0** : les chevaux de grades 1 à 5 par rapport au grade 0 ; **6/0** : Polka (individu sain traité à la taurine) par rapport aux chevaux présentant un grade 0 ; **3-4/R** : les chevaux de grades 3 et 4 par rapport aux grades 0,1, 2 et 5 ; **6/R** : Polka par rapport aux grades 0, 1, 2 et 5.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Var.	Métabolites	Axe LD 1		Axe LD 2		Evolution			
			Can	Rg	Can	Rg	1-5 /0	6 /0	3-4 /R	6 /R
7,7	V34	4-aminohippurate	-0,95180	1	-0,11	—	↗	↘		
2,82	V43	Bruit	-0,92018	2	0,26	—				
0,66	V13	Bruit	0,87940	3	-0,35	—				
7,54	V41	?	0,84686	4	-0,5	—				
8,02	V48	Bruit	0,82714	5	-0,54	—				
8,42	V47	Bruit	0,82499	6	-0,54	—				
7,5	V40	Bruit	0,82241	7	-0,55	—				
3,22	V46	Choline	0,81775	8	-0,56	—	↘	↗		
9,3	V49	Bruit	0,81206	9	-0,57	—				
7,14	V42	Bruit	0,80465	10	-0,54	—				
3,26	V15	Glucose	-0,03	—	0,96549	1			↘	↘
3,46	V1	Glucose	-0,29	—	0,93377	2			↘	↘
0,94	V21	Leucine	0,36	—	-0,91773	3			↗	↗
2,78	V23	Aspartate	0,14	—	-0,90673	4			↗	↗
3,22	V44	Choline	-0,15	—	0,89965	5			↘	↘
3,78	V26	Glucose	-0,42	—	0,89462	6			↘	↘
1,94	V35	Acetate	0,35	—	-0,88614	7			↗	↗
3,02	V6	Lysine	0,001	—	-0,87649	8			↗	↗
3,82	V39	Glucose	-0,38	—	0,86401	9			↘	↘

Tableau 13: Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les chevaux malades et Polka, seul individu sain traité à la taurine, après correction OSC avec les facteurs cheval, écurie, saison.

Le 4-aminohippurate permet, ainsi que la choline, de différencier les chevaux malades de grade 1 à 5 des chevaux présentant une rémission clinique. En effet, une augmentation de la concentration plasmatique du 4-aminohippurate et une diminution de la choline dans le plasma ont pu être mis en évidence chez les chevaux cliniquement atteints. Nous observons, par ailleurs, le même phénomène chez les chevaux en rémission clinique si on prend Polka (cheval sain traité à la taurine) comme référence.

En ce qui concerne Polka, on peut noter qu'elle a moins de glucose et de choline et davantage de leucine, lysine, aspartate et acétate dans son plasma que les chevaux de grades 0, 1, 2 et 5.

c/ Effet du grade clinique et du traitement

Dans la suite de cet exposé des résultats statistiques, les chevaux suspects ont été écartés des analyses statistiques puisque leur statut reste indéterminé.

Après avoir obtenu l'AFD précédente, nous avons décidé de regrouper les individus malades en fonction de leur grade au moment du prélèvement et d'un éventuel traitement. En effet, nous voulions pouvoir réinsérer les chevaux sains dans le modèle sans pour autant avoir un nombre trop important de groupes. De plus, cela nous a permis d'obtenir des groupes de taille plus importante.

Nous avons ainsi réparti les individus de la manière suivante :

- Groupe 0 : Malades en rémission clinique ;
- Groupe 1 : Individus sains ;
- Groupe 2 : Polka, qu'elle soit sous traitement ou non ;
- Groupe 3 : Individus malades aux grades 1 et 2, non traités ;
- Groupe 4 : Individus malades aux grades 1 et 2, traités ;
- Groupe 5 : Individus malades aux grades 3, 4 et 5, non traités ;
- Groupe 6 : Individus malades aux grades 3, 4 et 5, traités.

Lorsque l'on parle d'individus traités, c'est qu'ils sont sous traitement, que ce soit avec la phénytoïne ou la taurine.

Les grades évoqués font référence à l'échelle de Huntington (1989) et sont les grades attribués au moment du prélèvement.

Notre tableau de données a subi une correction OSC en fonction du facteur «groupe» afin de le mettre en avant. Puis, une AFD en fonction des groupes cités précédemment a été réalisée, après filtration des variables corrigées par OSC.

❖ Analyse factorielle discriminante

La représentation graphique par AFD montre une séparation de ces groupes selon les deux premiers axes de discrimination factorielle (LD 1 et 2), portant respectivement 32,7% et 21,5% de la variabilité de l'échantillonnage (figure 30).

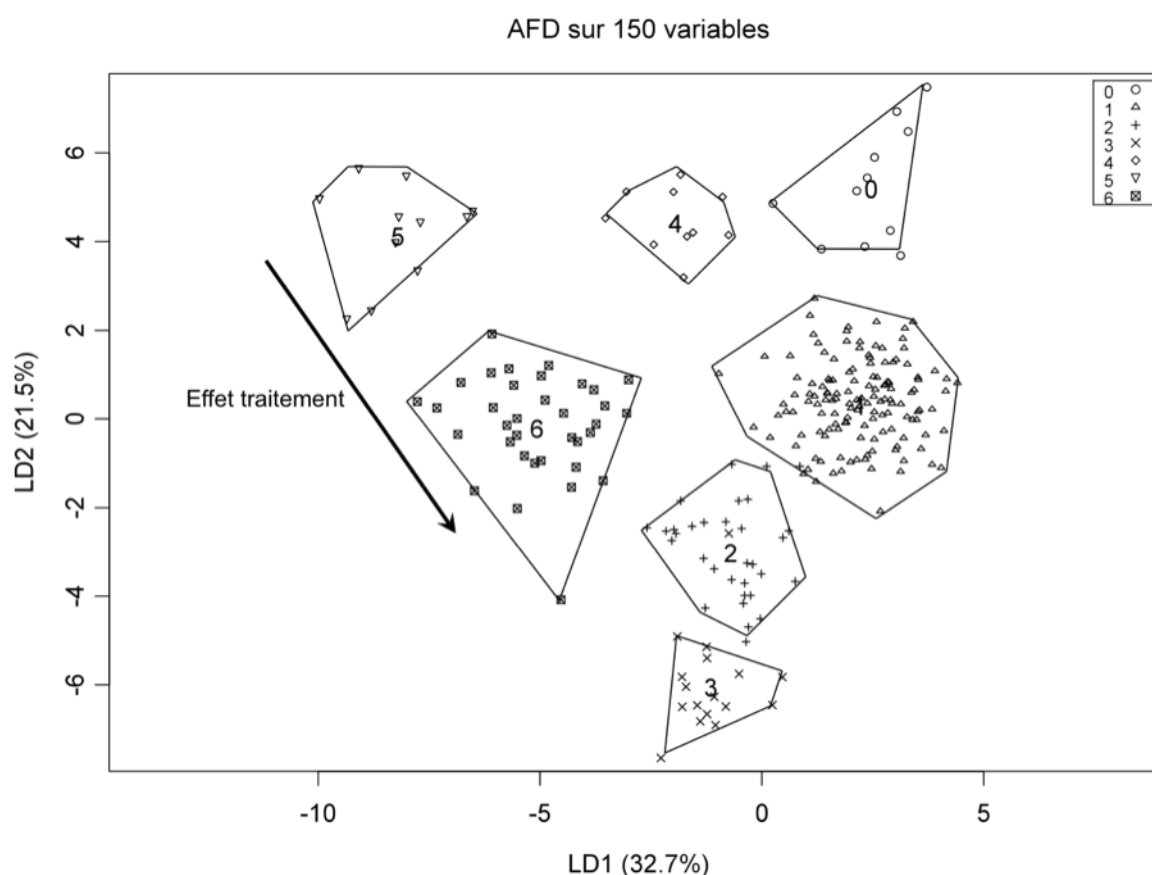


Figure 30: Représentation graphique de l'AFD des individus en fonction des groupes 0 à 6 après correction par OSC avec le facteur groupe.

Avec **0** : les malades en rémission clinique ; **1** : les individus sains ; **2** : Polka, qu'elle soit sous traitement ou non ; **3** : les individus malades aux grades 1 et 2, non traités ; **4** : les individus malades aux grades 1 et 2, traités ; **5** : les individus malades aux grades 3, 4 et 5, non traités ; **6** : les individus malades aux grades 3, 4 et 5, traités.

Le tableau 14 rapporte les distances de Mahalanobis entre ces groupes.

	0	1	2	3	4	5	6
0	0	88,23	138,13	200,92	164,84	215,35	139,07
1	88,23	0	58,78	72,26	107,37	146,21	61,5
2	138,13	58,78	0	99,04	119,30	177,85	76,24
3	200,92	72,26	99,04	0	208,77	192,69	78,27
4	164,84	107,37	119,30	208,77	0	177,48	114,71
5	215,35	146,21	177,85	192,69	177,48	0	84,1
6	139,07	61,5	76,24	78,27	114,71	84,1	0

Tableau 14: Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les groupes, l'AFD avait été réalisée après correction par OSC avec le facteur groupe.

Les distances entre les différents groupes sont toutes significatives (probabilités de Mahalanobis inférieures à 0,05), (tableau 15).

	0	1	2	3	4	5	6
0	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
1	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
2	<0.0001	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1	0.0002	<0.0001	<0.0001
4	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001
5	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1	0.0005
6	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0005	1

Tableau 15: Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes, l'AFD avait été réalisée après correction par OSC avec le facteur groupe.

❖ La sélection des variables

Les groupes pouvaient être séparés selon les deux premiers axes de discrimination factorielle (LD1 et 2) lors de l'AFD.

Il y a par ailleurs une translation due au traitement qui est visible et ceci selon le deuxième axe de discrimination factorielle de l'AFD. Certaines variables ayant la plus grande corrélation avec les deux axes de discrimination de l'AFD ont pu être identifiées à partir du déplacement chimique correspondant au centre de l'intervalle d'intégration associé à chaque variable et ont été répertoriés dans le tableau 16.

Légende du tableau 16 ci-contre : $\delta^1\text{H}$: le déplacement chimique ; **Var** : le nom des variables ; **Can** : les corrélations canoniques ; **Rang** : le rang de la variable lors du classement par ordre décroissant des valeurs absolues des corrélations canoniques ; ↗, ↘ : l'augmentation ou la diminution des concentrations du composé correspondant dans le plasma ; **2-4/0** : Polka et les animaux atteints de grades 1 et 2, traités ou non par rapport au individus sains ; **5-6** : grades 3 à 5, traités ou non, par rapport aux chevaux sains ; **E** : peut correspondre aux grades 3 à 5 traités par rapport aux non traités, ou bien, à Polka (individu sain traité à la taurine) par rapport aux chevaux malades en rémission clinique, ou enfin, aux chevaux malades en rémission clinique par rapport aux chevaux sains ; **4/3** : grades 1 et 2 traités par rapport aux non traités.

