

2m 11.3022.3

Université de Montréal

LES MARQUEURS BIOCHIMIQUES  
DU MÉTABOLISME OSSEUX  
DANS L'ÉVALUATION D'UN BISPHOSPHONATE  
CHEZ LE CHEVAL

par

AUORE VARELA

Département des sciences cliniques

Faculté de Médecine Vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
**Maître ès sciences (M.Sc.)**  
en sciences vétérinaires  
option sciences cliniques

Avril 2002

© Aurore Varela, 2002.



SF  
607  
U54  
2002  
V.019

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**LES MARQUEURS BIOCHIMIQUES  
DU MÉTABOLISME OSSEUX  
DANS L'ÉVALUATION D'UN BISPHOSPHONATE  
CHEZ LE CHEVAL**

présenté par :

**AURORE VARELA**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr André Vrins**  
Président-rapporteur

**Dr Marcel Marcoux**  
Directeur de recherche

**Dre Michèle Doucet**  
Codirectrice de recherche

**Dr Olivier M. Lepage**  
Codirecteur de recherche

**Dr André Bisailon**  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

Le but de cette étude est d'évaluer la tolérance du tiludronate chez le cheval, son effet sur le métabolisme osseux et l'utilité des marqueurs biochimiques osseux dans ce contexte. Une étude préliminaire a permis d'évaluer la tolérance intraveineuse du tiludronate et son effet à court terme. Deux paramètres de la formation osseuse ont été évalués : l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline osseuse. Deux marqueurs de la résorption osseuse : le CTX-MMP (*Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases*) et le CTX-I (*Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*) ont été mesurés. Ces marqueurs ont été dosés avant traitement, après 24 heures dans l'étude préliminaire et durant un suivi de 4 mois.

Aucune variation des marqueurs de la formation osseuse, ni du CTX-MMP n'a été observée. A +24 h, la concentration en CTX-I a fortement diminué de 72,4 % en moyenne ( $p=0,0313$ ). Aucune autre fluctuation interprétable n'est observée pour ce paramètre durant les 4 mois de suivi.

Le tiludronate en perfusion lente a été bien toléré chez le cheval sans réaction clinique secondaire significative et sans inhibition marquée du métabolisme osseux. Les marqueurs sélectionnés dans notre étude comme indice du métabolisme osseux n'ont pas permis d'identifier un effet significatif du tiludronate chez le cheval adulte sain non exercé. Des études complémentaires utilisant des techniques d'ostéodensitométrie sont nécessaires pour déterminer les effets du tiludronate sur la densité et l'architecture osseuses chez le cheval sain. Marqueurs biochimiques et ostéodensitométrie devront également être utilisés pour évaluer le tiludronate dans des modèles de maladies orthopédiques osseuses chez le cheval.

Mots-Clés : Cheval, Bisphosphonates, Tiludronate, Métabolisme osseux, Ostéocalcine, Phosphatase alcaline osseuse, CTX-MMP, CTX-I.



## SUMMARY

The purpose of this study is to evaluate the safety of tiludronate in horses, its pharmacological effects on bone metabolism and the usefulness of bone biochemical markers in this case. The purpose of a preliminary study was to evaluate intravenous tolerance of tiludronate in horses and its short-term effects on bone metabolism. Bone metabolism was evaluated before treatment and 24 hours after treatment in the preliminary study and over a 4-month period after treatment in a second study. Bone metabolism was measured using osteocalcin and bone alkaline phosphatase as formation markers and CTX-MMP (Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases) and CTX-I (Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen) as bone resorption markers.

No changes in formation markers or in CTX-MMP concentrations were observed after treatment. Twenty-four hours post IV administration of tiludronate, CTX-I levels markedly decreased by an average 72.4% ( $p=0.0313$ ). No other interpretable fluctuations of CTX-I levels were observed during the 4 months of follow-up.

Slow intravenous administration of tiludronate appears to be safe, as no clinical side effects were observed and there was no evidence of impairment of bone metabolism. The biochemical markers selected for this study as indices of bone turnover did not allow assessing a significant effect of tiludronate in normal healthy non-exercised horses. Further studies are needed to evaluate the effects of tiludronate on increasing bone mineral density and/or improving bone architecture in horses using osteodensitometry. Studies using both biochemical markers and osteodensitometry in horses that are affected by specific orthopedic disease would also be of interest.

Key words: Horse, Bisphosphonates, Tiludronate, Bone Metabolism, Osteocalcin, Bone Alkaline Phosphatase, CTX-MMP, CTX-I.



1.1.4	<i>Pharmacocinétique</i> .....	15
1.1.4.1	Absorption intestinale .....	15
1.1.4.2	Distribution .....	16
1.1.4.2.1	Distribution sanguine et liaison aux protéines sériques .....	16
1.1.4.2.2	Affinité tissulaire .....	16
1.1.4.2.3	Affinité osseuse .....	17
1.1.4.3	Métabolisme .....	18
1.1.4.4	Excrétion .....	18
1.1.5	<i>Toxicologie</i> .....	18
1.2	Études cliniques .....	19
1.2.1	<i>Chez l'homme</i> .....	19
1.2.1.1	Maladie de Paget .....	19
1.2.1.2	Ostéoporose .....	20
1.2.1.3	Ostéoporose de non-usage .....	20
1.2.1.4	Oncologie .....	21
1.2.1.5	Guérison osseuse .....	21
1.2.2	<i>Chez le cheval</i> .....	22
1.2.2.1	Médecine nucléaire .....	22
1.2.2.2	Utilisations thérapeutiques lors d'affections osseuses .....	23
	CONCLUSION .....	24
2	LES MARQUEURS BIOCHIMIQUES DU MÉTABOLISME OSSEUX CHEZ LE CHEVAL .....	25
2.1	Les marqueurs biochimiques de la formation osseuse .....	25
2.1.1	<i>L'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline</i> .....	25
2.1.2	<i>L'ostéocalcine sérique</i> .....	28
2.1.3	<i>Les peptides d'extension du collagène de type I</i> .....	31
2.2	Les marqueurs biochimiques de la résorption osseuse .....	33
2.2.1	<i>L'hydroxyproline</i> .....	33
2.2.2	<i>Les glycosides de l'hydroxylysine</i> .....	33
2.2.3	<i>Les molécules de pontage du collagène et leurs télopeptides associés</i> .....	34
2.2.3.1	Les molécules de pontage pyridinium .....	34
2.2.4	<i>Le C-télopeptide du collagène de type I : CTX-MMP</i> .....	36
2.2.5	<i>Le N-télopeptide du collagène de type I : NTX-I</i> .....	37
2.2.6	<i>Le C-télopeptide du collagène de type I : CTX-I</i> .....	38
2.2.7	<i>Autres marqueurs de la résorption</i> .....	38
2.3	Considérations pour l'utilisation clinique de marqueurs biochimiques osseux chez le cheval .....	39
	CONCLUSION .....	44
	HYPOTHÈSES DE RECHERCHE .....	45

## Chapitre deuxième : Étude expérimentale

MÉTHODOLOGIE.....	46
1 Animaux.....	47
2 Traitement.....	48
3 Suivi clinique.....	49
4 Analyses biochimiques.....	50
5 Analyse statistique.....	52
 Premier article.....	 53
Varela A., Lepage O.M., Doucet M., Marcoux M., Garnero P. Tiludronate chez le cheval : Tolérance et effets à court terme sur le métabolisme osseux. <i>Annales de Médecine Vétérinaire</i> 2002, <b>147</b> ,123-130.	
Résumé.....	55
Summary.....	56
Introduction.....	57
Matériel et méthodes.....	60
Résultats.....	63
Discussion.....	69
Références bibliographiques.....	73
 Second article.....	 78
Varela A., Lepage O.M., Doucet M., Marcoux M., Garnero P. Pharmacodynamic effects of tiludronate on equine bone: a biochemical study. <i>Research in Veterinary Science</i> , submitted.	
Summary.....	80
Introduction.....	81
Materials and methods.....	83
Results.....	87
Discussion.....	93
Bibliography.....	97

## **Chapitre troisième : Discussion-Conclusion**

DISCUSSION-CONCLUSION .....	102
Discussion générale.....	103
Tolérance clinique du tiludronate chez le cheval.....	103
Effets du tiludronate sur le métabolisme osseux chez le cheval .....	105
<i>Les marqueurs de la formation osseuse.....</i>	<i>105</i>
<i>Les marqueurs de la résorption osseuse.....</i>	<i>106</i>
CTX-MMP.....	106
CTX-I.....	106
L'efficacité du tiludronate chez le cheval .....	108
Les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux dans l'évaluation d'un bisphosphonate chez le cheval .....	109
Conclusion .....	110
BIBLIOGRAPHIE .....	111

# LISTE DES TABLEAUX

## **CHAPITRE PREMIER**

Tableau I : Structure chimique des différents bisphosphonates étudiés pour leur effet sur le tissu osseux ..... 7

Tableau II : Abréviations et nomenclature des marqueurs du métabolisme osseux. .... 27

## **CHAPITRE DEUXIÈME**

### **Premier article**

Tableau I : Évolution de la concentration plasmatique en OC et en bone-ALP avant traitement au J1 et 24h après administration intraveineuse de tiludronate ..... 66

Tableau II : Évolution de la concentration plasmatique en CTX-MMP et en CTX-I avant traitement au J1 et 24h après administration intraveineuse de tiludronate ..... 67

Tableau III : Variation des marqueurs biochimiques osseux avant traitement au J1 et 24h après administration intraveineuse de tiludronate..... 67

### **Deuxième article**

Table I: Effect of tiludronate on CTX-I from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4)..... 92

# LISTE DES FIGURES

## **CHAPITRE PREMIER**

Figure 1 : Structure chimique des pyrophosphates et des bisphosphonates (sous forme d'acide).....	6
Figure 2 : Tiludronate sous forme d'acide tiludronique, sel disodique.....	6
Figure 3 : Relation structure et activité des bisphosphonates. ....	13
Figure 4 : Représentation schématique de la molécule d'ostéocalcine intacte et de ses principaux produits de dégradation.....	29
Figure 5 : Maturation extracellulaire des molécules de collagène de type I.....	32
Figure 6 : Pyridinoline, désoxypyridinoline et télépeptides : marqueurs de la résorption osseuse .....	35

## **CHAPITRE DEUXIÈME**

### **Premier article**

Figure 1 : Évolution de la fréquence cardiaque moyenne avant et après administration intraveineuse de tiludronate .....	64
Figure 2 : Évolution des concentrations plasmatiques moyennes du calcium ionisé et du calcium total avant et après administration intraveineuse de tiludronate .....	65
Figure 3 : Concentration sérique en CTX-I avant traitement au J1 et 24h après administration intraveineuse de tiludronate .....	68

**Deuxième article**

Fig. 1: Effect of tiludronate on OC from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4). .....	88
Fig. 2: Effect of tiludronate on b-ALP from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4).. .....	89
Fig. 3: Effect of tiludronate on CTX-MMP from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4).....	90
Fig. 4: Effect of tiludronate on CTX-I from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4). .....	91



## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADP	Adénosine Diphosphate
ALP	Phosphatase alcaline
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine Tri-phosphate
BGP	Protéine osseuse Gla ; <i>Bone Gla Protein</i>
Bone ALP	Isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline
C	Carbone
CLHP	Chromatographie liquide haute performance ; <i>HPLC high-performance liquid chromatography</i>
CTX-I	C-télopeptide du collagène de type I ; <i>Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen</i>
CTX-MMP	C-télopeptide du collagène de type I généré par les métalloprotéases matricielles ; <i>Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases</i>
CV	Coefficient de variation
D	<i>Diem</i>
DEXA	Absorptiométrie biphotonique ; <i>Dual-Energy X ray Absorptiometry</i>
DMO	Densité minérale osseuse
DPD	Désoxypyridinoline
ELISA	Dosage par la méthode E.L.I.S.A ; <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>

FC	Fréquence cardiaque
F-DPD	Désoxypyridinoline libre ; <i>Free-Desoxypyridinoline</i>
F-PYR	Pyridinoline libre ; <i>Free-Pyridinoline</i>
GGT	$\gamma$ -glutamyl transférase
H	heure
ICTP	CTX-MMP
IL	Interleukine
IM	Intramusculaire
IV	Intraveineuse
IRMA	Dosage immunoradiométrique ; <i>ImmunoRadioMetric Assay</i>
MDP	Méthylène bisphosphonate
N	Azote ou radical amine
NO	Oxyde nitrique
NTX-I	N-télopeptide du collagène de type I ; <i>N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen</i>
O	Oxygène
OC	Ostéocalcine
OH	Groupement hydroxyl
P	Phosphore
P-C-P	Structure Phosphate-Carbone-Phosphate
P-O-P	Structure Phosphate-Oxygène-Phosphate

PICP	Peptide C-terminal d'extension du collagène de type I ou <i>Procollagen I C-terminal Propeptide</i>
PINP	Peptide N-terminal d'extension du collagène de type I ou <i>Procollagen I N-terminal Propeptide</i>
PTH	Hormone Parathyroïdienne ; <i>Parathyroid hormone</i>
PYD	Pyridinoline
R <sub>1</sub>	Radical carboné 1
R <sub>2</sub>	Radical carboné 2
RIA	Dosage radio-immunologique ; <i>RadioImmunoAssay</i>
Tc	Technétium
TNF	Facteur nécrosant des tumeurs ; <i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
Total-ALP	Phosphatase alcaline totale
TRACP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
UMO	Unité multicellulaire osseuse ; <i>BMU Bone Multicellular Unit</i>
USO	Unité structurale osseuse ; <i>BSU Bone Structural Unit</i>
V-ATPase	ATPase à protons de type vacuolaire
WGL	Précipitation par la lectine du germe de blé ; <i>wheat germ lectin</i>

## DÉDICACE

«La vie, dans la constance de son processus de formation et de destruction, ne me semble pour l'œil humain pouvoir être concrètement mieux enclose qu'entre les haies de mésanges bleues de l'aragonite et le pont de trésors de la «grande barrière» australienne.»

Extrait de «L'amour Fou»,  
André Breton, 1937.

A toi,

Mon Amour, pour ces deux années et toutes nos transatlantiques. La prochaine nous la ferons enfin ensemble!

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont travaillé de près ou de loin à la réalisation de ce projet de recherche. Plusieurs personnes ont été particulièrement impliquées pour la réalisation et l'aboutissement d'un tel projet :

Au Dr Marcel Marcoux, mon directeur de recherche, pour la supervision de ma maîtrise, sa grande disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée dans la réalisation de ce projet transatlantique.

Au Dre Michèle Doucet, co-directrice de recherche, pour son aide sans limite, sa grande disponibilité, sa rigueur intellectuelle et son enthousiasme. Ce fut un très grand plaisir de travailler à ses côtés.

Au Pr Olivier Lepage, co-directeur de recherche, pour son encadrement, son expertise et les ressources qu'il a mis à ma disposition. Il est à l'origine de ce projet au Département hippique de l'ENV Lyon, il m'a permis de le réaliser et de découvrir le monde passionnant du tissu osseux.

Au Dr Patrick Garnero de l'Université Lyon I pour ses conseils précieux et sa grande connaissance des marqueurs biochimiques.

A CEVA Santé Animal France, pour le support financier du projet.

Au GREMEQ\* et au Fonds du Centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal qui m'ont aidé dans la réalisation de ma maîtrise.

\* Groupe de recherche en médecine équine du Québec

# INTRODUCTION

La pathologie du système locomoteur est la cause la plus fréquente de perte d'activité des chevaux de course, car elle cause des diminutions de performance, des réformes prématurées, des retraits temporaires durant la saison de course et entraîne ainsi des pertes économiques importantes (Jeffcott *et al.*, 1982 ; Rosedale *et al.*, 1985 ; Physick-Sheard et Russell, 1986 ; Estberg *et al.*, 1996). Parmi ces affections, les problèmes osseux constituent un élément majeur (Bathe, 1994). Approximativement 60% des pertes fatales en course sont dues à des fractures (Riggs, 1997). Des affections osseuses moins graves mais douloureuses sont responsables de retards à l'entraînement (Riggs, 1997). La forte incidence des affections du système locomoteur chez le cheval incite à l'amélioration des méthodes d'évaluation du métabolisme osseux, du diagnostic précoce des affections du squelette, et au développement de molécules thérapeutiques visant à prévenir et traiter ces affections.

L'os joue un rôle de soutien essentiel dans l'organisme mais il convient de concevoir le tissu osseux autrement que comme une charpente amorphe. Au sein du tissu osseux, on distingue trois grandes activités qui sont la croissance, le modelage et le remaniement (Lepage *et al.*, 1997a). Ce tissu osseux par son renouvellement perpétuel, le remaniement, possède des capacités rapides d'adaptation. A la différence des activités de croissance et de modelage, le remaniement osseux est un phénomène continu qui a lieu durant toute la vie de l'individu à la fois dans l'os cortical et trabéculaire. L'os est constitué d'une matrice protéique, essentiellement formée de collagène de type I, sur laquelle est déposée la substance cristalline phosphocalcique. Des molécules de pontage permettent de stabiliser les molécules de collagène au sein de la matrice protéique extracellulaire. Le métabolisme osseux est caractérisé par deux activités opposées et couplées : la dégradation ou résorption de l'os ancien par les ostéoclastes et les ostéocytes résorbants et la formation d'un nouvel os par les ostéoblastes qui synthétisent la matrice ostéoïde, nom que porte la matrice avant sa minéralisation. Ce tissu ostéoïde subit secondairement une minéralisation avec formation d'un front de calcification. Le tissu osseux est une source d'ions calcium, disponibles en grande quantité et rapidement échangeables, source capitale pour l'homéostasie calcique de l'organisme.

Le calcium sanguin est presque exclusivement plasmatique, séparé en deux fractions, le calcium lié aux protéines, surtout à l'albumine, et le calcium ultra-filtrable presque entièrement sous forme ionisée qui correspond à la fraction biologiquement active. Le calcium osseux et le calcium sanguin et interstitiel sont en échange permanent pour maintenir l'homéostasie calcique (Rosol et Capen, 1997). Le bilan calcique est donc le reflet du métabolisme osseux. Une inhibition de la résorption osseuse peut entraîner une séquestration des ions calcium dans le tissu osseux, réduire les échanges avec le compartiment interstitiel et le sang, et l'homéostasie peut être affectée si les autres sources de calcium (reins et intestins) sont non fonctionnelles ou déficientes.

Les bisphosphonates constituent une classe thérapeutique aujourd'hui bien connue en médecine humaine pour le traitement des maladies métaboliques de l'os (Fleisch, 1997). Le tiludronate comme les autres bisphosphonates est caractérisé par une forte activité anti-ostéoclastique. Il agit principalement sur le tissu osseux, en inhibant la résorption osseuse par inhibition de l'activité ostéoclastique (Ammann *et al.*, 1993). Les bisphosphonates sont très intéressants dans le traitement de certaines maladies de l'os où le remaniement est mis en cause (Reginster *et al.*, 1988 et 1989) ou lors de métastases osseuses (Fleisch, 1991). Les bisphosphonates de première génération comme l'etidronate, inhibant la minéralisation osseuse, sont utilisés lors de calcification ectopique (Fleisch, 1997). Deux groupes peuvent être distingués selon leur mécanisme d'action : les bisphosphonates contenant un groupement azoté et les bisphosphonates ne contenant pas de groupement azoté (non aminobisphosphonates) comme le tiludronate (Benford *et al.*, 1999). Des effets anti et pro-inflammatoires ont été mis en évidence dans ces deux catégories.

Chez le cheval, les bisphosphonates pourraient être utilisés dans le traitement d'affections osseuses associées à des lésions de type ostéolytique ou de remaniement osseux anormal. C'est le cas pour les fractures de stress qui impliquent une activité de résorption intense et localisée (Stover, 1998), l'ostéopénie de non-usage, le syndrome naviculaire, l'éparvin, les kystes sous-chondraux et les sésamoïdites. Le tiludronate a récemment reçu une autorisation de mise sur le marché en France pour le traitement des boiteries associées aux remaniements osseux et cartilagineux observés dans l'éparvin, une affection dégénérative des petites articulations du tarse. Différentes études rapportent l'utilisation des bisphosphonates chez le cheval. Le pamidronate, un aminobisphosphonate

inhibant la minéralisation osseuse a été utilisé dans le traitement d'exostose expérimentalement induite chez le poney (Lepage et François, 1989). Le pamidronate a également été évalué mais sans succès dans le traitement du syndrome naviculaire (McGuigan *et al.*, 2000). Deux études cliniques provenant d'une même équipe de recherche montrent l'intérêt du tiludronate dans le traitement des boiteries associées à des lésions ostéolytiques chez le cheval (Denoix *et al.*, 2001 ; Thibaud *et al.*, 2001).

Différentes méthodes d'évaluation non invasives du tissu osseux sont décrites chez le cheval (Lepage *et al.*, 2001). Le métabolisme osseux est indirectement évalué par l'évolution des concentrations sériques ou plasmatiques de marqueurs biochimiques. Ceux-ci constituent des composants de la matrice osseuse collagénique ou non collagénique ou des enzymes qui sont libérés dans la circulation durant la formation ou la résorption osseuse. Le dosage des marqueurs biochimiques osseux constitue une méthode simple, rapide et non invasive d'investiguer le métabolisme osseux. Les marqueurs biochimiques du remaniement osseux reflètent le métabolisme osseux qui se modifie rapidement et ils sont utilisés pour prédire l'efficacité des traitements antirésorbants à court terme (Taylor *et al.*, 1994). A plus long terme, les mesures de densité osseuse constituent la technique de choix pour évaluer le gain de masse osseuse (Reginster *et al.*, 1989). Dans l'ensemble du texte, nous utiliserons pour décrire les marqueurs la nomenclature internationale la plus récente (Delmas *et al.*, 2000) approuvée par le CSAIOF (Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation). Chez le cheval, ces marqueurs pourraient être utilisés pour le diagnostic précoce des affections osseuses, le suivi de ces affections, pour déterminer la réponse à des traitements antirésorbants et effectuer un suivi du métabolisme osseux chez le cheval à l'entraînement ou en compétition afin de prévenir l'apparition de ces affections. Chez le cheval, de nombreuses études décrivent l'utilisation de ces marqueurs pour évaluer le métabolisme osseux. En médecine humaine, l'évaluation de l'efficacité de médicaments antirésorbants et la réponse thérapeutique à ces traitements est leur principale utilisation (Garnero et Delmas, 1996).



# RECENSION DE LITTÉRATURE

L'objectif de cette recension de la littérature est de présenter les connaissances actuelles sur les bisphosphonates en particulier le tiludronate, et sur les marqueurs biochimiques osseux, leur utilisation dans l'évaluation du métabolisme osseux et des traitements antirésorbants chez le cheval.

# **1 Les bisphosphonates**

## **1.1 Étude préclinique**

### **1.1.1 Antécédents au développement pharmacologique**

Le pyrophosphate inorganique est un sous-produit du clivage cellulaire de l'adénosine triphosphate (ATP), présent dans les fluides biologiques, le plasma et l'urine. C'est le plus simple des composés utilisés massivement en industrie pour leur propriété d'inhiber la précipitation du carbonate de calcium ceci essentiellement dans les additifs anticalcaires. Le pyrophosphate inorganique inhibe à la fois la formation et la dissolution du phosphate de calcium *in vitro* (Fleisch *et al.*, 1966). *In vivo*, il prévient les calcifications ectopiques. Il pourrait être un régulateur du dépôt et de la dissolution minérale dans l'organisme (Fleisch *et al.*, 1966), mais il est inactif lorsqu'il est donné oralement du fait d'une hydrolyse rapide. Les bisphosphonates sont des analogues résistant à l'hydrolyse enzymatique, qui ont été développés pour avoir une activité physicochimique similaire (Fleisch *et al.*, 1968).

### **1.1.2 Caractéristiques physicochimiques**

Les bisphosphonates, anciennement appelés diphosphonates, sont connus par les chimistes depuis la deuxième moitié du 19<sup>ème</sup> siècle où le premier composé a été synthétisé. Ce sont des analogues stables des composés naturels contenant des pyrophosphates, dans lesquels l'oxygène dans la structure Phosphate-Oxygène-Phosphate a été remplacé par un atome de carbone C. Il en résulte une structure P-C-P (figure 1) stable à la chaleur et à la plupart des agents chimiques, et complètement résistante à l'hydrolyse enzymatique. Ils ont une forte affinité pour les ions métalliques avec lesquels ils peuvent former des complexes solubles, insolubles et des agrégats (Fleisch, 1997).

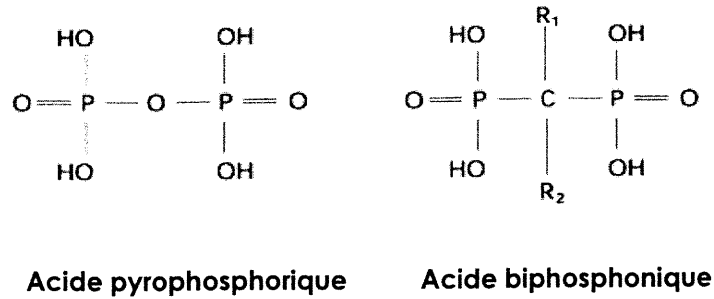


Figure 1 : Structure chimique des pyrophosphates et des bisphosphonates (sous forme d'acide).

En substituant différents radicaux R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> à l'atome de carbone, une grande variété de bisphosphonates peuvent être synthétisés (Tableau I), chacun avec des caractéristiques physicochimiques, biologiques, thérapeutiques et toxicologiques différentes. Le tiludronate ou (4-chlorophényl) thiométhylène bisphosphonate (figure 2) est un non-aminobisphosphonate sulfuré (Reginster *et al.*, 1988).

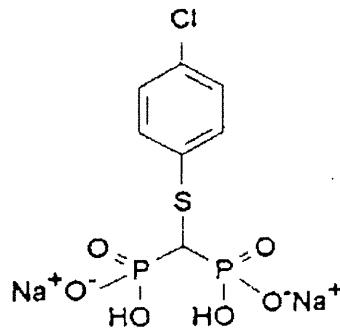


Figure 2 : Tiludronate sous forme d'acide tiludronique, sel disodique.

Les caractéristiques physicochimiques des bisphosphonates sont très similaires à celles des pyrophosphates. Ils inhibent la formation, l'agrégation et la dissolution des cristaux de phosphate de calcium et de carbonate de calcium. Du fait de la structure P-O-P ou P-C-P tridimensionnelle des pyrophosphates inorganiques et des bisphosphonates (Jung *et al.*, 1973), ceux-ci ont en général une forte affinité pour les cristaux de phosphate de calcium et de carbonate de calcium ainsi que pour le tissu minéral osseux. Ces propriétés sont la base de leur utilisation comme marqueurs du squelette dans la scintigraphie osseuse et comme inhibiteurs des calcifications ectopiques et de la résorption osseuse en médecine.

Bisphosphonate	Radical R <sub>1</sub>	Radical R <sub>2</sub>
Étidronate	OH	CH <sub>3</sub>
Clodronate	Cl	Cl
Pamidronate*	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>
Alendronate*	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>
<u>Risédrónate*</u>	OH	CH <sub>2</sub> -3- <u>pyridine</u>
<u>Tiludronate</u>	H	CH <sub>2</sub> -S- <u>phenyl</u> -Cl
Ibandronate*	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> )(C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> -CH <sub>3</sub> )
<u>Zolédronate*</u>	OH	CH <sub>2</sub> - <u>imidazole</u>
<u>YH529*</u>	OH	CH <sub>2</sub> -2- <u>imidazo-pyridinyl</u>
Incadronate* (YM175)	H	NH-(cyclo-heptyl)
Olpadronate*	OH	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Néridronate*	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>
EB-1053	OH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -1-pyrrolidinyl

Tableau I : Structure chimique des différents bisphosphonates étudiés pour leur effet sur le tissu osseux (D'après Fleisch, 1997). \*aminobisphosphonates, bisphosphonates ayant un groupement R<sub>2</sub> cyclique.

### 1.1.3 Effets biologiques

La principale propriété pharmacologique des bisphosphonates est l'inhibition de la résorption osseuse. Certains bisphosphonates peuvent aussi inhiber la minéralisation des tissus calcifiés lorsqu'ils sont administrés à haute dose.

#### 1.1.3.1 Inhibition de la résorption osseuse

L'inhibition de la résorption osseuse a été largement étudiée *in vitro* sur des cultures cellulaires et sur des cultures d'organes. Cette propriété a aussi été observée *in vivo* chez des animaux normaux, des modèles expérimentaux et chez l'Homme dans différentes conditions cliniques accompagnées d'une augmentation de la résorption osseuse comme la maladie de Paget, l'ostéolyse tumorale, l'hyperparathyroïdisme et l'ostéoporose.

##### 1.1.3.1.1 Effets physicochimiques

Le mode d'action des bisphosphonates était initialement attribué à leurs propriétés physicochimiques sur les cristaux d'hydroxyapatite car, comme les pyrophosphates naturels, ils inhibent la dissolution minérale. *In vitro*, les bisphosphonates inhibent à la fois la formation et la dissolution du minéral osseux. Les concentrations nécessaires à ces effets *in vitro*, en comparaison à celles utilisées en chimie, sont tellement faibles, qu'il semble improbable que le seul effet physicochimique sur le cristal soit significatif (Fleisch, 1998). De plus les études structure/activité ne montrent pas de corrélation entre l'inhibition de la dissolution minérale *in vitro* et l'activité pharmacologique sur la résorption osseuse (Van Beek *et al.*, 1994).

##### 1.1.3.1.2 Effets *in vivo*

###### 1.1.3.1.2.1 Chez l'animal normal

Chez le rat en croissance, les bisphosphonates inhibent le modelage et le remaniement osseux de la métaphyse, qui devient plus dense radiographiquement (Schenk, 1973) de façon similaire à ce qui est rencontré lors d'ostéopétrose congénitale (Reynolds *et al.*, 1973). L'inhibition de la résorption est accompagnée par une augmentation de la balance calcique, une augmentation du contenu minéral de l'os et une augmentation de l'absorption intestinale conséquence de l'élévation de la 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamine D (Gasser *et al.*, 1972 ;

Amman *et al.*, 1993). L'effet principal est donc de diminuer la vitesse du renouvellement de l'os, d'augmenter la balance osseuse et ainsi d'augmenter la masse osseuse. Chez des singes en croissance, le tiludronate a un effet marqué sur la densité osseuse tout en préservant la résistance mécanique osseuse (Geusens *et al.*, 1992).

#### 1.1.3.1.2.2 Chez les animaux ayant une résorption osseuse augmentée expérimentalement

Différents types d'ostéoporose expérimentale, comme l'ostéoporose induite par immobilisation par section du nerf sciatique, par ovariectomie, par orchidectomie, par l'administration de corticostéroïdes ou une alimentation faible en calcium ont été étudiés. Tous les bisphosphonates étudiés se sont montrés efficaces (Fleisch, 1998). Ils diminuent la perte osseuse induite et augmentent même la densité minérale osseuse (DMO). Le tiludronate prévient complètement la perte minérale osseuse chez les rates ovariectomisées ostéoporotiques, il normalise la vitesse de renouvellement de l'os et augmente la DMO de façon temps et dose-dépendante (Ammann *et al.*, 1993).