δ ¹ H (ppm)	Var.	Métabolites	Axe LD 1		Axe LD 2		Evolution			
			Can	Rg	Can	Rg	2-4 /0	5-6 /0	E	4 /3
1,34	V1	Lactate	0,96345	1	-0,13	—	↘	↘		
3,86	V68	Glucose	-0,95952	2	-0,08	—	↗	↗		
4,1	V82	Lactate	0,94840	3	-0,05	—	↘	↘		
2,26	V18	Glucose	0,86956	4	-0,13	—	↘	↘		
4,14	V48	Lactate	0,886956	5	-0,0006	—	↘	↘		
1,54	V31	Citrulline	-0,86097	6	-0,06	—	↗	↗		
3,3	V54	?	0,83183	7	-0,03	—	↘	↘		
3,46	V69	Glucose	0,81865	8	0,11	—	↘	↘		
3,1	V127	?	0,7866	9	0,79	—	↘	↘		
2,22	V47	Choline	0,69477	10	-0,37	—	↘	↘		
3,9	V51	Glucose	0,69284	11	0,69	—	↘	↘		
3,42	V50	Glucose	0,62254	12	0,13	—	↘	↘		
0,86	V24	Lipides	-0,61592	13	-0,17	—	↗	↗		
5,34	V73	Lipides	-0,31	—	-0,83141	1			↗	↘
7,3	V3	Bruit	0,3	—	-0,82037	2				
2,34	V11	Proline	-0,09	—	0,812	3			↘	↗
1,9	V21	Acétate	-0,37	—	0,79446	4			↘	↗
7,26	V75	Bruit	0,45	—	-0,78102	5				
2,86	V38	Bruit	0,15	—	-0,77825	6				
7,22	V44	Bruit	0,33	—	-0,77271	7				
6,84	V20	4-aminohippurate	0,29	—	-0,77271	8			↗	↘
7,34	V59	Bruit	0,55	—	-0,76367	9				
2,3	V43	?	-0,46	—	0,75552	10			↘	↗
2,7	V14	Bruit	0,29	—	0,74486	11				
5,3	V104	Lipides	-0,43	—	-0,71585	12			↗	↘
1,18	V12	3-hydroxybutyrate	-0,23	—	0,70581	13			↘	↗

Tableau 16: Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les chevaux malades répartis selon leur grade et leur traitement, les individus sains et Polka, seul individu sain traité à la taurine. L'AFD avait été réalisée après correction OSC avec le facteur groupe.

Ces résultats montrent que les concentrations plasmatiques en glucose et choline sont plus faibles chez les chevaux malades que chez les sains. On met aussi en évidence une augmentation des lipides et de la citrulline plasmatiques chez les chevaux malades par rapport aux sains.

Par contre, on observe une variation à l'opposé pour certains métabolites (lipides, proline acétate, 4-aminohippurate et 3-hydroxybutyrate) pour les grades 1 et 2, d'une part, et 3 à 5, d'autre part, selon la présence ou l'absence de traitement.

d/ Effet du traitement

Pour étudier l'effet du traitement, plusieurs groupes ont été créés, séparant les individus sains, les chevaux malades traités des non traités, et enfin, Polka sous traitement ou sans traitement avec de la taurine. Les groupes ont été définis comme suit :

- Individus sains,
- Chevaux malades traités à la phénytoïne,
- Chevaux malades traités à la taurine,
- Individus malades mais non traités au moment de la prise de sang,
- Polka, individu sain, traitée à la taurine au moment du prélèvement,
- Polka non traitée à la taurine au moment du prélèvement sanguin.

Nous avons tout d'abord réalisé une correction du tableau de données par OSC avec les groupes créés reflétant l'effet du traitement. Puis, une AFD en fonction de ces mêmes groupes faisant intervenir le traitement a été réalisée après filtration des variables corrigées.

❖ Analyse factorielle discriminante

La figure 31 montre une séparation des groupes selon les deux premiers axes de discrimination factorielle (LD 1 et 2), portant respectivement 41,4% et 21,6% de la variabilité de l'échantillonnage. Une translation des individus induite par les traitements (phénytoïne et taurine) peut être observée. On peut aussi remarquer une translation due au statut des individus entre chevaux sains et chevaux malades non traités. Par ailleurs, les individus traités à la phénytoïne sont opposés aux autres groupes selon le troisième axe de discrimination factorielle (LD3), portant 19,5% de la variabilité de l'échantillonnage (figure 32).

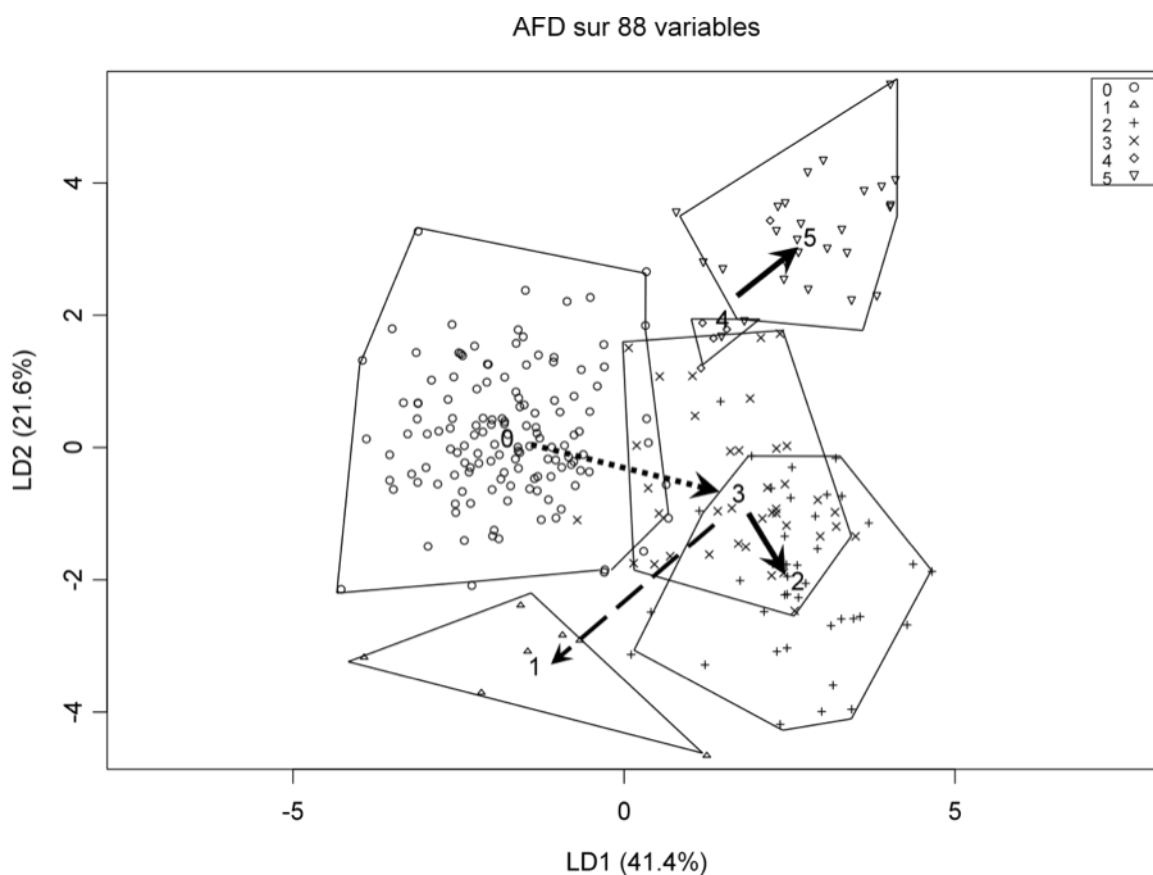


Figure 31: Représentation graphique de l'AFD (axes LD1 et LD2) des individus en fonction des groupes reflétant l'effet du traitement après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD. Avec **0** : les individus sains; **1** : les chevaux malades traités à la phénytoïne; **2** : les chevaux malades traités à la taurine ; **3** : les chevaux malades non traités au moment de la prise de sang; **4** : Polka non traitée au moment du prélèvement; **5** : Polka recevant de la taurine lors de la réalisation de la prise de sang; **flèche pleine** : translation liée à la taurine ; **flèche en longs pointillés** : translation induite par la phénytoïne ; **flèche en pointillés courts** : translation liée à l'intoxication.

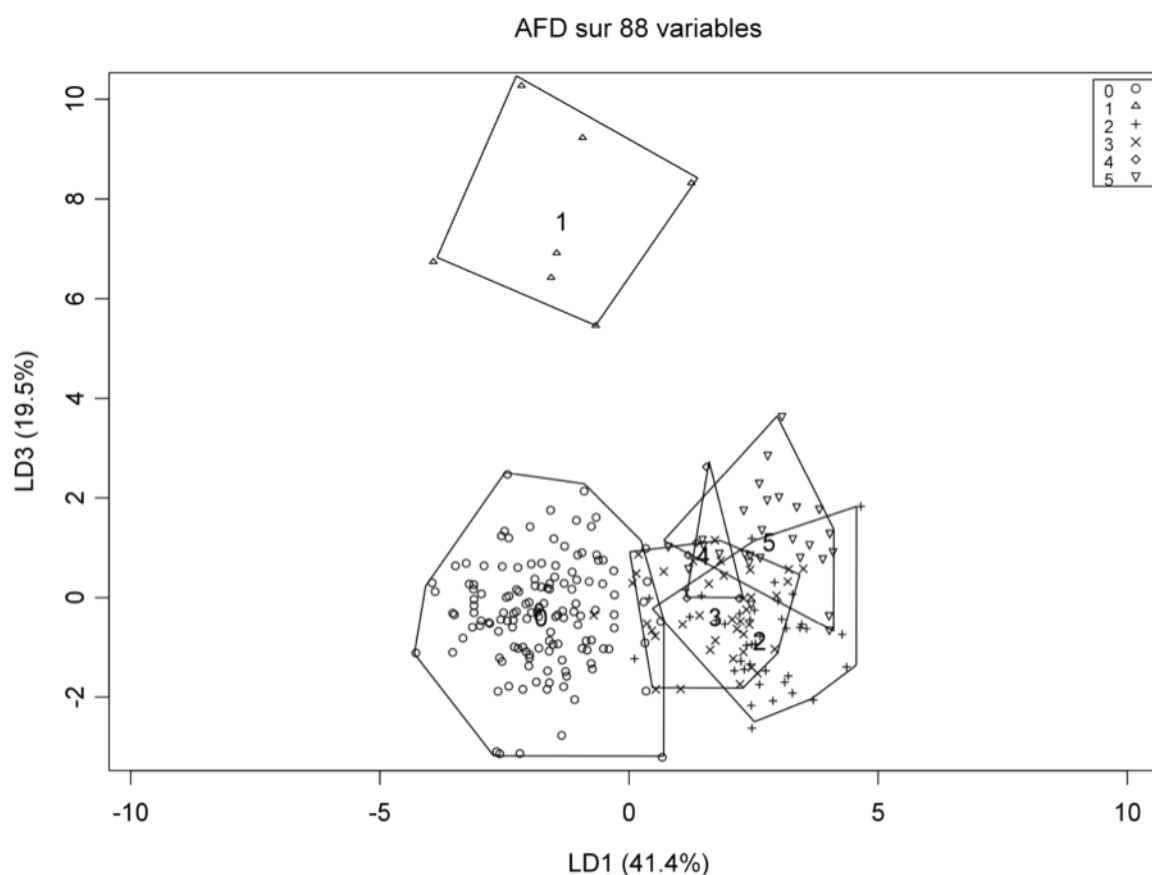


Figure 32: Représentation graphique (axes LD1 et LD3) de l'AFD des individus en fonction des groupes reflétant l'effet du traitement après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD. Avec **0** : les individus sains; **1** : les chevaux malades traités à la phénytoïne; **2** : les chevaux malades traités à la taurine ; **3** : les chevaux malades non traités au moment de la prise de sang; **4** : Polka non traitée au moment du prélèvement; **5** : Polka recevant de la taurine lors de la réalisation de la prise de sang.

Le tableau 17 rapporte les distances de Mahalanobis entre les groupes.

	0	1	2	3	4	5
0	0	109,2	42,81	33,87	63,41	48,23
1	109,2	0	133,61	125,12	160,26	132,22
2	42,81	133,61	0	24,11	73,34	42,73
3	33,87	125,12	24,11	0	64,79	36,42
4	63,41	160,26	73,34	64,79	0	65,64
5	48,23	132,22	42,73	36,42	65,64	0

Tableau 17: Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les groupes de l'AFD des individus en fonction des groupes reflétant l'effet du traitement après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD.

Les distances entre les différents groupes ne sont pas toutes significatives : les probabilités de Mahalanobis ne sont pas toutes inférieures à 0,05.

Ainsi, les individus sains ne sont pas séparables de Polka sans traitement, ce qui paraît normal puisque Polka est elle-même saine.

Les individus traités à la taurine, ainsi que les malades sans traitement ne peuvent pas être séparés de Polka non traitée.

Enfin, il n'y a pas de différence entre les deux groupes constitués par Polka traitée ou non.

Le tableau 18 résume ces résultats.

	0	1	2	3	4	5
0	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,1363	<0.0001
1	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001	0.0003	<0.0001
2	<0.0001	<0.0001	1	0.0004	0.0760	<0.0001
3	<0.0001	<0.0001	0.0004	1	0.2328	<0.0001
4	0,1363	0.0003	0.0760	0.2328	1	0,2929
5	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0,2929	1

Tableau 18: Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes obtenus par l'AFD des individus en fonction des groupes reflétant l'effet du traitement après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD.

❖ La sélection des variables

Les corrélations des variables explicatives du deuxième axe de discrimination factorielle (LD 2) étaient très faibles (toutes inférieures à 0,5), elles n'ont donc pas été retenues pour l'interprétation des métabolites correspondants.

Nous nous sommes donc intéressés aux métabolites correspondant aux variables les plus corrélées aux axes 1 et 3 (tableau 19).

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Var.	Métabolites	Axe LD 1		Axe LD 3		Evolution		
			Can	Rg	Can	Rg	3 /0	1 /3	P
3,86	V100	Glucose	-0,98503	1	-0,02	—	↘	↗	
3,82	V29	Glucose	-0,96415	2	0,08	—	↘	↗	
3,78	V37	Alanine/glucose	-0,96292	3	0,06	—	↘	↗	
7,34	V43	Bruit	0,93926	4	0,15	—			
4,14	V121	Lactate	0,93902	5	-0,11	—	↗	↘	
2,14	V31	Méthionine/glutamate	0,92939	6	0,14	—	↗	↘	
3,3	V55	?	0,91594	7	-0,04	—	↗	↘	
4,26	V16	Bruit	0,90353	8	-0,35	—			
3,18	V64	Citrulline	0,8956	9	-0,08	—	↗	↘	
4,1	V50	Lactate	0,89264	10	-0,18	—	↗	↘	
3,42	V119	Glucose	-0,88586	11	0,08	—	↘	↗	
7,62	V9	Bruit	0,88014	12	-0,13	—			
3,5	V86	Glucose	-0,87823	13	-0,02	—	↘	↗	
3,1	V7	?	0,87681	14	-0,02	—	↗	↘	
1,7	V39	Leucine/lysine	0,8501	15	0,06	—	↗	↘	
2,74	V103	Aspartate	0,84195	16	-0,32	—	↗	↘	
4,3	V78	Bruit	0,81378	17	-0,47	—			
7,26	V57	Bruit	0,80776	18	0,04	—			
3,74	V101	glucose	-0,80479	19	-0,12	—	↘	↗	
2,38	V5	Glutamate	-0,21	—	-0,94267	1			↘
5,7	V19	Bruit	-0,02	—	0,94199	2			
7,7	V95	4-aminohippurate	0,26	—	-0,91480	3			↘
1,58	V98	Citrulline	0,15	—	-0,91452	4			↘
6,82	V126	Bruit	-0,15	—	0,91271	5			
5,78	V94	Bruit	-0,17	—	0,90426	6			
5,9	V96	Bruit	-0,24	—	0,89726	7			
2,02	V116	Glutamate	0,16	—	-0,89599	8			↘
6,06	V113	Bruit	-0,36	—	0,86815	9			
7,14	V70	Bruit	-0,35	—	0,86157	10			
7,54	V20	?	-0,37	—	0,85828	11			↗
6,1	V112	Bruit	-0,38	—	0,85288	12			
6,78	V41	Bruit	-0,39	—	0,85007	13			
6,74	V44	Bruit	-0,42	—	0,84450	14			
7,1	V115	Bruit	-0,44	—	0,8457	15			
6,42	V45	Bruit	-0,46	—	0,84450	16			
6,18	V66	Bruit	-0,44	—	0,83597	17			
6,22	V67	Bruit	-0,45	—	0,83571	18			
1,82	V105	?	-0,18	—	-0,83396	19			↘
6,26	V83	Bruit	-0,45	—	0,83204	20			
6,58	V111	Bruit	-0,49	—	0,82936	21			
6,34	V84	Bruit	-0,47	—	0,82596	22			
6,38	V97	Bruit	0,15	—	0,82538	23			

Tableau 19: Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec les chevaux malades répartis selon leur traitement, les individus sains et Polka, seul individu sain traité à la taurine. L'AFD avait été réalisée après correction OSC avec le même facteur que pour faire l'AFD.

Avec $\delta^1\text{H}$: le déplacement chimique ; **Var** : le nom des variables ; **Can** : les corrélations canoniques ; **Rang** : le rang de la variable lors du classement par ordre décroissant des valeurs absolues des corrélations canoniques ; ↗, ↘ : l'augmentation ou la diminution des concentrations du composé correspondant dans le plasma ; **3/0** : les chevaux malades non traités par rapport aux sains ; **1/3** : les

chevaux malades traités à la phénytoïne par rapport aux chevaux malades sans traitement ; **P** : les chevaux malades traités à la phénytoïne par rapport à tous les autres.

En comparant les chevaux sains et malades, nous retrouvons ici les mêmes variations concernant le glucose (diminué chez les malades), le lactate, la lysine, la leucine et l'aspartate (tous augmentés chez les malades). Par contre, nos résultats sont contradictoires par rapport à l'AFD (figure 22, tableau 8) en ce qui concerne la citrulline et le glutamate.

Par ailleurs, en comparant les chevaux malades traités à la phénytoïne et ceux non traités, on s'aperçoit que le glutamate, la citrulline, le 4-aminohippurate diminuent chez les animaux traités.

En comparant les chevaux malades traités à la phénytoïne au reste des chevaux de l'étude (mis à part les suspects), on trouve des concentrations plasmatiques diminuées en glutamate, 4-aminohippurate et citrulline chez les chevaux traités à la phénytoïne.

e/ Effet de la durée d'évolution de la maladie

Dans cette partie, nous avons décidé d'opposer les individus sains aux individus malades, mais surtout nous avons voulu introduire une notion d'évolution de la maladie au cours du temps. Pour cela, les chevaux malades ont été répartis en trois groupes :

- le premier groupe réunit les chevaux malades depuis moins d'un an (< 365 jours) au moment de la prise de sang,
- le second est constitué des chevaux atteints depuis une période comprise entre un an et deux ans (365 jours << 730 jours),
- enfin, le dernier concerne les individus malades depuis plus de deux ans (> 730 jours).

Pour classer les chevaux, nous avons situé le début de la maladie lors de la constatation des premiers signes cliniques par les propriétaires. La durée prise en compte correspond au temps écoulé entre ces premiers signes cliniques et la prise de sang. Les chevaux ayant présenté une rémission clinique ont néanmoins été considérés comme malades.

❖ Analyse Factorielle Discriminante

Au commencement de notre étude, nous avons effectué une correction du tableau de données par OSC avec cette notion de durée afin de mettre ce facteur en exergue.

Une AFD en fonction des groupes, faisant intervenir la durée d'évolution de la maladie et en ajoutant le groupe des individus sains a été réalisée après filtration des variables corrigées.

La représentation graphique de l'AFD (figure 33) montre que les chevaux malades depuis moins d'un an sont éloignés des autres individus (sains ou bien malades depuis plus longtemps) selon le deuxième axe de discrimination factorielle (LD 2), portant 27,2% de la variabilité de l'échantillonnage. Par ailleurs, les animaux sains et les malades depuis plus d'un an sont séparés selon le premier axe de discrimination (LD 1), portant 51,9% de la variabilité de l'échantillonnage. Enfin, les groupes 2 et 3 ne semblent pas être séparés sur la figure bien que les distances de Mahalanobis de ces deux groupes sont significativement différentes (tableau 21).

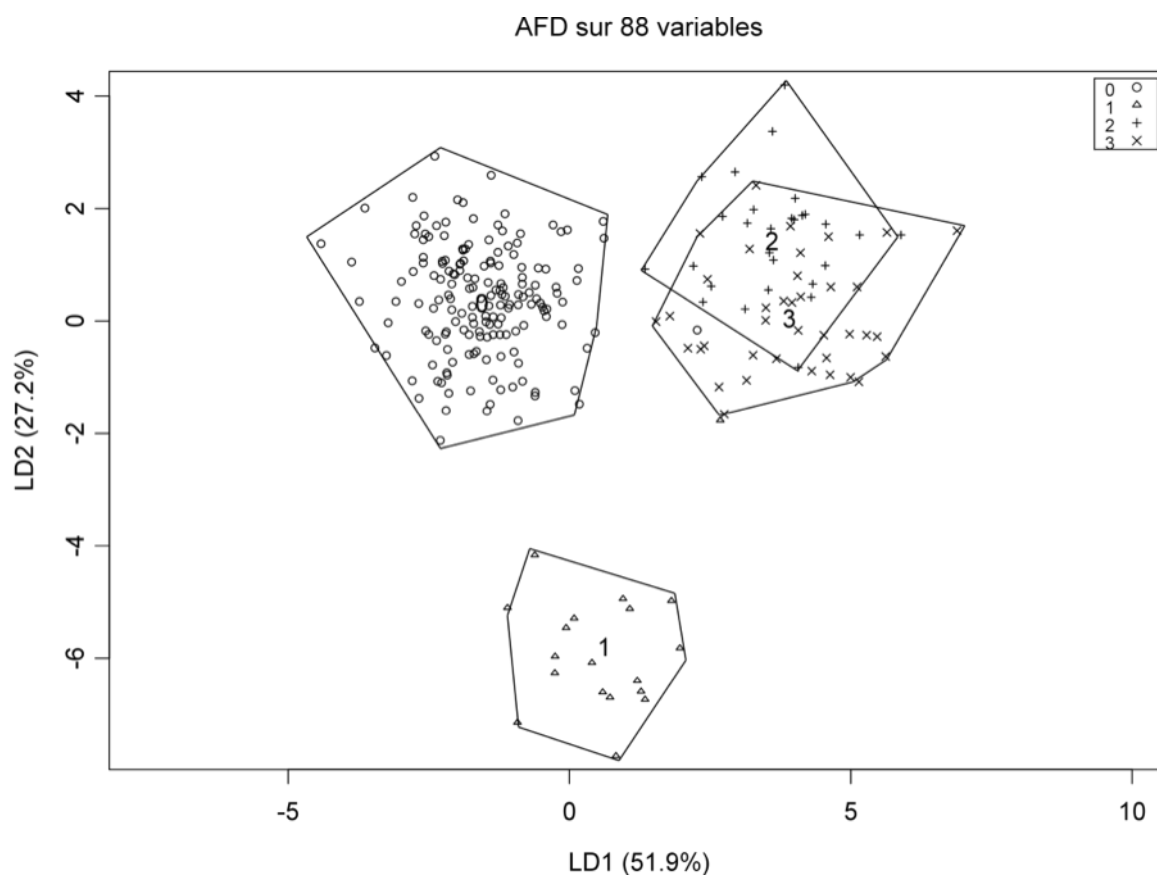


Figure 33: Représentation graphique de l'AFD des individus en fonction des groupes reflétant l'effet de la durée d'évolution de la maladie en opposition aux individus sains après correction par OSC avec le même facteur que pour l'AFD.

avec **0** : les individus sains; **1** : les individus malades depuis moins d'un an; **2** : les individus malades depuis un à deux ans; **3** : les individus malades depuis plus de deux ans.

Le tableau 20 rapporte les distances de Mahalanobis entre les groupes.

	0	1	2	3
0	0	43,47	38,87	35,40
1	43,47	0	65,65	57,45
2	38,87	65,65	0	34,27
3	35,40	57,45	34,27	0

Tableau 20: Carrés des distances de Mahalanobis (D^2) entre les groupes obtenus par AFD, celle-ci avait été réalisée après correction par OSC avec le facteur durée.

Les distances entre les différents groupes sont toutes très significatives (probabilités de Mahalanobis < 0,001), (tableau 21).

	0	1	2	3
0	1	<0.0001	<0.0001	<0.0001
1	<0.0001	1	<0.0001	<0.0001
2	<0.0001	<0.0001	1	<0.0001
3	<0.0001	<0.0001	<0.0001	1

Tableau 21: Significativité (probabilités) des distances de Mahalanobis entre les groupes obtenus par AFD, celle-ci avait été réalisée après correction par OSC avec le facteur durée.