#### 1.1.3.1.3 Effets tissulaires

Au niveau tissulaire, tous les bisphosphonates réduisent la vitesse du renouvellement osseux. Ceci est démontré à la fois par une diminution de la résorption et de la formation évaluée par des études cinématiques du  $\text{Ca}^{45}$  (Gasser *et al.*, 1972), des marqueurs biochimiques (Garnero *et al.*, 1994b) et des études histomorphométriques (Schenk *et al.*, 1973 ; Boyce *et al.*, 1995). Les bisphosphonates diminuent la profondeur du site de résorption au niveau des unités multicellulaires osseuses UMO (Boyce *et al.*, 1995). La quantité d'os nouvellement formé dans l'UMO n'est pas diminuée et peut même être augmentée (Boyce *et al.*, 1995). Ceci conduit à un épaissement des trabécules et une diminution du nombre de perforations des trabécules (Boyce *et al.*, 1995). Donc la diminution de la vitesse du renouvellement total ne signifie pas une diminution de la formation osseuse. Au contraire, il semblerait y avoir un effet léger d'augmentation de la formation (Boyce *et al.*, 1995). Cette augmentation de la formation, si elle est présente, n'est pas détectable avec les techniques actuelles d'évaluation comme les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux, car elle est masquée par la diminution du remaniement (Fleisch, 1998). Il est maintenant communément admis que les bisphosphonates entraînent une balance calcique et osseuse positive chez les animaux

(Gasser *et al.*, 1972) et chez l'homme (voir paragraphe sur l'ostéoporose). Il y a plusieurs explications pour ce gain de masse osseuse au niveau de l'UMO (Fleisch, 1998) :

1- La diminution de la résorption n'est pas immédiatement suivie d'une diminution de la formation ce qui entraîne une augmentation temporaire de la balance osseuse.

2- Après diminution de la vitesse de renouvellement, la nouvelle unité structurale osseuse USO est remaniée dans un délai plus long que normalement. Le processus de minéralisation a le temps de s'achever, ce qui entraîne une augmentation de la DMO, mais pas une augmentation de la quantité d'os.

3- La diminution de la résorption n'est pas couplée à une diminution de la formation dans l'UMO, ce qui semble être le cas. La balance osseuse locale est alors positive dans l'UMO, ce qui entraînent un gain de quantité osseux.

#### 1.1.3.1.4 Effets cellulaires

L'ostéoclaste est la cible principale des bisphosphonates. Quatre mécanismes semblent impliqués : 1-Inhibition du recrutement des ostéoclastes : Plusieurs bisphosphonates inhibent la différenciation et le recrutement des ostéoclastes dans des cultures cellulaires et dans l'os (Boonekamp *et al.*, 1986).

2-Inhibition de l'adhésion ostéoclastique : Ce second mécanisme pourrait intervenir (Fleisch, 1998) et il semble également que les bisphosphonates peuvent inhiber l'adhésion des cellules tumorales sur la matrice osseuse *in vitro* (Van der Pluijm *et al.*, 1996).

3-Diminution de la durée de vie des ostéoclastes : Récemment il a été montré que les bisphosphonates induisent l'apoptose des ostéoclastes, *in vitro* et *in vivo* à la fois chez la souris normale et chez la souris ayant une augmentation de la résorption osseuse (Hughes *et al.*, 1995).

4-Inhibition de l'activité ostéoclastique : L'administration chronique de bisphosphonates diminue le nombre d'ostéoclastes multinucléés à la surface de l'os. Ceci est associé à des changements morphologiques des ostéoclastes *in vitro* (Endo *et al.*, 1993) et *in vivo* (Schenk *et al.*, 1973). Ces changements morphologiques se produisent seulement sur des cellules actives résorbant la matrice calcifiée sous traitement au tiludronate (Murakami *et al.*, 1995). *In vitro*, le tiludronate inhibe la libération de calcium, la sécrétion d'enzymes lysosomiales et la dégradation de la matrice collagénique. Le

tiludronate pourrait agir sur les ostéoclastes matures en diminuant leur capacité de sécréter des protons dans le compartiment de résorption et en favorisant leur détachement de la matrice osseuse (Bonjour *et al.*, 1995).

L'effet antirésorbant est dû à une médiation cellulaire, en partie par un effet direct sur les ostéoclastes, en partie par les ostéoblastes en produisant un inhibiteur du recrutement et de l'activité ostéoclastiques (Vitté *et al.*, 1996).

#### 1.1.3.1.5 Effets moléculaires

Les amino et les non aminobisphosphonates pourraient avoir des modes d'action moléculaires différents (Boonekamp *et al.*, 1986 ; Benford *et al.*, 1999). Les non-aminobisphosphonates (comme le clodronate, tiludronate et étidronate) peuvent être métabolisés comme des analogues non hydrolysables de l'ATP ce qui pourrait inhiber les enzymes intracellulaires ATP-dépendentes (Frith *et al.*, 1997). La résorption de l'os nécessite la dissolution des composés minéraux de la matrice. Cette dissolution est réalisée grâce à l'acidification du compartiment de résorption par l'ATPase à protons de type vacuolaire (V-ATPase) présente dans la bordure en brosse de la membrane des ostéoclastes. Le tiludronate inhibe la V-ATPase de façon plus importante que les autres bisphosphonates (David *et al.*, 1996). Le tiludronate inhibe la synthèse de prostaglandines par les cellules osseuses *in vitro* (Tokuda *et al.*, 1998). Les prostaglandines étant impliquées dans la résorption, cette inhibition pourrait jouer un rôle dans son mode d'action. Les plus puissants aminobisphosphonates (comme le pamidronate, alendronate, risédronate, zolédronate et ibandronate) ne sont pas métabolisés mais peuvent inhiber les enzymes de la modification post-translationnelle (prénylation) des protéines (Rogers *et al.*, 1999). L'inhibition de la prénylation protéique et l'arrêt du fonctionnement de protéines régulatrices clés de la formation et de l'activation ostéoclastique explique la perte d'activité ostéoclastique et l'induction de l'apoptose (Benford *et al.*, 1999). Ces différents modes d'action pourraient expliquer les différences subtiles en terme d'effet clinique entre les composés (Rogers *et al.*, 1999).

#### 1.1.3.1.6 Effets sur les caractéristiques mécaniques de l'os

A long terme, une inhibition importante de la résorption osseuse pourrait conduire à une fragilisation de l'os à la fois chez l'animal et chez l'homme, comme l'illustre



l'ostéopétrose humaine (Reynolds *et al.*, 1973). En effet, à long terme, une forte inhibition de la résorption osseuse peut entraîner une augmentation de la fragilité osseuse et des fractures du fait de l'incapacité de remplacer l'os ancien et de réparer les micro-fractures. Toutefois avec l'accumulation du bisphosphonate dans l'os, l'inhibition de la résorption osseuse atteint un état d'équilibre car il n'y a pas d'accumulation et d'accumulation de l'effet dans le temps suggérant que les bisphosphonates soient incorporés dans l'os sous forme inactive (Garnero *et al.*, 1994b). Dès lors aux doses thérapeutiques, il n'y a pas de risque de diminution continue de la vitesse du renouvellement osseux associée à long terme à une augmentation de fragilité osseuse (Fleisch, 1998). Chez l'animal normal et les modèles animaux de l'ostéoporose, les études ont montré que un effet positif du tiludronate sur les caractéristiques mécaniques de l'os comme (Geusens *et al.*, 1992 ; Amman *et al.*, 1993 ; Bonjour *et al.*, 1995 ; Ohnishi *et al.*, 1997).

#### 1.1.3.1.7 Relation structure activité

L'activité des bisphosphonates varie grandement d'un composé à l'autre (Fleisch, 1997). Ces composés ont une affinité marquée pour la surface solide du phosphate de calcium auquel ils sont liés par chimisorption (Jung *et al.*, 1973) principalement au site de dissolution et de croissance. Le lien peut être bidenté entre le calcium et l'oxygène des groupements phosphates. Le lien est tridenté pour la plupart des bisphosphonates, la troisième liaison se fait entre l'atome d'oxygène d'un groupement hydroxyl du carbone central en  $R_1$  ou un atome d'azote. La liaison tridentée est plus forte (Fleisch, 1998). Les bisphosphonates liés à la surface du cristal sont incorporés dans le tissu osseux lors de l'apposition d'un nouveau cristal. Une activité maximale dépend également des caractéristiques des chaînes latérales  $R_1$  et  $R_2$  (figure 3). Un groupement OH en  $R_1$  augmente l'affinité pour l'os mais pas la puissance antirésorbante (Van Beek *et al.*, 1994 ; Rogers *et al.*, 1999). Le déterminant principal de l'activité antirésorbante est la structure et la conformation de la chaîne  $R_2$  (Van Beek *et al.*, 1994 ; Rogers *et al.*, 1999). Les amines tertiaires sont également plus actives et les bisphosphonates cycliques sont aussi très puissants (Fleisch, 1998). Contrairement à ce qui était admis, les bisphosphonates geminaux ne sont pas les seuls à posséder une activité antirésorbante (Van Gelder *et al.*, 1997).

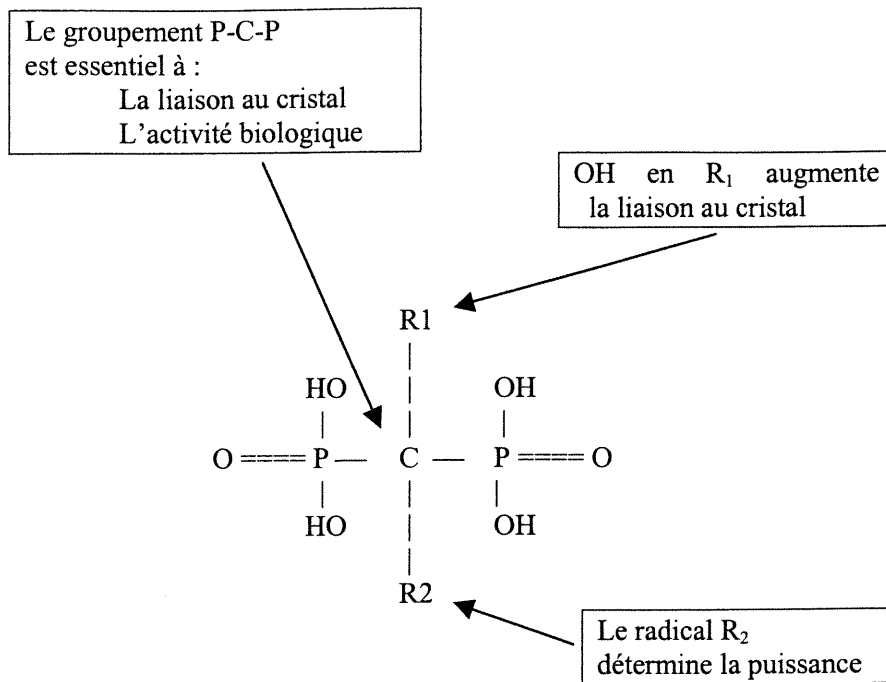


Figure 3 : Relation structure et activité des bisphosphonates. La liaison au cristal d'hydroxyapatite et l'activité biologique des bisphosphonates dépendent du groupement P-C-P et de la structure des radicaux R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub>. (Traduit de Rogers *et al*, 1999).

### 1.1.3.2 Inhibition de la minéralisation

Les bisphosphonates comme les pyrophosphates inhibent la formation du phosphate de calcium. C'est pourquoi ils ont été utilisés dans le traitement de maladies associées à des minéralisations ectopiques.

#### 1.1.3.2.1 Minéralisation et calcification ectopique

Chez l'animal, les bisphosphonates peuvent effectivement inhiber les calcifications ectopiques induites expérimentalement de différents tissus mous *in vivo*. Chez l'Homme, l'étidronate a été utilisé dans la prévention des calcifications et des ossifications ectopiques mais les résultats ont été décevants (Fleisch, 1998).

### 1.1.3.2 Minéralisation normale

Aux doses inhibant la calcification des tissus mous (plus fortes que celles indiquées pour inhiber la résorption osseuse), les bisphosphonates inhibent la minéralisation normale des tissus calcifiés (Schenk *et al.*, 1973) et causent de l'ostéomalacie. Même à des doses normales, un traitement continu et prolongé à l'étidronate peut affecter la calcification d'un os nouvellement formé. Le risque n'est pas présent avec les générations plus récentes de bisphosphonates, comme le tiludronate. Ce dernier n'altère pas de manière significative la composante minérale de l'os après un an de traitement (Bohic *et al.*, 2000). Le tiludronate augmente légèrement la largeur des cristaux d'apatite de l'os chez des rates ovariectomisées ostéoporotiques, sans changer les autres caractéristiques du cristal (Rohanizadeh *et al.*, 2000).

### 1.1.3.3 Mécanismes d'action

L'inhibition de la minéralisation normale et ectopique semble due à un mécanisme physicochimique. En effet la capacité d'un bisphosphonate à inhiber la calcification *in vivo* est fortement liée à sa capacité à inhiber le phosphate de calcium *in vitro* (Van Beek *et al.*, 1994) contrairement à ce qui se passe pour la résorption osseuse.

### **1.1.3.3 Effets sur la formation osseuse**

Jusqu'à récemment, les bisphosphonates n'étaient pas considérés comme pouvant affecter directement la formation osseuse mais plutôt comme pouvant augmenter la balance osseuse en inhibant la résorption. Des études récentes semblent indiquer que ce ne serait pas totalement juste. Des études histomorphométriques ont démontré une augmentation possible de la formation dans la UMO (Boyce *et al.*, 1995). Au niveau cellulaire, des études montrent qu'ils entraînent une augmentation de la prolifération des ostéoblastes tout en stimulant la biosynthèse du collagène de type I *in vitro* (Tsuchimoto *et al.*, 1994).

### **1.1.3.4 Effets sur les tissus non calcifiés**

Des chercheurs ont essayé d'utiliser les bisphosphonates pour le traitement d'autres affections osseuses comme l'arthrite rhumatoïde ou l'ostéoarthrose. Le tiludronate par exemple inhibe la résorption locale de l'os sous-chondral et du cartilage, préservant l'architecture de l'articulation et diminuant la réaction inflammatoire lors d'arthrite induite

expérimentalement (Barbier *et al.*, 1986). Une étude récente *in vitro* confirme l'innocuité des bisphosphonates (dont les noms ne sont pas précisés) même lorsqu'ils sont administrés directement dans l'articulation (Koike *et al.*, 2000).

Des effets anti et pro-inflammatoires ont été mis en évidence avec différents bisphosphonates en fonction de leurs effets sur le système des phagocytes mononucléaires. Les non aminobisphosphonates pourraient avoir des propriétés anti-inflammatoires potentielles : le clodronate inhibe des cytokines proinflammatoires (Mönkkonen *et al.*, 1994) et la sécrétion d'oxyde nitrique NO par les macrophages activés *in vitro* (Mäkkonen *et al.*, 1996). Le tiludronate inhibe des cytokines pro inflammatoires des macrophages activés *in vitro* (Mönkkonen *et al.*, 1998). Le clodronate (Österman *et al.*, 1997) et le tiludronate (Barbier *et al.*, 1986) ont des propriétés anti-inflammatoires *in vivo* lors d'arthrite expérimentale. Au contraire les aminobisphosphonates administrés par voie intraveineuse peuvent induire une réponse inflammatoire aiguë et de l'hyperthermie *in vivo* (Adami *et al.*, 1987). Cette réponse semble impliquer l'induction de la sécrétion de cytokines (Schweitzer *et al.*, 1995) après activation des macrophages comme avec le pamidronate *in vitro* (Sauty *et al.*, 1996) et l'ibandronate dans l'arthrite expérimentale (Richards *et al.*, 1999). Ceux-là peuvent en fait induire la production de cytokines après activation des macrophages (Mönkkonen *et al.*, 1998). Ceci suggère fortement que les bisphosphonates peuvent être groupés en ceux qui sont capables d'inhiber la sécrétion de cytokines et de NO par les macrophages, ayant ainsi des propriétés anti-inflammatoires potentielles, et ceux qui augmentent la production de cytokines après activation des macrophages (Mönkkonen *et al.*, 1998).

#### 1.1.4 Pharmacocinétique

La pharmacocinétique des bisphosphonates n'a pas été étudiée chez le cheval. Cette section présente les données connues en médecine humaine.

##### 1.1.4.1 Absorption intestinale

La biodisponibilité orale du tiludronate, comme celle des autres bisphosphonates est faible, probablement à cause de leur faible lipophilie et de leur forte charge négative qui empêche le transport paracellulaire (Fleisch, 1997). De plus, ils peuvent se retrouver en partie sous forme insoluble dans l'intestin du fait de la chélation avec le calcium. Le

tiludronate étant hautement soluble dans l'eau, son absorption est probablement due à une diffusion passive à travers les jonctions serrées de la muqueuse gastro-intestinale (Sansom *et al.*, 1995). L'absorption est rapide et a lieu en partie dans l'estomac et principalement dans la partie proximale de petit intestin. L'absorption est très variable et dépend des espèces et des conditions d'administration. Chez l'Homme, l'absorption est diminuée de façon significative après les repas, en particulier en présence de calcium et de fer, du à la chélation avec les cations (Sansom *et al.*, 1995). Chez l'Homme, le tiludronate semble être rapidement absorbé après administration orale et atteint un pic plasmatique dans les deux heures après ingestion avec une importante variabilité inter et intra-sujet (Sansom *et al.*, 1995). L'absorption semble être dose-dépendante, proportionnellement plus importante lorsque la dose augmente (Fleisch, 1997).

### 1.1.4.2 Distribution

#### 1.1.4.2.1 Distribution sanguine et liaison aux protéines sériques

Dans le sang, les bisphosphonates sont partiellement ultrafiltrables. La partie non ultrafiltrable est soit liée aux protéines soit présente en très petits agrégats. Les cations pourraient intervenir dans la transformation des bisphosphonates en un matériel insoluble dans le sang (Fleisch, 1998). La liaison du produit aux protéines plasmatiques est en général un processus très rapide. *In vitro*, 90% de l'acide tiludronique est lié aux protéines plasmatiques, l'albumine essentiellement (Sansom *et al.*, 1995). Le pic de concentration plasmatique apparaît rapidement une demi-heure à une heure après l'administration (Davi *et al.*, 1999). Après une administration intraveineuse unique par perfusion sur 30 minutes, la concentration d'acide tiludronique diminue de manière multiphasique avec une demi-vie apparente de 40 heures approximativement (Sansom *et al.*, 1995).

#### 1.1.4.2.2 Affinité tissulaire

Les tissus calcifiés sont la principale cible de déposition avec une absorption très rapide et importante. Ce qui est compatible avec l'affinité très forte pour les cristaux d'hydroxyapatite (Jung *et al.*, 1973). Les autres tissus ayant une affinité modérée sont la paroi gastrique, les reins, la rate, et le foie. Les gonades, les glandes surrénales, le cœur, la glande thyroïde ont les plus faibles affinités. Le tiludronate ne semble pas pénétrer dans le cerveau, la moelle épinière et le pancréas. Ainsi les tissus mous sont peu exposés

expliquant les effets osseux spécifiques et leur faible toxicité. La déposition est proportionnellement plus grande lorsque de grandes quantités de composé sont administrées. Au moins une part de ce dépôt extra-osseux semble être dû à la formation de complexes avec des métaux ou l'agrégation après des injections intraveineuses trop importantes ou trop rapides (Fleisch, 1997).

#### 1.1.4.2.3 Affinité osseuse

Le tiludronate comme les autres bisphosphonates est largement lié au tissu osseux. La vitesse de concentration dans l'os est très rapide, similaire à celle du calcium et du phosphate (Sansom *et al.*, 1995). Entre 20 et 80 % du composé (variable selon le bisphosphonate administré) est absorbé dans le tissu osseux. Le reste est rapidement excrété dans l'urine. La distribution du tiludronate dans l'os n'est pas homogène avec des concentrations plus élevées dans les parties distales et proximales des os longs (près des articulations) que dans les portions moyennes des diaphyses, et avec des concentrations plus importantes dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical des os longs (Davi *et al.* 1999). Ceci indique que le tiludronate, comme les autres bisphosphonates, se lie préférentiellement aux zones osseuses ayant une vitesse de renouvellement rapide (Fleisch, 1997). La clairance osseuse peut être compatible avec une extraction totale par le squelette après le premier passage. Ainsi la fixation dans l'os pourrait être déterminée pour une grande partie par sa vascularisation. L'aire de dépôt est généralement celle de modelage ou de remaniement osseux. Cette propriété est utile pour mesurer les zones de fort renouvellement en médecine nucléaire au moyen de  $^{99m}\text{Tc}$  lié à un bisphosphonate. La fixation osseuse varie selon l'espèce, le sexe et l'âge. Chez les animaux âgés, une diminution de la fixation dans l'os est probablement due à une diminution du renouvellement osseux reliée à l'âge (Davi *et al.*, 1999). L'accumulation dans le squelette atteint un plateau lors d'administration chronique seulement après une très longue période, possiblement des décennies. Au contraire, le plateau de l'effet est atteint rapidement et est dose dépendent. De même la durée de l'effet après l'arrêt du traitement est plus courte que la durée d'accumulation du produit. Le fait qu'un plateau d'activité soit atteint malgré que des bisphosphonates continuent à être incorporés, suggère aussi que le composé puisse être stocké dans le tissu osseux et devenir inactif (Fleisch, 1997). Une fois déposée dans le squelette, une partie du bisphosphonate est libérée lors de la résorption osseuse. Ainsi, la

demi-vie dans l'organisme dépend de la vitesse de renouvellement elle-même. Comme les bisphosphonates ralentissent la résorption du tissu osseux dans lequel ils sont déposés, leur demi-vie pourrait même être plus longue que la demi-vie normale du squelette. La demi-vie varie entre trois mois et plus d'un an chez la souris et le rat. Chez l'Homme, elle est plus longue et pour certains bisphosphonates elle est de plus de 10 ans ; sa persistance dans l'os dure possiblement toute la vie sans activité pharmacologique (Fleisch, 1997).

#### **1.1.4.3 Métabolisme**

La liaison P-C-P des bisphosphonates est résistante à l'hydrolyse enzymatique. Chez toutes les espèces étudiées, après administration orale ou intraveineuse, aucun métabolite du tiludronate n'a été mis en évidence (Sansom *et al.*, 1995).

#### **1.1.4.4 Excrétion**

Le tiludronate est principalement excrété par élimination rénale, essentiellement par filtration glomérulaire. Une relation linéaire existe entre la concentration plasmatique de l'acide tiludronique et son taux d'excrétion urinaire (Schwietert *et al.*, 1996). L'excrétion urinaire a un profil diphasique, la majorité du produit (70-90%) étant excrété dans l'urine dans les 24 heures, alors que le reste est lentement excrété sur une longue période de temps. Ce schéma est corrélé avec la longue demi-vie osseuse et la faible clairance totale de l'organisme (Sansom *et al.*, 1995). Chez l'Homme, la demi-vie est approximativement de 40-60 h pour le tiludronate. La détection du composé est possible dans l'urine pour une période allant jusqu'à 13 jours pour une administration unique (Sansom *et al.*, 1995).

#### **1.1.5 Toxicologie**

La toxicité des bisphosphonates est faible probablement à cause de leur clairance rapide du plasma et des tissus mous. Toutefois elle varie grandement d'un composé à l'autre (Fleisch, 1998). Les effets secondaires significatifs sont minimes. La toxicité aiguë est essentiellement due à l'hypocalcémie qui est induite par la formation de complexe ou d'agrégat avec le calcium (Fleisch, 1998). L'administration IV rapide de grande quantité peut conduire à une insuffisance rénale par formation d'agrégats insolubles dans le sang (Bounameaux *et al.*, 1983). Chez les sujets pagétiques traités avec de fortes doses de tiludronate, il est rapporté une diminution significative du calcium sérique (Audran *et al.*,

1989). Une inhibition de la minéralisation osseuse normale peut se produire à de très fortes doses parentérales : 10 mg/kg/j (Schenk *et al.*, 1973). A fortes doses, l'inhibition de la minéralisation peut être telle qu'elle entraîne une fragilisation osseuse et des fractures (Flora *et al.*, 1980). Certains bisphosphonates peuvent également altérer les fonctions hépatiques ou causer des gastrites et des oesophagites lorsqu'ils sont donnés oralement. Ces désordres gastro-intestinaux peuvent apparaître à des doses élevées mais aux doses recommandées, ils sont généralement bien tolérés avec le tiludronate (Fraser *et al.*, 1997), mais ils semblent plus marqués avec les aminobisphosphonates (Fleisch, 1998). Les dérivés azotés administrés par voie IV induisent une période de deux à trois jours d'hyperthermie montrant une similitude avec une réaction inflammatoire aiguë (Adami *et al.*, 1987) qui semble due à la stimulation des macrophages à libérer l'IL-6 et le TNF $\alpha$  (Schweitzer *et al.*, 1995 ; Sauty *et al.*, 1996). Chez l'Homme, les réactions indésirables dépendent du composé et de la dose administrée. Dans les études cliniques, les analyses biochimiques n'ont pas révélé de toxicité significative du tiludronate sur les paramètres biochimiques reflétant les fonctions rénales, hépatiques et ni sur les paramètres hématologiques (Reginster *et al.*, 1992).

## **1.2 Études cliniques**

### **1.2.1 Chez l'homme**

Les bisphosphonates sont efficaces dans le traitement de la maladie de Paget et des métastases osseuses, l'ostéoporose post-ménopausique, l'ostéoporose lors de corticothérapie et l'ostéoporose de non-usage.

#### **1.2.1.1 Maladie de Paget**

La maladie de Paget est une affection progressive localisée, caractérisée par une grande vitesse du renouvellement osseux, une augmentation de remaniement osseux, une hypertrophie osseuse et une structure anormale de l'os, entraînant de la douleur et des déformations. Le tiludronate a été particulièrement étudié dans le traitement de la maladie de Paget (Reginster *et al.*, 1988). Il peut normaliser la vitesse du renouvellement osseux sans altérer la minéralisation et en restaurant une structure osseuse normale. Il permet de contrôler les signes cliniques, en particulier la douleur osseuse (Fraser *et al.*, 1997). La diminution effective du renouvellement osseux est déterminée par le suivi de la diminution



de l'ALP sérique totale. L'amélioration clinique est significative dès le premier mois de traitement, avec une diminution importante de l'ALP sérique totale (Reginster *et al.*, 1988).

### 1.2.1.2 Ostéoporose

Les changements de vitesse du renouvellement osseux avec l'âge sont responsables d'une perte osseuse qui joue un rôle majeur dans l'ostéoporose. Les bisphosphonates sont maintenant considérés comme des agents antirésorbants efficaces pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose (Gatti et Adami, 1999). L'utilisation des marqueurs biochimiques du métabolisme osseux démontre dans de nombreuses études que la vitesse du renouvellement osseux augmente de façon marquée après la ménopause et reste élevée chez la femme postménopausique et chez la femme âgée (Garnero *et al.*, 2000). Une augmentation de la vitesse du renouvellement osseux est associée à une perte osseuse rapide chez la femme post ménopausique et une diminution de la masse osseuse chez la femme âgée. Les bisphosphonates diminuent la perte osseuse et augmente même la DMO. La plupart des résultats ont été obtenus chez la femme lors d'ostéoporose postménopausique avec l'etidronate, le pamidronate, l'alendronate, le clodronate, l'ibandronate et le tiludronate. L'alendronate (Lieberman *et al.*, 1995) et le tiludronate (Reginster *et al.*, 1989) permettent également de prévenir la perte osseuse chez la femme postménopausique saine. Une augmentation de la masse osseuse et une réduction de moitié du taux de fractures ont été prouvées avec l'etidronate et l'alendronate (Lieberman *et al.*, 1995).

La réponse des patients ostéoporotiques aux traitements antirésorbants est évaluée par les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux, les marqueurs de la résorption et les marqueurs de la formation. Sous traitement aux bisphosphonates, les marqueurs de la résorption osseuse diminuent plus précocement que les marqueurs de la formation, de façon cohérente avec le mode d'action direct de ces produits qui inhibent la résorption osseuse, puis les concentrations des marqueurs osseux reviennent aux valeurs préménopausiques (Garnero *et al.*, 1994b).

### 1.2.1.3 Ostéoporose de non-usage

Une immobilisation secondaire à une atteinte de la moelle épinière est associée avec une atrophie rapide et importante de l'os trabéculaire : Ostéoporose de non-usage. Elle est

due à une augmentation précoce de la résorption osseuse ostéoclastique associée à une diminution prononcée de la formation osseuse ostéoblastique. Les bisphosphonates sont efficaces dans la prévention de l'ostéoporose de non-usage. Chez des animaux immobilisés, le tiludronate prévient la perte osseuse en inhibant la résorption sans réduire le taux d'apposition minérale (Murakami *et al.*, 1994 ; Barou *et al.*, 1999).

#### **1.2.1.4 Oncologie**

Des tumeurs d'origines différentes entraînent une destruction osseuse, soit par invasion locale soit à distance en sécrétant dans le courant sanguin des composés induisant une résorption osseuse ou par ces deux mécanismes à la fois. Les principales manifestations cliniques de ces ostéolyses tumorales sont la douleur, les fractures, et le syndrome hypercalcémique. Les bisphosphonates inhibent la destruction locale de l'os par les tumeurs et corrigent l'hypercalcémie. Les bisphosphonates sont maintenant le traitement de choix de l'hypercalcémie maligne. En inhibant la résorption osseuse, ils réduisent la douleur, préviennent le développement de nouvelles lésions ostéolytiques et l'apparition de fractures (Fleisch, 1991). Cet effet est expliqué par l'inhibition de la résorption osseuse, mais il pourrait être dû à l'inhibition de l'adhésion des cellules tumorales, observée *in vitro* (Van der Pluijm *et al.*, 1996). Les bisphosphonates oraux semblent moins efficaces que ceux administrés par voie intraveineuse pour réduire les complications osseuses chez des patients atteints de métastases osseuses. La faible biodisponibilité orale est vraisemblablement une des raisons de cette différence. Comparé aux aminobisphosphonates, le tiludronate ne semble pas être indiqué pour le traitement de ces affections, les fortes doses IV nécessaires étant potentiellement néphrotoxiques (Dumon *et al.*, 1991).

#### **1.2.1.5 Guérison osseuse**

Une fracture et une immobilisation d'une extrémité conduisent à une perte osseuse au site de fracture et aux sites adjacents. La résorption osseuse est essentielle à la guérison des fractures, à la réparation des fêlures microscopiques de fatigue et la réorientation interne de l'os trabéculaire et de l'os cortical en réponse aux modifications des contraintes mécaniques. En théorie, un surdosage de bisphosphonates pourrait interférer avec la réparation des fractures, fragiliser la résistance osseuse en accumulant et propageant des fêlures de fatigue ou en abolissant la capacité d'adaptation du squelette (Neer, 1995). Les

bisphosphonates n'entraînent pas d'effets indésirables sur l'union, la résistance ou la minéralisation de l'os. Les bisphosphonates comme le pamidronate (Goodship *et al.*, 1994), l'alendronate (Peter *et al.*, 1996) et l'incadronate (Li *et al.*, 2001) augmentent la quantité de cal et préviennent la perte osseuse sans compromettre la restauration de l'intégrité mécanique après une fracture

## 1.2.2 Chez le cheval

Chez le cheval, ces composés pourraient être utilisés dans le diagnostic ou le traitement de certaines affections osseuses.