❖ La sélection des variables

La représentation graphique de l'AFD des groupes de chevaux malades classés par durée d'évolution de la maladie montre que les chevaux malades depuis moins d'un an sont éloignés des autres individus (sains ou bien malades depuis plus longtemps), selon le deuxième axe de discrimination factorielle (LD 2). Par ailleurs, les sains et les malades depuis plus d'un an sont séparés selon le premier axe de discrimination (LD 1).

Nous allons donc étudier les métabolites pouvant être à l'origine de la séparation de ces groupes. Les variables les plus corrélées aux axes de discrimination ont été retenues et classées dans le tableau 22.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Var	Métabolites	Axe LD 1		Axe LD 2		Evolution	
			Can	Rg	Can	Rg	>1	<1
1,34	V1	Lactate	0,99757	1	-0,04	—	↗	
5,26	V19	α -glucose	-0,98539	2	-0,06	—	↘	
3,86	V79	Glucose	-0,97252	3	-0,14	—	↘	
7,34	V25	Bruit	0,96996	4	0,2	—		
3,74	V31	Glucose	-0,925	5	0,003	—	↘	
3,82	V35	Glucose	-0,91675	6	-0,14	—	↘	
3,5	V53	Glucose	-0,88836	7	-0,4	—	↘	
1,66	V66	?	-0,88625	8	-0,3	—	↘	
3,9	V34	Glucose	-0,86217	9	-0,06	—	↘	
1,22	V74	3-hydroxybutyrate	0,84332	10	0,12	—	↗	
3,46	V23	Glucose	-0,80272	11	-0,2	—	↘	
3,34	V6	?	0,80154	12	-0,32	—	↗	
2,54	V80	Bruit	0,11	—	0,98995	1		
1,58	V45	Citrulline	-0,18	—	-0,98366	2		↗
2,46	V73	Bruit	0,2	—	0,98008	3		
2,1	V39	Lipides	0,16	—	0,97985	4		↘
2,42	V10	Glutamine	-0,05	—	0,97631	5		↘
3,98	V29	Bruit	0,13	—	0,97049	6		
3,94	V2	Créatine	0,06	—	0,96917	7		↘
1,26	V38	Lipides	-0,29	—	-0,95616	8		↗
7,7	V16	4-aminohippurate	-0,33	—	-0,94232	9		↗
2,02	V51	Glutamate/glycoprotéines	-0,34	—	-0,93602	10		↗

Tableau 22: Variables les plus importantes pour chacun des deux axes principaux de l'AFD réalisée avec la notion de durée d'évolution de la maladie. L'AFD avait été réalisée après correction OSC avec le facteur durée.

Avec $\delta^1\text{H}$: le déplacement chimique ; **Var** : le nom des variables ; **Can** : les corrélations canoniques ; **Rang** : le rang de la variable lors du classement par ordre décroissant des valeurs absolues des corrélations canoniques ; ↗, ↘ : l'augmentation ou la diminution des concentrations du composé correspondant dans le plasma des chevaux malades depuis plus d'un an (> 1) ou depuis moins d'un an (< 1) par rapport aux sains.

Chez les chevaux malades depuis moins d'un an, on observe que leurs concentrations plasmatiques sont augmentées en citrulline ainsi qu'en glutamate, ou possiblement, en glycoprotéines, par rapport aux animaux sains. A l'inverse, celles de glutamine et de créatine diminuent.

Concernant les individus malades depuis plus d'un an, une augmentation plasmatique en lactate et en 3-hydroxybutyrate est observée. Nous retrouvons, par ailleurs, une diminution du glucose chez ces individus par rapport aux sains.

Discussion

I. Objectifs et réalisation

L'objectif de notre étude était de comprendre le métabolisme de l'intoxication à *Hypochaeris radicata* chez le cheval. Une étude similaire avait été réalisée chez le rongeur et avait montré que le *scyllo*-inositol était augmenté de manière dose-dépendante chez les souris intoxiquées (Domange *et al.*, 2008). Or, ce métabolite est augmenté dans le cerveau lors de différentes maladies neuro-dégénératives, chez l'homme. Nous avons donc souhaité réaliser une étude métabonomique en travaillant avec l'espèce cible, en espérant confirmer les résultats obtenus dans des conditions de laboratoire. Enfin, à travers cette étude qui vise à mettre en évidence des marqueurs biologiques de la maladie, nous souhaitons mettre en évidence un marqueur destiné à développer une méthode diagnostique du Harper Australien chez le cheval.

Nous avons donc travaillé avec 58 chevaux séparés en trois groupes : les malades, les sains et les suspects. Les chevaux malades de l'étude nous ont été référés par nos confrères de la région Midi-Pyrénées. Les autres chevaux ont été sélectionnés dans les écuries où nous avions des chevaux malades.

Nous avons réalisé des prélèvements sanguins selon la disponibilité et la volonté des propriétaires. Les plasmas ont ensuite été analysés par RMN, puis les données ont été travaillées grâce aux analyses statistiques multivariées.

II. Les difficultés rencontrées sur le terrain

Lors de cette étude nous avons travaillé sur le terrain avec des chevaux appartenant à des particuliers, et nous avons donc été confrontés à maintes difficultés liées à une étude de terrain.

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, nos démarches dépendaient du « bon vouloir » des propriétaires. La première étape était de les convaincre de participer à cette étude, ce qui les contraignait à nous accorder du temps pour le suivi des chevaux, qu'ils soient malades ou non. De plus, leurs disponibilités ne permettaient pas toujours des prélèvements très réguliers. Ensuite, les personnes soignant les chevaux ont dû administrer consciencieusement le traitement, et ceci malgré l'incertitude du résultat. Enfin, il ne faut pas occulter l'aspect financier de ce traitement car, même si la phénytoïne est une molécule « bon marché », son coût est parfois resté un obstacle.

Concernant les prélèvements sanguins, d'autres facteurs entrent également en jeu. Le facteur temps intervient aussi pour la personne qui réalisait les prises de sang, dans la mesure où certaines écuries sont très éloignées de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Les plus lointaines étaient à trois heures de route. C'est pourquoi, certaines écuries ont été moins suivies que d'autres, comme évoqué plus haut. Par ailleurs, cette dispersion géographique a influé sur l'homogénéité du traitement des prélèvements. En effet, après la prise de sang, le prélèvement était ramené au laboratoire de l'ENVT afin d'être centrifugé pour recueillir le plasma et le conserver au congélateur. Il y a eu ainsi une grande disparité du délai entre le prélèvement et la centrifugation. Ce temps a été même encore augmenté lorsque le prélèvement était réalisé en soirée. Dans ce cas, le tube de sang total passait la nuit au réfrigérateur pour n'être centrifugé que le lendemain. Le plasma a pu donc subir certaines modifications lors des longs transports, ou *a fortiori*, lors de la conservation du sang au frais. Néanmoins, il a été prouvé que le sang total conservé au frais (+4°C) montrait une bonne stabilité sur les premières 24 heures après récolte. Les changements métaboliques apparaissent surtout au bout de 36 heures de stockage (Peakman et Elliott, 2008).

Ensuite, le choix des animaux s'est fait à partir des cas référés par les vétérinaires exerçant en Midi-Pyrénées puis certains chevaux sains des écuries concernées ont été recrutés

pour notre étude. Il existe donc une grande hétérogénéité au niveau des races de chevaux, de leur sexe ... Par exemple, de fortes différences d'âge et d'activité existent au sein de notre échantillon. En effet, les individus sont âgés de 1 à 25 ans. On comprend donc aisément que certains chevaux soient au travail avec des intensités différentes (chevaux de club, de compétition ou de loisir) pendant que d'autres sont à la retraite ou en croissance. Enfin, les chevaux malades de l'étude étaient forcément au repos. Enfin, les chevaux étant répartis dans 16 écuries différentes et ayant des modes de vie disparates (box, pré, paddock avec ou sans herbe), il existe de grandes variations en ce qui concerne leur alimentation.

Ainsi, la grande variabilité intrinsèque de notre échantillon risquait d'être un obstacle lors du traitement des données dans notre partie statistique.

III. Plasma versus urine

Lors de notre étude, nous avons rencontré une difficulté temporelle. En effet, nous venons d'évoquer les distances à parcourir pour recueillir les prélèvements ainsi que la disponibilité des propriétaires des animaux suivis. Le choix du prélèvement de sang était le seul possible. En effet, le recueil d'urines implique d'éduquer les chevaux suivis afin de les familiariser au matériel utilisé. De plus, il est nécessaire que le propriétaire soit davantage disponible afin d'être certain que le cheval n'urine pas dans les heures précédant le prélèvement pour avoir une chance de pouvoir récolter des urines. En effet, le cheval n'urine pas sur demande et urine beaucoup moins fréquemment qu'un chien. Il est donc très délicat de pouvoir récolter de l'urine lors de miction spontanée. Le prélèvement aurait donc du être invasif. Par ailleurs, le stockage et la conservation du plasma ne pose aucun problème technique. Notre choix de travailler sur plasma s'est donc fait en prenant en compte la réalisation et la faisabilité du suivi des animaux.

Toutefois, le plasma est plus difficile à explorer en spectroscopie RMN. En effet, chaque échantillon biologique est caractérisé à un instant « t » par une « empreinte » en RMN. Or, de par son rôle biologique, le plasma contient des milliers de métabolites et a une composition extrêmement variable au cours du temps, à la différence des urines.

Dans la mesure où les profils obtenus par RMN peuvent refléter à la fois les variations biologiques liés à l'action pathogénique de la plante et/ou simplement liés à son absorption, il

est délicat d'interpréter les changements biologiques dans le plasma dans le cadre de notre étude.

IV. Les analyses statistiques

1) La séparation des individus en deux groupes

Dans l'analyse statistique de nos résultats, nous avons été confrontés à l'apparition de deux groupes très distincts lors de la réalisation de la première ACP (figure 12). Cela signifie qu'il existe un facteur ou une combinaison de facteurs dont l'importance est colossale dans la variabilité des échantillons. Nous nous sommes donc intéressés à l'identification de ce facteur présentant un intérêt majeur dans notre étude. Après avoir pu identifier les individus en les séparant en deux groupes, nous avons pu exclure les facteurs comme le sexe, l'écurie, le statut (malade, sain ou suspect), la nature du pré (contaminé par *Hypochoaeris radicata* ou non), la date du prélèvement ainsi que l'éventualité d'un groupe d'individu dissociable des autres. En effet, certains chevaux présents sur le cadran de gauche se retrouvaient aussi sur le cadran de droite.

Une telle séparation est restée inexplicable. Elle peut être liée à un facteur dont nous ne connaissons pas l'existence et que nous n'avons pas maîtrisé. Ceci est lié à la réalisation de notre étude.

En effet, bon nombre de facteurs physiologiques intrinsèques sont connus pour avoir une influence sur la composition métabolique d'échantillons biologiques (plasma, urine) et ce, sur des animaux en bonne santé, voire même en conditions expérimentales. En outre, plusieurs facteurs extérieurs peuvent jouer un rôle sur le profil métabolique des animaux, comme par exemple l'alimentation, la qualité et la provenance de l'eau ingérée, la température extérieure, le stress — ceci peut être étroitement lié au mode de vie chez le cheval (box versus pré) — ou encore la durée d'ensoleillement.

Il reste cependant dans notre étude un facteur pré-analytique qui aurait pu être maîtrisé et qui a pu jouer un rôle majeur sur la composition du plasma : il s'agit du délai entre la prise de sang et de la centrifugation de l'échantillon. En effet, les prélèvements étaient systématiquement centrifugés à l'ENVT et le délai a été plus ou moins important entre le

prélèvement et la séparation du plasma. Ce facteur reste à ce jour non étudié et devra être pris en considération dans nos investigations futures.