### 1.2.2.1 Médecine nucléaire

Du fait de sa forte affinité pour le tissu osseux et les zones de renouvellement osseux rapide, les bisphosphonates liés au  $^{99m}\text{Tc}$  sont utilisés chez les chevaux comme marqueurs osseux pour la scintigraphie osseuse. Une gamma-caméra mesure la fixation du  $^{99m}\text{Tc}$  lié au bisphosphonate dans le tissu. La fixation augmente avec l'inflammation (liée à la vascularisation) et la vitesse du renouvellement osseux. Chez le jeune cheval, l'activité des plaques de croissance entraîne une fixation intense, diminuant graduellement avec l'âge jusqu'aux valeurs des chevaux adultes qui sont atteintes à 42 mois (Uhlhorn *et al.*, 2000). Une fixation diffuse peut apparaître comme une manifestation exagérée du processus de remaniement normal chez des chevaux immatures de deux à trois ans. Le  $^{99m}\text{Tc}$ -méthylène bisphosphonate ( $^{99m}\text{TcMDP}$ ) a été utilisé pour évaluer la guérison de défauts d'os sous-chondraux créés chirurgicalement (Todhunter *et al.*, 1993). C'est également un outil diagnostique intéressant dans l'évaluation de l'os naviculaire chez des chevaux présentant une boiterie antérieure isolée à l'aspect palmaire du pied (Keegan *et al.*, 1996). Le  $^{99m}\text{TcMDP}$  est aussi un bon moyen de faire le suivi de la guérison osseuse au cours du temps. Une fois la lésion guérie, la fixation du  $^{99m}\text{Tc}$  dans la zone revient à la normale. Différents schémas scintigraphiques peuvent être identifiés selon que l'on serait en présence de lésions récentes, chroniques ou diffuses comme lors de fractures de stress (Koblik *et al.*, 1988). Cette utilisation met en évidence le fait que les bisphosphonates administrés par voie IV vont se concentrer dans les zones de renouvellement actif comme les plaques de croissance, les lésions osseuses de l'os sous-chondral, de l'os naviculaire et des fractures de stress chez le cheval. L'utilisation du tiludronate lié au  $^{99m}\text{Tc}$  permettrait de

déterminer la distribution du produit chez des chevaux normaux et des chevaux atteints d'affections osseuses.

### **1.2.2.2 Utilisations thérapeutiques lors d'affections Osseuses**

Peu d'études rapportent l'utilisation des bisphosphonates chez le cheval. Le pamidronate, un aminobisphosphonate inhibant la minéralisation osseuse a été utilisé par voie intraveineuse dans le traitement d'exostoses expérimentalement induites chez le poney. Il avait été observé une bonne tolérance clinique, une absence de toxicité du produit sur le remaniement osseux, une moindre croissance des exostoses chez les animaux traités et une diminution du taux de minéralisation de l'ostéoïde (Lepage *et al.*, 1988 et 1989). Cette étude essayait d'objectiver la propriété de certains bisphosphonates à inhiber la minéralisation d'un tissu. Une étude récente décrit l'administration par voie intraveineuse et la bonne tolérance clinique du pamidronate dans le traitement du syndrome naviculaire, mais sans succès (McGuigan *et al.*, 2000). Le tiludronate administré par voie IV semble être très intéressant dans le traitement des boiteries associées à des lésions ostéolytiques comme le syndrome naviculaire, l'arthropathie, l'éparvin osseux, l'ostéopénie. La réponse clinique est bonne entre 4 et 26 semaines (Denoix *et al.*, 2001) et semble meilleure pour les boiteries de moins de six mois (Thibaud *et al.*, 2001).

## CONCLUSION

Les bisphosphonates sont une importante classe de médicaments dans le traitement des maladies osseuses chez l'Homme. Ces composés agissent principalement sur le tissu osseux en diminuant la résorption osseuse par inhibition de l'activité ostéoclastique. Les études de tolérance osseuse indiquent que le tiludronate est un composé sûr avec une marge thérapeutique appréciable puisqu'il peut effectivement inhiber la résorption osseuse et qu'il normalise la vitesse du renouvellement osseux sans réduire la minéralisation et la résistance osseuse (Geusens *et al.*, 1992 ; Bonjour *et al.*, 1995 ; Ohnishi *et al.*, 1997). Leur mécanisme d'action s'éclaircit et leur potentiel thérapeutique augmente (Rogers *et al.*, 1999). Chez l'Homme, l'indication des traitements antirésorbants comme les bisphosphonates et la réponse thérapeutique à ces traitements sont essentiellement déterminés par l'évaluation dynamique des marqueurs biochimiques du métabolisme osseux. La meilleure stratégie est de traiter le plus tôt possible et d'arrêter la progression de la maladie en normalisant les marqueurs biochimiques qui sont le reflet du remaniement osseux augmenté. L'utilisation de nouveaux bisphosphonates puissants et sans risque comme le tiludronate représente une avancée majeure dans le traitement de ces affections. Ces composés permettent la normalisation des indicateurs biochimiques de remaniement osseux, et les doses thérapeutiques ont des effets bénéfiques à long terme sans inhiber la minéralisation tout en restituant une structure osseuse normale. Chez le cheval, des études cliniques montrent son intérêt dans le traitement des boiteries associées à des lésions d'ostéolyse. A l'avenir, son utilisation dans le traitement d'affections articulaires pourrait être envisagée.

## **2 Les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux chez le cheval**

L'évaluation non invasive du métabolisme osseux a été particulièrement améliorée durant les dernières années avec le développement de marqueurs sensibles et spécifiques de la formation et de la résorption osseuses (Garnero et Delmas, 1996). Ils ont été largement utilisés dans les études cliniques de recherche, notamment comme critère secondaire (après les mesures d'ostéodensitométrie) d'efficacité de nouveaux médicaments à visée osseuse comme les bisphosphonates (Garnero *et al.*, 2000). Un article récent résume les techniques d'évaluation non invasive décrites chez le cheval (Lepage *et al.*, 2001) (Tableau II). Dans l'ensemble de notre mémoire nous utiliserons pour décrire les marqueurs la nouvelle nomenclature internationale (Delmas *et al.*, 2000).

### **2.1 Les marqueurs biochimiques de la formation osseuse**

Les marqueurs biochimiques de la formation osseuse comprennent l'isoenzyme osseuse spécifique de la phosphatase alcaline (bone ALP), l'ostéocalcine (OC) et les propeptides dérivés de l'extrémité terminale azotée ou carbonée du procollagène de type I (PICP et PINP), à la fois chez l'Homme (Garnero *et al.*, 2000) et chez le cheval (Lepage *et al.*, 2001).

#### **2.1.1 L'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline**

L'activité de la phosphatase alcaline totale (total ALP) sérique a été utilisée pour évaluer le métabolisme osseux chez différentes espèces. Toutefois la total ALP manque de spécificité osseuse car son activité sérique dépend de plusieurs isoenzymes, issues de plusieurs tissus, incluant le foie et l'os essentiellement, l'intestin, la rate, les reins, le placenta durant la gestation et de différentes tumeurs. La phosphatase alcaline osseuse spécifique (bone ALP) est produite par les ostéoblastes. Son rôle biologique n'est pas clairement établi, mais cette ectoenzyme interviendrait principalement dans le processus de minéralisation osseuse. Différentes techniques incluant la dénaturation à la chaleur, l'inhibition chimique de l'activité sélective, l'électrophorèse sur gel et la précipitation par la lectine du germe de blé (WGL *wheat germ lectin*) ont été utilisées pour différencier l'isoforme hépatique de l'isoforme osseuse. Un dosage radioimmunométrique récent

(IRMA) a utilisé des anticorps spécifiques pour mesurer l'isoforme osseuse avec une faible réactivité croisée de l'ordre de 10% à 20% avec la forme hépatique (Garnero et Delmas, 1993). Les dosages immunologiques de la bone ALP constituent un marqueur sensible de l'augmentation du remaniement osseux après la ménopause et d'autres maladies métaboliques osseuses (Garnero et Delmas, 1993) et permettent de refléter de façon précise et rapide les effets des traitements antirésorbants, pour prédire la réponse à long terme, 2 ans, sur la densité minérale osseuse DMO (Garnero *et al.*, 1999). La bone ALP est un marqueur de la formation osseuse, sensible et fiable, utilisé dans le suivi thérapeutique de la maladie de Paget traitée au tiludronate (De La Piedra *et al.*, 1996) ou au pamidronate administré par voie intraveineuse (Rosen *et al.*, 1998).

Chez le cheval, des méthodes semi-quantitatives par électrophorèse sur gel ont été utilisées (Thorén-Tolling, 1988). La précipitation à la WGL permet le dosage quantitatif (Hank *et al.*, 1993). Le dosage IRMA pour mesurer la bone ALP dans le sérum équin a été évalué et il est montré qu'il peut partiellement réagir avec la phosphatase alcaline d'origine hépatique (Jackson *et al.*, 1996).

Chez les animaux, il y a une corrélation négative entre les concentrations sériques en bone-ALP et l'âge. Ces changements sont significatifs durant la première année de vie chez le cheval (Thorén-Tolling, 1988 ; Hank *et al.*, 1993 ; Price *et al.*, 1995a). Les variations saisonnières semblent faibles (Price *et al.*, 2001). La bone ALP connaît également des variations selon l'activité physique, avec des valeurs plus élevées chez les Thoroughbred de deux ans aux premiers stades de l'entraînement, reflétant une augmentation de la vitesse de renouvellement osseux (Price *et al.*, 1995b).

Formation osseuse	Résorption osseuse
<b>Marqueurs non collagéniques</b>	
<b>Sérum</b>	
Ostéocalcine OC Phosphatases alcalines : total ALP et bone ALP	<i>TRACP</i> <i>Sialoprotéine osseuse BSP</i>
<b>Marqueurs collagéniques</b>	
<b>Sérum</b>	
Propeptide C du collagène I PICP <i>Propeptide N du collagène I PINP</i>	<i>NTX-I</i> CTX-I CTX-MMP
<b>Urine</b>	
	Hydroxyproline Hyp Hydroxylysine Hyl Deoxypyridinoline DPD (total et libre) Pyridinoline PYD total NTX CTX ( $\alpha$ et $\beta$ )

Tableau II : Abréviations et nomenclature des marqueurs du métabolisme osseux, *marqueurs non disponibles chez le cheval* (d'après Delmas *et al.*, 2000 et Lepage *et al.*, 2001).



### 2.1.2 L'ostéocalcine sérique

L'ostéocalcine (OC), ou *bone gla protein* (BGP) est la protéine matricielle non collagénique la plus abondante dans le tissu osseux et la dentine. Ses caractéristiques ont été détaillées dans un mémoire de maîtrise de l'Université de Montréal (Lepage, 1990) et sa caractérisation spécifique chez le cheval a été récemment publiée (Carstanjen *et al.*, 2002). Son rôle est déterminant dans la régulation de la formation osseuse mais elle n'intervient pas lors de la résorption (Ducy *et al.*, 1996). L'OC pourrait intervenir en limitant le processus de minéralisation. Un fois sécrétée par l'ostéoblaste, l'OC est incorporée dans la matrice osseuse mais une fraction de celle-ci passe dans la circulation sanguine lors de la formation osseuse. Dans la circulation, l'OC est donc présente sous forme de molécule intacte (1/3) et sous forme d'un fragment «*N-terminal-mid*» de grande taille (1/3) ou de petits fragments de la molécule intacte (1/3) (Garnero *et al.*, 1994a) (figure 4). Le lieu de cette fragmentation reste incertain, soit dans le sang soit lors de la résorption osseuse, soit les deux. Le fragment «*N-terminal-mid*» ne serait pas nécessairement libéré lors de la dégradation de la matrice (Garnero *et al.*, 1994a). En effet après quelques heures d'incubation à température ambiante d'échantillons sériques, une portion importante de l'OC intacte est convertie en ce fragment «*N-terminal-mid*» (figure 4) ce qui entraîne une perte d'immunoréactivité lors des dosages utilisant l'OC bovine qui reconnaissent la partie C-terminale absente sur ce fragment (Garnero *et al.*, 2000). Chez l'Homme, lors d'affections osseuses, une augmentation des concentrations sériques d'OC est associée avec une vitesse du renouvellement osseux élevée comme dans certains cas d'ostéoporose (Eastell *et al.*, 1988), d'ostéopénie de non-usage (Uebelhart *et al.*, 1995) ou de métastases osseuses (Price *et al.*, 1980). Une diminution est associée aux traitements antirésorbants, aux traumatismes (avec une diminution suivie d'une augmentation) et aux fractures. Mais l'OC sérique ne semble pas un bon indicateur dans le suivi de traitement au tiludronate de la maladie de Paget (De La Piedra *et al.*, 1996).

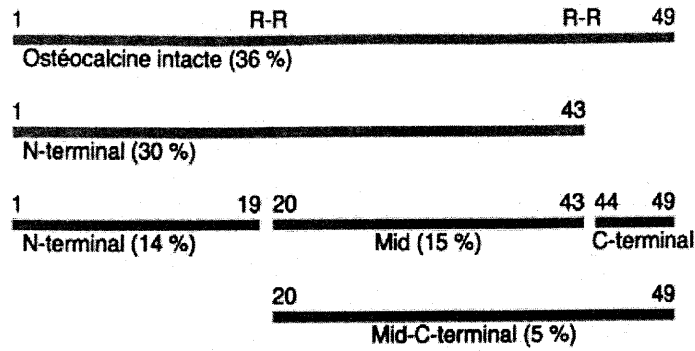


Figure 4 : Représentation schématique de la molécule d'ostéocalcine intacte et de ses principaux produits de dégradation (d'après Garnero *et al.*, 1994a). Le principal fragment de dégradation est le peptide 1-43 qui provient de la coupure protéolytique de la molécule intacte. Ce fragment est très rapidement produit dans la circulation mais aussi *in vitro* à température ambiante. Entre parenthèses est indiquée la quantité de chacun des fragments (en %) chez des sujets humains sains.

Chez le cheval et pendant près de dix ans, c'est un dosage RIA (Osteocalcin-kit, Incstar Co) utilisant des anticorps contre l'OC bovine qui ont été validés (Patterson-Allen *et al.*, 1982). La trousse de dosage IRMA utilisée chez l'Homme ne reconnaissant pas l'OC équine (Lepage *et al.*, 1997b), de nouvelles trousse ELISA ou RIA utilisant l'OC équine (Price *et al.*, 2001, Carstanjen *et al.*, 2002) sont actuellement utilisées ou à l'essai notamment depuis que l'isolement et la caractérisation de l'OC équine est connue (Carstanjen *et al.*, 2002). Une corrélation inverse existe entre la concentration sérique en OC et l'âge, avec des variations significatives de la naissance jusqu'à quatre ans chez le Standardbred (Lepage *et al.*, 1990) et le Thoroughbred (Chiappe *et al.*, 1999). Aucune différence de concentration en OC sérique ne semble exister entre les sexes (Lepage *et al.*, 1992) bien que des résultats différents selon le sexe aient été trouvés chez des poulains de quatre mois, avec des concentrations plus grandes chez les poulains que chez les pouliches (Fletcher *et al.*, 1998) et chez des poulains de deux ans, avec des concentrations plus élevées chez les pouliches (Chiappe *et al.*, 1999). Des différences existeraient chez les poulains de deux ans à l'exercice avec des concentrations plus grandes chez les pouliches (Fletcher *et al.*, 1998). Ces variations liées au sexe restent obscures chez le cheval et pourraient être expliquées par des différences à l'exercice et au repos et par le faible nombre d'individus étudiés dans chaque classe. L'OC sérique varie également en fonction du type de cheval, les chevaux de

trait ayant des concentrations plus faibles que les chevaux de sang (Lepage *et al.*, 1998), mais aucune différence entre les races pour un type de chevaux n'a été observée (Lepage *et al.*, 1997b).

Des variations circadiennes de l'OC sérique existent chez le cheval adulte, avec un pic entre quatre et huit heures le matin, avec un rythme diphasique, une phase stable durant le jour (période de lumière) et des variations durant la nuit (période sombre) (Lepage *et al.*, 1991 ; Hope *et al.*, 1993). Des variations saisonnières des concentrations sériques d'OC ont été mesurées chez des poulains jusqu'à l'âge d'un an : une diminution transitoire de l'OC corrélée à l'activité de la total-ALP était présente en novembre lors du transfert à l'écurie depuis les pâturages, avec une augmentation légère en décembre et janvier indiquant un ralentissement de la formation osseuse chez les poulains après le transfert à l'écurie, qui pourrait être lié à une diminution de l'activité physique (Mäenpää *et al.*, 1988). Les concentrations en OC semblent stables entre janvier et avril, ensuite elles diminuent (Price *et al.*, 2001), toutefois les auteurs ne précisent pas les conditions de stabulation. D'autres études montrent une augmentation similaire des concentrations en OC sériques chez des poulains Thoroughbred de un an et de deux ans (Price *et al.*, 1997). Des variations physiologiques durant la gestation et la lactation, bien décrites chez la femme doivent encore être clairement établies chez la jument.

Des variations iatrogènes existent lors d'administration de corticostéroïdes (Lepage *et al.*, 1993 ; Goer *et al.*, 1995). L'acétonide de triamcinolone entraîne une diminution des concentrations sériques en OC, atteignant un minimum en 24 à 48 heures et un retour aux valeurs avant traitement après 28 à 150 jours (Lepage *et al.*, 1993). Les concentrations sériques en OC diminuent aussi lors d'administration de dexaméthasone en 12 heures et retournent aux valeurs avant traitement dans les trois jours (Goer *et al.*, 1995). L'anesthésie générale diminue également les concentrations plasmatiques d'OC chez le cheval (Grafenau *et al.*, 1999). La glucosamine ne semble pas modifier les concentrations sériques en OC (Fenton *et al.*, 1999) et la somatotropine semble les augmenter (Julen Day *et al.*, 1998).

Chez le cheval, des diminutions sont observées lors des premières semaines de confinement (Mäenpää 1988 ; Hoeskstra *et al.*, 1999), mais pas lors de déconditionnement (Porr *et al.*, 1998). Ces concentrations sériques plus faibles sont associées à une

augmentation des concentrations urinaires de la déoxypyridinoline DPD et une diminution de contenu minéral osseux chez les chevaux confinés au box (Hoekstra *et al.*, 1999). Un groupe de Thoroughbreds exercés sur tapis roulant montre des concentrations en OC et CTX-MMP plus faibles que le groupe contrôle (Jackson *et al.*, 1998). Un exercice modéré à la longe ne semble pas avoir d'effet sur les concentrations sériques d'OC (Fenton *et al.*, 1999). Chez des Quarter Horses adultes, les marqueurs osseux (OC et CTX-MMP) sont plus faibles en début d'entraînement sur piste (à 2 semaines) même chez des chevaux pré-entraînés sur tapis roulant (Hiney *et al.*, 2000). La diminution du remaniement chez les chevaux exercés pourrait correspondre à une adaptation du tissu osseux à l'exercice. Les résultats restent parfois contradictoires et difficiles à interpréter. Ils dépendent de l'âge, du moment de prélèvement, des conditions de prélèvement, du stockage, de la saison, du type d'activité et du type de cheval.

### 2.1.3 Les peptides d'extension du collagène de type I

Le collagène de type I est le collagène retrouvé majoritairement dans l'os. Sur le plan structural, il résulte de l'association de deux chaînes  $\alpha_1$  et d'une chaîne  $\alpha_2$ . La biosynthèse de ces chaînes a lieu dans le réticulum endoplasmique granuleux des ostéoblastes, sous forme de précurseurs appelés procollagène (figure 5). La molécule comporte alors deux domaines globulaires situés aux extrémités N et C-terminales, les propeptides N et C-terminaux. La molécule de procollagène est ensuite transférée vers le milieu extérieur. Là, des protéases clivent les propeptides N et C-terminaux. Les domaines propeptides N et C-terminaux encore appelés PINP et PICP pour *Procollagen I N-terminal Propeptide* et *Procollagen I C-terminal Propeptide* respectivement, sont donc des entités moléculaires libérées dans la circulation sanguine dans une relation stœchiométrique avec la biosynthèse du collagène dans un ratio 1 :1 (Garnero *et al.*, 2000). Le rôle biologique de ces propeptides n'est pas connu clairement, mais ils sembleraient jouer un rôle essentiel dans la formation des fibrilles de collagène. Ils sont peu spécifiques, car ils sont produits par d'autres tissus qui synthétisent du collagène de type I comme la peau et les vaisseaux. Les premiers dosages se sont révélés peu sensibles pour détecter des modifications du remaniement osseux (Garnero *et al.*, 2000). Le PINP apparait plus sensible, mais ne connaît pas de variation lors de la maladie de Paget. Le PICP sérique est également moins sensible comme

marqueur de la formation osseuse dans le suivi du traitement au tiludronate dans la maladie de Paget (De La Piedra *et al.*, 1996).

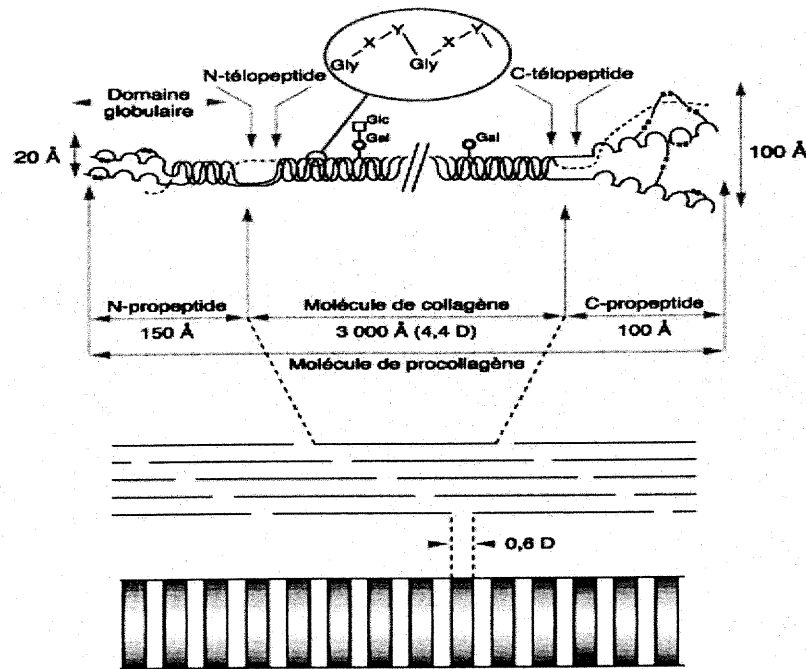


Figure 5 : Maturation extracellulaire des molécules de collagène de type I. La molécule de procollagène de type I est constituée par l'association en triple hélice de deux chaînes  $\alpha_1$  et d'une chaîne  $\alpha_2$ . Elle comprend une zone hélicoïdale, des parties linéaires aux deux extrémités (N et C-télopeptides) et des propeptides N et C-terminaux. Lorsque la molécule de collagène est synthétisée et sécrétée dans l'espace extracellulaire, les propeptides N et C-terminaux sont clivés par des enzymes spécifiques et libérés dans la circulation. Les molécules de collagène proprement dite (région hélicoïdale + télopeptides) s'assemblent pour former les microfibrilles de collagène qui se regroupent entre elles pour former la fibre de collagène (D'après Garnero *et al.*, 2000).

Chez le cheval, seul le PICP sérique a été dosé grâce à une trousse commerciale RIA (Orion Diagnostica) validée dans cette espèce (Price *et al.*, 1995a). Il existe une corrélation inverse entre les concentrations sériques en PICP et l'âge de l'animal, avec des changements plus marqués lors des deux premières années de vie (Price *et al.*, 1995a). Les concentrations sériques en PICP sont significativement corrélées avec les concentrations en bone-ALP et en total-ALP (Price *et al.*, 1995a). Les variations saisonnières semblent peu marquées (Price *et al.*, 2001). Après quatre mois d'entraînement, les concentrations en

PICP chez des Thoroughbreds de deux ans sont plus élevées que lors des premiers stades de l'entraînement reflétant une augmentation du renouvellement osseux corrélée avec une augmentation de la bone-ALP (Price *et al.*, 1995b), mais chez les Thoroughbreds en croissance, le PICP sérique est peu spécifique, car il provient aussi d'autres tissus. D'ailleurs une étude récente ne montre pas de différences entre les chevaux exercés sur tapis roulant et les contrôles (Hiney *et al.*, 2000).

## **2.2 Les marqueurs biochimiques de la résorption osseuse**

Au contraire des marqueurs de la formation osseuse, pour lesquels les protéines non collagéniques produites par les ostéoblastes sont les plus utilisées, les marqueurs de la résorption les plus utilisés sont les produits de dégradation du collagène de type I plutôt que des protéines spécifiques des ostéoclastes (Garnero *et al.*, 2000). Les meilleurs indicateurs de la résorption osseuse sont les nouveaux dosages immunologiques pour les molécules de pontage pyridinolines et les télopeptides associés CTX-I et NTX-I dans l'urine et dans le sérum (Garnero et Delmas, 1996).

### **2.2.1 L'hydroxyproline**

La résorption osseuse a été évaluée par le dosage urinaire de l'hydroxyproline libre et totale. L'hydroxyproline est un acide aminé très abondant dans le collagène de type I mature, existant dans tous les types de collagène. Après dégradation des collagènes tissulaires, il est libéré dans la circulation sanguine sous forme libre pour 90 %. Cette fraction libre ne peut être réutilisée pour la synthèse *de novo* du collagène. En raison du remaniement important du collagène osseux comparativement aux autres collagènes tissulaires, une grande partie de l'hydroxyproline urinaire provient du catabolisme du collagène osseux, cette spécificité osseuse est toute relative. L'hydroxyproline étant un constituant normal de la gélatine, son dosage urinaire impose des restrictions diététiques. L'hydroxyprolinurie est une méthode ancienne, peu spécifique au tissu osseux. Il a été le premier marqueur du métabolisme osseux chez le cheval (Jaeschkte, 1975).

### **2.2.2 Les glycosides de l'hydroxylysine**

L'hydroxylysine, comme l'hydroxyproline, est un acide aminé spécifique du collagène. Bien que moins important quantitativement que l'hydroxyproline,

l'hydroxylysine est libérée au cours de la dégradation du collagène et excrétée sous forme de glycosides. Elle représente donc un marqueur potentiel de la dégradation du collagène. Un dosage immunochimique a été récemment développé qui devrait permettre de confirmer l'intérêt de ce composé comme marqueur de la résorption osseuse (Al-Dehaimi *et al.*, 1999). A notre connaissance, son utilisation n'a pas été rapportée chez le cheval.

### 2.2.3 Les molécules de pontage du collagène et leurs télopeptides associés

Au cours des dernières années, le développement du dosage des molécules de pontage du collagène de type I a considérablement amélioré l'efficacité des marqueurs de la dégradation de l'os (Garnero *et al.*, 2000).

#### 2.2.3.1 Les molécules de pontage pyridinium

Les molécules de collagène mature sont liées par des liaisons covalentes inter et intramoléculaires, les molécules de pontage, pour former et stabiliser les fibrilles dans la matrice de collagène extracellulaire. Ces molécules de pontage sont des hydroxylysyl-pyridinoline, la pyridinoline (PYD) et de la désoxypyridinoline (DPD). Les concentrations urinaires des molécules de pontage sont des marqueurs spécifiques et sensibles de la résorption osseuse, la DPD ayant une plus grande spécificité car la PYD est présente dans une certaine mesure dans le collagène de type II du cartilage, des tendons, des vaisseaux et autres tissus conjonctifs. La DPD a une distribution tissulaire plus restreinte et elle est présente en quantité importante dans le tissu osseux (Garnero *et al.*, 2000). Au cours de la dégradation du collagène, ces molécules sont libérées dans la circulation sanguine et sont ensuite métabolisées par le foie et les reins, puis ultérieurement excrétées dans les urines sous forme libre (40 %) et sous forme conjuguée à des peptides de différentes masses moléculaires (60 %) (figure 6). La CLHP mesurant le DPD et PYD, total et libre (F-DPD, F-PYR), reste la méthode de référence, mais c'est une méthode longue, complexe et chère. Différents dosages immunologiques peuvent mesurer la PYD et la DPD libres dans l'urine. Ces dosages ont été utilisés chez le cheval. Un nouveau dosage immunologique peut mesurer la DPD totale chez l'Homme et chez le cheval (Weitz *et al.*, 1999). Chez le cheval, la PYD et la DPD ont été dosées par CLHP dans l'urine (Black *et al.*, 1999), et la DPD par dosage ELISA (Metra Biosystems Inc.) dans l'urine (Hoekstra *et al.*, 1999).

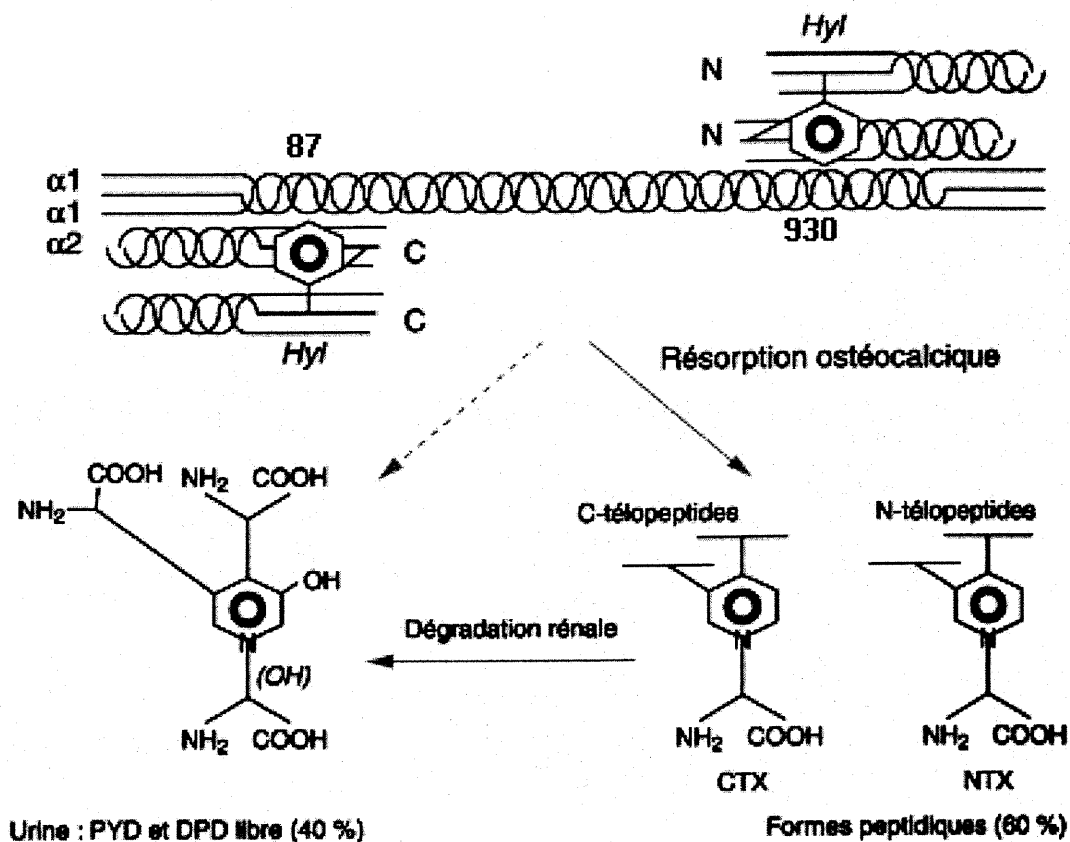


Figure 6 : Pyridinoline, désoxypyridinoline et télopeptides : marqueurs de la résorption osseuse (D'après Garnero *et al.*, 2000). Dans la matrice osseuse, les molécules de collagène de type I sont liées entre elles par des molécules de pontage (pyridinoline ou PYD et désoxypyridinoline ou DPD) au niveau des télopeptides N et C-terminaux. La pyridinoline se différencie de la désoxypyridinoline par la présence d'un groupement hydroxyle (*OH*) représenté en italique. Au cours de la résorption ostéoclastique de la matrice osseuse, les molécules de pontage sont libérées dans la circulation surtout sous forme peptidique, c'est-à-dire associées à des fragments des télopeptides C-terminaux (CTX-I) ou N-terminaux (NTX-I). Une partie de ces peptides de la pyridinoline est secondairement dégradée en PYD et DPD libres au niveau du rein. Des dosages immunologiques reconnaissent de façon spécifique et différentielle la PYD libre, la DPD libre et les peptides CTX-I et NTX-I dans les urines ou le sérum (tableau II).



Des variations avec l'âge existent. Chez les poulains au sevrage les concentrations urinaires en PYD et en DPD sont 9 à 10 fois plus élevées que chez les chevaux adultes (Black *et al.*, 1999). Des variations circadiennes significatives ont été mises en évidence avec un pic de concentrations entre deux et huit heures le matin chez des chevaux adultes hongres (Black *et al.*, 1999). Chez des chevaux confinés au box, les concentrations urinaires en DPD sont plus élevées après quatre semaines que chez des chevaux au pâturage. Ceci est associé avec une diminution de l'OC sérique et une diminution de la DMO, ce qui pourrait indiquer une adaptation du tissu osseux à la diminution des forces de charge chez les chevaux confinés au box comparés aux animaux libres en pâture (Hoekstra *et al.*, 1999).

Les molécules de pontage étant excrétées majoritairement sous leur forme peptidique, certains auteurs se sont donc attachés à développer d'autres méthodes analytiques pour évaluer les dérivés peptidiques. Plusieurs stratégies de synthèse d'anticorps ont été utilisées.

#### 2.2.4 Le C-télopeptide du collagène de type I : CTX-MMP

Le CTX-MMP (*Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases*), appelé anciennement ICTP (Price *et al.*, 1995a), est généré par les métalloprotéases matricielles. Il est constitué d'une molécule de pyridinoline liée, d'une part, à une partie des deux fragments télopeptidiques C-terminaux et, d'autre part, à un fragment issu de la zone hélicoïdale. Un dosage RIA (ICTP assay, Orion Diagnostica) est disponible depuis plusieurs années (Risteli *et al.*, 1993) et utilisé chez le cheval (Price *et al.*, 1995a).

Le CTX-MMP ne semble pas approprié pour le suivi de traitement à l'étridronate (Blumsohn *et al.*, 1995) ni au tiludronate dans la maladie de Paget (De La Piedra *et al.*, 1996). Le dosage RIA a été relativement décevant comme marqueur de la résorption osseuse, du fait de ses faibles variations lors d'affections osseuses et de son usage limité pour le suivi des traitements antirésorbants de certains bisphosphonates (Gamero *et al.*, 1994b).

Chez le cheval, une corrélation négative existe entre les concentrations sériques en CTX-MMP et l'âge, avec des variations plus importantes lors des deux premières années de vie, une diminution jusqu'à quatre ans et une stabilisation à l'âge adulte (Price *et al.*,

1995a). Ces variations sont corrélées avec celles de la bone-ALP (Price *et al.*, 1995a). Aucune variation significative n'existe avec le sexe, mais des variations avec le type de cheval avec des concentrations plus élevées chez les chevaux de trait que chez les chevaux de sang mais les chevaux de sang ont un ratio OC : CTX-MMP plus élevé que les chevaux de trait, ce qui pourrait indiquer un remaniement positif en adaptation au stress mécanique chez des chevaux ayant un travail régulier (Lepage *et al.*, 1998). Les variations saisonnières montrent une augmentation en hiver entre octobre et février, des valeurs plus constantes entre février et début avril puis une diminution en avril (Price *et al.*, 2001). Le CTX-MMP montre de variations à l'exercice avec des concentrations plus élevées après deux mois lors des premières phases de l'entraînement (Price *et al.*, 1995b). Ces changements sont associés à une augmentation de la DMO (Jackson *et al.*, 1998). Des variations sont également rapportées lors d'atteintes orthopédiques (Price *et al.*, 1997).

### 2.2.5 Le N-télopeptide du collagène de type I : NTX-I

Les molécules de pontage sont liées à la molécule de collagène à deux sites : au ou près du résidu 930, où 2 télopeptides N-terminaux de la chaîne  $\alpha_1$  sont liés à un site hélicoïdal (N-télopeptide du collagène de type I ou NTX-I) et au ou près du résidu 87, où 2 télopeptides C-terminaux de la chaîne  $\alpha_1$  sont liés à un site hélicoïdal (C-télopeptide du collagène de type I ou CTX-I). Le NTX-I est un dérivé peptidique comportant une pyridinoline liée à deux fragments peptidiques, issus des extrémités N-télopeptidiques de la molécule de collagène impliquée dans la formation d'une molécule de pontage (Hanson *et al.*, 1992). Une trousse ELISA, basée sur l'utilisation de cet anticorps, a été commercialisée sous le nom de Osteomark<sup>®</sup>. L'anticorps réagit avec des peptides issus de la dégradation enzymatique du collagène de la peau, ce qui suggère une faible spécificité pour le collagène osseux. Cependant, de nombreuses études cliniques ont confirmé que la détermination des taux urinaires de NTX-I constituait néanmoins un reflet sensible et spécifique de la résorption osseuse (Garnero *et al.*, 2000). Comparé au PYD et DPD, le NTX-I urinaire connaît une des plus fortes diminutions après un traitement au pamidronate IV mais avec une grande variabilité (Rosen *et al.*, 1998). A notre connaissance ce marqueur n'a jamais été utilisé chez le cheval.

### 2.2.6 Le C-télopeptide du collagène de type I : CTX-I

Les molécules de pontage sont liées à la molécule de collagène au ou près du résidu 87, où 2 télopeptides C-terminaux de la chaîne  $\alpha_1$  sont liés à un site hélicoïdal (C-télopeptide du collagène de type I ou CTX-I, *Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*). Un peptide de huit acides aminés correspondant à une séquence spécifique retrouvée sur l'extrémité C-terminale d'une chaîne  $\alpha_1$  de la molécule de collagène de type I a été synthétisé (Bonde *et al.*, 1994). Cette séquence comporte une lysine qui correspond à la lysine en position 16 impliquée dans la formation d'une molécule de pontage (Bonde *et al.*, 1994). La production d'anticorps dirigés contre ce peptide a permis le développement d'une trousse commercialisée sous le nom de CrossLaps<sup>®</sup> (Christgau *et al.*, 1998 ; Rosenquist *et al.*, 1998). Son intérêt a été précisé (Bonde *et al.*, 1994) dans le diagnostic des maladies métaboliques osseuses et dans le suivi des traitements antirésorbants (Rosen *et al.*, 2000). Par ailleurs, le dosage des isomères  $\alpha$  et  $\beta$  du CTX-I devrait permettre à la fois une évaluation quantitative et qualitative du métabolisme osseux (Garnero *et al.*, 1997).

Chez le cheval, le dosage du CTX-I sérique avec une trousse ELISA (CrossLaps<sup>™</sup> Osteometer Biotech, Danemark) a été validé (Kellerhouse *et al.*, 2000). Après confinement au box chez des Thoroughbreds adultes ayant été au pré les trois mois précédents, une augmentation marquée du CTX-I sérique est notée après sept jours de confinement et l'élévation persiste pendant six semaines (Kellerhouse *et al.*, 2000).

### 2.2.7 Autres marqueurs de la résorption

D'autres marqueurs du métabolisme osseux ont été développés chez l'homme mais leur utilisation n'a pas été rapportée chez le cheval :

La phosphatase acide tartrate résistante : La phosphatase acide tartrate résistante (*TRACP Tartrate-resistant acid phosphatase*) est le seul produit spécifique de l'ostéoclaste utilisé comme marqueur de la résorption osseuse. La phosphatase acide est une enzyme lysosomiale présente dans de nombreux tissus, incluant l'os, la prostate, les plaquettes, les érythrocytes et la rate. La phosphatase acide sécrétée par l'ostéoclaste est résistante à l'acide tartrique. La mesure de cette activité enzymatique constitue un reflet de l'activité des ostéoclastes et donc de la résorption osseuse. Des dosages immunologiques utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre l'isoenzyme 5b de la TRAP, spécifique des

ostéoclastes ont été développés (Kraenzlin *et al.*, 1990). Ce marqueur semble plus corrélé au nombre d'ostéoclastes plutôt qu'à leur activité (Glorieux *et al.*, 1993).

La sialoprotéine osseuse : La sialoprotéine osseuse est une glycoprotéine phosphorylée osseuse, synthétisée par les ostéoblastes et les ostéoclastes, qui représente de 5 à 10 % des protéines non collagéniques de la matrice osseuse. Du fait de sa distribution relativement restrictive aux tissus minéralisés, la sialoprotéine osseuse pourrait servir potentiellement de marqueur du métabolisme osseux. Un dosage RIA a été développé (Karmatschek *et al.*, 1997). Les traitements aux bisphosphonates intraveineux résultent en une rapide diminution de la sialoprotéine osseuse sérique (Seibel *et al.*, 1996). Il est probable que la sialoprotéine osseuse reflète de façon prépondérante la résorption osseuse.

Le peptide hélicoïdal de la chaîne  $\alpha_1$  du collagène I : Un peptide isolé de l'urine de patients pagétiques correspondant aux résidus 620-633 de la région hélicoïdale de la chaîne  $\alpha_1$  pourrait être utilisé comme marqueur osseux. Un test ELISA a été développé. Ce marqueur semble très sensible à l'augmentation de la vitesse du renouvellement osseux lors de la ménopause chez la femme, et en réponse aux traitements aux bisphosphonates avec une corrélation à la DMO (Garnero et Delmas, 2001).

### **2.3 Considérations pour l'utilisation clinique de marqueurs biochimiques osseux chez le cheval**

Comme cela a été décrit dans les précédents paragraphes, il existe de nombreux facteurs expliquant la variabilité des marqueurs biochimiques du remaniement osseux dont seuls quelques-uns peuvent être contrôlés pour en minimiser les effets.

L'âge : Les concentrations sanguines et urinaires des différents marqueurs osseux diminuent avec l'âge, ce qui reflète la diminution de vitesse de renouvellement osseux avec une augmentation de la maturité du squelette (Lepage *et al.*, 1990 ; Price *et al.*, 1995a).

Le type de cheval : L'OC et le ratio OC : CTX-MMP varient en fonction du type de cheval (Lepage *et al.*, 1998).

L'état physiologique : L'effet de la gestation et la lactation n'a pas encore été étudié correspondent à une «dépense» calcique importante, associée à une perte osseuse chez la

femme. Pendant la grossesse, il existe chez la mère une augmentation de tous les marqueurs osseux (à l'exception de l'ostéocalcine). Ce haut remaniement persiste pendant l'allaitement, et cela jusqu'au moins trois mois après la fin de l'allaitement (Garnero *et al.*, 2000).

L'activité physique : Chez l'Homme, l'immobilisation entraîne une augmentation de la résorption osseuse, mais semble avoir peu d'effet sur les marqueurs de la formation. Les marqueurs de la résorption augmentent de façon significative dès les premiers jours d'alitement et les concentrations augmentent après sept jours (Smith *et al.*, 1998). Ceci est également rapporté chez le cheval avec le CTX-I (Kellerhouse *et al.*, 2000). Après mobilisation, le retour aux valeurs de base est plus lent (Garnero *et al.*, 2000). L'activité physique régulière a une influence positive sur l'acquisition du capital osseux. Schématiquement, les marqueurs de la formation osseuse (OC, bone-ALP, PICP) augmentent en réponse à l'exercice (Woitge *et al.*, 1998 ; Wallace *et al.*, 2000) alors que les marqueurs de la résorption sont augmentés (Wallace *et al.*, 2000) ou diminués (Woitge *et al.*, 1998) selon le type (Woitge *et al.*, 1998) et l'intensité de l'exercice. Chez le cheval, des variations ont été rapportées aux premiers stades de l'entraînement, reflétant une augmentation générale du métabolisme osseux en réponse aux contraintes mécaniques (Price *et al.*, 1995b).

Les maladies intercurrentes : Certaines maladies qui n'affectent pas le remaniement osseux, ont un effet sur le niveau des marqueurs osseux, par l'altération de leurs clairances, l'insuffisance rénale sévère (Melick *et al.*, 1988), l'insuffisance hépatique sévère (Garnero et Delmas, 1993). Outre les traitements à visée osseuse ayant un effet important sur le niveau de remaniement osseux comme les bisphosphonates, les corticoïdes ont un effet important chez le cheval (Lepage *et al.*, 1993). Chez l'Homme, il est montré que cet effet est dose-dépendant sur l'activité des cellules osseuses, en inhibant directement la formation osseuse et en stimulant indirectement la résorption osseuse par le biais d'une hyperparathyroïdie secondaire (Werhja *et al.*, 1998).

Les variations circadiennes et saisonnières : Comme cela est rapporté chez l'Homme (Woitge *et al.*, 1998b), des rythmes circadiens existent pour la plupart des marqueurs osseux chez le cheval (Lepage *et al.*, 1991 ; Black *et al.*, 1999). Les variations saisonnières représentent, après l'âge, la deuxième cause de variation physiologique des marqueurs avec une accélération du remaniement osseux durant l'hiver. Chez le cheval, une augmentation

de tous les marqueurs osseux sauf la bone-ALP existe en hiver (d'octobre à décembre) et au printemps (avril-mai) chez des Thoroughbreds de un et deux ans (Price *et al.*, 1997 ; Price *et al.*, 2001).

Le mode et l'heure de prélèvement : Étant donné, l'importance des variations nyctémérales, notamment pour les marqueurs de la résorption, il est indispensable de standardiser l'heure de prélèvement (Black *et al.*, 1999). Les marqueurs devront être mesurés de préférence, sur sérum recueilli à jeun avant neuf heures. Le dosage des marqueurs urinaires implique une correction par la créatininurie. De plus, les problèmes pratiques de récolte de l'urine chez le cheval pourrait limiter l'utilisation des marqueurs urinaires en recherche et dans leur potentielle utilisation clinique. Pour la conservation des échantillons, un délai de deux à quatre heures entre le prélèvement et la congélation de l'échantillon est fréquent. Tous les paramètres sont stables à l'exception de l'OC à température ambiante. L'ostéocalcine reste stable si le prélèvement est conservé pendant quatre heures à +4 °C. Les échantillons congelés sont stables à -20 °C pendant quatre mois et -80 °C pour de plus longues périodes (Garnero *et al.*, 2000).

Les variations analytiques : Les variabilités analytiques intra et interdosages des marqueurs osseux sont acceptables avec des coefficients de variation généralement inférieurs à 10 %. Les performances sont meilleures pour les dosages automatisés. La variabilité analytique est mineure par rapport à la variabilité totale des marqueurs osseux (Garnero *et al.*, 2000).

Les variations intra-individuelles : Les différentes sources de variabilité pré-analytiques et analytiques des marqueurs osseux contribuent à une variabilité intra-individuelle (ou intra-sujet) globale qui est en fait la limitation majeure à leur utilisation en routine clinique. La variabilité intra-individuelle peut affecter l'interprétation d'un dosage. Dans le cas d'une évaluation longitudinale, lors du suivi d'un traitement à visée osseuse, des modifications substantielles (dépendant de la variabilité intra-individuelle du marqueur) sont nécessaires pour considérer que deux concentrations sont significativement différentes. La variabilité dépend de la population étudiée, de la technique utilisée, du nombre de sujets, de la durée de la période d'étude et des conditions de prélèvements. Afin de déterminer le marqueur le plus approprié à l'étude pour l'évaluation des bisphosphonates, il a été proposé d'utiliser le calcul du plus petit changement significatif (LSC pour *least significant change*) (Rosen *et*

*al.*, 1998) qui tient compte à la fois de la variabilité intra-individuelle d'un marqueur mais aussi de sa variabilité analytique.

Autres considérations : En médecine humaine, la découverte de marqueurs biochimiques spécifiques et sensibles reflétant le taux de formation et de résorption osseuse a grandement amélioré les techniques non invasives d'évaluation de la vitesse de renouvellement osseux dans différentes maladies métaboliques de l'os, particulièrement l'ostéoporose (Garnero et Delmas, 1996). Malgré les problèmes potentiels de leur utilisation clinique, les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux sont la méthode la plus sensible d'évaluer des changements aigus du métabolisme osseux. Il est possible de mesurer une diminution significative dans les concentrations sériques en OC, PICP dans les 12 heures suivant la mise en place d'un traitement antirésorbant comme les bisphosphonates. Ces changements sont trop précoces pour être déterminés par aucune autre méthode d'évaluation du métabolisme osseux (Taylor *et al.*, 1994).

Les dosages immunologiques de l'OC, de la bone-ALP et du PINP sont les marqueurs les plus sensibles actuellement pour évaluer la formation osseuse. Les meilleurs indicateurs de la résorption osseuse sont les dosages immunologiques des molécules de pontages et des peptides associés CTX-I et NTX-I dans l'urine et dans le sérum. Ils sont actuellement les marqueurs les plus spécifiques et sensibles de la vitesse du renouvellement osseux pour l'évaluation clinique de l'ostéoporose et du risque fracturaire (Garnero *et al.*, 2000). Ils peuvent également permettre de déterminer rapidement l'efficacité des traitements antirésorbants (Garnero et Delmas, 1996). Une combinaison appropriée des marqueurs les plus efficaces de la formation et de la résorption osseuse apportera certainement un outil efficace dans l'évaluation du métabolisme osseux (Garnero et Delmas, 1996). Ceci est corrélé avec des effets à long terme de ces traitements sur la masse osseuse évaluée par la DMO mesuré par DEXA (Garnero *et al.*, 1999). En particulier les marqueurs de la résorption osseuse dont le CTX-I qui sont les meilleurs pour prédire le gain de DMO après traitement à l'alendronate et qui identifie le plus grand nombre de patients répondant à la thérapie après un an (Fink *et al.*, 2000).

Chez le cheval, l'utilisation des marqueurs du métabolisme osseux reste à établir pour le diagnostic, le suivi et le pronostic en clinique (Girard *et al.*, 1997 ; Jackson *et al.*, 2000) et différentes considérations sont à prendre en compte pour leur utilisation en recherche.

Les études utilisant ces marqueurs doivent travailler avec une population strictement sélectionnée, une méthodologie standardisée et avec des hypothèses spécifiques en contrôlant le maximum de facteurs de variations.



## CONCLUSION

Les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux constituent un outil rapide et sensible pour évaluer la formation et la résorption osseuse. Les marqueurs biochimiques sont classés en marqueurs de la formation et marqueurs de la résorption, mais il faut garder à l'esprit que chez un individu normal les deux activités restent couplées, qu'elles varient dans la même direction, l'un et l'autre de ces marqueurs reflètera alors l'activité globale du remaniement osseux. Il est logique de mesurer une sélection de différents marqueurs puisque chacun reflète un mécanisme physiologique différent. Des dosages immunologiques spécifiques et sensibles ont été développés en médecine humaine, ce qui a amélioré leur potentiel d'utilisation clinique. Malgré tout, de larges variations intra patients existent avec la plupart des dosages, sans empêcher leur utilisation clinique. Un dosage unique a peu de valeur par contre un suivi longitudinal permet d'évaluer le métabolisme et le développement osseux, les affections osseuses et les effets pharmacologiques des traitements antirésorbants comme les bisphosphonates (Taylor *et al.*, 1994 ; Garnero *et al.*, 1994b ; Rosen *et al.*, 1998). Parmi les marqueurs sériques connus chez le cheval, l'OC, la bone-ALP, le CTX-MMP et les CTX-I pourraient constituer de bons outils pour l'évaluation pharmacologique des bisphosphonates chez le cheval, en particulier la bone-ALP et le CTX-I d'après les données rapportées en médecine humaine. Bien que les marqueurs reflètent la balance dynamique entre la formation et la résorption osseuse à tout moment, ils ne fournissent pas d'informations sur la masse et l'architecture osseuses, c'est pourquoi ils sont le complément de mesures statiques d'ostéodensitométrie.

## HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

La présentation de cette revue de littérature conduit à la formulation de diverses hypothèses de travail :

1. La première concerne la tolérance de l'administration intraveineuse d'un bisphosphonate, le tiludronate, chez le cheval. Elle sera bien tolérée par administration intraveineuse lente.
2. La deuxième hypothèse concerne l'effet pharmacodynamique du tiludronate sur le métabolisme osseux chez le cheval. Conformément aux connaissances acquises en médecine humaine et équine, l'administration de tiludronate engendrera une évolution significative des marqueurs biochimiques osseux dans le sens d'une balance positive, avec un effet plus important sur les marqueurs de la résorption et notamment le CTX-I. Une action marquée et précoce sur les marqueurs de la résorption est attendue compte tenu de l'effet principal du produit, mais un effet secondaire pourrait être observé sur les marqueurs osseux de la formation du fait du couplage du remaniement osseux.

Nos travaux se divisent en deux parties soit une étude préliminaire qui rapporte la tolérance du tiludronate et son effet à court terme sur quatre marqueurs biochimiques du métabolisme osseux et une deuxième partie qui porte sur l'étude des effets pharmacodynamiques à moyen terme sur quatre mois avec un groupe contrôle.

# MÉTHODOLOGIE

Le protocole expérimental de ces études a été révisé et accepté par le comité d'éthique de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon, suivant les recommandations du Conseil de la Communauté Européenne (Directive n° 86/609/EEC 24.11.86). Ces travaux ont été réalisés selon un schéma unicentrique avec un seul groupe de chevaux lors de l'étude préliminaire et quatre groupes parallèles, lors de l'étude principale, dont un groupe placebo et trois groupes recevant le produit testé selon trois protocoles d'administration différents dans le but de comparer leurs effets sur le métabolisme osseux.

## **1 Animaux**

Tous les animaux sélectionnés ont été déclarés sains après examen physique complet et examen de boiterie ainsi qu'un profil biochimique. Chaque examen physique consistait en l'observation de l'attitude générale du cheval, la mesure de la température rectale, l'examen de l'appareil cardio-vasculaire (couleur des muqueuses, temps de remplissage capillaire, pouls facial, pouls digités, fréquence cardiaque, auscultation cardiaque bilatérale), examen de l'appareil respiratoire (fréquence, rythme et auscultation), et examen de l'appareil digestif (auscultation digestive, appétit, aspect des fèces). Les paramètres biochimiques de la fonction rénale (créatinine plasmatique) et de la fonction hépatique (aspartate aminotransférase (AST) et  $\gamma$ -glutamyl transférase (GGT)) ont été mesurés par dosage colorimétrique. Seuls les chevaux cliniquement sains, ne présentant aucune évidence biochimique d'atteinte hépatique ou rénale, ont été acceptés pour l'étude. Les animaux n'avaient pas d'antécédent de pathologie locomotrice et n'avaient jamais été traités avec des bisphosphonates. Pendant une période d'exclusion de six semaines et pendant toute la durée de l'essai, aucun produit connu pour modifier le métabolisme osseux ou les marqueurs biochimiques (corticostéroïdes, anti-inflammatoires non stéroïdiens, agents d'anesthésie générale) n'a été administré, sauf la vermifugation et les vaccinations. Les chevaux étaient immunisés contre le tétanos et la grippe et vermifugés avec de l'ivermectin (Eqvalan<sup>®</sup>, Merial, Lyon, France), deux semaines avant le début de l'étude.

*Étude préliminaire* : Cinq chevaux sains adultes âgés de 6 à 11 ans (deux chevaux de 6 ans et trois chevaux de 11 ans), hongres ou femelles de race Trotteur Français ont été sélectionnés. L'hébergement des animaux se faisait en box de 3x4 m. Les chevaux n'étaient

pas exercés. L'eau était fournie *ad libitum* et l'alimentation était constituée de foin de bonne qualité, distribué en deux repas quotidiens.

Étude principale : La population étudiée était composée de 32 chevaux adultes sains (Trotteurs Français), 12 juments et 20 hongres âgés de 4 à 16 ans (avec une moyenne d'âge de 9,9 ans) et un poids corporel de  $488,9 \pm 6,8$  kg (moyenne  $\pm$  écart-type). Tous les animaux étaient hébergés au même endroit et gardés dans des paddocks avec de l'herbe rase afin de limiter les différences d'alimentation entre les chevaux. Les chevaux étaient nourris avec une alimentation à base de foin avec un accès *ad libitum* au fourrage et à l'eau. Les chevaux étaient gardés en liberté sans être exercés. Avant le début de l'étude principale, tous les chevaux étaient gardés dans d'autres pâtûres depuis au moins deux mois et habitués à être gardés en groupe. Les animaux n'étaient confinés dans des salles d'examen que lors des examens cliniques, des prélèvements sanguins et des traitements.

## **2 Traitement**

Les traitements étaient réalisés le matin et les durées de la perfusion étaient notées. Le tiludronate se présentait sous forme de poudre lyophilisée pour solution injectable conditionnée dans un flacon de verre contenant 50 mg d'acide tiludronique. La conservation du produit était faite à température ambiante (lot de fabrication 145R0/2 ; date de fabrication : Octobre 1999). Le produit test était remis en solution juste avant l'administration, à l'aide de 10 mL d'eau stérile pour préparations injectables (Laboratoire Aguetant, Lyon, France).

Étude préliminaire : Un cathéter intraveineux en polytétrafluoroéthylène (Intraflon II, Vygon, France) était mis en place stérilement pour la période du traitement dans une veine jugulaire de chaque cheval. Le traitement consistait en une perfusion unique de tiludronate à la posologie de 1 mg/kg pendant 30 minutes à J1. La dose exacte en mg de tiludronate était injectée stérilement dans une outre de 1 litre de chlorure de sodium 0,9% (Tuliflex, Laboratoire Aguetant, Lyon, France), identifiée pour chaque cheval. La quantité équivalente de chlorure de sodium 0,9% était préalablement retirée de l'outre pour conserver un volume total de 1 litre.

Étude principale : Le placebo était constitué d'une solution commerciale de chlorure de sodium 0.9 %. Les animaux étaient divisés en quatre groupes de traitement de huit individus chaque, répartis aléatoirement selon l'âge (de 4 à 8 ans, de 9 à 13 ans et de 14 à 16 ans) puis selon le sexe (juments ou hongres).

**Groupe 1:** Huit chevaux ont reçu 1 L de solution saline isotonique administrée par voie intraveineuse sur 30 min au jour 1 (J1).

**Groupe 2:** Huit chevaux ont reçu 0.1 mg/kg (poids corporel), de tiludronate par voie intraveineuse une fois par jour pendant 10 jours (J1 à J10).

**Groupe 3:** Huit chevaux ont reçu 1 mg/kg (poids corporel), de tiludronate dans 1L de saline par voie intraveineuse sur 30 min au jour 1 (J1).

**Groupe 4:** Huit chevaux ont reçu 1 mg/kg (poids corporel), de tiludronate dans 1L de saline par voie intraveineuse sur 30 min au jour 1 (J1) et au jour 29 (J29).

Dans le Groupe 2, dans une veine jugulaire de chaque individu, un cathéter intraveineux, 13-gauge en polyuréthane (Central Venous Catheter, COOK® veterinary products, Australia) a été mis en place après rasage et préparation chirurgicale. Les cathéters ont été retirés au J10 après traitement. Dans le Groupe 1, 3 et 4 et pour les cinq chevaux de l'étude préliminaire, un cathéter intraveineux, 14-gauge en polytétrafluoroéthylène (PTFE Intraflon II, Vygon, France) a été mis en place après rasage et préparation chirurgicale, juste avant le traitement au jour 1 (J1). A la fin de la perfusion, le cathéter était immédiatement retiré. La même procédure a été réalisée pour le Groupe 4 au jour 29 (J29). Les chevaux étaient gardés dans un travail sous surveillance médicale par un vétérinaire durant le traitement.

### **3 Suivi clinique**

Étude préliminaire : Un examen clinique était effectué au jour -1 (J-1) et au J1 avant le traitement, ainsi qu'au J1 +15 minutes (durant la perfusion), J1+30 min (à la fin de la perfusion), J1+2h, J1+6h, et J1+24h Les chevaux étaient gardés sous surveillance continue dans un travail de contention durant les trois heures suivant le début de la perfusion. Chaque cheval était ensuite replacé dans son box et gardé sous surveillance médicale pendant 48h.

Chaque examen clinique consistait en l'observation de l'attitude générale du cheval, la mesure de la température rectale, l'examen de l'appareil cardio-vasculaire (couleur des muqueuses, temps de remplissage capillaire, pouls facial, pouls digités, fréquence cardiaque, auscultation cardiaque bilatérale), examen de l'appareil respiratoire (fréquence et rythme), et examen de l'appareil digestif (auscultation digestive, appétit, aspect des fèces).

*Étude principale* : Une inspection clinique de tous les chevaux était réalisée deux fois par jour durant toute l'étude principale. Un examen clinique complet était effectué avant le traitement à J-5 et J1, et après le début du traitement aux jours J6, J11, J29, J43, J57, J85 et J113. L'examen clinique incluait également un examen locomoteur de base réalisé sur une surface dure.

## **4 Analyses biochimiques**

***Calcium ionisé, calcium total, des protéines totales et autres paramètres biochimiques sanguins.***

*Étude préliminaire* : Des prélèvements sanguins ont été effectués au J-1, au J1 juste avant le début du traitement, au J1+30 min. (juste après la fin de la perfusion), J1+2h, J1+6h, et J1+24h. Les prélèvements étaient réalisés par ponction à l'aiguille dans la veine jugulaire du côté opposé au cathéter, sur tube héparine lithium, conservés à +4°C après centrifugation, et analysés dans les 24 heures au laboratoire de biochimie clinique de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon.

Des mesures de la créatinine sanguine, de la GGT sérique et de l'AST par dosage colorimétrique ont été réalisées à partir des échantillons de plasma prélevés au J1 avant traitement et au J1+24 heures après le début du traitement.

### ***Dosage des marqueurs du métabolisme osseux***

L'effet du tiludronate sur le métabolisme a été évalué par deux marqueurs de la formation osseuse (OC et bone-ALP) et deux marqueurs de la résorption osseuse (CTX-MMP et le CTX-I). Les échantillons ont été prélevés le matin entre 8h30 et 11h30, dans la

veine jugulaire du côté opposé au cathéter et récoltés dans des tubes EDTA/benzaminidine et des tubes secs de 10 ml. Les échantillons de sérum ont été laissés à température ambiante pour coagulation avant la centrifugation. Le plasma et le sérum ont été séparés par centrifugation (2000 rpm à 5°C) dans les deux heures après le prélèvement et les prélèvements ont été conservés à -30°C jusqu'à l'analyse.

Étude préliminaire : Les prélèvements sanguins ont été réalisés le matin au J1 avant traitement et au J1+24h.

Étude principale : Les échantillons sanguins pour le dosage des marqueurs biochimiques osseux ont été prélevés avant traitement à J-5 et J1 et après le début de traitement à J6, J11, J29, J43, J57, J85 et J113. Les concentrations sériques initiales de chaque marqueur ont été évaluées par la moyenne du jour J-5 et J1 juste avant le traitement. Les concentrations sériques ou plasmatiques moyennes de chaque marqueur ont été évaluées selon le schéma suivant : Les concentrations en OC, le CTX-MMP, et le CTX-I ont été déterminées à J-5 et J1 avant traitement et à J6, J11, J29, J43, J57, J85 et J113 dans les différents groupes. Les concentrations en b-ALP ont été mesurées à J-5 et J1 avant traitement et à J6, J11, J29, J57, J85 et J113. L'OC, la bone-ALP et le CTX-MMP ont été dosés dès la fin de l'étude à quatre mois, alors que le CTX-I a été dosé au plus tard deux mois après le prélèvement.

L'OC a été dosée en double dans le plasma à l'aide de la trousse radioimmunologique RIA (Osteocalcin Radioimmunoassay Kit, Incstar Co) utilisant des anticorps dirigés contre l'ostéocalcine bovine et qui a été validée pour une utilisation chez le cheval (Patterson-Allen *et al.*, 1982). Les concentrations en ostéocalcine sont exprimées en micro-grammes par litre ( $\mu\text{g/L}$ ). Le coefficient de variation intra-dosage (CV) était inférieur à 6%. La concentration minimale détectable était estimée à 0.2  $\mu\text{g/L}$ . Le dosage de la bone-ALP a été réalisé dans le plasma par méthode immunoradiométrique IRMA à l'aide de la trousse utilisée chez l'homme (Tandem-R Ostase : Immunotech, Belgique) (Garnero et Delmas, 1993) dont l'utilisation a été validée chez le cheval (Jackson *et al.*, 1996). Le CV intra-dosage était de 6.7% et le CV inter dosage était de 8.1%. La concentration minimale détectable était estimée à 2.0  $\mu\text{g/L}$ . Le CTX-MMP sérique a été mesuré en double dans le



plasma par dosage radioimmunologique RIA (I-CTP assay, Orion Diagnostica) développé pour une utilisation chez l'Homme (Risteli *et al.*, 1993), et qui a été validé chez le cheval (Price *et al.*, 1995a). Les résultats sont exprimés en ng/mL. Le CV intra-dosage était de 6.2% et le CV inter-dosage de 7.9%. La concentration minimale détectable était estimée à 0.5 µg/L. Le CTX-I a été dosé dans le sérum par dosage immunoenzymatique automatisé (β Crosslaps, Elecsys, Roche Diagnostics) utilisé pour la détection quantitative d'une séquence spécifique du collagène de type I dans le sérum humain (Garnero *et al.*, 2001a) et chez le cheval (Kellerhouse *et al.*, 2000). Les résultats sont exprimés en ng/mL. Le CV intra-dosage était de 3.1% et le CV inter-dosage inférieur à 7 %. La concentration minimale détectable était estimée à 0.1 ng/mL.