Néanmoins, ce délai n'est pas forcément responsable de la formation des deux groupes observés lors de la première ACP (figure 12). En effet, pour pouvoir identifier les individus, nous avons été contraints de les séparer en deux groupes. Nous avons choisi arbitrairement d'opposer l'écurie 1 (où le nombre de prélèvement était important) aux autres écuries de l'étude. Après une ACP avec uniquement les chevaux de l'écurie 1 (figure 13), nous avons pu constater que nous obtenions toujours deux groupes clairement séparés. Les chevaux de cette écurie ont tous été prélevés en même temps et les prélèvements ont donc tous suivis le même devenir. Ceci nous conduit donc à penser que la durée entre le prélèvement et la séparation du plasma n'est pas le facteur responsable de cette séparation en deux des prélèvements de notre étude. Néanmoins, on peut noter que les prélèvements ont été réalisés à des périodes différentes de l'année, un effet « température » peut donc avoir influé sur l'évolution du plasma au cours du transport. En étudiant les dates auxquelles les prélèvements ont été réalisés, nous avons pu infirmer cette hypothèse.

La séparation des groupes reste à ce jour inexplicée.

Nous avons néanmoins réalisé une AFD (figure 21) en créant des groupes d'individus en utilisant la séparation observée lors de notre première ACP (figure 12) afin d'essayer de comprendre ce qui a pu séparer nos individus de la sorte. En effet, nous espérons pouvoir interpréter les métabolites identifiés à partir des variables explicatives de l'AFD en question.

A ce jour, une hypothèse reste à vérifier. En effet, une légère hémolyse a été observée lors de la centrifugation de certains tubes provenant de chevaux malades. Une hypothèse a été émise sur le fait que le Harper Australien serait probablement une maladie oxydante, et l'hémolyse serait alors facilitée par la maladie.

Une étude pourrait être mise en place ultérieurement pour vérifier cette hypothèse. En effet, nous pourrions comparer le taux d'hémolyse entre les chevaux malades et les sains. Les prélèvements devraient alors être réalisés dans des conditions rigoureusement identiques et les indices d'hémolyse pourraient être mesurés par une méthode spectrophotométrique.

2) Les traitements

Les traitements réalisés sur les chevaux n'ont été pris en compte que lorsqu'ils étaient en cours au moment du prélèvement.

En effet, certains chevaux de l'étude avaient reçu un traitement, mais ce dernier étant très antérieur aux prélèvements, il n'a pas été pris en compte. Il se peut cependant que l'efficacité éventuelle du traitement puisse avoir eu des répercussions métaboliques durables chez les chevaux.

a/ La phénytoïne

Une étude, réalisée en 2007 par Guillaume Collignon, a montré que sur 43 chevaux traités à la phénytoïne, quatre d'entre eux n'ont montré aucune réponse au traitement. Les autres ont répondu de manière positive, et même parfois spectaculaire, au traitement. En fait, la phénytoïne ne favoriserait pas nécessairement la régénération axonale, condition indispensable à une guérison complète, mais participerait à réduire l'expression clinique en améliorant le confort de l'animal par son action anxiolytique et son effet direct sur les cellules nerveuses. Il est également possible que la phénytoïne interagisse avec un éventuel déficit proprioceptif.

b/ La taurine

Comme les premiers résultats obtenus par Céline Domange (non publié) dans sa thèse de science montraient apparemment une forte proportion d'hypotaurine dans les urines des rats nourris avec *Hypochaeris radicata*, nous avons émis l'hypothèse que la porcelle enracinée pouvait bloquer la synthèse de taurine. Elle agirait au niveau de la transformation de l'hypotaurine en taurine. Cette considération nous a donc conduit à utiliser la taurine comme traitement du Harper Australien.

En effet, la taurine intervient dans bon nombre de processus physiologiques. Elle participe notamment à la conjugaison des acides biliaires, à l'osmorégulation, à la détoxification de xénobiotiques, à la stabilisation des membranes cellulaires, à la modulation du flux calcique des cellules, ainsi qu'à la modulation de l'excitabilité des neurones (Taurine monograph, 2001). C'est en outre un puissant antioxydant qui sert de régulateur spécifique des concentrations en ions hypochlorides et en acides hypochloriques. Elle protège aussi contre les effets potentiellement toxiques du relargage d'aldéhyde (Birdsall, 1998).

Enfin, la taurine a un rôle spécifiquement neuroprotecteur. En effet, il a été prouvé qu'elle améliorerait la récupération des fonctions neuronales après des conditions d'hypoxie (Schurr *et al.*, 1987). De plus, la taurine protège les neurones de l'excitotoxicité neuronale induite par le L-glutamate en diminuant la concentration de calcium libre intracellulaire. Ce rôle dans la régulation calcique se fait en intervenant à plusieurs niveaux, notamment en inhibant la pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et en agissant sur plusieurs types de canaux à calcium des cellules (Wu, 2005). Ainsi, l'action neuroprotectrice de la taurine serait due à son rôle osmorégulateur (Chen, 2001).

Lors de neuropathies induites par certaines formes de diabète, la taurine, grâce à son rôle d'antioxydant et en améliorant la transmission via son action sur la régulation calcique, a été proposée. En effet, la supplémentation de la ration de rats diabétiques a ainsi permis de prévenir la diminution de la vitesse de la conduction nerveuse (Pop-Busui R *et al.*, 2001). Aussi, la taurine est devenue importante dans la prise en charge thérapeutique des polyneuropathies, chez l'homme (Li, 2004).

Or, le Harper Australien est une maladie oxydative avec une atteinte nerveuse, donc il est possible que la taurine ait un rôle à jouer dans l'intoxication. Aussi, de la taurine a été donnée *per os* à 6 chevaux, dont 5 malades et 1 sain, à une dose de 10 g *in toto* pendant 60 jours (soit environ 20 mg/kg/j). Cette dose a été calculée en prenant un millième du poids de la ration d'un cheval de 500 kg à l'entretien. Nous aurions aussi pu faire une relation d'allométrie à partir de la supplémentation réalisée dans les expérimentations sur les rats, mais cela paraissait très délicat à mettre en place. En effet, la dose apportée aux rats varie d'une publication à l'autre (Ito *et al.*, 2009 ; Belfer *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 2009 ; Pop-Busui *et al.* 2001 ; Li *et al.* 2005).

A la suite de l'administration de taurine, une amélioration clinique a pu être observée chez les tous les chevaux atteints sauf un. Le seul cheval n'ayant présenté aucune amélioration était un cheval qui a été traité à la taurine après avoir été sous phénytoïne et qui n'a présenté aucune amélioration clinique avec l'un ou l'autre des traitements (le cheval a présenté un grade 1 pendant tout le temps de l'étude). L'amélioration clinique s'est traduite par une légère diminution du grade du harper, mais surtout à une amélioration du comportement des chevaux atteints. La taurine a amélioré le stress des chevaux, diminué leur agressivité envers les autres chevaux et/ou l'homme (qui étaient apparus avec le harper). Le cheval sain traité n'a présenté aucune modification clinique dont comportementale avec la taurine.

Cependant, une erreur avait été commise lors de l'interprétation initiale des spectres RMN concernant la présence d'hypotaurine dans les urines des rats (il s'agissait en fait de *scyllo*-inositol). Le traitement avec de la taurine semble toutefois avoir eu une efficacité, bien que celle-ci n'ait jamais été scientifiquement prouvée. Par ailleurs, compte tenu de l'erreur commise, nous n'avons pas réellement d'éléments scientifiques pour expliquer la mise en place de ce traitement chez les chevaux intoxiqués, à part les propriétés évoquées précédemment.

3) Le nombre d'individus de l'étude

Pour notre étude, nous disposions de 58 chevaux, ce qui est un nombre assez important lorsque l'on travaille sur le terrain, chez le cheval. Cependant, nous avons rencontré quelques difficultés liées au nombre de chevaux lors de notre démarche statistique.

Dans notre tableau de données, chaque prélèvement est considéré comme un individu puisqu'il a donné un spectre avec un profil métabolique qui lui est propre. Cette façon de prendre en compte les prélèvements a donc augmenté notre nombre d'individus pour la démarche statistique, mais de ce fait, un même cheval a pu être mis dans plusieurs groupes en fonction de son profil métabolique et suivant son évolution. Par exemple, un cheval a pu être classé à la fois dans le groupe des chevaux de grade 3 puis de grade 2 s'il a présenté une amélioration clinique au cours du temps.

Cette façon de raisonner peut se justifier lorsque l'on travaille en RMN et s'est avérée très utile. Cependant, pour certains aspects de l'étude, nous manquons d'individus. Par exemple, il manque des chevaux sains traités avec de la taurine (il n'y en a qu'un) ou avec de la phénytoïne.

a/ Evolution du Harper Australien au cours du temps

Lors de l'étude de la notion de durée, et en constatant l'intérêt de ce facteur, nous avons souhaité étudier la dynamique de l'évolution de la maladie. Nous voulions recréer des groupes parmi les individus malades en croisant plusieurs facteurs, en prenant en compte la

durée de la maladie, l'amélioration ou la détérioration clinique, le grade selon l'échelle de Huntington (1989), ainsi que le traitement.

Nous nous sommes rapidement heurtés à deux problèmes. Le premier a été le nombre d'individus. En effet, nous n'avions que 16 chevaux malades et, parmi eux, seuls 11 chevaux ont pu être suivis dans le temps, aussi, après la formation des groupes, nous aboutissions à des groupes de trop petite taille (moins de 4 prélèvements dans certains groupes. Le second problème rencontré a été lié à la réalisation de l'étude, en effet, la réalisation des prélèvements était soumise non seulement à la disponibilité de l'opérateur (certains chevaux demeurant à un peu plus de trois heures de route de l'Ecole Vétérinaire) mais aussi au bon vouloir des propriétaires. Certains animaux ont donc été prélevés tous les 3 ou 4 jours alors que d'autres n'ont pu être prélevés que tous les 5 mois. Enfin, pour certains chevaux, nous ne possédons qu'un seul prélèvement.

Ainsi, le temps écoulé entre deux prélèvements était tellement aléatoire que la création de groupes homogènes pour étudier l'évolution dynamique de la maladie était impossible.

b/ L'effet traitement

Lors de notre étude statistique, nous avons pris en compte l'effet du traitement. Nous avons pu opposer des individus malades traités à des non traités ainsi que des prélèvements (32 échantillons de plasma en tout) sur un cheval sain, recevant ou non de la taurine.

Pour être complet et étudier cet effet traitement de manière plus approfondie, il nous manque d'autres chevaux sains traités avec de la taurine ou de la phénytoïne. L'idéal serait d'avoir au moins cinq chevaux dans chaque groupe. Ceci sera à prendre en considération lors de futures investigations.

4) L'AFD en fonction du statut des chevaux

Au cours de notre démarche statistique, une AFD en fonction des statuts des individus a été réalisée. Celle-ci a montré que les chevaux malades, sains et suspects sont séparés de manière significative : les suspects sont séparés des autres chevaux selon le deuxième axe de

discrimination alors que les chevaux malades et sains sont séparés selon le premier axe (LD 1).

Si on s'intéresse à ce premier axe, et que l'on projette les trois groupes, on se rend alors compte que les chevaux suspects se situent entre les individus malades et les sains. Cependant, il y a chevauchement entre ces trois groupes et il est impossible de savoir à quel groupe les suspects pourraient être rattachés. Enfin, ce groupe est éloigné significativement des groupes des animaux sains et malades sur l'axe 2.

5) Les individus suspects de l'étude

Lors du recrutement des individus de l'étude, les chevaux ont été classés en trois groupes : les individus sains, malades ou suspects.

Ici nous allons nous intéresser aux 5 chevaux déterminés comme suspects. Ces individus sont des chevaux dont le Harper Australien n'a pas pu être confirmé à partir des symptômes observés, mais qui présentaient des symptômes nerveux touchant les membres postérieurs et le larynx.

Ces animaux ont été pris en compte au début de nos investigations dans notre partie statistique. Du fait de leur statut « indéfini », ils n'ont pas pu être classés dans les groupes créés et étudiés par la suite, et ont donc été mis de côté. Dans nos futures investigations, il serait particulièrement intéressant de les réintégrer dans nos AFD pour déterminer à quel groupe ils seraient susceptibles d'appartenir ou voir s'ils se projettent à un tout autre endroit, ce qui signifierait qu'ils sont atteints d'une autre affection nerveuse. En effet, lors des représentations graphiques de ces AFD, en fonction de l'endroit où ces individus se projettent, et grâce aux distances de Mahalanobis, nous pourrions les réintégrer ou non dans un des groupes de chaque AFD.