## **5 Analyse statistique**

*Étude préliminaire* : L'analyse statistique a été réalisée avec un modèle mixte à mesures répétées pour le suivi de la fréquence cardiaque, de la calcémie et de la protéinémie. Si un effet du temps existait, des tests de Wilcoxon pour échantillons appariés ont ensuite été réalisés. Pour les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux, un test statistique unilatéral non paramétrique de Wilcoxon a été effectué. L'analyse a été basée sur un intervalle de confiance calculé à 95%.

*Étude principale* : L'analyse statistique a été réalisée avec un logiciel SAS version 8. L'homogénéité initiale entre les groupes a été testé pour l'âge, le sexe et les concentrations initiales des marqueurs biochimiques avec une ANOVA à un groupe (traitement). Du fait de la variabilité intra-individuelle, les données ont été exprimées en pourcentage par rapport aux valeurs individuelles initiales. Les données ont été analysées pour l'effet temps en utilisant une ANOVA pour mesures répétées incluant les valeurs initiales comme covariable. Lorsqu'une interaction temps-traitement était significative, les moyennes étaient comparées à chaque échéance, et lorsqu'une différence significative existait entre les groupes, chaque groupe était comparé aux autres. Le seuil de significativité était fixé à 0.05.

**PREMIER ARTICLE**

# TILUDRONATE CHEZ LE CHEVAL : TOLÉRANCE ET EFFETS À COURT TERME SUR LE MÉTABOLISME OSSEUX.

*Ann. Méd. Vét.*, 2002, **147**, 123-130.

VARELA A.<sup>1,2</sup>, LEPAGE O.M.<sup>1</sup>, DOUCET M.<sup>3</sup>, MARCOUX M.<sup>2</sup>, GARNERO P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Département Hippique, École Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Étoile, France,

<sup>2</sup>Département des sciences cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada,

<sup>3</sup>Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada,

<sup>4</sup>Institut national de la santé et de la recherche médicale INSERM, unité de recherche 403 et Synarc, Lyon, France.

Ces travaux de recherche ont été financés par CEVA Santé Animale.

Correspondance: Dr A. Varela, Département des sciences cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, St-Hyacinthe J2S 7C6, Québec, Canada. E-mail : [aurore.varela@umontreal.ca](mailto:aurore.varela@umontreal.ca)

## RÉSUMÉ

Le but de cette étude était d'évaluer la tolérance du tiludronate chez le cheval et son effet sur le métabolisme osseux. Cinq chevaux ont reçu 1 mg/kg de tiludronate en perfusion lente. Un suivi clinique et biochimique a été effectué avant traitement et au cours des 24 h qui ont suivi. Deux paramètres de la formation osseuse ont été évalués : l'ostéocalcine et l'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline. Deux marqueurs de la résorption osseuse : CTX-MMP (*Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases*) et le CTX-I (*Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*) ont été mesurés.

Une légère augmentation non significative de la fréquence cardiaque a été notée à +30 min et à +2h. Une légère hypocalcémie était présente à +30 min. A +6h, tous les paramètres étaient revenus aux valeurs initiales. Aucune modification des paramètres rénaux et hépatiques n'a été observée.

Aucune variation des marqueurs de la formation osseuse, ni du CTX-MMP n'a été observée. A +24 h, la concentration en CTX-I a diminué fortement, 72,4 % en moyenne ( $p = 0,0313$ ).

Le tiludronate en perfusion lente est bien toléré chez le cheval sans réaction clinique secondaire significative. Il entraîne une diminution marquée de la concentration en CTX-I, indiquant un effet inhibiteur de la résorption osseuse.

Title: Tiludronate in horses: tolerance and short-term effects on bone metabolism

## SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate intravenous tolerance of tiludronate in horses and its effects on bone metabolism. Five French Trotters received 1 mg/kg of tiludronate intravenously during 30 min. Complete physical examination was performed, blood calcium as well as renal and hepatic parameters were monitored before and after treatment. Bone metabolism was evaluated before and 24 hours after treatment by measuring biochemical bone formation markers, osteocalcin and bone alkaline phosphatase and bone resorption markers, CTX-MMP (Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases) and CTX-I (Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen).

A slight non-significant increase in heart rate without dysrhythmia was noted at +30 min. and at +2h. A transient slight hypocalcaemia was present with or without increased heart rate, in all horses at +30 min. However, 6h-post treatment, all values had returned to normal. There were no changes in plasma creatinine or hepatic parameters during the study.

No changes in formation marker concentrations were observed after treatment, neither in CTX-MMP concentrations. Twenty-four hours post tiludronate IV administration, CTX-I levels markedly decreased by an average 72.4% ( $p=0.0313$  vs. baseline).

In conclusion, slow intravenous administration of tiludronate was well tolerated in horses without any clinically relevant adverse effects. The drug induces a rapid and marked decrease in serum CTX-I, indicating an antiresorptive effect.

## INTRODUCTION

Les affections du système locomoteur causent des diminutions de performances, des réformes prématurées, des retraits temporaires durant la saison de course et entraînent ainsi des pertes économiques importantes (Jeffcott *et al.*, 1982 ; Rosedale *et al.*, 1985 ; Physick-Sheard et Russell, 1986 ; Estberg *et al.*, 1996). Parmi ces affections, les problèmes osseux constituent un élément majeur (Bathe, 1994). Approximativement 60% des pertes fatales en course sont dues à des fractures (Riggs, 1997). Des affections osseuses moins graves mais douloureuses sont responsables de retards à l'entraînement (Riggs, 1997). La forte incidence des affections musculosquelettiques chez le cheval incite au développement de molécules thérapeutiques visant à prévenir et traiter ces maladies.

L'os joue un rôle de soutien essentiel dans l'organisme mais il convient de concevoir le tissu osseux autrement que comme une charpente amorphe. Au sein du tissu osseux, on distingue trois grandes activités qui sont la croissance, le modelage et le remaniement (Lepage *et al.*, 1997). Le tissu osseux par son renouvellement perpétuel, le remaniement, possède des capacités d'adaptation rapide. A la différence des activités de croissance et de modelage, le remaniement osseux est un phénomène continu qui a lieu durant toute la vie de l'individu, à des endroits diffus, à la fois dans l'os cortical et trabéculaire. L'os est constitué d'une matrice protéique, essentiellement formée de collagène de type I, sur laquelle est déposée la substance cristalline phosphocalcique. Des molécules de pontage (pyridinoline et désoxypyridinoline) permettent de stabiliser les molécules de collagène au sein de la matrice protéique extracellulaire. Le métabolisme osseux est caractérisé par deux activités opposées et couplées : la dégradation ou résorption de l'os ancien par les ostéoclastes et les ostéocytes résorbants et la formation d'un nouvel os par les ostéoblastes qui synthétisent la matrice ostéoïde, nom que porte la matrice avant sa minéralisation. Ce tissu ostéoïde subit secondairement une minéralisation avec formation d'un front de calcification. Le tissu osseux est une source d'ions calcium, disponibles en grande quantité et rapidement échangeables, source capitale pour l'homéostasie calcique de l'organisme. Le calcium sanguin est presque exclusivement plasmatique, séparé en deux fractions, le calcium lié aux protéines, surtout l'albumine et le calcium ultra-filtrable presque entièrement sous forme ionisée qui correspond à la fraction biologiquement active. Le calcium osseux et le calcium sanguin et interstitiel sont en échange permanent pour

maintenir l'homéostasie calcique (Rosol et Capen, 1997). Le bilan calcique est donc le reflet du métabolisme osseux, une inhibition de la résorption osseuse peut entraîner une séquestration des ions calcium dans le tissu osseux, réduire les échanges avec le compartiment interstitiel et le sang, et l'homéostasie peut être affectée si les autres sources de calcium (reins et intestins) sont non fonctionnelles ou déficientes.

Les bisphosphonates constituent une classe thérapeutique aujourd'hui bien connue en médecine humaine pour le traitement des maladies métaboliques de l'os (Fleisch, 1997). Ces composés caractérisés par une forte activité anti-ostéoclastique, agissent principalement sur le tissu osseux, en inhibant la résorption osseuse par inhibition de l'activité des ostéoclastes (Ammann *et al.*, 1993). Les bisphosphonates sont très intéressants dans le traitement de certaines maladies de l'os où le remaniement est mis en cause (Bonjour *et al.*, 1995 ; Gatti et Adami, 1999) ou lors de métastases osseuses (Fleisch, 1991). Les bisphosphonates de première génération comme l'étidronate sont utilisés lors de calcification ectopique (Fleisch, 1997). Chez le cheval, ces composés pourraient être utilisés dans le traitement d'affections osseuses associées à des lésions de type ostéolytique ou de remaniement osseux anormal. C'est le cas pour les fractures de stress qui impliquent une activité de résorption intense et localisée (Stover, 1998), l'ostéopénie de non-usage, le syndrome naviculaire, l'éparvin, les kystes sous-chondraux et les sésamoïdites. Des études rapportent l'utilisation des bisphosphonates chez le cheval. Le pamidronate (AHPBP ou 3-amino-1-hydroxypropilidene-1,1-bisphosphonate), un aminobisphosphonate inhibant la minéralisation osseuse a été utilisé dans le traitement d'exostose expérimentalement induite chez le poney. Il avait été observé une absence de toxicité du produit sur le remodelage osseux, une moindre croissance des exostoses chez les animaux traités et une diminution du taux de minéralisation de l'ostéoïde (Lepage et François, 1989). Le pamidronate a également été évalué mais sans succès dans le traitement du syndrome naviculaire (McGuigan *et al.*, 2000).

Différentes méthodes d'évaluation non invasives du tissu osseux ont été décrites récemment chez le cheval (Lepage *et al.*, 2001). Le métabolisme osseux peut être évalué indirectement par l'évolution des concentrations sériques ou plasmatiques de marqueurs biochimiques. Ceux-ci font partie des composants de la matrice osseuse collagénique ou non-collagénique ou peuvent être des enzymes qui sont libérés dans la circulation durant la formation ou la résorption osseuse. Le dosage des marqueurs biochimiques osseux constitue

une méthode simple, rapide et non-invasive d'investiguer le métabolisme osseux. Les marqueurs biochimiques du remaniement osseux reflètent le métabolisme osseux qui se modifie rapidement et ils sont utilisés pour prédire l'efficacité des traitements antirésorbants à court terme (Taylor *et al.*, 1994). A plus long terme, l'ostéodensitométrie constitue la technique de choix pour évaluer le gain de masse osseuse (Reginster *et al.*, 1989). Dans l'ensemble du texte, nous utiliserons pour décrire les marqueurs la nomenclature internationale la plus récente (Delmas *et al.*, 2000). Chez le cheval, pour évaluer la synthèse osseuse, on peut doser l'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline (Jackson *et al.*, 1996) (bone-ALP) et l'ostéocalcine (OC) (Lepage *et al.*, 1990). L'OC est petite protéine non-collagénique, qui est libérée par les ostéoblastes. Son rôle est déterminant dans la régulation de la formation osseuse mais elle ne semble pas intervenir lors de la résorption (Ducy *et al.*, 1996). Elle est incorporée dans la matrice durant sa formation et libérée de la matrice dans le courant sanguin lors de la résorption osseuse. Ainsi la concentration sérique en OC reflète l'activité globale du remaniement osseux. Les marqueurs de la résorption osseuse sont essentiellement représentés par les produits de la dégradation du collagène de type I, les molécules de pontage et les télopeptides associés. Le CTX-MMP (*Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases*), molécule de pontage pyridinoline liée à deux fragments télopeptidiques Carboxy-terminaux d'une chaîne de collagène I, appelé anciennement I-CTP (Price *et al.*, 1995) et le CTX-I (*Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*), octapeptide de l'extrémité C-terminale d'une chaîne de collagène I, impliqué dans la liaison avec une molécule de pontage (Kellerhouse *et al.*, 2000), ont été utilisés comme marqueurs de la résorption osseuse chez le cheval.

Le but de cette étude est de déterminer, chez le cheval, la tolérance du tiludronate et son effet à court terme sur 4 marqueurs biochimiques du métabolisme osseux. Le tiludronate est un non-aminobisphosphonate inhibant fortement la résorption osseuse et sans action sur la minéralisation (Bonjour *et al.*, 1995).



## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le protocole expérimental de cette étude a été accepté par le comité d'éthique de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon.

### Animaux

Cinq chevaux sains adultes âgés de 6 à 11 ans hongres ou femelles de race Trotteur Français ont été sélectionnés. Seuls les chevaux cliniquement sains, ne présentant aucune évidence biochimique d'atteinte hépatique (mesure sérique de la gamma-glutamyltransférase et de l'aspartate aminotransférase par dosage colorimétrique) ou rénale (mesure de la créatinine sanguine par dosage colorimétrique), ont été acceptés pour l'étude. Les animaux n'avaient pas d'antécédent de pathologie locomotrice et n'avaient jamais été traités avec des bisphosphonates. Pendant une période d'exclusion de 6 semaines et pendant toute la durée de l'essai, aucun autre traitement médical connu à ce jour comme susceptible de modifier le métabolisme osseux, n'a été autorisé tels que les anti-inflammatoires stéroïdiens (Lepage *et al.*, 1993) et non stéroïdiens ou l'anesthésie générale. L'hébergement des animaux se faisait en box de 3×4 m. L'eau était fournie *ad libitum* et l'alimentation était constituée de foin de bonne qualité, distribué en deux repas quotidiens.

### Traitement

Le tiludronate se présentait sous forme de poudre lyophilisée pour solution injectable conditionnée dans un flacon de verre contenant 50 mg de tiludronate. La conservation du produit était faite à température ambiante (lot de fabrication 145R0/2 ; date de fabrication : Octobre 1999). Le produit test était remis en solution juste avant l'administration, à l'aide de 10 mL d'eau stérile pour préparations injectables (Laboratoire Aguetant, Lyon, France).

### Protocole

Un cathéter intraveineux en polytétrafluoroéthylène (Intraflon II, Vygon, France) était mis en place stérilement pour la période du traitement dans une veine jugulaire de chaque cheval. Le traitement consistait en une perfusion unique de tiludronate à la posologie de 1 mg/kg pendant 30 minutes à J1. Le tiludronate était mis en solution à l'aide d'eau pour préparation injectable. La dose exacte en mg de tiludronate était injectée stérilement dans

une outre de 1 litre de chlorure de sodium 0,9% (Tuliflex, Laboratoire Aguetant, Lyon, France), identifiée pour chaque cheval. La quantité équivalente de chlorure de sodium 0,9% était préalablement retirée de l'outre pour conserver un volume total de 1 litre. Les traitements étaient réalisés le matin entre 9h15 et 10h19 : les durées de la perfusion étaient de 33, 29, 32, 30 et 34 minutes respectivement pour chaque cheval, pour une moyenne de 31,6 min.

### Suivi clinique

Un examen clinique était effectué au jour -1 (J-1) et au jour 1 (J1) avant le traitement, ainsi qu'au J1 +15 minutes (durant la perfusion), J1+30 min (à la fin de la perfusion), J1+2 h, J1+6 h, et J1+24 h. Les chevaux étaient gardés sous surveillance continue dans un travail de contention durant les 3 heures suivant le début de la perfusion. Chaque cheval était ensuite replacé dans son box et gardé sous surveillance médicale pendant 48 h. Chaque examen physique consistait en l'observation de l'attitude générale du cheval, la mesure de la température rectale, l'examen de l'appareil cardio-vasculaire (couleur des muqueuses, temps de remplissage capillaire, pouls facial, pouls digités, fréquence cardiaque, auscultation cardiaque bilatérale), examen de l'appareil respiratoire (fréquence et rythme), et examen de l'appareil digestif (auscultation digestive, appétit, aspect des fèces).

### Analyses biochimiques

#### *Calcium ionisé, calcium total et des protéines totales.*

Des prélèvements sanguins ont été effectués au J-1, au J1 juste avant le début du traitement, au J1+30 min. (juste après la fin de la perfusion), J1+2h, J1+6h, et J1+24h. Les prélèvements étaient réalisés par ponction à l'aiguille dans la veine jugulaire du côté opposé au cathéter, sur tube héparine lithium, conservés à +4°C après centrifugation, et analysés dans les 24 heures au laboratoire de biochimie clinique de l'école nationale vétérinaire de Lyon.

#### *Autres paramètres biochimiques sanguins*

Des mesures de la créatinine sanguine, de la gamma-glutamyltransférase sérique et de l'aspartate aminotransférase par dosage colorimétrique ont été réalisées à partir des

échantillons de plasma prélevés au J1 avant traitement et au J1+24 heures après le début du traitement.

### *Marqueurs du métabolisme osseux*

Deux marqueurs de la formation osseuse (OC et bone-ALP) et deux marqueurs de la résorption osseuse (CTX-MMP et le CTX-I) ont été étudiés. Les prélèvements sanguins ont été réalisés le matin au J1 avant traitement et au J1+24h. Les échantillons ont été prélevés dans la veine jugulaire du côté opposé au cathéter et récoltés dans des tubes EDTA/benzaminidine et des tubes secs de 10 ml. Le plasma et le sérum ont été séparés par centrifugation et les prélèvements ont été conservés à  $-30^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse.

L'OC a été dosée dans le plasma à l'aide de la trousse radioimmunologique RIA (Osteocalcin Radioimmunoassay Kit, Incstar Co) utilisant des anticorps dirigés contre l'ostéocalcine bovine et qui a été validée pour une utilisation chez le cheval (Patterson *et al.*, 1982). Le dosage de la bone-ALP a été réalisé dans le plasma par méthode immunoradiométrique IRMA à l'aide de la trousse utilisée chez l'homme (Tandem-R Ostase : Beckman-Coulter, San Diego CA) (Garnero et Delmas, 1993) dont l'utilisation a été validée chez le cheval (Jackson *et al.*, 1996). Le CTX-MMP sérique a été mesuré dans le plasma par dosage radioimmunologique RIA (I-CTP assay, Orion Diagnostica) développée pour une utilisation chez l'homme et qui a été validée chez le cheval (Price *et al.*, 1995). Le CTX-I a été dosé dans le sérum par dosage immunoenzymatique automatisé ( $\beta$  Crosslaps, Elecsys, Roche Diagnostics) utilisée pour la détection quantitative d'une séquence spécifique du collagène de type I dans le sérum humain (Garnero *et al.*, 2001) et chez le cheval (Kellerhouse *et al.*, 2000).

### Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée avec un modèle mixte à mesures répétées pour le suivi de la fréquence cardiaque, de la calcémie et de la protéinémie. Si un effet du temps existait, des tests de Wilcoxon pour échantillons appariés ont ensuite été réalisés. Pour les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux, un test statistique unilatéral non paramétrique de Wilcoxon a été effectué. L'analyse a été basée sur un intervalle de confiance calculé à 95%.

## RÉSULTATS

### Tolérance clinique du tiludronate

Aucune réaction tissulaire locale n'a été observée au cours de l'administration intraveineuse du tiludronate dans les cathéters intraveineux.

Quelques signes cliniques légers sont apparus durant les deux premières heures suivant la perfusion chez deux chevaux (101 et 102). Une heure trente après le début de la perfusion, un léger inconfort, associé à une augmentation de la fréquence cardiaque (+7 battements par minute (bpm) en moyenne) a été observé. Ces signes légers (cheval grattant le sol et se calmant à son abord) ont été de courte durée et se sont résolus spontanément en 5 et 10 minutes. Aucun autre signe anormal n'a été mis en évidence à l'examen général lors de ces manifestations.

Une augmentation similaire de la fréquence cardiaque a été notée chez les 5 chevaux. L'évolution de la fréquence cardiaque moyenne (moyenne $\pm$ écart-type) est représentée en figure 1 comparant les valeurs moyennes avant (J-1 et J1) et après administration intraveineuse de tiludronate. En moyenne, une légère augmentation de la fréquence cardiaque a été observée à +30 min et +2h (figure 1) sans différence significative dans le temps entre les échéances ( $p=0,125$ ). Le retour à une valeur de base de la fréquence cardiaque est survenu au plus tard dans les 6 heures.

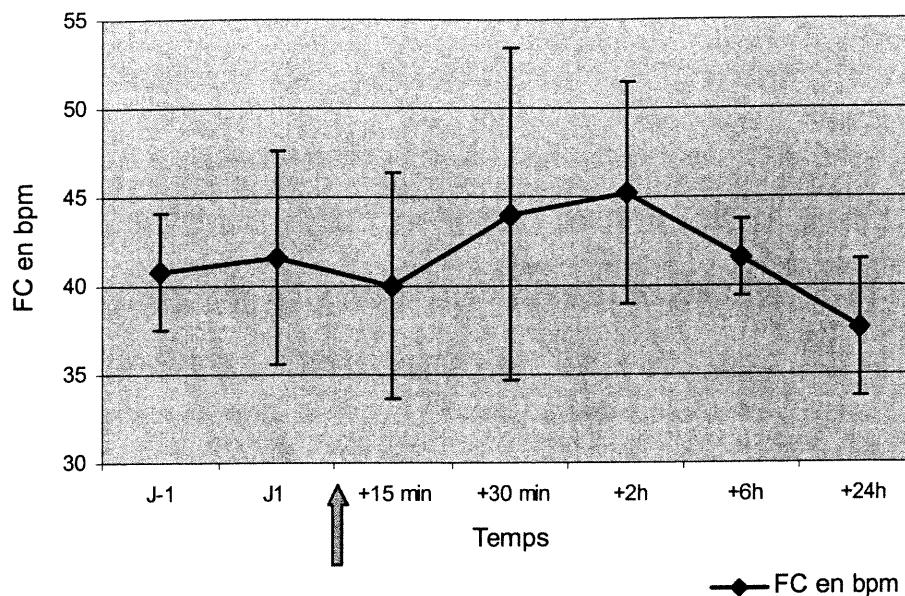


Figure 1 : Évolution de la fréquence cardiaque moyenne (FC) (moyenne±écart-type, n=5) en battements par minute (bpm), avant (J-1 et J1) et après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min. (flèche).

### Effets sur la calcémie

Chez tous les chevaux, une diminution modérée significative de la calcémie (calcium total) a été observée dès la fin de la perfusion à +30 min (jusqu'à 1.5 mmol/L chez le cheval 102 à +30 min). L'évolution des concentrations plasmatiques moyennes (moyenne±écart-type) du calcium ionisé et du calcium total est représentée en figure 2 comparant les valeurs moyennes avant (J-1 et J1) et après administration intraveineuse de tiludronate. En moyenne, une diminution de la calcémie de 2.60 mmol/L avant traitement à 2.06 mmol/l à +30 min a été notée,  $p=0.031$  (figure 2). Le retour aux valeurs de base a été noté à +2h pour 4 individus (102, 103, 104 et 105) et à +6h pour le cheval 101.

Le dosage du calcium ionisé n'a pas démontré de diminution après traitement (figure 2). Pour le cheval 101, la concentration sérique en calcium ionisé a diminué légèrement au J1 +30 min et J1 +2h (1.31 et 1.38 mmol/L) avec une très légère diminution de la

concentration du calcium total et de la concentration en protéines totales. Chez les chevaux 102, 103 et 105, la concentration sérique du calcium ionisé est demeurée stable avec une légère diminution de la concentration sérique du calcium total et une concentration sérique de protéines totales stable. Pour le cheval 104, les différentes concentrations sont restées stables, avec une très légère diminution de la concentration en calcium total et ionisé. Aucune diminution significative n'a été mise en évidence aux différentes échéances.

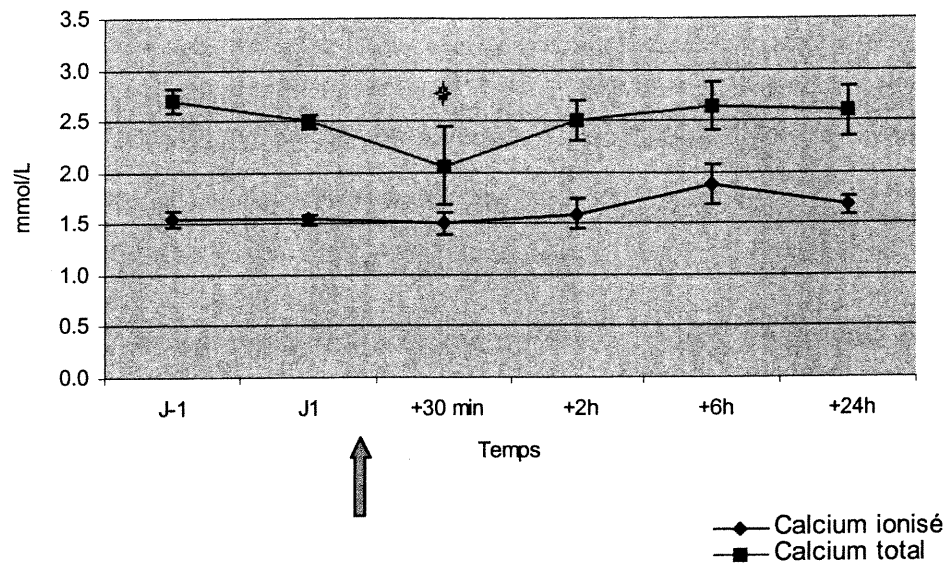


Figure 2 : Évolution des concentrations plasmatiques moyennes (moyenne ± écart-type, n=5) du calcium ionisé et du calcium total en mmol/L avant (J-1 et J1) et après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min (flèche). \* $p=0.031$  indique une différence significative entre la concentration du calcium total à +30 min par rapport à la valeur de base à J1 avant traitement.

### Effets sur la fonction rénale et hépatique

Chez tous les chevaux, les valeurs des paramètres biochimiques des fonctions hépatique (gamma-glutamyltransférase sérique et de l'aspartate aminotransférase) et rénale (créatinine sanguine) sont demeurées dans les valeurs usuelles avant et durant les 24 heures suivant le traitement.

Effets sur les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux

Aucune variation significative des marqueurs de la formation osseuse, bone-ALP ( $p=0.156$ ) et OC ( $p=0.125$ ) n'a été observée 24h après le traitement en comparaison aux valeurs initiales mesurées avant traitement au J1 (Tableau I).

Numéro	Age*	OC		bone-ALP	
		Avant	+ 24h	Avant	+ 24h
101	11	7.4	4.2	39.6	57.1
102	11	6.6	6.8	44.7	40.1
103	11	3.4	4.1	40.5	36.4
104	6	5.5	3.5	45.0	53.2
105	6	8.9	6.9	39.8	45.8

Tableau I : Évolution de la concentration plasmatique en OC (ng/mL) et en bone-ALP ( $\mu\text{g/L}$ ) avant traitement au J1 et +24h après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min pour les 5 individus étudiés, \*âge estimé en fonction de l'examen dentaire.

Aucune variation du CTX-MMP ( $p=0.5$ ) n'a été observée 24 h après le traitement en comparaison aux valeurs initiales (Tableau II). La concentration sérique du CTX-I était plus élevée chez deux chevaux de 6 ans que chez trois chevaux de 11 ans (Tableau II et figure 3). Vingt-quatre heures après le traitement, une diminution significative ( $p=0.0313$ ) et marquée  $-72.4\%$  de la concentration sérique en CTX-I a été observée chez les 5 chevaux, passant en moyenne de 0.150 ng/mL à 0.048 ng/mL (Tableau III). Chez les 2 chevaux de 6 ans, une diminution moyenne en CTX-I de 68.4% a été mesurée tandis que chez les 3 chevaux de 11 ans, une diminution moyenne de 78% a été notée (figure 3).

Numéro	Age*	CTX-MMP		CTX-I	
		Avant	+ 24h	Avant	+ 24h
101	11	5.4	4.8	0.083	0.039
102	11	5.8	6.7	0.085	0.001
103	11	5.4	7.7	0.062	0.011
104	6	9.5	8.3	0.280	0.114
105	6	9.0	7.1	0.241	0.076

Tableau II : Évolution de la concentration plasmatique en CTX-MMP ( $\mu\text{g/L}$ ) et en CTX-I ( $\text{ng/mL}$ ) avant traitement au J1 et +24 h après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min pour les 5 individus étudiés, \*âge estimé en fonction de l'examen dentaire.

	Avant	+ 24h	% de variation	<i>p</i>
	m $\pm$ ET	m $\pm$ ET	m $\pm$ ET	
<b>OC</b>	6.4 $\pm$ 2.07	5.1 $\pm$ 1.62	-15.7 $\pm$ 26.92	0.125
<b>bone-ALP</b>	41.9 $\pm$ 2.7	46.5 $\pm$ 8.67	11.4 $\pm$ 22.74	0.156
<b>CTX-MMP</b>	7 $\pm$ 2.05	6.9 $\pm$ 1.33	2.7 $\pm$ 26.21	0.5
<b>CTX-I</b>	0.15 $\pm$ 0.102	0.048 $\pm$ 0.047	-72.4 $\pm$ 18.43*	0.0313*

Tableau III : Variation des marqueurs biochimiques osseux avant traitement au J1 et +24h après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min. m=moyenne; ET=écart-type (n=5), % de variation=pourcentage de variation 24 h après traitement par rapport aux valeurs de base mesurée au J1 avant traitement et *p* = degré de significativité. \**p*=0.0313 indique une diminution significative de la concentration sérique du CTX-I +24h après traitement par rapport à la valeur de base à J1 avant traitement.



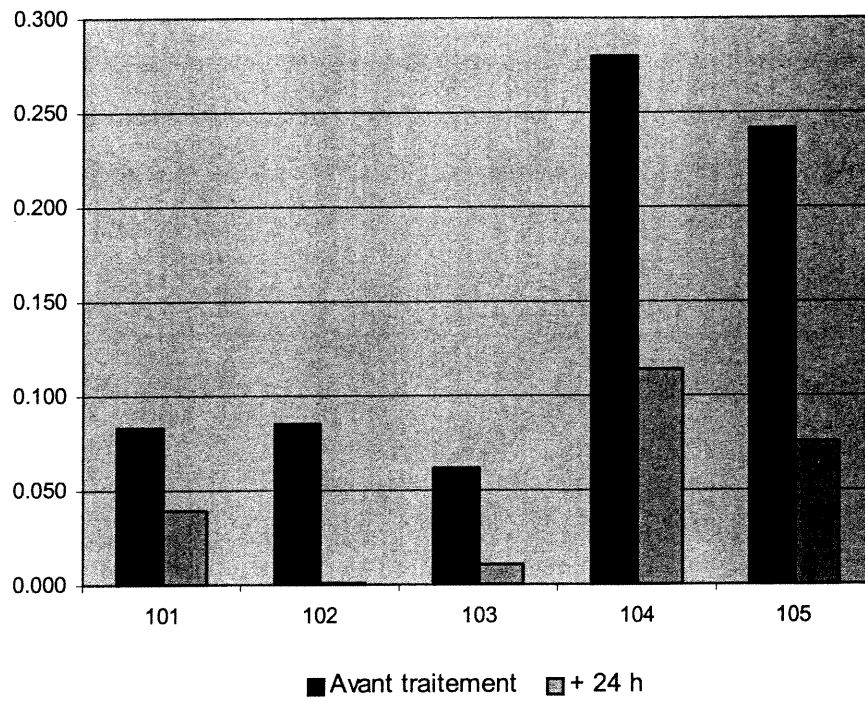


Figure 3 : Concentration sérique en CTX-I (ng/mL) avant traitement au J1 et +24h après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min pour les 5 individus étudiés.

## DISCUSSION

Le but de cette étude était d'évaluer la tolérance intraveineuse à court terme, du tiludronate chez le cheval et ses effets sur le métabolisme osseux. Seuls des chevaux adultes (de plus de 6 ans) ont été sélectionnés pour cette étude, du fait des variations importantes de certains marqueurs biochimiques osseux avec l'âge lors des 4 premières années de vie (Lepage *et al.*, 1990 ; Price *et al.*, 1995 ; Black *et al.*, 1999).

Aucune réaction tissulaire locale n'a été mise en évidence au cours de cette étude. Les réactions systémiques cliniques rapportées peuvent être considérées comme bénignes, avec un léger inconfort, une augmentation de la fréquence cardiaque et une hypocalcémie transitoires et modérées. Les augmentations de fréquence cardiaque au J1 avant traitement par rapport au J-1 observées peuvent être liées aux manipulations dans le travail de contention et à la mise en place du cathéter. Les augmentations de fréquence cardiaque observées après traitement n'ont pas été mises en relation avec l'hypocalcémie rapportée. En effet, l'augmentation de la fréquence cardiaque correspondait à une diminution du calcium total chez 4 des cinq chevaux sans que le taux de calcium ionisé ne soit diminué. Puisque la forme ionisée est la seule forme active du calcium sanguin total, l'augmentation de la fréquence cardiaque ne peut être expliquée par des effets de cet électrolyte sur la contractilité du muscle cardiaque (Rosol et Capen, 1997).

De plus toutes les valeurs de concentration sérique du calcium total et ionisé observées sur les cinq chevaux lors de l'étude sont supérieures à des valeurs d'hypocalcémie normalement associées à des signes cliniques. Chez le cheval, une hypocalcémie modérée de 1.996 mmol/L de calcium total ou 1.1976 mmol/L de calcium ionisé est bien tolérée avec des signes cardiaques modérés tels que tachycardie, arythmie et des fasciculations musculaires (Valberg et Hodgson, 1996). A 1.497 mmol/L pour le calcium total et 0.8982 mmol/L pour le calcium ionisé, on observe généralement un décubitus et des valeurs de 0.998 et 0.5988 mmol/L respectivement peuvent être fatales pour le cheval (Valberg et Hodgson, 1996).

L'hypocalcémie observée peut-être liée à l'action du produit. En effet, le tiludronate entraîne une forte inhibition de la résorption osseuse, bloquant ainsi transitoirement la réserve calcique que représente le tissu osseux (Fleisch, 1991). *In vitro*, le tiludronate

additionné à des cultures de tissus osseux inhibe la libération de calcium (Bonjour *et al.*, 1995). En découplant la résorption de la formation osseuse, le tiludronate peut induire une balance calcique positive avec un risque d'hypocalcémie. Chez les sujets pagétiques traités avec de fortes doses de tiludronate, il est rapporté une diminution significative du calcium sérique (Audran *et al.*, 1989) et chez l'homme, les bisphosphonates sont indiqués dans le traitement de l'hypercalcémie maligne (Fleish, 1991). Chez le rat, leur administration est associée à une augmentation de l'absorption intestinale de calcium (Amman *et al.*, 1993). Chez l'homme, il est recommandé de maintenir un apport calcique alimentaire normal (Amman *et al.*, 1993).

Dans notre étude, on observe une diminution transitoire du calcium total, mais pas de diminution du calcium ionisé, ce qui pourrait être lié à la libération du calcium lié aux protéines plasmatiques du fait du fort lien entre le tiludronate et les protéines plasmatiques (Sansom *et al.*, 1995). *In vitro*, le produit se lie de façon rapide et importante aux protéines plasmatiques (90%) principalement à l'albumine (Sansom *et al.*, 1995). Un processus semblable pourrait exister chez le cheval.

La formation d'une phase solide entre le tiludronate et les ions divalents tels que le calcium pourrait également expliquer l'hypocalcémie observée. En effet, la toxicité aiguë liée à l'administration de bisphosphonates est essentiellement due à la formation de complexes ou d'agrégats avec le calcium ou les ions divalents pouvant induire une hypocalcémie et une insuffisance rénale (Fleisch, 1997). Chez l'homme, la toxicité est variable et dépend de la vitesse de perfusion, qui doit être très contrôlée lors de l'administration de fortes doses de bisphosphonates (Fleisch, 1997). Il est ainsi recommandé d'administrer de grands volumes de solution. Les solutions contenant des ions divalents comme la solution de Lactate de Ringer sont à éviter (Fleisch, 1997).

Tous les prélèvements des marqueurs du métabolisme osseux ont été réalisés le matin pour minimiser les effets des changements nyctéméraux observés chez le cheval (Lepage *et al.*, 1991 ; Black *et al.*, 1999). Le suivi des marqueurs biochimiques de la formation osseuse ne montre aucune variation des concentrations sanguines en OC et en bone-ALP. Ceci pourrait être mis en relation avec le mécanisme d'action du produit (Ammann *et al.*, 1993 ; Bonjour *et al.*, 1995). Les bisphosphonates sont caractérisés par une forte activité anti-ostéoclastique directe et dans un deuxième temps, par une diminution du remaniement

osseux général par le phénomène de couplage entre résorption et formation osseuse, expliquant l'absence de diminution de la formation à court terme (Ammann *et al.*, 1993). Il est donc probable que des durées de traitement plus longues seraient nécessaires pour entraîner une diminution des paramètres de la formation osseuse. Par ailleurs, les études de tolérance *in vitro* et *in vivo* sur les modèles expérimentaux animaux et chez l'humain démontrent une marge d'innocuité thérapeutique appréciable pour le tiludronate. En effet le produit inhibe la résorption osseuse sans affecter la minéralisation et en préservant la résistance mécanique de l'os (Bonjour *et al.*, 1995).

En ce qui concerne, les marqueurs de la résorption osseuse nous n'avons pas observé de variations significatives du CTX-MMP. En médecine humaine, l'utilisation du CTX-MMP comme marqueur de la résorption osseuse est d'ailleurs controversée. En effet, chez la femme il a été montré que ce marqueur est peu sensible à l'augmentation du remodelage osseux survenant après la ménopause et qu'il ne diminue pas après traitement par des bisphosphonates, suggérant que CTX-MMP ne soit pas un marqueur spécifique de la résorption osseuse (Garnero *et al.*, 1994 ; Blumsohn *et al.*, 1995). Donc l'absence de variation observée chez le cheval dans cette étude après administration du bisphosphonate tiludronate, n'est pas un signe d'absence d'effet antirésorbant de ce médicament. Néanmoins, jusqu'à très récemment encore, le CTX-MMP était le seul marqueur sérique de la résorption osseuse pour lequel nous disposons de plusieurs études (Jackson *et al.*, 1995 ; Price *et al.*, 1997 ; Lepage *et al.*; 1998) et c'est pourquoi nous l'avons utilisé.

Le CTX-I est un marqueur de la résorption osseuse récemment utilisé chez le cheval (Kellerhouse *et al.*, 2000). Le dosage du CTX-I permet de quantifier dans le sérum des fragments du collagène de type I contenant un octapeptide spécifique des C-télopeptides impliqués dans le pontage intermoléculaire des fibres de collagène (Christau *et al.*, 1998 ; Rosenquist *et al.*, 1998). Les molécules de pontage et les télopeptides collagéniques impliquant le site de pontage sont considérés en médecine humaine comme les marqueurs les plus sensibles de la résorption notamment pour suivre l'efficacité des traitements antirésorbants comme les bisphosphonates (Garnero et Delmas, 1998). Les variations physiologiques de ces marqueurs chez le cheval ne sont pas connues, mais nous constatons dans notre étude des valeurs initiales plus élevées chez les chevaux adultes plus jeunes suggérant un métabolisme osseux plus actif. Les concentrations sériques en CTX-I sont les

plus augmentées à la ménopause chez la femme comparée aux autres marqueurs (Déoxyypyridinoline DPD) et identifient le plus grand nombre de femmes chez qui le métabolisme osseux est anormalement augmenté dans les premiers stades de la ménopause (Fink *et al.*, 2000). Chez le cheval, notre étude démontre son intérêt dans le suivi des traitements au tiludronate, avec une diminution marquée et précoce des concentrations sériques 24 heures après l'administration de tiludronate par voie intraveineuse. Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux définir l'utilisation de ce marqueur chez le cheval.

Cette étude met en évidence l'innocuité clinique du tiludronate à la posologie de 1 mg/kg en perfusion lente sur 30 min chez le cheval sain. Ce mode d'administration du tiludronate à une posologie élevée serait particulièrement indiqué en situation clinique chez le cheval car si le produit devait s'avérer efficace dans le traitement de certaines affections, ce mode d'administration éviterait des injections intraveineuses quotidiennes pendant plusieurs jours. D'autre part le tiludronate entraîne une diminution précoce et marquée des concentrations sériques en CTX, indiquant un effet inhibiteur de la résorption osseuse. Des études réalisées sur un plus grand nombre d'individus et sur des durées plus longues seront nécessaires pour évaluer les effets bénéfiques du tiludronate sur le métabolisme osseux et son intérêt dans le traitement des affections locomotrices impliquant des lésions ostéolytiques chez le cheval.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AMMANN P., RIZZOLI R., CAVERZASIO J., SHIGEMATSU T., SLOSMAN D., BONJOUR J.P. Effects of the bisphosphonate tiludronate on bone resorption, calcium balance and bone density. *J Bone Miner Res*, 1993, **8**, 1491-1498.
2. AUDRAN M., CLOCHON P., ETGHEN D., MAZIERES B., RENIER J.C. Treatment of Paget's disease of bone with (4-chloro-phenyl) thiomethylene bisphosphonate. *Clin Rheumatol*, 1989, **8**, 71-79.
3. BATHE A.P. 245 fractures in Thoroughbred racehorses: Results of a 2 year prospective study in Newmarket. *Proc Annual Am Assoc Equine Pract Conv*. 1994, p.175.
4. BLACK A., SCHOKNECHT P.A., RALSTON S.L., SHAPES S.A. Diurnal variation and age differences in biochemical markers of bone turnover in horses. *J Anim Sci*, 1999, **77**, 75-83.
5. BLUMSOHN A., NAYLOR K.E., ASSIRI A.M., EASTELL R. Different responses of biochemical markers of bone resorption to bisphosphonate therapy in Paget disease. *Clin Chem* 1995, **41**, 1592-1598.
6. BONJOUR J.P., AMMANN P., BARBIER A., CAVERZASIO J., RIZZOLI R. Tiludronate: Bone pharmacology and safety. *Bone*, 1995, **17**, 473S-477S.
7. CHRISTGAU S., ROSENQUIST C., ALEXANDERSEN P., BJARNASON N.H., RAVN P., FLEDELIUS C., HERLING C., QVIST P., CHRISTIANSEN C. Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem*, 1998, **44**, 2290-2300.
8. DELMAS P.D., EASTELL R., GARNERO P., SEIBEL M.J., STEPAN J., Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000, **11** : Suppl 6, S2-17.
9. DUCY P., DESBOIS C., BOYCE B., PINERO G., STORY B., DUNSTAN C., SMITH E., BONADIO J., GOLDSTEIN S., GUNDBERG C., BRADLEY A.,

- KARSENTY G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 1996, **382**, 448-452.
10. ESTBERG L., STOVER S.M., GARDNER I.A., DRAKE C.M., JOHNSON B., ARDANS A. High-speed exercise history and catastrophic racing fracture in thoroughbreds. *Am J Vet Res* 1996, **57**, 1549-1555.
  11. FINK E., CORMIER C., STEINMETZ P., KINDERMANS C., LE BOUC Y., SOUBERBIELLE J.C. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporos Int* 2000, **11**, 295-303.
  12. FLEISCH H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991, **42**, 919-944.
  13. FLEISCH H. Bisphosphonates in bone disease, from laboratory to the patient. 3<sup>rd</sup> edition, The Parthenon Publishing Group Eds : New York, London, 1997, 184 p.
  14. GARNERO P., DELMAS P.D. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new direct immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, **77**, 1046-1053.
  15. GARNERO P., GINEYTS E., RIOU J.P., DELMAS P.D. Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, **79**, 780-785.
  16. GARNERO P., DELMAS P.D. Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998, **27**, 303-323.
  17. GARNERO P., BOREL O., DELMAS P.D. Evaluation of a fully automated serum assay for C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen in osteoporosis. *Clin Chem* 2001, **47**, 694-702.
  18. GATTI D., ADAMI S. New bisphosphonates in the treatment of bone diseases. *Drugs Aging* 1999, **15**, 285-296.
  19. JACKSON B., WILSON A.M., EASTELL R.E., RUSSEL R.G., LANYON L.E., GOODSHIP A.E., PRICE J.S. The effects of exercise on biochemical markers of bone metabolism in the horse. *Proc Annu Meet Orthop Res Soc*, 1995, **20**, 201-234.
  20. JACKSON B., EASTELL R., RUSSEL R.G., LANYON L.E., PRICE J.S. Measurement of bone specific alkaline phosphatase in horse: a comparison of two techniques. *Res Vet Sci*, 1996, **61**, 160-164.

21. JEFFCOTT L.B., ROSSDALE P.D., FREESTONE J., FRANK C.J., TOWERS-CLARK P.F. An assessment of wastage in thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine Vet J*, 1982, **14**, 185-198.
22. KELLERHOUSE P.L., BROWN C., NEWHALL K., JUDD K., THOMPSON D. Assessment of bone resorption marker assays in Thoroughbred horses. *J Bone Miner Res*, 2000, **15** : suppl.1, 526.
23. LEPAGE O.M., FRANÇOIS R.J. Aspects microradiographiques et en microscopie de fluorescence d'une exostose expérimentale du métacarpien chez le poney Shetland et de son traitement par un bisphosphonate, l'AHPrBP (APD). Applications possibles au cheval d'arme. *Ann Med Milit Belg*, 1989, **3**, 38-44.
24. LEPAGE O.M., MARCOUX M., TREMBLAY A. Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Can J Vet Res*, 1990, **54**, 223-226.
25. LEPAGE O.M., DESCOTEAUX L., MARCOUX M., TREMBLAY A. Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Can J Vet Res*, 1991, **55**, 5-10.
26. LEPAGE O.M., LAVERTY S., MARCOUX M., DUMAS G. Serum osteocalcin concentration in horses treated with triamcinolone acetonide. *Am J Vet Res*, 1993, **54**, 1209-12.
27. LEPAGE O.M., FRANÇOIS R.J., PERRON-LEPAGE M-F. Modelage et remaniement osseux. Observations sur les os métacarpiens du poney Shetland. *Prat Vet Equine*, 1997, **29**,47-57.
28. LEPAGE O.M., HARTMANN D.J., EICHER R., UEBELHART B., TSCHUDI P. UEBELHART D. Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses. *Vet J*, 1998, **156**, 169-175.
29. LEPAGE O.M., CARSTANJEN B., UEBELHART D. Non-invasive assessment of equine bone: an update. *Vet J*, 2001, **161**, 10-22.
30. MCGUIGAN M.P., CAUVIN E., SCHRAMME M.C., PARDOE C.H., MAY S.A., WILSON A.M. A double-blind placebo-controlled trial of bisphosphonate in the treatment of navicular syndrome. *Proc Br Equine Vet Assoc Congr*, 2000, 207.
31. PATTERSON-ALLEN P., BRAUTIGAM C.E., GRINDELAND R.E., ASLING C.W., CALLAHAN P.X. A specific radioimmunoassay for osteocalcin with advantageous species crossreactivity. *Anal Biochem*, 1982, **120**, 1-7.



32. PHYSICK-SHEARD P.W., RUSSELL M. Career profile of the Canadian Standardbred. III. Influence of temporary absence from racing and season. *Can J Vet Res*, 1986, **50**, 471-478.
33. PRICE J.S., JACKSON B., EASTELL R., GOODSHIP A.E., BLUMSOHN A., WRIGHT I., STONEHAM S., LANYON L.E., RUSSELL R.G. Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine Vet J*, 1995, **27**, 201-207.
34. PRICE J.S., JACKSON B., GRAY J., WRIGHT I., HARRIS P.E., RUSSELL R.G., EASTELL R., MCILWRAIGHT C.W., RICKETTS S.W., LANYON L.E. Serum levels of molecular markers in growing horses: the effects of age, season and orthopaedic disease. *Proc Annu Meet Orthop Res Soc*, 1997, 587.
35. REGINSTER J.Y., LECART M.P., DEROISY R., SARLET N., DENIS D., ETHGEN D., COLLETTE J., FRANCHIMONT P. Prevention of postmenopausal bone loss by tiludronate. *Lancet* 1989, **2**(8678-8679), 1469-1471.
36. RIGGS C.M. Implications of bone adaptation in the thoroughbred racehorse. In : Robinson E.D. (Eds) Current therapy in equine medicine 4. W.B. Saunders Company : Philadelphia, 1997, 99-103.
37. ROSENQUIST C., FLEDELIUS C., CHRISTGAU S., PEDERSEN B.J., BONDE M., QVIST P., CHRISTIANSEN C. Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem*, 1998, **44**, 2281-2289.
38. ROSOL T.J., CAPEN C.C. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral metabolism. In : Kaneko J.J, Harvey J.W. Bruss M.L. (Eds.), Clinical biochemistry of domestics animals, 5<sup>th</sup> Ed, Academic Press : San Diego, 1997, 619-702.
39. ROSSDALE P.D., HOPES R., DIGBY N.J., OFFORD K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec*, 1985, **116**, 66-69.
40. SANSOM L.N., NECCIARI J., THIERCELIN J.F. Human pharmacokinetics of tiludronate. *Bone*, 1995, **17** : Suppl, 479S-483S.
41. STOVER S.M. Stress fractures. In : White N.A., Moore J.N. (Eds), Current techniques in equine surgery and lameness, Second Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998, 451-459.

42. TAYLOR A.K., LUEKEN S.A., LIBANATI C., BAYLINK D.J. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of bone metabolism. *Rheum Dis Clin North Am* 1994, **20**, 589-607.
43. VALBERG S.J., HODGSON D.R. Hypocalcemia in horses. In : Smith B.P. (Eds), Large animal internal medicine, Second Edition. Mosby-Year book Inc., St-Louis, 1996, 1498-1499.

**SECOND ARTICLE**

# PHARMACODYNAMIC EFFECTS OF TILUDRONATE ON EQUINE BONE: A BIOCHEMICAL STUDY.

A. VARELA<sup>1</sup>, O.M. LEPAGE<sup>2</sup>, M. DOUCET<sup>3</sup>, M. MARCOUX<sup>1</sup>, P. GARNERO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Département des sciences cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

<sup>2</sup>Département Hippique, École Nationale Vétérinaire de Lyon, E.N.V.L, Marcy l'Étoile, France,

<sup>3</sup>Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

<sup>4</sup>INSERM research unit 403 and Synarc, Lyon, France.

This research was supported by CEVA Santé Animale.

Corresponding author : Dr M. Doucet, Département de biomédecine vétérinaire, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200, rue Sicotte, St-Hyacinthe J2S 7C6, Québec, Canada. E-mail : [michele.doucet@umontreal.ca](mailto:michele.doucet@umontreal.ca)

## SUMMARY

The first objective of this study was to evaluate the clinical safety of tiludronate on bone metabolism in horses over a 4 month period. The second purpose was to verify the usefulness of a combination of biochemical bone markers to evaluate the pharmacodynamics of tiludronate in horses. Thirty-two French Trotters were divided in four groups, one placebo group and three treated groups receiving 0.1 mg/kg a day for 10 days, 1 mg/kg of tiludronate intravenously during 30 min once or twice a month respectively. In order to compare the effects of these treatments on bone metabolism plasma biochemical markers were used. Bone metabolism was evaluated before and over a 4 month period after treatment by measuring osteocalcin (OC) and bone specific alkaline phosphatase (bone-ALP) as formation markers and cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases (CTX-MMP) and carboxy-terminal cross linking telopeptide of type I collagen (CTX-I) as bone resorption markers.

No changes in formation marker concentrations were observed after treatment in all groups, while, aberrant significant differences were observed for CTX-MMP suggesting that caution is still indicated when selecting this parameter for resorption assessment in horses. Results also demonstrated that CTX-I levels showed non-interpretable marked fluctuations during the study in all groups before and after treatment.

The biochemical markers selected for in this study as indices of bone turnover for the assessment of the pharmacodynamics of tiludronate in normal healthy non-exercised horses were found to be inconclusive. However, tiludronate administration did appear to be safe, as no clinical side effects were observed and there was no evidence of impairment of bone metabolism.

## INTRODUCTION

Reduced performance, premature retirement, and temporary absences during the racing season are a cause of significant economic loss in the racehorse industry (Estberg *et al.*, 1996). Diseases of the skeleton are a major component of these losses (Bathe, 1994). Approximately 60% of all racecourse fatalities are related to fractures while less severe yet painful bone affections lead to delays in training (Riggs, 1997). The high incidence of musculoskeletal injuries in horses has highlighted the need for improved methods of assessing equine bone structure and metabolism. Focus is now made on early diagnosis of skeletal diseases, the evaluation of pharmacological agents with bone tropism, and monitoring exercise regimens in terms of skeletal adaptive responses.

Bisphosphonates are an important class of antiresorptive drugs used in the treatment of metabolic bone diseases in humans in order to increase bone mass (Fleisch, 1997). Bisphosphonates are characterized by a strong anti-osteoclastic activity (Ammann *et al.*, 1993). Because of this pharmacological property, they are considered as the treatment of choice for diseases associated with excessive bone resorption or with an imbalance in bone turnover (Fleisch, 1997) such as Paget's disease (Reginster *et al.*, 1988), malignant hypercalcemia, bone metastases (Fleisch, 1991) and osteoporosis (Reginster *et al.*, 1989). Two groups of bisphosphonates can be distinguished by their mechanisms of action. These are the nitrogen-containing bisphosphonates such as risedronate, zoledronate, ibandronate, alendronate, and pamidronate and the non nitrogen-containing bisphosphonates including clodronate, etidronate, and tiludronate (Benford *et al.*, 1999). Anti and pro-inflammatory effects of the different bisphosphonates depend on their effects on the mononuclear phagocyte system. Non-aminobisphosphonates could have potential anti-inflammatory properties. Clodronate inhibits proinflammatory cytokines (Mönkkonen *et al.*, 1994) and nitric oxide secretion from activated macrophages *in vitro* (Makkonen *et al.*, 1996) while tiludronate inhibits proinflammatory cytokines from activated macrophages *in vitro* (Mönkkonen *et al.*, 1998). Both clodronate (Österman *et al.*, 1997) and tiludronate (Barbier *et al.*, 1986) have demonstrated anti-inflammatory properties *in vivo* in experimental arthritis in animal models. By contrast, intravenous aminobisphosphonates can induce an acute inflammatory response and fever *in vivo* (Adami *et al.*, 1987). These responses appear to involve the induction of cytokine secretion (Schweitzer *et al.*, 1995) following

macrophage activation as with pamidronate *in vitro* (Sauty A *et al.*, 1996) and ibandronate in experimental arthritis (Richards *et al.*, 1999). A study in ponies revealed that pamidronate was effective in reducing the development of induced experimental bone exostosis while no signs of bone turnover toxicity were observed (Lepage and François, 1989). However, pamidronate was unsuccessful in the treatment of navicular syndrome in horses (McGuigan *et al.*, 2000).

In several animal models, bone tolerance studies indicate that tiludronate is a safe compound with an appreciable therapeutic margin since it can effectively inhibit bone resorption without reducing bone mineralization and strength (Bonjour *et al.*, 1995). In horses, tiludronate could be developed for the treatment of diseases associated with osteolytic lesions such as navicular disease, arthropathy, bone spavin, subchondral bone cysts and disuse osteopenia. Another potential indication could be stress fractures in horses where progressive microdamages are associated with localized high bone turnover (Stover, 1998). Tiludronate was recently granted a marketing authorization in the treatment of bone spavin in horses in France. Slow intravenous administration of 1 mg/kg of tiludronate was well tolerated in one study in horses with no evidence of clinically relevant adverse effects (Varela *et al.*, 2002)

New and improved non-invasive methods of assessing equine bone have been described (Lepage *et al.*, 2001). Bone matrix components or enzymes, released into the blood circulation during bone remodelling by the cells responsible for bone formation (osteoblasts) and resorption (osteoclasts) are used as biochemical markers. They provide a simple, rapid and non-invasive means of investigating bone metabolism in horses that can potentially be applied to the early diagnosis of skeletal pathology or to evaluate responses to treatment. In human medicine, their most important application is to monitor the efficacy of antiresorptive drugs (Garnero et Delmas, 1996). In horses, several studies have reported the use of biochemical markers to monitor bone metabolism in urine and in serum (Lepage *et al.*, 2001). Since there are great practical difficulties in obtaining suitable urine samples from horses especially in longitudinal studies, serum markers such as CTX-MMP (Price *et al.*, 1995a) and CTX-I (Kellerhouse *et al.*, 2000) are preferably used. To obtain a good assessment of the biphasic remodelling activity of bone, an appropriate combination of bone formation and bone resorption markers is needed and will probably provide a

powerful tool in the experimental investigation of bone metabolism, since each marker reflects a different physiological process in bone. Variations of biochemical markers depend on the age of the animals with the most significant changes seen over the first 4 years (Lepage *et al.*, 1990 ; Price *et al.*, 1995a), diurnal changes (Lepage *et al.*, 1991), and seasonal variations. From January to April, changes in OC, b-ALP and CTX-MMP are less likely (Price *et al.*, 2001). The pharmacodynamic effects on bone formation may be measured with bone specific alkaline phosphatase (bone-ALP) (Thorén-Tolling, 1988) and osteocalcin (OC) (Lepage *et al.*, 1990), a small non-collagenous protein synthesized by osteoblasts during bone formation. CTX-MMP or carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases, previously I-CTP (Price *et al.*, 1995a) and CTX-I, carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (Kellerhouse *et al.*, 2000, Varela *et al.*, 2002) products of type I collagen degradation can be used as resorption markers.

The first objective of this study was to assess clinical safety of tiludronate given intravenously following three different administration protocols in horses. The second purpose was to verify the usefulness of a combination of biochemical bone markers to evaluate the pharmacodynamics of tiludronate in horses.

## MATERIALS AND METHODS

The new international standardization of bone marker nomenclature is used in this paper (Delmas *et al.*, 2000). The experimental protocol was reviewed and approved by the Animal Care Committee of the Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, which abides by the requirements of Directive n° 86/609/EEC 24.11.86 of the European Community Council. The longitudinal study was randomised on a unicentric experimental pattern with 4 parallel groups receiving either placebo or the drug following three different administration protocols in order to compare the effects of treatment on bone metabolism.

### **Animals**

The study population was composed of thirty-two healthy adult horses (French Trotters), including twelve mares and twenty geldings aged between 4 and 16 years (mean: 9.9) and with an average body weight of  $488.9 \pm 6.8$  kg (mean  $\pm$  SD). All selected animals were declared healthy after complete physical and lameness examinations as well as



biochemical serum profiles. Blood biochemical parameters reflecting renal (creatinine) and hepatic functions (aspartate aminotransferase (AST) and  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT)) were measured by colorimetric analysis. None of the animals were under medication for at least 6 weeks prior to the start of the study (except for deworming). Horses were immunized against tetanus and equine influenza and were dewormed with ivermectin (Eqvalan<sup>®</sup>, Merial, Lyon, France) 2 weeks prior to the start of the study. All animals were kept in the same location and were maintained on pasture with marginal grazing in order to minimize dietary differences between horses. The horses were fed a standard hay diet and had *ad libitum* access to hay and water. Prior to the start of the project, all horses were maintained on other pastures for at least 2 months and accustomed to being kept in a group. Animals were confined in an examination room (with stocks) only during clinical examination, blood collection and treatments.

### **Treatments**

The tiludronate formulation was presented as a lyophilised powder for intravenous injection and packaged in a glass bottle containing 50 mg of tiludronic acid. The tested compound was reconstituted with 10 ml of sterile water. Placebo was composed of a commercial solution of sodium chloride 0.9 %. Animals were divided into four treatment groups of 8 individuals each, and allocated by age (4 to 8 years, 9 to 13 years and 14 to 16 years) then by sex (geldings and mares).

**Group 1:** Eight horses received 1 L of isotonic saline solution administered intravenously during 30 min on Day 1 (D1).

**Group 2:** Eight horses received daily 0.1 mg/kg body weight of tiludronate intravenously for 10 days (D1 to D10).

**Group 3:** Eight horses received 1 mg/kg of tiludronate in 1L saline intravenously during 30 min on D1.

**Group 4:** Eight horses received 1 mg/kg of tiludronate in 1L saline intravenously during 30 min on D1 and D29.

All treatments were administered in the morning. In Group 2, the jugular vein of each animal was catheterised after clipping and a surgical scrub using a 13-gauge polyurethane catheter (Central Venous Catheter, COOK<sup>®</sup> veterinary products, Australia). Catheters were

removed on D10 after treatment. In Groups 1, 3 and 4, the jugular vein of each subject was catheterised just prior to treatment on D1 after clipping and a surgical scrub using a 14-gauge catheter (PTFE Intraflon II, Vygon, France). At the end of the injection, the catheter was immediately removed. The same procedure was performed in Group 4 on D29. Horses were kept in stocks under continuous medical observation during perfusion. No drugs, known to modify bone metabolism or biochemical bone markers (corticosteroids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, general anesthetic agents) were administered during the study. One horse in Group 1 received 3.5 mg/kg of imidocarb on D6 and D8 to treat babesiosis.

### ***Experimental procedure***

The trial was conducted from January 23<sup>rd</sup> to May 25<sup>th</sup> 2001.

#### ***Clinical examination***

Clinical inspection of all horses was performed twice daily during the entire study. Complete clinical examination was performed before treatment at D-5 and D1 and after the start of the treatment on D6, D11, D29, D43, D57, D85 and D113. The clinical examination also included fecal evaluation and a basic lameness examination done on a hard surface.

#### ***Blood sample collection***

Samples were collected for bone marker measurements before treatment on D-5 and D1 in all groups and after the start of treatment on D6, D11, D29, D43, D57, D85 and D113. Venous blood samples were collected in the morning between 8.30 am and 11.30 am from the jugular vein contralateral to the catheterised vein, into two sterile glass tubes (one plain tube and one containing EDTA/benzaminidin). Serum samples were allowed to clot at room temperature before centrifugation. Sera and plasma were separated by centrifugation (2000 rpm at 5°C) within 2 hours after venipuncture and stored frozen at -25°C until assayed.