V. Les variables explicatives et métabolites correspondants

1) Influence des statuts sur les profils métaboliques

L'AFD qui nous a permis de séparer les individus sains, malades et suspects permet de mettre en évidence l'existence de métabolites qui différencient statistiquement les différents groupes.

Si on s'intéresse tout d'abord aux métabolites séparant les chevaux sains et malades, le métabolite le plus corrélé à l'axe 1 est le *scyllo*-inositol. La présence de ce composé et sa participation à la différenciation entre les animaux sains et malades, représentent un intérêt majeur pour notre étude. En effet, en 2008, dans l'étude réalisée par Domange *et al.*, ce métabolite avait été détecté en plus grande quantité dans les urines, le foie et le cerveau des souris nourries avec 3 ou 9% d'*Hypochaeris radicata*, et ceci de manière dose-dépendante. L'IRM *in vivo* avait permis de confirmer la présence anormale de ce composé dans le thalamus des souris intoxiquées.

On observe également l'existence de lipides parmi les composés très corrélés à l'axe 1. Cette perturbation du métabolisme lipidique pourrait être liée à l'inositol qui entre dans la composition du phosphatidylinositol, un phospholipide des membranes cellulaires.

Le *scyllo*-inositol est un des 9 isomères de l'inositol. Cet isomère est l'un des principaux inositols trouvés dans l'organisme dans plusieurs tissus (Sherman *et al.*, 1968). Le *scyllo*-inositol est le second isomère le plus répandu dans l'encéphale après le *myo*-inositol à partir duquel se fait sa synthèse. Malgré sa présence observée depuis de nombreuses années, son rôle reste inconnu.

Cependant, dans plusieurs études, des changements dans sa concentration ont été observés dans le cerveau lors de plusieurs maladies nerveuses. En effet, dans la littérature, une augmentation du *scyllo*-inositol a souvent été associée avec des troubles du système nerveux central et s'est même révélé être un nouveau biomarqueur de l'encéphalopathie et des désordres métaboliques induits par l'alcoolisme chronique, chez l'homme (Viola *et al.*, 2004). Une augmentation significative de ce composé a aussi été mise en évidence dans l'encéphale de personnes atteintes par la maladie d'Alzheimer (Griffith *et al.*, 2007). Par ailleurs, dans le cas de lésions induites par une tumeur, la gliomatose cérébrale, les auteurs ont pu montrer que

l'amélioration clinique induite des sujets pouvait être associée avec une réduction du *scyllo*-inositol (Lodi *et al*, 2003).

Dans notre étude, nous observons, contre toute attente et à l'inverse de ce qui a été décrit dans la littérature, une diminution de la concentration en *scyllo*-inositol plasmatique. Néanmoins, toutes les études citées ont été réalisées sur l'encéphale *in vivo* grâce à l'IRM, ou sur des liquides biologiques (urine, liquide cébrospinal), mais aucune n'a concerné le plasma, comme c'est le cas dans notre étude. Nous ne pouvons pas à ce jour expliquer ce fait, et nous projetons d'étudier chez la souris le plasma des animaux intoxiqués.

La présence de citrulline est plus faible dans le plasma des chevaux malades par rapport aux chevaux sains. Cet acide aminé présent à l'état libre dans les cellules intervient dans le cycle de l'urée. La citrulline capte les résidus ammoniacques dans les mitochondries puis est exporté dans le cytoplasme pour recevoir le deuxième atome d'azote.

Ensuite, le troisième composé le plus fortement corrélé à l'axe 1 est le 3-hydroxybutyrate, suivi de loin par l'acétoacétate, deux corps cétoniques synthétisés à partir de l'acétyl-coA, issu de la β -oxydation des acides gras. On peut ainsi retrouver un lien avec les lipides. La cétogénèse peut aussi avoir lieu à partir d'acides aminés cétogénés comme, notamment, la lysine et la leucine que l'on retrouve parmi les composés fortement corrélés positivement à l'axe 1. Il est donc possible qu'il y ait une perturbation au niveau du métabolisme des corps cétoniques, chez les individus atteints. Enfin, la synthèse de ces composés est augmentée lorsque l'organisme ne peut utiliser de glucose comme source d'énergie. Ce qui renforce l'observation du fait que la concentration plasmatique en glucose est plus élevée chez les chevaux sains que chez les malades. Il existe ainsi probablement une perturbation du métabolisme glucidique ou un déficit énergétique global dans l'organisme, chez les individus malades.

De plus, nous observons une augmentation de l'aspartate plasmatique chez les individus malades. Outre son rôle d'acide aminé pouvant être utilisé pour la néoglucogénèse, l'aspartate est un neurotransmetteur excitant sous forme méthylée dans le système nerveux central et est un métabolite du cycle de l'urée.

En outre, on observe aussi que le glutamate est fortement corrélé au premier axe de discrimination factorielle de l'AFD. Or, le glutamate est l'acide aminé le plus répandu des neurotransmetteurs excitateurs trouvés dans le système nerveux central. L'excitotoxicité induite par un excès de glutamate a été présentée comme jouant un rôle majeur dans plusieurs maladies neurodégénératives, et notamment dans la maladie d'Alzheimer (Moussa *et al*,

2008 ; Scott *et al*, 2002 ; Kirvell *et al*, 2006). Cependant, ici chez les chevaux malades, comme chez les souris nourries avec 9% d'*Hypochoaeris radicata* (Domange *et al*, 2008), on observe une diminution de la concentration en glutamate dans le plasma et dans le cerveau des animaux atteints, respectivement. On peut aussi imaginer que le déficit en glutamate chez les animaux intoxiqués serait à la source des symptômes nerveux puisque le glutamate est le précurseur du GABA, qui est le principal inhibiteur du système nerveux central et qui a un rôle neurotrophique. Néanmoins, il semble qu'il n'y ait pas de corrélation entre la quantité de glutamate circulante et celle présente dans le système nerveux central, à condition que la barrière hémato-méningée soit intacte (Price *et al*, 1981 et 1984 ; Smith, 2000).

Enfin, d'après le tableau 8, le lactate plasmatique augmente chez les chevaux malades, comme lors de l'étude de Domange *et al*. (2008) où le lactate augmentait dans l'encéphale des souris nourries avec 9% d'*Hypochoaeris radicata*. Or, le lactate est détecté dans l'encéphale lorsque le métabolisme énergétique est sévèrement affecté (Ross, 2004). Il est cependant difficile d'attribuer l'augmentation plasmatique du lactate observée dans notre étude à cette même cause.

Sur un autre plan, les métabolites fortement corrélés au deuxième axe de discrimination factorielle de l'AFD, axe permettant d'opposer les individus suspects aux autres, sont le 4-aminohippurate et la lysine.

L'hippurate est généralement associé à des perturbations de la flore digestive liées à des changements dans la composition de la ration (Wang *et al*, 2004 ; Nicholls *et al*, 2003). Il s'avère donc impossible d'interpréter ce métabolite puisque les chevaux de l'étude suivaient des régimes alimentaires totalement différents.

La lysine est, quant à elle, un acide aminé essentiel mais très abondant dans l'organisme, ce qui rend sa présence ininterprétable lorsqu'elle apparaît seule.

Ainsi, la métabonomique ne nous permet pas de caractériser les différences métaboliques des chevaux suspects par rapport au reste des individus de l'étude.

2) Etude des 4 groupes notés A à D créés avec les ACP

L'AFD avec les quatre groupes de chevaux créés à partir de la représentation de l'ACP de tous les chevaux de l'étude avait pour but de comprendre ce qui séparait les groupes.

Le premier axe de discrimination factorielle s'est avéré être inexploitable pour une telle explication puisque les variables fortement corrélées à cet axe ne correspondent qu'à du « bruit » sur le spectre.

Le second axe permet de séparer les groupes C et B des deux groupes A et D. Cet axe n'est donc pas le plus facile à interpréter étant donné que sur l'ACP des chevaux de l'étude, les groupes A et C se projetaient à gauche et étaient opposés aux groupes B et D qui se projetaient à droite.

Nous allons étudier les différences qui opposent les trois groupes discernables sur l'AFD : le groupe B, le groupe C et le groupe A-D, bien que cela ne nous dévoilera pas une piste exploitable afin d'essayer de comprendre la séparation des individus existant lors de l'ACP des chevaux de l'étude. Les métabolites impliqués dans cette séparation sont ceux cités dans le paragraphe précédent : le glucose plasmatique diminue lorsque l'on passe du groupe C au groupe A-D puis au groupe B, alors que le 3-hydroxybutyrate et la leucine suivent l'évolution inverse. Il y a alors vraisemblablement une différence dans le métabolisme glucidique (énergétique) entre les trois groupes de chevaux créés.

Par ailleurs, l'alanine et la valine suivent la même évolution que la leucine. Ces trois molécules sont des acides aminés très abondants dans l'organisme. L'alanine est, quant à elle, synthétisée à partir du glutamate, mais ce dernier n'apparaît pas comme étant un composé permettant de différencier les groupes de cette AFD. La signification et l'interprétation de la séparation de ces groupes restent donc à ce jour peu interprétable.

3) Profils métaboliques des individus malades

Les variables différenciant les individus malades (grade 1 à 5) des chevaux malades en rémission clinique et Polka (seul individu sain traité à la taurine) sont celles fortement corrélées au premier axe de discrimination factorielle de l'AFD (figure 29).

Plus le grade augmente, plus le 4-aminohippurate augmente et signe une perturbation de la flore digestive chez les chevaux malades.

On note par ailleurs que la choline (non mise en évidence jusqu'ici dans les autres AFD) est en quantité plus faible chez les individus malades. Cependant, le spectre RMN de la choline peut être généré par la choline, mais aussi par la glycérophosphocholine et la phosphocholine, ces molécules interviennent dans la synthèse et la dégradation de membranes cellulaires. En outre, la choline est le précurseur de l'acétylcholine (Miller *et al*, 1991 et 1996). Une diminution du signal de la choline a été reportée lors de maladies hypomyélinisantes avec secondairement un dysfonctionnement axonal dans l'encéphale (Tedeschi *et al*, 1995 ; Bonavita *et al*, 1999). Ce nouveau syndrome de la matière blanche est caractérisé par une forte diminution du N-acétylaspartate, de la choline et créatine, ainsi qu'une augmentation du lactate.

Cette observation, une baisse des concentrations de la choline chez les chevaux atteints ne s'explique pas dans notre cas. En effet, lors du Harper Australien, les lésions observées sur les longs nerfs périphériques sont essentiellement des lésions de démyélinisation et non d'hypomyélinisation. Les lésions de démyélinisation sont généralement accompagnées d'une augmentation du pic de la choline sur les spectres RMN réalisés sur l'encéphale (Narayanan, 1997). Cependant, les prélèvements ont été réalisés généralement tardivement après le début de la maladie, et peuvent correspondre déjà à une phase de régénération neuronale.

Par ailleurs, en comparant nos résultats sur la choline, à ceux obtenus dans l'étude de Domange *et al*. (2008), nous retrouvons là aussi l'exact opposé. Nous évoquerons une possible différence entre ce qui est présent dans le plasma et dans l'encéphale car la choline avait été mise en évidence par IRM sur les encéphales de souris intoxiquées.

Le 4-aminohippurate et la choline ont exactement la variation inverse de celle observée chez les malades lorsque l'on compare Polka (individu sain) traitée à la taurine et les chevaux sains de l'étude. On peut alors évoquer ici une possible interaction entre le traitement avec de la taurine et la choline. Par ailleurs, nous pouvons aussi remarquer l'absence de taurine dans les tableaux de l'étude alors que nous pensions l'observer comme marqueur d'exposition sur les spectres des animaux en recevant.