#### ***Biochemical bone marker analysis***

Bone metabolism was evaluated by measuring two markers of bone formation, OC and bone-ALP and two markers of bone resorption, CTX-MMP and CTX-I. Baseline serum concentrations were measured five days before treatment (D-5) and just prior to it. Mean plasma or serum concentrations for each marker in each group were measured according to the following time schedule. Osteocalcin, CTX-MMP, and CTX-I concentrations were determined on D-5 and D1 before treatment and on D6, D11, D29, D43, D57, D85 and D113 in all groups. The b-ALP was analysed on D-5 and D1 before treatment and on D6, D11, D29, D57, D85 and D113. Osteocalcin, bone-ALP and CTX-MMP measurements were assayed after completion of the 4 month study, whereas CTX-I was assessed 2 months after collection. Results were expressed as a percentage of baseline values. Osteocalcin plasma concentrations were determined in duplicate by radioimmunoassay using bovine antibodies (Osteocalcin radioimmunoassay kit, Incstar Corporation) according to the manufacturer's instructions. The bovine antibody used has been determined to cross-react with horse OC (Patterson-Allen *et al.*, 1982). Osteocalcin levels were expressed in micrograms per liter ( $\mu\text{g/L}$ ). The intra-assay coefficient of variation (CV) was  $< 6\%$ . The minimum detectable concentration was estimated to be  $0.2 \mu\text{g/L}$ . Plasma b-ALP was measured by means of a commercial immunoradiometric assay IRMA according to the manufacturer's instructions (Tandem-R Ostase, Immunotech, Belgium). The intra-assay CV was  $6.7\%$  and the inter-assay coefficient of variation was  $8.1\%$ . The minimum detectable concentration was estimated to be  $2.0 \mu\text{g/L}$ . CTX-MMP was measured in duplicate in plasma using a commercially available radioimmunoassay (I-CTP assay, Orion Diagnostica, Finland) with an antibody directed against CTX-MMP extracted from decalcified human bone (Risteli *et al.*, 1993), which was previously demonstrated to cross-react with horse CTX-MMP (Price *et al.*, 1995a). Results were expressed in  $\text{ng/mL}$ . The intra-assay CV was  $6.2\%$  and the inter-assay coefficient of variation was  $7.9\%$ . The minimum detectable concentration was estimated to be  $0.5 \mu\text{g/L}$ . Serum CTX-I was measured in duplicate using automated immunoassay ( $\beta$  Crosslaps, Elecsys, Roche Diagnostics) used for quantitative detection of a specific sequence of type I collagen in human serum. CTX-I levels were expressed as  $\text{ng/mL}$ . The intra-assay CV was  $3.1\%$  and the inter-assay coefficient of variation was  $<7\%$ . The minimum detectable concentration was estimated to be  $0.1 \text{ ng/mL}$ .

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using SAS software version 8. Initial homogeneity between groups was tested for age, sex and pre-treatment biochemical bone marker levels using one group ANOVA (treatment group). Because of intra-animal variability, data were expressed as a percentage of the individual pre-treatment values. These data were statistically analysed over time using repeated measures ANOVA including initial values as a covariable. When time to treatment group interaction was found to be significant, means were compared at each date, and when significant group differences existed, each group was compared to the others. A level of significance of 0.05 was used.

## RESULTS

Because of health problems unrelated to treatment (one major thrombophlebitis in group 2 at D85 and one phlegmon in group 3 at D102), two horses were excluded from the study.

### Tolerance of intravenous tiludronate

No adverse drug reaction was observed from the time of perfusion or initial treatment up to 4 months after the beginning of treatments.

### Bone biochemical markers

#### *Osteocalcin*

There was no significant variation in OC concentration between groups ( $p=0.19$ ) or between sex ( $p=0.81$ ) during the 4 month period ( $p=0.41$ ). No treatment or time effect was observed (Fig. 1).

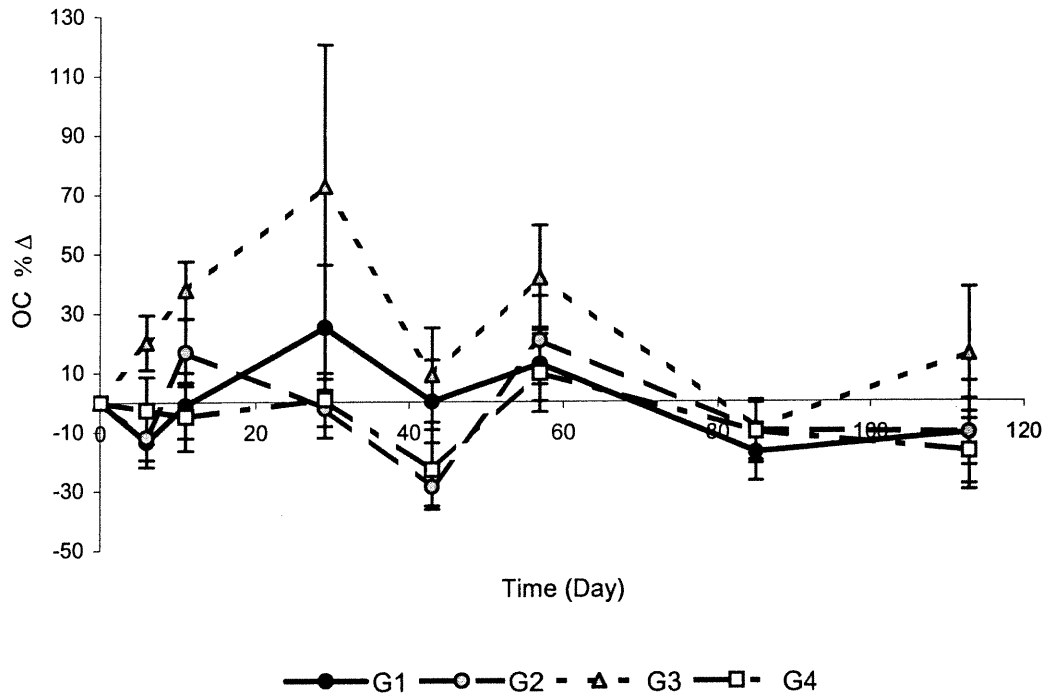


Fig. 1: Effect of tiludronate on OC from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4). Values are mean  $\pm$  SEM expressed as percent change from pre-treatment baseline values : % $\Delta$ . n=10 except in group 2 where D85 and D113 n=9 and in group 3 where D113 n=9.

### *bone-ALP*

There was no significant variation in b-ALP concentration within groups ( $p=0.72$ ) or between sex ( $p=0.19$ ) during the 4 months period ( $p=0.87$ ). In group 4, greater values were observed with a decrease at D 113, but no significant treatment or time differences were observed (Fig. 2).

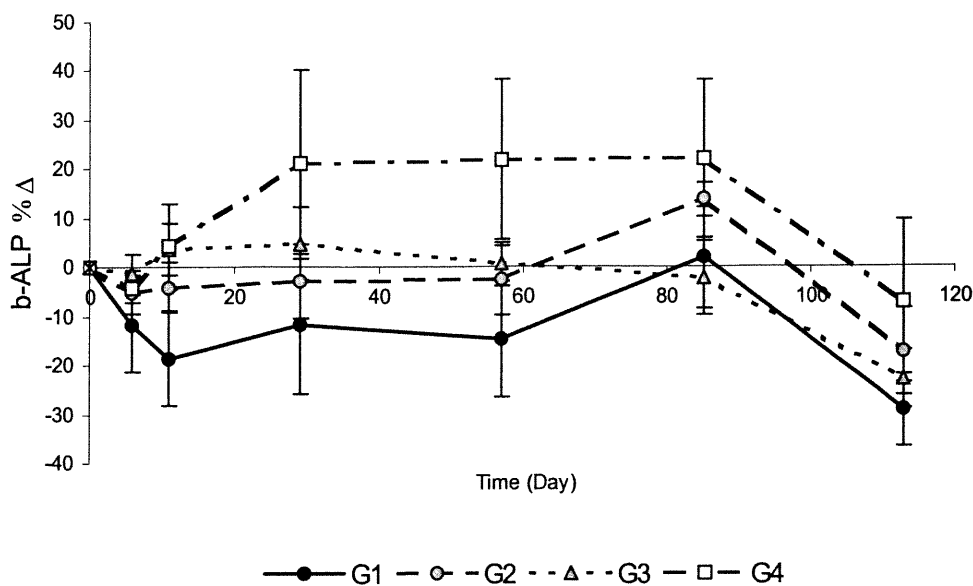


Fig. 2: Effect of tiludronate on b-ALP from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4). Values are mean  $\pm$  SEM expressed as percent change from pre-treatment baseline values : % $\Delta$ . n=10 except in group 2 where D85 and D113 n=9 and in group 3 where D113 n=9.

### *CTX-MMP*

A statistically significant time-group interaction ( $p < 0.022$ ) was observed for CTX-MMP concentrations. No significant differences were observed between sex. Significant differences were observed between groups 3 and 4 at D6 ( $p = 0.02$ ), D11 ( $p = 0.044$ ) and D43 ( $p = 0.04$ ). Marked individual variations were observed between dates (Fig. 3).

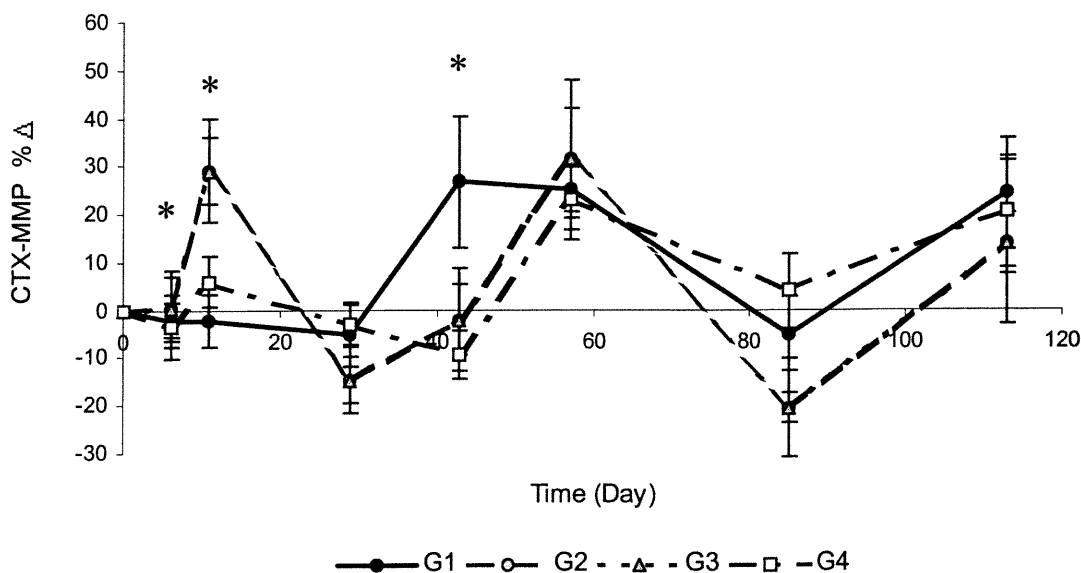


Fig. 3: Effect of tiludronate on CTX-MMP from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4). Values are mean  $\pm$  SEM expressed as percent change from pre-treatment baseline values : % $\Delta$ . n=10 except in group 2 where D85 and D113 n=9 and in group 3 where D113 n=9. \*Significant time/group interaction between group 3 and group 4.

### CTX-I

Serum CTX-I concentrations changed significantly with time and between groups ( $p < 0.0001$ ). Data on D6, D11, D29, D43, D57 and D85 showed a significant difference: between groups 3 and 4 on D6 ( $p = 0.0013$ ), on D11 ( $p = 0.019$ ) and on D29 ( $p = 0.0008$ ), between groups 1 and 3 on D29 ( $p = 0.0008$ ), between groups 1 and 2 on D43 ( $p = 0.05$ ), between groups 2 and 4 on D57 ( $p = 0.03$ ), between groups 1 and 4 and between groups 2 and 4 on D85 ( $p = 0.005$ ).

CTX levels showed marked fluctuations during the study in all groups before and after treatments (Fig. 4). In Group 1 on D43, CTX-I levels in two horses were high (0.403 and 0.329 ng/mL) resulting in a higher mean on this day ( $0.181 \pm 0.044$  ng/mL) compared to other groups on the different days (Table I).

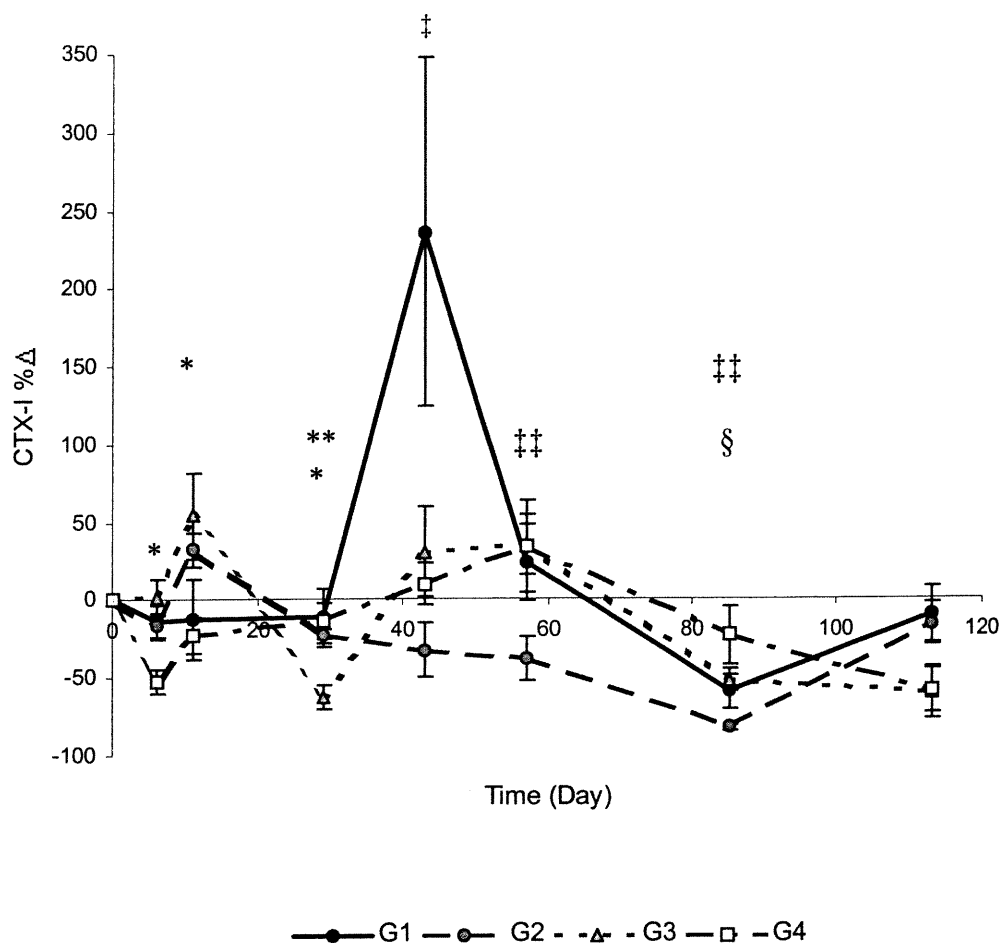


Fig. 4: Effect of tiludronate on CTX-I from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4). Values are mean  $\pm$  SEM expressed as percent change from pre-treatment baseline values : % $\Delta$ . n=10 except in group 2 where D85 and D113 n=9 and in group 3 where D113 n=9. \*Significant time/group interaction between group 3 and group 4. \*\*Significant time/group interaction between placebo (group 1) and group 3, †Significant time/group interaction between placebo (group 1) and group 2, ‡Significant time/group interaction between placebo (group 1) and group 4, ††Significant time/group interaction between group 2 and group 4.



		D-5	D1	BEFORE TX		D6	D11	D29	D43	D57	D85	D113
<b>Group 1</b>	<b>m</b>	<b>0.094</b>	<b>0.068</b>	<b>0.081</b>	<b>0.062</b>	<b>0.066</b>	<b>0.068</b>	<b>0.181</b>	<b>0.099</b>	<b>0.025</b>	<b>0.067</b>	
	SEM	0.020	0.019	0.015	0.010	0.026	0.020	0.044	0.025	0.007	0.019	
<b>Group 2</b>	<b>m</b>	<b>0.123</b>	<b>0.131</b>	<b>0.127</b>	<b>0.102</b>	<b>0.158</b>	<b>0.092</b>	<b>0.082</b>	<b>0.079</b>	<b>0.021</b>	<b>0.087</b>	
	SEM	0.022	0.026	0.022	0.016	0.024	0.013	0.022	0.020	0.005	0.016	
<b>Group 3</b>	<b>m</b>	<b>0.103</b>	<b>0.163</b>	<b>0.133</b>	<b>0.130</b>	<b>0.188</b>	<b>0.053</b>	<b>0.178</b>	<b>0.156</b>	<b>0.069</b>	<b>0.036</b>	
	SEM	0.024	0.031	0.025	0.024	0.032	0.013	0.044	0.024	0.017	0.009	
<b>Group 4</b>	<b>m</b>	<b>0.141</b>	<b>0.173</b>	<b>0.157</b>	<b>0.077</b>	<b>0.113</b>	<b>0.135</b>	<b>0.165</b>	<b>0.174</b>	<b>0.110</b>	<b>0.066</b>	
	SEM	0.021	0.034	0.027	0.019	0.019	0.026	0.029	0.020	0.028	0.028	
					*	*	*	†	††	§	††	
						**	**					

Table I: Effect of tiludronate on CTX-I from D6 to D113 in placebo group (1) and in treated groups (2, 3 and 4). Values are mean  $\pm$  SEM expressed as percent change from pre-treatment baseline values: % $\Delta$ . n=10 except in group 2 where D85 and D113 n=9 and in group 3 where D113 n=9. \*Significant time/group interaction between group 3 and group 4. \*\*Significant time/group interaction between placebo (group 1) and group 3, †Significant time/group interaction between placebo (group 1) and group 2, §Significant time/group interaction between placebo (group 1) and group 4, ††Significant time/group interaction between group 2 and group 4.

## DISCUSSION

No clinical adverse effects were observed when tiludronate was administered to horses intravenously at 1mg/kg in slow perfusion following various protocols. These findings are consistent with a preliminary experimental study also performed in horses administered the same dose (Varela *et al.*, 2002).

No significant differences in bone formation markers were observed after tiludronate administration and this may be explained by the mechanism of action of tiludronate (Bonjour *et al.*, 1995). Indeed bisphosphonates are characterized by a strong anti-osteoclastic activity combined with uncoupling bone resorption from bone formation (Ammann *et al.*, 1993). In several animal models, bone tolerance studies have indicated that tiludronate is a safe compound with an appreciable therapeutic margin since it can effectively inhibit bone resorption without reducing bone mineralization and strength (Bonjour *et al.*, 1995). This may also explain the lack of effects on bone formation markers in this study.

Statistically significant differences were observed at various time points and between various treatment groups for the bone resorption markers. The clinical and pharmacodynamic implications of these findings are not clear due to the large variability in individual results.

In recent years, CTX-MMP has been used in different equine studies to evaluate bone turnover (Price *et al.*, 1995 a and b). In this study, however, aberrant significant differences were observed. In fact, differences observed between groups 3 and 4 could not be explained by differences in treatment protocols. On D43, these groups had received the same dosage of tiludronate, since a second treatment in group 4 was performed only after sampling on D43. Some caution is still indicated in selecting CTX-MMP as a possible bone resorption marker. Indeed, in humans, the lack of response of this marker following bisphosphonates therapy in post-menopausal osteoporotic women and in Paget's disease suggest that CTX-MMP may not be a sufficiently specific marker of bone resorption (Garnero *et al.*, 1994 and Blumsohn *et al.*, 1995). Therefore the lack of CTX-MMP variation with tiludronate therapy in this study does not necessarily indicate that there is no antiresorption effect of the drug in horses.

Statistically significant variations were observed with CTX-I, but several of them may also be considered aberrant, making interpretation of results difficult. Significant differences existed between groups 3 and 4 on D6, D11 and D29, during the first four weeks where the treatment protocols were similar. Aberrant values observed in 2 horses of the placebo group, on D43 cannot be explained by any specific clinical event. High individual variability in bone biochemical markers concentrations may be due to age (Lepage *et al.*, 1990), circadian rhythm (Lepage *et al.*, 1991), seasonal variation (Price *et al.*, 2001) and level of activity (Price *et al.*, 1995b) with CTX-I increasing in confined horses (Kellerhouse *et al.*, 2000). In our study in order to control for confounding variables, all horses were housed in pens, aged between 4 and 16 years, sampled in the morning between February and May. However the effect of age, circadian rhythm and season on CTX-I concentrations are not known in horses. The pyridinoline crosslinks and telopeptides of collagen crosslinks are the most sensitive indicators of bone resorption in humans especially to monitor early the efficacy of antiresorptive drugs (Garnero and Delmas, 1996). Serum CTX-I presented the highest increase during menopause in women compared to other markers (deoxypyridinoline DPD), identified the highest rate of early menopausal women with bone turnover above the premenopausal range (Fink *et al.*, 2000) and shows a bisphosphonate treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy (Rosen *et al.*, 2000). In horses, more studies are needed to understand internal and external factors affecting CTX-I levels.

These results can raise the question of effective dosage for tiludronate with regards to bone metabolism in horses. Bone density measurements with or without different morphometric analysis based on standardized bone biopsies would have been useful to assess the actual benefit of the dosages used in this study for clinical use. Since tiludronate has been approved for use in horses in France (at a dose of 0.1 mg/kg I.V. daily for 10 days) in the treatment of bone spavin, clinical efficacy studies should have been submitted to European regulatory authorities though none have been published in the scientific literature.

Biochemical bone markers are less invasive, and less expensive than other methods of assessing bone status, such as X-Ray absorptiometry and bone biopsies often used in

human medicine to determine the efficacy of antiresorptive therapy. On the other hand, in specific cases, they may show a lack of sensitivity and specificity as in Paget's disease (De La Piedra *et al.*, 1996) for OC or Paget's disease and osteoporosis for CTX-MMP (Garnero *et al.*, 1994; Blumshon *et al.*, 1995). In horses, different studies have indicated that various markers of bone turnover are potentially applicable for detection and monitoring orthopaedic diseases (Girard *et al.*, 1997; Jackson *et al.*, 2000), and effects of training (Price *et al.*, 1995b). Because of the complex relationship between marker concentration, age, sampling time, seasonal and inter individual variability, studies in horses have been limited to longitudinal designs. Despite a series of measurements over a period of time, the intra individual variability was found to be high. Also in our study, longitudinal measurements of these biochemical markers failed to demonstrate an effect of bisphosphonates on bone metabolism in adult healthy horses.

With a lack of reliable biochemical markers in the horse, assessment of bone metabolism remains difficult in clinical veterinary medicine. In this study, biochemical bone markers were measured using assays originally developed for monitoring human metabolic bone diseases. Use of human kits for measurement of different markers is valid for equine urine and serum, but these tests are not commonly used as sensitive and specific markers of bone metabolism in equine medicine. In the future, development of polyclonal or monoclonal assays based on purified equine markers should have better sensitivity and are worthy of being investigated (Price *et al.*, 2001; Carstanjen *et al.*, 2002). It is too early to decide which bone markers will prove clinically useful, or under what circumstances. In horses, physiological and external variation must be taken into account when evaluating bone markers in research or clinical situations. These variations can be large and may interfere with expected variations due to training or antiresorptive treatment, especially if these effects are subtle.

In this study, the normal bone turnover in adult healthy non-trained horses may have limited the potential pharmacodynamic action of the drug. Tiludronate may only be effective during periods of high bone turnover such as in orthopaedic diseases or at exercise. Another difficulty is that there are no equivalent equine models for human metabolic bone diseases such as osteoporosis, Paget's disease or primary hyperparathyroidism. Bone metabolism markers have been assessed in the horse for

orthopaedic diseases such as forelimb immobility (Price *et al.*, 1992), fracture risk in racehorses (Jackson *et al.*, 2000) and in one clinical report that indicated that levels of certain markers were altered in a case of generalized osteochondritis (Girard *et al.*, 1997).

The results of this study seem to indicate that intravenous administration of tiludronate, at 1 mg/kg, as slow infusion given once or twice at 1-month intervals or at 0.1 mg/kg for 10 daily injections did not impair bone metabolism in normal horses at rest. This could represent a beneficial characteristic of tiludronate in horses, since it is essential to preserve normal adaptive mechanisms of bone to a new functional load (Lanyon, 1987). Moreover, major impairment of bone resorption could cause skeletal fragility, as reported in human osteopetrosis where bone resorption rate is severely reduced (Reynolds *et al.*, 1973).

The assessment of biochemical markers as indices of bone turnover to evaluate the pharmacodynamic effects of tiludronate treatment in normal healthy, non-exercised horses was inconclusive in this study. Results did not demonstrate that the selected biochemical bone markers were useful in the evaluation of tiludronate on bone metabolism. This study does suggest that tiludronate administration is safe, since no clinical side effects were observed and no impairment of bone metabolism was detected. Further studies are needed to evaluate the effects of tiludronate in increasing bone mineral density and/or improving bone architecture in horses using methods such as osteodensitometry (Dual Energy X-Ray Absorptiometry). Studies in horses that are affected by specific orthopedic disease would also be of interest.

## BIBLIOGRAPHY

1. ADAMI S., BHALLA A.K., DORIZZI R., MONTESANTI F., ROSINI S., SALVAGNO G., LO CASCIO V. (1987) The acute-phase response after bisphosphonate administration. *Calcified Tissue International* **41**,326-331.
2. AMMANN P., RIZZOLI R., CAVERZASIO J., SHIGEMATSU T., SLOSMAN D. AND BONJOUR J.P. (1993) Effects of the bisphosphonate tiludronate on bone resorption, calcium balance and bone density. *Journal of Bone and Mineral Research* **8**,1491-1498.
3. BARBIER A., BRELIERE J.C., REMANDET B., RONCUCCI R. (1986) Studies on the chronic phase of adjuvant arthritis: effect of SR 41319, a new diphosphonate. *Ann Rheum Dis* **45**,67-74.
4. BATHE A.P. (1994) 245 fractures in Thoroughbred racehorses: Results of a 2 year prospective study in Newmarket. *Proceeding of the 40<sup>th</sup> Annual American Association of Equine Practitioners Convention* p175.
5. BENFORD H.L., FRITH J.C., AURIOLA S., MONKKONEN J., ROGERS M.J. (1999) Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Molecular Pharmacology* **56**,131-140.
6. BLUMSOHN A., NAYLOR K.E., ASSIRI A.M., EASTELL R. (1995) Different responses of biochemical markers of bone resorption to bisphosphonate therapy in Paget disease. *Clinical Chemistry* **41**,1592-1598.
7. BONJOUR J.P., AMMANN P., BARBIER A., CAVERZASIO J. AND RIZZOLI R. (1995) Tiludronate : Bone pharmacology and safety. *Bone* **17**,473S-477S.
8. CARSTANJEN B., WATTIEZ R., AMORY H., LEPAGE O.M., REMY B. (2002) Isolement et caractérisation de l'ostéocalcine équine. *Annales de Médecine Vétérinaire* **146**,31-38.
9. DE LA PIEDRA C., RAPADO A., DIAZ DIEGO E.M., DIAZ MARTIN M.A., AGUIRRE C., LOPEZ GAVILANES E., DIAZ CURIEL M. (1996) Variable efficacy of bone remodeling biochemical markers in the management of patients with Paget's disease of bone treated with tiludronate. *Calcified Tissue International* **59**,95-99.

10. DELMAS P.D., EASTELL R., GARNERO P., SEIBEL M.J., STEPAN J. (2000) Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporosis international* **11**:Suppl 6,S2-17.
11. ESTBERG L., STOVER S.M., GARDNER I.A., DRAKE C.M., JOHNSON B., ARDANS A. (1996) High-speed exercise history and catastrophic racing fracture in thoroughbreds *American Journal of Veterinary Research* **57**,1549-1555.
12. FINK E., CORMIER C., STEINMETZ P., KINDERMANS C., LE BOUC Y., SOUBERBIELLE J.C. (2000) Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporosis international* **11**,295-303.
13. FLEISCH H. (1991) Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* **42**,919-944.
14. FLEISCH H. (1997) Biphosphonates in bone disease, from laboratory to the patient. 3d edition, The Parthenon Publishing Group, Eds (New York, London), p1-184.
15. GARNERO P., SHIH W.J., GINEYTS E., KARPF D.B., DELMAS P.D. (1994) Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **79**,1693-1700.
16. GARNERO P, DELMAS PD. (1996) New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcified Tissue International* **59**:Suppl 1,S2-9.
17. GIRARD C., LEPAGE O.M., ROSSIER Y. (1997) Multiple vertebral osteochondrosis in a foal. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **9**,436-438.
18. JACKSON B., LONNELL A.C.C., VERHEYEN K., WOOD J.L.N., EASTELL R, PRICE J.S. (2000) Can biochemical markers of bone turnover be used to predict fracture in 2-year-old thoroughbreds? 39<sup>th</sup> *British Equine Veterinary Association Congress*, p195.
19. KELLERHOUSE P.L., BROWN C., NEWHALL K., JUDD K., THOMPSON D. (2000) Assessment of bone resorption marker assays in Thoroughbred horses. *Journal of Bone and Mineral Research* **15**:suppl. 1,p526.

20. LANYON L.E. (1987) Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodelling. *Journal of Biochemistry* **20**,1083-1093.
21. LEPAGE O.M., FRANÇOIS R.J. (1989) Aspects microradiographiques et en microscopie de fluorescence d'une exostose expérimentale du métacarpien chez le poney Shetland et de son traitement par un bisphosphonate, l'AHPPrBP (APD). Applications possibles au cheval d'arme. *Annales de Médecine Militaire Belge* **3**,38-44.
22. LEPAGE O.M., MARCOUX M., TREMBLAY A. (1990) Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses : differences in serum levels with age. *Canadian Journal of Veterinary Research* **54**, 223-226.
23. LEPAGE O.M., DESCOTEAUX L., MARCOUX M., TREMBLAY A. (1991) Circadian rythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Canadian Journal of Veterinary Research* **55**,5-10.
24. LEPAGE O.M., CARSTANJEN B., UEBELHART D. (2001) Non-invasive assessment of equine bone: an update. *Veterinary Journal* **161**,10-22.
25. MCGUIGAN M.P., CAUVIN E., SCHRAMME M.C., PARDOE C.H., MAY S.A. AND WILSON A.M. (2000) A double-blind placebo-controlled trial of bisphosphonate in the treatment of navicular syndrome. *39<sup>th</sup> British Equine Veterinary Association Congress*, p207.
26. MAKKONEN N., HIRVONEN M.R., TERAVAINEN T., SAVOLAINEN K., MONKKONEN J. (1996) Different effects of three bisphosphonates on nitric oxide production by RAW 264 macrophage-like cells in vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **277**,1097-1102.
27. MÖNKKÖNEN J., PENNANEN N., LAPINJOKI S., URTTI A. (1994) Clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) inhibits LPS-stimulated IL-6 and TNF production by RAW 264 cells. *Life Sciences* **54**,229-234.
28. MÖNKKÖNEN J., SIMILA J., ROGERS M.J. (1998) Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sciences* **62**,PL95-102.
29. ÖSTERMAN T, VIRTAMO T, LAUREN L, KIPPO K, PASANEN I, HANNUNIEMI R, VAANANEN K, SELLMAN R. (1997) Slow-release clodronate



- in prevention of inflammation and bone loss associated with adjuvant arthritis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **280**,1001-1007.
30. PATTERSON-ALLEN P., BRAUTIGAM C.E., GRINDELAND R.E., ASLING C.W., CALLAHAN P.X. (1982) A specific radioimmunoassay for osteocalcin with advantageous species crossreactivity. *Analytical Biochemistry* **120**,1-7.
  31. PRICE J.S., COLWELL A, EASTELL R., GOODSHIP A.E., RUSSELL R.G.G. (1992) Urinary excretion of deoxypyridinoline as a marker of bone resorption in the thoroughbred racehorse. *Bone* **13**,279.
  32. PRICE J.S., JACKSON B., EASTELL R., GOODSHIP A.E., BLUMSOHN A., WRIGHT I, STONEHAM S., LANYON L.E., RUSSELL R.G.G. (1995a) Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine Veterinary Journal* **27**,201-207.
  33. PRICE J.S., JACKSON B., EASTELL R., WILSON A.M., RUSSELL R.G.G., LANYON L.E., GOODSHIP A.E. (1995b) The response of the skeleton to physical training : a biochemical study in horses. *Bone* **17**,221-227.
  34. PRICE J.S., JACKSON B.F., GRAY J.A., HARRIS P.A., WRIGHT I.M., PFEIFFER D.U., ROBINS S.P., EASTELL R., RICKETTS S.W. (2001) Biochemical markers of bone metabolism in growing thoroughbreds: a longitudinal study. *Research in veterinary science* **71**,37-44.
  35. REGINSTER JY, JEUGMANS-HUYNEN AM, ALBERT A, DENIS D, DEROISY R, LECART MP, FONTAINE MA, COLLETTE J, FRANCHIMONT P. (1988) Biological and clinical assessment of a new bisphosphonate, (chloro-4 phenyl) thiomethylene bisphosphonate, in the treatment of Paget's disease of bone. *Bone* **9**,349-354.
  36. REGINSTER JY, LECART MP, DEROISY R, SARLET N, DENIS D, ETHGEN D, COLLETTE J, FRANCHIMONT P. (1989) Prevention of postmenopausal bone loss by tiludronate. *Lancet* **2**,1469-1471.
  37. REYNOLDS JJ, MURPHY H, MUHLBAUER RC, MORGAN DB, FLEISCH H. (1973) Inhibition by diphosphonates of bone resorption in mice and comparison with grey-lethal osteopetrosis. *Calcified Tissue Research* **12**,59-71.
  38. RICHARDS P.J., AMOS N., WILLIAMS A.S., WILLIAMS B.D. (1999) Pro-inflammatory effects of the aminobisphosphonate ibandronate *in vitro* and *in vivo*. *Rheumatology* **38**,984-991.