4) Effet du grade clinique et du traitement

Lorsque les variations des métabolites observées chez Polka et chez les animaux faiblement atteints (grades 1 et 2) traités ou non sont comparées à celles des individus sains, nous retrouvons les différences observées entre les animaux malades et les sains évoquées précédemment, à savoir une baisse des concentrations plasmatiques en glucose et choline. Cependant, la quantité de lactate augmente alors qu'il était diminué chez les chevaux malades par rapport aux sains. Cette observation peut être liée aux prélèvements réalisés sur Polka. En effet, ses points se projettent au même endroit que ceux des individus faiblement atteints sur l'axe 1 (figure 30) alors que cette jument est saine. Cependant, ses points se projetaient avec ceux des individus sains lors de l'AFD en fonction des statuts (figure 22).

Par ailleurs lorsque l'on compare les chevaux atteints de grade 1 et 2 traités par rapport à ces mêmes grades non traités, nous obtenons des résultats contradictoires avec la comparaison entre les chevaux de grade 3 à 5 traités et les non traités (du même grade). En effet, chez les individus de grades 3 à 5 traités, les concentrations plasmatiques en lipides et 4-aminohippurate augmentent alors que celles en proline, acétate et 3-hydroxybutyrate diminuent par rapport aux individus non traités classés dans les mêmes grades. Et nous observons une évolution inverse en comparant les chevaux de grades 1 et 2 traités par rapport au non traités. Cela signifie qu'il peut y avoir une influence du grade clinique sur la réponse métabolique au traitement. Il est par ailleurs à noter que la dénomination de «traités» inclut les animaux traités à la taurine et ceux traités à la phénytoïne. Il peut alors y avoir une influence du traitement si les individus traités à la taurine ou à la phénytoïne sont répartis de manière inégale dans les différents groupes. En effet, 7 chevaux malades (en incluant le cheval qui a eu les deux traitements) ont reçu de la taurine, et nous avons récolté 47 prélèvements. La moyenne des grades pour les chevaux malades sous taurine est de 2,5 avec un écart type de 1,2. Pour la phénytoïne, 3 chevaux ont été traités et un a reçu les deux types de traitements, et nous avons obtenu 6 prélèvements. La moyenne des grades des chevaux malades recevant de la phénytoïne est de 2,7 avec un écart type de 2,3.

Nous rejoignons ici le problème évoqué plus haut concernant le nombre d'individus de l'étude. En effet, le nombre de chevaux ne nous a pas permis d'avoir des groupes suffisamment importants pour séparer les chevaux traités à la phénytoïne des chevaux traités à la taurine, tout en conservant la notion de grade clinique dans les groupes.

5) Effet du traitement

Lors de l'AFD réalisée avec l'effet du traitement (figures 31 et 32), nous avons pu séparer les individus malades non traités des individus sains. Cela va donc nous permettre une comparaison métabolique sans faire intervenir le biais lié aux traitements.

Nous avons retrouvé une partie des métabolites, glucose, lactate, glutamate, citrulline, leucine, lysine et aspartate, intervenant dans la séparation des individus malades (traités ou non) par rapport aux sains. Il existe donc bien une perturbation du métabolisme glucidique (énergétique) dans le Harper Australien.

Par ailleurs, en comparant les chevaux malades traités à la phénytoïne aux individus malades non traités, nous observons l'intervention des mêmes composés reflétant une perturbation du métabolisme glucidique, mais cette fois-ci en sens inverse. En effet, nous avons évoqué précédemment que nous observions une diminution en glucose, glutamate, *scyllo*-inositol, citrulline accompagnée par une augmentation des concentrations plasmatiques en valine, 3-hydroxybutyrate, leucine lactate, acétate, acétoacétate et aspartate chez les individus malades par rapport aux sains. Dans le tableau 19, en comparant les chevaux atteints traités à la phénytoïne aux chevaux malades non traités, on observe une augmentation du glucose, du glutamate et de la citrulline avec une diminution du lactate, de la leucine et lysine et de l'aspartate. Ces variations sont donc totalement opposées à celles des chevaux malades par rapport aux sains. Ceci montre que la phénytoïne peut améliorer les perturbations métaboliques induites par la maladie.

Enfin, les composés responsables de l'opposition du groupe des malades traités à la phénytoïne au restant des chevaux de l'étude (mis à part les suspects) sont le glutamate et le 4-aminohippurate. Nous avons déjà vu que ce dernier métabolite est difficile à interpréter du fait de la diversité des régimes alimentaires des chevaux de l'étude. Cependant, il se peut qu'il y ait une réelle perturbation de la flore digestive chez les chevaux traités à la phénytoïne, car cette molécule entraîne un ralentissement du transit chez le cheval (observation personnelle).

6) Effet de la durée d'évolution de la maladie

En comparant les chevaux malades depuis moins d'un an et ceux depuis plus d'un an par rapport aux chevaux sains de l'étude, on retrouve une fois de plus les mêmes perturbations (tableau 22) chez les chevaux atteints, avec une diminution du glucose, 3 hydroxybutyrate et de la créatine ainsi qu'une augmentation du lactate, 4-aminohippurate et de la citrulline. Un nouveau métabolite intervient dans la séparation des chevaux malades depuis plus d'un an des chevaux sains de l'étude : il s'agit de la glutamine qui diminue chez les chevaux malades. La glutamine est un acide aminé et l'un des précurseurs du glutamate (Smith, 2000). Il existe par ailleurs un cycle entre le glutamate et la glutamine: dans les astrocytes récupèrent le glutamate présent dans le liquide extracellulaire puis le converti en glutamine, à son tour libérée dans le liquide extracellulaire. Enfin, la glutamine est transportée dans les neurones pour être transformée en glutamate. Ce cycle entre astrocytes et neurones est une des voies majeures du recyclage du glutamate et est qualifié de cycle glutamine-glutamate. Ainsi, la diminution de la glutamine chez les chevaux malades est à relier à la diminution du glutamate, via une perturbation du cycle ou des transporteurs membranaires des astrocytes et des neurones (Danbolt, 2001).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus à partir de la spectroscopie RMN des encéphales des souris nourries avec *Hypochoeris radicata* (Domange *et al.*, 2008).

Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence un changement du profil métabolique des chevaux malades au cours du temps. Notre étude a été conduite sur le terrain, avec des intervalles de prélèvements variables. De plus, le premier prélèvement a souvent eu lieu tard après le début de la maladie, chez les chevaux (la moyenne entre le début de la maladie et le premier prélèvement est de 582 jours avec un écart type de 457 jours), ce qui constitue une autre différence majeure entre notre étude et celle de Domange *et al.* (2008). En effet, les souris avaient été nourries avec *Hypochoeris radicata* pendant au maximum 21 jours. Enfin, il est impossible de déterminer les quantités ingérées de plante par les chevaux et la période pendant laquelle l'ingestion a eu lieu.

Conclusion

La méthode des signatures biologiques constitue une démarche novatrice pour étudier les réponses métaboliques des systèmes biologiques à différents stimuli. L'utilisation de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire permet une description exhaustive des métabolites dans les liquides ou tissus biologiques. Les contrastes biologiques sont ensuite étudiés par des analyses statistiques multivariées des données ainsi obtenues.

Dans cette étude, les signatures biologiques ont été réalisées par spectroscopie ^1H RMN sur le plasma de 58 chevaux. Ce travail permet de différencier les individus atteints des individus sains. Nos résultats montrent, d'une part, qu'il existe une perturbation du métabolisme glucidique ou un déficit énergétique global de l'organisme chez les chevaux atteints et, d'autre part, l'implication du *scyllo*-inositol, du glutamate, de la glutamine et de la choline, métabolites déjà mis en évidence dans plusieurs maladies neurodégénératives.

En travaillant dans des conditions non expérimentales et sur l'espèce équine, nous avons réussi à retrouver des métabolites identiques à ceux mis en évidence chez les souris nourries avec *hypochaeris radicata* lors de l'étude réalisée par Domange *et al.* en 2008. Cependant, nous obtenons des variations opposées en ce qui concerne le *scyllo*-inositol et la choline par rapport à la littérature et à l'étude évoquée précédemment. Ceci peut être lié au fait que nous avons travaillé sur du plasma et pourra donner lieu à de futures investigations. Par ailleurs, nous n'avons pas pu mettre en évidence une évolution du profil métabolique au cours du temps chez les malades. Enfin, la phénytoïne semble avoir, métaboliquement parlant, un effet positif sur les individus malades.

Les résultats obtenus dans cette étude apportent quelques éléments de réponse sur les variations métaboliques mises en jeu lors de l'intoxication liée à l'ingestion d'*Hypochaeris radicata* et offrent de nouvelles pistes pour les études futures.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle Mélinda, Jackie, Emilie COLLET

a été admis(e) sur concours en : 2004

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 09 JUL. 2009

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussignée, Nathalie PRIYMENKO, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle Mélinda, Jackie, Emilie COLLET


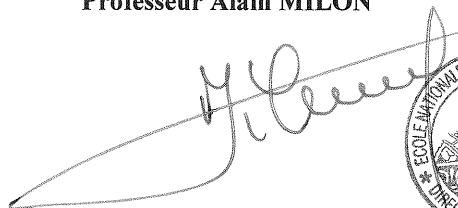
intitulée :

« Caractérisation métabolique de l'intoxication liée à l'ingestion d'*Hypochoeris radicata* chez le cheval. »

**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Nathalie PRIYMENKO**



**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Jean-Michel SENARD**



**Vu le : 16 MAI 2009
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**



Références Bibliographiques

ANONYME,

Taurine monograph,

Altern. Med. Rev., 2001, **61**, 78-82.

ARAUJO J.A.S, CURCIO B., ALDA J., MEDEIROS R.M.T, RIET-CORREA F.,

Stringhalt in Brazilian horses caused by *Hypochoeris radicata*,

Toxicon, 2008, **52**, 190-193.

ARAYA O., KRAUSE A., SOLIS DE OVANDO M.,

Outbreaks of stringhalt in southern Chile,

Vet. Rec., 1998, **142**, 462-463.

BIRDSALL T.C,

Therapeutic Applications of Taurine,

Altern. Med. Rev., 1998, **3**, 128-136.

BONAVITA S., DI SALLE F., TEDESCHI G.,

Proton MRS in neurological disorders,

Eur. J. Radiol., 1999, **30**, 125-131.

CANET D.,

In: La RMN : concepts et méthodes.

InterEditions, Paris, 1999, *Structure des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire*, 19-87.

CANET D., BOUBEL J-Cl., CANET-SOULAS E.,

In: La RMN : concept, méthodes et applications.

Dunod édition, 2nde Edition, Paris, 2002, *Structure des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire*, 2-47.

CAHILL J.I., GOULDEN B.E.,

Stringhalt – current thoughts on aetiology and pathogenesis,

Equine Vet. J., 1992, **24**, 161-162.

CAHILL J.I., GOULDEN B.E., JOLLY R.D.,

Stringhalt in horses: a distal axonopathy,

Neuropath. Appl. Neuro., 1986, **12**, 459-475.

CAHILL J.I., GOULDEN B.E., PEARCE H.G.,

A review and some observations on stringhalt,

New Zeal. Vet. J., 1985, **33**, 101-104.

CHEN W.Q., JIN H, NGUYEN M., CARR J., LEE Y.J., HSU C.C., FAIMAN M.D.,

SCHLOSS J.V., WU J.Y.,

Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons,

J. Neurosci. Res., 2001, **66**, 612-619.

COLLIGNON G.,

Contribution à l'étude épidémiologique de l'enzootie de harper australien en France depuis 2003 chez le cheval,

Thèse: Toulouse, Ecole Vétérinaire de Toulouse : 2007, 2007 – TOU3 – 4071, 81 pp.

CRABILL M.R., CLIFFORD M.H., TAYLOR D.S., SCHUMACHER J., WATKINS J.P.,

SNYDER J.R.,

Stringhalt secondary to trauma to the dorsoproximal region of the metatarsus in horses: 10 cases (1986-1991),

J. Am. Vet. Med. Assoc., 1994, **205**, 867-869.

DANBOLT N.C.,

Glutamate uptake,

Prog Neurobiol, 2001, **65**, 1-105.

DEBLINGER M., TNIBAR M.A.,

Forme classique et forme australienne de harper chez le cheval,

Prat. Vét. Equine, 2003, **35**, 15-20.

DIXON R.T., STEWART G.A.,

Clinical and pharmacological observations in case of equine stringhalt,

Aust. Vet. J., 1969, **45**, 127-130.

DOMANGE C., CANLET C., TRAORE A., BIELICKI G., KELLER C., PARIS A.,

PRIYMENKO N.,

Orthologous metabonomic qualification of a rodent model combined with magnetic resonance imaging for an integrated evaluation of the toxicity of *Hypochoeris radicata*,

Chem. Res. Toxicol., 2008, **21**, 2082-2096.

DUMAS M.E.,

Les signatures biologiques : étude globale des perturbations de l'homéostasie métabolique par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse et par reconnaissance de forme. Application au cas des stéroïdes anabolisants en élevage.

Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes : 2002, 230 pp.

FALISSARD B.,

Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie,

3^{ème} Edition, Masson édition, Paris, 2005, 372 pp.

GALEY F.D., HULLINGER P.J., McCASKILL J.,

Outbreak of Stringhalt in Northern California,

Vet. Hum. Toxicol., 1991, **33**, 176-177.

GARDNER S.Y., COOK A.G., JORTNER B.S., TROAN B.V., SHARP N.J.H., CAMPBELL N.B., BROWNIE C.F.,

Stringhalt associated with a pasture infested with *Hypochoeris radicata*,

Equine Vet. Educ., 2005, **17**, 118-122.

GAY C.C., FRANSEN S., RICHARDS J., HOLLER S.,

Hypochoeris-associated stringhalt in North America,

Equine Vet. J., 1993, **25**, 456-45.

GOUY I., LEBLOND A., EGRON-MORAND G., CADORE J.L.,

Etude de Harper Australien après sa recrudescence dans la région lyonnaise,

Prat. Vét. Equine, 2005, **37**, 51-58.

GRIFFITH H.R., DEN HOLLANDER J.A., STEWART C.C., EVANOCHKO W.T.,
BUCHTAL S.D., HARRELL L.E., ZAMRINI E.Y., BROCKINGTON J.C., MARSON D.C.,
Elevated brain *scyllo*-inositol concentrations in patients with Alzheimer's disease,
NMR Biomed., 2007, **20**, 709-716.

HUNTINGTON P.J., JEFFCOTT L.B., FRIEND S.C.E., LUFF A.R., FINELSTEIN D.I.,
Australian Stringhalt – epidemiological, clinical and neurological investigations, *Equine Vet.
J.*, 1989, **21**, 266-273.

HUNTINGTON P.J., SENEQUE S., SLOCOMBE R.F., JEFFCOTT L.B., MCLEAN A.,
LUFF A.R.,
Use of phenytoin to treat horses with Australian Stringhalt,
Aust. Vet. J., 1991, **68**, 221-225.

KENDALL W.T.,
The diseases of Australian horses,
Cameron Laing ed., Melbourne, Australie, 1884, 183-185.

KIRVELL S.L., ESIRI M., FRANCIS P.T.,
Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in
Alzheimer's disease,
J. Neurochem., 2006, **98**, 939-950.

LEBART L., MORINEAU A., PIRON M.,
In: Statistique exploratoire multidimensionnelle,
3^{ème} Edition, Science Sup Dunod édition, Paris, 2004, 464 pp.

LI F., OBROSOVA I.G., ABATAN O., TIAN D., LARKIN D., STUENKEL E.L.,
STEVENS M.J.,
Taurine replacement attenuates hyperalgesia and abnormal calcium signalling in sensory
neurons of STZ-D rats,
Am. J. Physiol. Endoc. M., 2005, **288**: E29-E36.

LINDON J.C., HOLMES E., NICHOLSON J.K.,
So what's the deal with metabonomics?
Anal. Chem., 2003, **75**, 384-391.

LODI R., SETOLA E., TONON C., AMBROSETTO P., FRANCESCHI E., CRINO L.,
BARBIROLI B., CORTELLI P.,
Gliomatosis cerebri: clinical, neurochemical and neuroradiological response to temozolomide
administration,

Magn. Reson. Imaging, 2003, **21**, 1003-1007.

MAYHEW I.G.,

In: Large animal neurology. A handbook for veterinary clinicians,

Lea and Febriger ed., Philadelphia, USA, 1989, *Stringhalt, Lathyrism and Shivering*,
219-222.

MILLER B.L.,

A review of chemical issues in ^1H NMR spectroscopy: N -acetylaspartate, creatine and
choline,

NMR Biomed., 1991, **4**, 47-52.

MILLER B.L., CHANG L., BOOTH R., ERNST T., CORNFORD M., NIKAS D., Mc
BRIDE D., JENDEN D.J.,

In vivo ^1H MRS choline: correlation with in vitro chemistry/histology,

Life Sci., 1996, **58**, 1929-1935.

MORINEAU A., ALUJA-BANET T.,

In: Analyse en composantes principales,

Cisia-Ceresta édition, 1998, 142 pp.

MOUSSA C.E., RUSNAK M., HAILU A., SIDHU A., FRICKE S.T.,

Alterations of striatal glutamate transmission in rotenone-treated mice: MRI/MRS in vivo
studies,

Exp. Neurol., 2008, **209**, 224-233.

NARAYANAN S., FU L., PIORO E., DE STEFANO N., COLLINS D.L., FRANCIS G.S.,
ANTEL J.P., MATTHEWS P.M., ARNOLD D.L.,

Imaging of axonal damage in multiple sclerosis: spatial distribution of magnetic resonance
imaging lesions,

Ann Neurol, 1997, **41**, 385-91.

- NICHOLLS A.W., MORTISHIRE-SMITH R.J., NICHOLSON J.K.,
NMR spectroscopic based metabonomic studies of urinary metabolite variation in
acclimatizing germ-free rats,
Chem. Res. Toxicol., 2003, **16**, 1395-1404.
- NICHOLSON J.K., CONELLY J., LINDON J.C., HOLMES E.,
Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function,
Nat. Rev. Drug Discov., 2002, **1**, 153-162.
- NICHOLSON J.K., LINDON J.C., HOLMES E.,
“Metabonomics”: understanding the metabolic response of living systems to pathological
stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data,
Xenobiotica, 1999, **29**, 1181-1189.
- PEAKMAN T.C., ELLIOTT P.,
The UK Biobank sample handling and storage validation studies,
Int. J. Epidemiol., 2008, **37**, i2–i6.
- PEMBERTON D.H.,
Investigations of a recent outbreak of stringhalt in horses in east Gippsland,
Victorian Veterinary Proceedings, 1979, 16.
- PEMBERTON D.H., CAPLE I.W.,
Australian Stringhalt in horse,
Vet. Annual, 1980, **20**, 167-171.
- POP-BUSUI R., SULLIVAN K.A., VAN HUYSEN C., BAYER L., CAO X., TOWNS R.,
STEVENS M.J.,
Depletion of taurine in experimental diabetic neuropathy : implications for nerve metabolic,
vascular, and functional deficits.
Exp. Neurol., 2001, **168**, 259-272.
- PRICE M.T., OLNEY J.W., LOWRY O.H., BUCHSBAUM S.,
Uptake of exogenous glutamate and aspartate by circumventricular organs but not other
regions of brain,
J. Neurochem., 1981, **36**, 1774 –1780.

PRICE M.T., PUSATERI M.E., CROW S.E., BUCHSBAUM S., OLNEY J.W., LOWRY O.H.,

Uptake of exogenous aspartate into circumventricular organs but not other regions of adult mouse brain,

J. Neurochem., 1984, **42**, 740–744.

ROBERTSON-SMITH R.G., JEFFCOTT L.B., FRIEND S.C.E., BADCOE L.M.,

An unusual incidence of neurological disease affecting horses during a drought,

Aust. Vet. J., 1985, **62**, 6-12.

ROSS A.J, SACHDEV P.S,

Magnetic resonance spectroscopy in cognitive research,

Brain Res. Brain Res. Rev., 2004, **44**, 83-102.

SCOTT H.L., POW D.V., TANNENBERG A.E., DODD P.R.,

Aberrant expression of the glutamate transporter excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) in Alzheimer's disease,

J. Neurosci., 2002, **22**, RC206.

SEDDON H.R., BELSCHNER H.G.,

Stringhalt in horses,

Agricultural Gazette of New South Wales, 1926, **37**, 381-382.

SHERMAN W.R., STEWART M.A., SIMPSON P.C., GOODWIN S.L.,

The identification of *myo*-inosose-2 and *scyllo*-inositol in mammalian tissues,

Biochemistry, 1968, **7**, 819-824.

SLOCOMBE R.F., HUNTINGTON P.J., FRIEND S.C.E., JEFFCOTT L.B., LUFF A.R.,

FINKELSTEIN D.K.,

Pathological aspects of Australian Stringhalt,

Equine Vet. J., 1992, **24**, 174-183.

SMITH Q.R.,

Transport of Glutamate and Other Amino Acids at the Blood-Brain Barrier,

J. Nutr., 2000, **130**, 1016S-22S.

STASHAK T.S.,

In: Adam's lameness in horses,

4^{ème} Edition, Lea and Febiger ed., Philadelphia, USA, 1987, *Stringhalt*, 723-725.

TAKAHASHI T., KITAMURA M., ENDO Y., ETO D., AOKI O., KUSUNOSE R.,
YOSHIHARA T., KAI M.,

An outbreak of Stringhalt resembling Australian Stringhalt in Japan,

J. Equine Vet. Sci., 2002, **13**, 93-100.

TEDESCHI G., SCHIFFMANN R., BARTON N.W., SHIH H.H., GOSPE S.M., BRADY
R.O., ALGER J.R., DI CHIRO G.,

Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in childhood ataxia with diffuse white
matter hypomyelination,

Neurology, 1995, **45**, 1526-1532.

TENENHAUS M.,

In: La régression PLS, théorie et pratique,

Technip édition, Paris, 1998, 254 pp.

TORRE F.,

Clinical diagnosis and results of surgical treatment of 13 cases of acquired bilateral stringhalt
(1991-2003),

Equine Vet. J., 2005, **37**, 181-183.

TRYGG J. [Page consultée le 17 Décembre 2008],

Everything you need to know about Orthogonal Signal Correction (OSC) filters - and how
they can improve interpretation of your data, 2002.

Adresse URL: <http://www.chemometrics.se/editorial/jan2003.pdf>

VIOLA A., NICOLI F., DENIS B., CONFORT-GOUNY S., LE FUR Y., RANJEVA J.P.,
VIOUT P., COZZONE P.J.,

High cerebral *scyllo*-inositol : a new marker of brain metabolism disturbances induced by
chronic alcoholism,

Magma, 2004, **17**, 47-61.

WANG Y., HOLMES E., NICHOLSON J.K., CLOAREC O., CHOLLET J., TANNER M.,
SINGER B.H., UTZINGER J.,

Metabonomic investigations in mice infected with *Schistosoma mansoni* : an approach for
biomarker identification,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, **101**, 12676-12681.

WOLD S., MARTENS H., WOLD H.,

In: Matrix Pencils,

Springer Verlag ed., Berlin, Allemagne, 1983, *The multivariate calibration problem in
chemistry solved by the PLS method*, 286-293.

WU H., JIN Y., WEI J., HONG J., SHA D., WU J.-Y.,

Mode of action of taurine as a neuroprotector,

Brain Res., 2005, **1038**, 123-131.

Liste des principales abréviations utilisées

ACP : Analyse en Composantes Principales

AFD : Analyse Factorielle Discriminante

ANOVA : ANalysis Of VAriance

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

MB : Matière Brute

OSC : Orthogonal Signal Correction

PLS : Partial Least Square

R&D : Recherche et Développement

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

TMS : TétraMéthylSilane

Imprimer à TOULOUSE par
la S.A.R.L. NOTREL



84, chemin des Capelles • 31300 TOULOUSE
notrel.sarl@wanadoo.fr

<http://www.photocopie-imprimerie-notrel.com>