39. RIGGS C.M. (1997) Implications of bone adaptation in the thoroughbred racehorse. In Robinson E.D. (Eds) Current therapy in equine medicine 4. W.B. Saunders Company : Philadelphia, 99-103.
40. RISTELI J., ELOMAA I., NIEMI S., NOVAMO A., RISTELI L. (1993) Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clinical Chemistry* **39**,635-640.
41. ROSEN HN, MOSES AC, GARBER J, ILOPUTAIFE ID, ROSS DS, LEE SL, GREENSPAN SL. (2000) Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcified Tissue International* **66**,100-103.
42. SAUTY A., PECHERSTORFER M., ZIMMER-ROTH I., FIORONI P., JUILLERAT L., MARKERT M., LUDWIG H., LEUENBERGER P., BURCKHARDT P., THIEBAUD D. (1996) Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy. *Bone* **18**,133-139.
43. SCHWEITZER D.H., OOSTENDORP-VAN DE RUIT M., VAN DER PLUIJM G., LOWIK C.W., PAPAPOULOS S.E. (1995) Interleukin-6 and the acute phase response during treatment of patients with Paget's disease with the nitrogen-containing bisphosphonate dimethylaminohydroxy-propylidene bisphosphonate. *Journal of Bone and Mineral Research* **10**,956-962.
44. STOVER S.M. (1998) Stress fractures, In White N.A. and Moore J.N. (Eds), Current techniques in equine surgery and lameness, Second Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia p451-459.
45. THORÉN-TOLLING K. (1988) Serum alkaline phosphatase isoenzymes in the horse - variation with age, training and in different pathological conditions. *Journal of veterinary medicine* **35**,13-23.
46. VARELA A., LEPAGE O.M., DOUCET M., MARCOUX M., GARNERO P.(2002) Tiludronate chez le cheval : Tolérance et effets à court terme sur le métabolisme osseux. *Annales de Médecine Vétérinaire*. In press.

**DISCUSSION CONCLUSION**

## DISCUSSION GÉNÉRALE

Le but de cette étude était d'évaluer la tolérance intraveineuse à court terme et à moyen terme, du tiludronate chez le cheval, les effets du tiludronate sur le métabolisme osseux par le dosage des marqueurs biochimiques du métabolisme osseux ainsi que l'utilité des marqueurs biochimiques du métabolisme osseux dans l'évaluation des effets pharmacodynamiques du tiludronate. Nos hypothèses de recherche étaient que le tiludronate chez le cheval serait bien tolérée par administration intraveineuse lente et que l'administration de tiludronate engendrerait une évolution significative des marqueurs biochimiques osseux dans le sens d'une balance positive, avec un effet plus important sur les marqueurs de la résorption et notamment le CTX-I.

### ***Tolérance clinique du tiludronate chez le cheval***

Lors de l'étude préliminaire, un suivi clinique et un suivi de la calcémie à court terme ont été effectués pour évaluer la toxicité aiguë du tiludronate administré par voie intraveineuse à la dose de 1 mg/kg. Aucune réaction tissulaire locale après administration intraveineuse du produit n'a été mise en évidence au cours de cette étude. Les réactions systémiques cliniques rapportées dans notre étude préliminaire peuvent être considérées comme bénignes, avec un léger inconfort, une augmentation de la fréquence cardiaque et une hypocalcémie, transitoires et modérées. Les augmentations de fréquence cardiaque, observées au J1 avant traitement par rapport au J-1 peuvent être liées aux manipulations dans le travail de contention et à la mise en place du cathéter. Les augmentations de fréquence cardiaque observées après traitement n'ont pas été mises en relation avec l'hypocalcémie rapportée. En effet, l'augmentation de la fréquence cardiaque correspondait à une diminution du calcium total chez quatre des cinq chevaux sans que le taux de calcium ionisé ne soit diminué. Puisque la forme ionisée est la seule forme active du calcium sanguin total, l'augmentation de la fréquence cardiaque ne peut être expliquée par des effets de cet électrolyte sur la contractilité du muscle cardiaque (Rosol et Capen, 1997).

De plus, toutes les valeurs de concentration sérique du calcium total et ionisé observées sur les cinq chevaux lors de l'étude sont supérieures à des valeurs d'hypocalcémie normalement associées à des signes cliniques. Chez le cheval, une

hypocalcémie modérée de 1.996 mmol/L de calcium total ou 1.1976 mmol/L de calcium ionisé est bien tolérée avec des signes cardiaques modérés tels que de la tachycardie, de l'arythmie et des fasciculations musculaires (Valberg et Hodgson, 1996). A 1.497 mmol/L pour le calcium total et 0.8982 mmol/L pour le calcium ionisé, on observe généralement un décubitus et des valeurs de 0.998 et 0.5988 mmol/L respectivement peuvent être fatales pour le cheval (Valberg et Hodgson, 1996). L'hypocalcémie observée peut-être liée à l'action du produit. En effet, le tiludronate entraîne une forte inhibition de la résorption osseuse, bloquant ainsi transitoirement la réserve calcique que représente le tissu osseux (Fleisch, 1991). *In vitro*, le tiludronate additionné à des cultures de tissus osseux inhibe la libération de calcium (Bonjour *et al.*, 1995). En découplant la résorption de la formation osseuse, le tiludronate peut induire une balance calcique positive avec un risque d'hypocalcémie. Chez les sujets pagétiques traités avec de fortes doses de tiludronate, il est rapporté une diminution significative du calcium sérique au cours du traitement (Audran *et al.*, 1989) et chez l'Homme, les bisphosphonates sont indiqués dans le traitement de l'hypercalcémie maligne (Fleish, 1991). Chez le rat, leur administration est associée à une augmentation de l'absorption intestinale de calcium (Amman *et al.*, 1993). Chez l'Homme, il est recommandé de maintenir un apport calcique alimentaire normal (Amman *et al.*, 1993). Cette recommandation pourrait être indiquée pour le cheval également.

Dans notre étude, nous observons une diminution transitoire du calcium total, mais pas de diminution du calcium ionisé, ce qui pourrait être rattaché à la libération du calcium lié aux protéines plasmatiques du fait du fort lien entre le tiludronate et les protéines plasmatiques (Sansom *et al.*, 1995). *In vitro*, le produit se lie de façon rapide et importante aux protéines plasmatiques (90%) principalement à l'albumine (Sansom *et al.*, 1995). Un processus semblable pourrait exister chez le cheval. La formation d'une phase solide entre le tiludronate et les ions divalents comme le calcium pourrait également expliquer l'hypocalcémie observée. En effet, la toxicité aiguë liée à l'administration de bisphosphonates est essentiellement due à la formation de complexes ou d'agrégats avec le calcium ou les ions divalents pouvant induire une hypocalcémie et une insuffisance rénale (Fleisch, 1997). Chez l'Homme, la toxicité est variable et dépend de la vitesse de perfusion, qui doit être très contrôlée lors de l'administration de fortes doses de bisphosphonates (Fleisch, 1997). Il est ainsi recommandé d'administrer de grands volumes de solution. Les

solutions contenant des ions divalents comme la solution de Lactate de Ringer sont à éviter (Fleisch, 1997).

A moyen terme durant quatre mois, aucune réaction clinique secondaire n'a été observée après administration intraveineuse de tiludronate à la dose de 1 mg/kg en perfusion lente sur 30 min. Ceci concorde avec les résultats de l'étude préliminaire.

### **Effets du tiludronate sur le métabolisme osseux chez le cheval**

Le suivi des marqueurs biochimiques du métabolisme osseux a été effectué à court terme (sur 24 heures) et à moyen terme (sur quatre mois) afin d'évaluer les effets du tiludronate sur le métabolisme osseux. Seuls des chevaux adultes (de plus de quatre ans) ont été sélectionnés pour cette étude, du fait des variations de certains marqueurs biochimiques osseux avec l'âge lors des quatre premières années de vie (Lepage *et al.*, 1990 ; Price *et al.*, 1995a ; Black *et al.*, 1999). Tous les prélèvements des marqueurs du métabolisme osseux ont été réalisés le matin pour minimiser les effets des changements nycthéméraux observés chez le cheval (Lepage *et al.*, 1991 ; Black *et al.*, 1999).

#### **Les marqueurs de la formation osseuse**

Le suivi des marqueurs biochimiques de la formation osseuse, OC et bone-ALP, ne montre aucune variation significative des concentrations sanguines, ni à court terme, ni à moyen terme. Ceci pourrait être mis en relation avec le mécanisme d'action du produit (Ammann *et al.*, 1993 ; Bonjour *et al.*, 1995). Les bisphosphonates sont caractérisés par une forte activité anti-ostéoclastique directe et une capacité de découpler la résorption et la formation osseuses (Ammann *et al.*, 1993), expliquant l'absence de diminution de la formation. Les études de tolérance *in vitro* et *in vivo* sur les modèles expérimentaux animaux et chez l'humain démontrent une marge d'innocuité thérapeutique appréciable pour le tiludronate. En effet, le produit inhibe la résorption osseuse sans affecter la minéralisation et en préservant la résistance mécanique de l'os (Geusens *et al.*, 1992 ; Bonjour *et al.*, 1995 ; Ohnishi *et al.*, 1997). Ceci pourrait expliquer l'absence de variation des marqueurs de la formation dans notre étude. Par ailleurs, si l'effet sur la formation osseuse est faible, les marqueurs de la formation pourraient ne pas les détecter.

### Les marqueurs de la résorption osseuse

Des différences significatives ont été observées à diverses échéances et entre différents traitements pour les marqueurs de la résorption osseuse. Les implications pharmacologiques et cliniques de ces résultats ne sont pas claires du fait d'une variabilité intra-individuelle importante. Cette variabilité individuelle importante des marqueurs du métabolisme osseux peut être due à l'âge (Lepage *et al.*, 1990), les rythmes circadiens (Lepage *et al.*, 1991), les variations saisonnières (Price *et al.*, 2001) et le niveau d'activité physique (Price *et al.*, 1995b) avec une augmentation marquée du CTX-I chez les chevaux confinés au box (Kellerhouse *et al.*, 2000). Dans notre étude afin de contrôler ces différents paramètres, les chevaux étaient libres dans des paddocks, étaient âgés de 4 à 16 ans, les prélèvements étaient effectués le matin et l'étude a été réalisée entre la fin du mois de janvier et le début du mois de mai.

### **CTX-MMP**

Dans les années précédentes, le CTX-MMP a été utilisé comme marqueur sérique de la résorption osseuse dans différentes études chez le cheval (Price *et al.*, 1995 a et b ; Lepage *et al.*; 1998). A court terme, nous n'avons pas observé de variations significatives du CTX-MMP. A moyen terme, des différences significatives aberrantes existaient entre les groupes, notamment, entre les groupes 3 et 4 qui ne peuvent être expliquées par des différences de traitement. En médecine humaine, l'utilisation du CTX-MMP comme marqueur de la résorption osseuse est d'ailleurs controversée. En effet, chez la femme il a été montré que ce marqueur est peu sensible à l'augmentation du remodelage osseux survenant après la ménopause et qu'il ne diminue pas après traitement par des bisphosphonates lors de maladie de Paget, suggérant que le CTX-MMP ne soit pas un marqueur spécifique de la résorption osseuse (Garnero *et al.*, 1994a ; Blumsohn *et al.*, 1995). Donc l'absence de variation observée chez le cheval dans cette étude après administration de tiludronate, n'est pas nécessairement un signe d'absence d'effet antirésorbant de ce médicament chez le cheval.

### **CTX-I**

Le CTX-I est un marqueur de la résorption osseuse récemment utilisé chez le cheval (Kellerhouse *et al.*, 2000). Les variations physiologiques de ce marqueur chez le cheval ne sont pas connues, mais nous constatons dans notre étude préliminaire des valeurs initiales plus élevées chez les chevaux plus jeunes suggérant un métabolisme osseux plus actif. Chez

le cheval, notre étude semble démontrer son intérêt dans le suivi des traitements au tiludronate, avec une diminution marquée et précoce des concentrations sériques 24 heures après l'administration de tiludronate à la dose de 1 mg/kg par voie intraveineuse. A moyen terme, des différences significatives ont été observées entre divers groupes et à différentes échéances, mais plusieurs d'entre elles peuvent être considérées comme aberrantes rendant l'interprétation de l'ensemble des résultats difficile. Des différences significatives existaient entre les groupes 3 et 4 au jour J6, J11 et J29, durant les quatre premières semaines où les protocoles de traitement étaient équivalents entre ces deux groupes. De la même façon, des valeurs particulièrement élevées chez deux chevaux du groupe placebo, au jour J43 n'ont pu être expliquées par un événement particulier. Une variabilité inter et intra-individuelle forte limite l'utilisation de ce marqueur. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les facteurs internes et externes de variations affectant ce marqueur et pour mieux définir son utilisation chez le cheval.

En effet, ce marqueur est largement utilisé en médecine humaine. Le dosage du CTX-I permet de quantifier dans le sérum des fragments du collagène de type I contenant un octapeptide spécifique des C-télopeptides impliqués dans le pontage intermoléculaire des fibres de collagène (Christau *et al.*, 1998 ; Rosenquist *et al.*, 1998). Les molécules de pontage et les télopeptides collagéniques impliquant le site de pontage sont considérés en médecine humaine comme les marqueurs les plus sensibles de la résorption notamment pour suivre rapidement l'efficacité des traitements antirésorbants comme les bisphosphonates (Garnero et Delmas, 1996). Les concentrations sériques en CTX-I sont les plus augmentées à la ménopause chez la femme par comparaison aux autres marqueurs (DPD) et identifient le plus grand nombre de femmes chez qui le métabolisme osseux est anormalement augmenté dans les premiers stades de la ménopause (Fink *et al.*, 2000). Lors de traitements aux bisphosphonates, ce marqueur serait le plus efficace comparé aux autres marqueurs de la résorption osseuse, avec le plus faible coefficient de variation et les variations les plus importantes après traitement aux bisphosphonates (Rosen *et al.*, 2000).

Après une diminution marquée du CTX-I à court terme, nous n'avons pas observé de diminution significative de ce marqueur dans les groupes traités à partir de sept jours dans la deuxième phase de l'étude. Ceci pourrait être lié à un effet très rapide du produit sur la concentration du CTX-I, de fait sur le métabolisme osseux, avec un retour à des



concentrations normales dès la première semaine. Cette diminution rapide des concentrations en CTX-I chez le cheval après administration de tiludronate pourrait être mise en relation avec des variations rapides de certains marqueurs osseux déjà observées chez le cheval dans d'autres conditions. Après traitement intramusculaire de triamcinolone, les concentrations sériques en OC atteignent un minimum en 24 à 48 heures (Lepage *et al.*, 1993). Après administration de dexaméthasone (IV, IM et per os), les concentrations sériques en OC atteignent un minimum en 12 à 48 heures (Goer *et al.*, 1995). Après une anesthésie générale, les concentrations en OC diminuent également dès 24 heures (Grafenau *et al.*, 1999). Dans ces différentes études, le retour aux valeurs de base était observé en 28 à 150 jours après administration de triamcinolone (Lepage *et al.*, 1993), en quatre à cinq jours après traitement à la dexaméthasone (Goer *et al.*, 1995) et en quatre jours après une anesthésie générale (Grafenau *et al.*, 1999). Selon les conditions, le retour aux valeurs de base peut être assez rapide en ce qui concerne l'OC. Le retour aux valeurs de base des concentrations sériques en CTX-I après administration d'un bisphosphonate dès la première semaine chez le cheval semblerait toutefois très rapide par rapport aux connaissances acquises chez l'homme où le retour aux valeurs de base se fait quelques mois après un traitement aux bisphosphonates (Blumsohn *et al.*, 1995 ; Rosen *et al.*, 1998 ; Rosen *et al.*, 2000 ; Garnero *et al.*, 2001b). Cette différence de réponse des marqueurs osseux chez le cheval pourrait constituer à l'avenir un champ d'étude important pour déterminer les particularités éventuelles du métabolisme osseux dans cette espèce.

### ***L'efficacité du tiludronate chez le cheval***

Les résultats de notre étude peuvent soulever la question du dosage efficace du tiludronate pour ces effets sur le métabolisme osseux chez le cheval. Des mesures de densité osseuse associées ou non à des études d'histomorphométrie basées sur des biopsies osseuses standardisées auraient été certainement utiles pour évaluer l'intérêt réel des posologies utilisées dans notre étude en vue d'une utilisation clinique. Il faut noter que le tiludronate a reçu une A.M.M. en France pour une utilisation chez le cheval (à la dose de 0.1 mg/kg/jour IV pendant 10 jours) dans le traitement de l'éparvin osseux, des études cliniques d'efficacité ont dû être soumises aux autorités européennes compétentes mais sans qu'aucune n'ait été publiée dans la littérature scientifique. Des études supplémentaires permettraient de préciser si une dose plus importante induirait des changements significatifs des marqueurs biochimiques osseux.

Dans notre étude, l'activité pharmacodynamique potentielle du tiludronate pourrait être limitée chez ces chevaux adultes normaux non entraînés pour lesquels la vitesse du renouvellement osseux est normale. Il est probable que le tiludronate ne soit efficace seulement que sur des zones de renouvellement osseux anormales. Toutefois fait qu'il n'existe pas de modèle équin des maladies métaboliques osseuses comme l'ostéoporose, la maladie de Paget ou l'hyperparathyroïdisme primaire est une difficulté. Les marqueurs du métabolisme osseux ont été évalués chez le cheval lors d'affections orthopédiques comme l'ostéoporose de non-usage lors d'immobilisation (Price *et al.*, 1992), l'évaluation du risque fracturaire chez le cheval de course (Jackson *et al.*, 2000) et un cas clinique rapporte que les concentrations de certains marqueurs étaient altérées dans un cas d'ostéochondrose généralisée (Girard *et al.*, 1997).

### **Les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux dans l'évaluation d'un bisphosphonate chez le cheval**

Les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux sont des outils non invasifs et peu onéreux particulièrement utilisés en médecine humaine pour déterminer l'efficacité des traitements antirésorbants. Chez le cheval, différentes études indiquent que certains marqueurs sont potentiellement utilisables pour la détection et le suivi d'affections orthopédiques (Price *et al.*, 1992 ; Girard *et al.*, 1997 ; Jackson *et al.*, 2000). Toutefois les variations physiologiques et externes et les variabilités inter-individuelles limitent l'utilisation de ces marqueurs à un suivi longitudinal chez le cheval. Malgré le suivi longitudinal de notre étude et le contrôle de différents paramètres, la variabilité intra-individuelle était élevée limitant l'étude des effets pharmacologiques du tiludronate sur le métabolisme osseux chez le cheval adulte sain ayant une activité physique modérée et gardé en liberté. Du fait de l'absence de marqueurs biochimiques osseux fiables chez le cheval, l'évaluation du métabolisme osseux reste un problème à résoudre en recherche clinique équine. Dans notre étude, le dosage des marqueurs a été effectué avec des trousse de dosage développées en médecine humaine pour le suivi des maladies métaboliques osseuses. L'utilisation de ces trousse a été validée chez le cheval. Le développement de trousse de dosage propre à l'espèce équine en cours devrait permettre de disposer de marqueurs équins plus sensibles et spécifiques (Price *et al.*, 2001, Carstanjen *et al.*, 2002).

## CONCLUSION

Nos travaux mettent en évidence l'innocuité clinique du tiludronate à la posologie de 1 mg/kg en perfusion lente sur 30 min en une seule administration ou en deux injections à un mois d'intervalle, ainsi que 10 injections quotidiennes à la dose de 0.1 mg/kg chez le cheval sain. Ce mode d'administration du tiludronate à une posologie de 1 mg/kg en une seule perfusion serait particulièrement indiqué en situation clinique chez le cheval car si le produit devait s'avérer efficace dans le traitement de certaines affections, ce mode d'administration éviterait des injections intraveineuses quotidiennes pendant plusieurs jours. L'administration de tiludronate à cette posologie ne compromet pas le métabolisme osseux chez le cheval adulte normal en liberté. Ceci pourrait constituer une caractéristique intéressante du tiludronate chez le cheval, puisqu'il est essentiel de préserver la capacité normale d'adaptation de l'os aux différentes charges qui lui sont appliquées (Lanyon, 1987). De plus, une inhibition majeure de la résorption osseuse normale pourrait conduire à une fragilité osseuse, comme cela est décrit lors de l'ostéopétrose humaine où le taux de résorption osseuse est sévèrement réduit (Reynolds *et al.*, 1973).

L'évaluation des marqueurs biochimiques du métabolisme osseux comme indicateurs de la vitesse du renouvellement osseux pour déterminer les effets pharmacodynamiques du tiludronate chez le cheval sain et non entraîné n'est pas concluante dans notre étude. Les résultats ne démontrent pas que les marqueurs biochimiques osseux soient utilisables pour le suivi d'un traitement au tiludronate. Notre étude montre que le tiludronate est un composé sûr, puisque aucun effet secondaire clinique n'a été observé à quatre mois, et qu'aucune inhibition marquée du métabolisme osseux n'a été détectée. D'autres études seront nécessaires pour évaluer les effets pharmacologiques du tiludronate sur la densité minérale osseuse, l'architecture osseuse du cheval en utilisant des techniques telles l'absorptiométrie biphotonique ou l'ultrasonographie quantitative. Pour l'évaluation d'un bisphosphonate, l'emploi de modèles expérimentaux équins d'affections orthopédiques spécifiques chez lesquels les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux seraient augmentés permettrait de confirmer ou non l'utilisation de ces marqueurs.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Adami S, Bhalla AK, Dorizzi R, Montesanti F, Rosini S, Salvagno G, Lo Cascio V. The acute-phase response after bisphosphonate administration. *Calcif Tissue Int* 1987, **41**(6):326-31.
2. Al-Dehaimi AW, Blumsohn A, Eastell R. Serum galactosyl hydroxylysine as a biochemical marker of bone resorption. *Clin Chem* 1999, **45**(5):676-81.
3. Ammann P, Rizzoli R, Caverzasio J, Shigematsu T, Slosman D and Bonjour JP. Effects of the bisphosphonate tiludronate on bone resorption, calcium balance and bone density. *J Bone Miner Res* 1993, **8**(12):1491-1498.
4. Audran M, Clochon P, Etghen D, Mazieres B, Renier JC. Treatment of Paget's disease of bone with (4-chloro-phenyl) thiomethylene bisphosphonate. *Clin Rheumatol*, 1989, **8**:71-79.
5. Barbier A, Breliere JC, Remandet B, Roncucci R. Studies on the chronic phase of adjuvant arthritis: effect of SR 41319, a new diphosphonate. *Ann Rheum Dis* 1986, **45**(1):67-74.
6. Barou O, Lafage-Proust MH, Martel C, Thomas T, Tirode F, Laroche N, Barbier A, Alexandre C, Vico L. Bisphosphonate effects in rat unloaded hindlimb bone loss model: three-dimensional microcomputed tomographic, histomorphometric, and densitometric analyses. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, **291**(1):321.
7. Bathe AP. 245 fractures in Thoroughbred racehorses: Results of a 2 year prospective study in Newmarket. *Proc Annual Am Assoc Equine Pract Conv* 1994, p.175.
8. Benford HL, Frith JC, Auriola S, Monkkonen J, Rogers MJ. Farnesol and geranylgeraniol prevent activation of caspases by aminobisphosphonates: biochemical evidence for two distinct pharmacological classes of bisphosphonate drugs. *Mol Pharmacol* 1999, **56**(1):131-40.
9. Black A, Schoknecht PA, Ralston SL, Shapes SA. Diurnal variation and age differences in biochemical markers of bone turnover in horses. *J Anim Sci* 1999, **77**:75-83.
10. Blumsohn A, Naylor KE, Assiri AM, Eastell R. Different responses of biochemical markers of bone resorption to bisphosphonate therapy in Paget disease. *Clin Chem* 1995, **41**(11):1592-8.

11. Bohic S, Rey C, Legrand A, Sfihi H, Rohanzadeh R, Martel C, Barbier A, Daculsi G. Characterization of the trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. *Bone* 2000, **26**(4):341-8.
12. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* 1994, **40**:2022-5.
13. Bonjour JP, Ammann P, Barbier A, Caverzasio J and Rizzoli R. Tiludronate: Bone pharmacology and safety. *Bone*, 1995, **17**(5):473S-477S.
14. Boonekamp PM, van der Wee-Pals LJ, van Wijk-van Lennep MM, Thesing CW, Bijvoet OL. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Miner* 1986, **1**(1):27-39.
15. Bounameaux HM, Schifferli J, Montani JP, Jung A, Chatelanat F. Renal failure associated with intravenous diphosphonates. *Lancet* 1983, **26**;1(8322):471.
16. Boyce RW, Paddock CL, Gleason JR, Sletsema WK, Eriksen EF. The effects of risedronate on canine cancellous bone remodeling: three-dimensional kinetic reconstruction of the remodeling site. *J Bone Miner Res* 1995, **10**(2):211-21.
17. Carstanjen B, Wattiez R, Amory H, Lepage OM, Remy B. Isolement et caractérisation de l'ostéocalcine équine. *Annal Med Vet* 2002, **146**,31-38.
18. Carstanjen B, Sulon J, Banga-Mboko H, Wattiez R, Amory H, Lepage OM, Remy B. Isolation and Radioimmunoassay Formation of Equine Osteocalcin Preliminary Results. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* 2002, **6**:8-9.
19. Chiappe A, Gonzalez G, Fradinger E, Iorio G, Ferretti JL, Zanchetta J. Influence of age and sex in serum osteocalcin levels in thoroughbred horses. *Arch Physiol Biochem* 1999, **107**(1):50-4.
20. Christgau S, Rosenquist C, Alexandersen P, Bjarnason NH, Ravn P, Fledelius C, Herling C, Qvist P, Christiansen C. Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem*, 1998, **44**(11):2290-300.
21. Davi H, Tronquet C, Caix J, Simiand J, Briot C, Berger Y, Thiercelin JF. Disposition of tiludronate (Skelid) in animals. *Xenobiotica* 1999, **29**(10):1017-31.
22. David P, Nguyen H, Barbier A, Baron R. The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J Bone Miner Res* 1996, **11**(10):1498-507.

23. De La Piedra C, Rapado A, Diaz Diego EM, Diaz Martin MA, Aguirre C, Lopez Gavilanes E, Diaz Curiel M. Variable efficacy of bone remodeling biochemical markers in the management of patients with Paget's disease of bone treated with tiludronate. *Calcif Tissue Int* 1996, **59**(2):95-9.
24. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J, Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000, **11**:Suppl 6,S2-17.
25. Denoix JM, Riccio B, Thibaud D. Evaluation de l'efficacité d'un bisphosphonate dans la traitement de boiterie associée à des lésions ostéolytiques chez le cheval. *Proc Ass Vet Equine Franc* 2001.
26. Ducy P, Desbois C, Boyce B, *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996, **382**:448-452.
27. Dumon JC, Magritte A, Body JJ. Efficacy and safety of the bisphosphonate tiludronate for the treatment of tumor-associated hypercalcemia. *Bone Miner* 1991, **15**(3):257-66.
28. Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF, Eriksen EP, Mann KG, Riggs BL. Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, **67**:741-748.
29. Endo Y, Nakamura M, Kikuchi T, Shinoda H, Takeda Y, Nitta Y, Kumagai K. Aminoalkylbisphosphonates, potent inhibitors of bone resorption, induce a prolonged stimulation of histamine synthesis and increase macrophages, granulocytes, and osteoclasts in vivo. *Calcif Tissue Int* 1993, **52**(3):248-54.
30. Estberg L, Stover SM, Gardner IA, Drake CM, Johnson B, Ardans A. High-speed exercise history and catastrophic racing fracture in thoroughbreds. *Am J Vet Res* 1996, **57**(11):1549-55.
31. Fenton JI, Orth MW, Chlebek-Brown KA, Nielsen BD, Corn CD, Waite KS, Caron JP. Effect of longeing and glucosamine supplementation on serum markers of bone and joint metabolism in yearling quarter horses. *Can J Vet Res* 1999, **63**(4):288-91.
32. Fink E, Cormier C, Steinmetz P, Kindermans C, Le Bouc Y, Souberbielle JC. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporos Int* 2000, **11**(4):295-303.

33. Fleisch H., Rusell RGG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966, **212**:901-903.
34. Fleisch H., Rusell RGG, Bisaz S., Casey PA, Mühlbauer RC. The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate *in vitro* and *in vivo*. *Calcif Tissue Res* 1968, **2**:10-10A.
35. Fleisch H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs* 1991, **42**(6):919-44.
36. Fleisch H. Bisphosphonates in bone disease, from laboratory to the patient. 3d edition, The Parthenon Publishing Group, Eds (New York, London), 1997, 184 p.
37. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998, **19**(1):80-100.
38. Fletcher KL, Topliff DR, Freeman DW, Cooper SR, Loope ML. Effects of sex and weaning on serum osteocalcin concentration in horses. *Animal Science Report*, Agricultural Experimental Station, Oklahoma State University 1998, 121-4.
39. Flora L, Hassing GS, Parfitt AM, Villanueva AR. Comparative skeletal effects of two diphosphonates in dogs. *Metab Bone Dis Rel Res* 1980, **2**:389-407.
40. Fraser WD, Stamp TC, Creek RA, Sawyer JP, Picot C. A double-blind, multicentre, placebo-controlled study of tiludronate in Paget's disease of bone. *Postgrad Med J* 1997, **73**(862):496-502.
41. Frith JC, Monkkonen J, Blackburn GM, Russell RG, Rogers MJ. Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1997, **12**(9):1358-67.
42. Garnero P, Delmas PD. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, **77**(4):1046-53.
43. Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated *in vivo* and *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1994a, **9**(2):255-64.
44. Garnero P, Shih WJ, Gineyts E, Karpf DB, Delmas PD. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1994b, **79**(6):1693-700.
45. Garnero P, Delmas PD. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1996;59 Suppl 1:S2-9.

46. Garnero P, Fledelius C, Gineyts E, Serre CM, Vignot E, Delmas PD. Decreased beta-isomerization of the C-terminal telopeptide of type I collagen alpha 1 chain in Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 1997, **12**(9):1407-15.
47. Garnero P, Darte C, Delmas PD. A model to monitor the efficacy of alendronate treatment in women with osteoporosis using a biochemical marker of bone turnover. *Bone* 1999, **24**(6):603-9.
48. Garnero P, Bianchi F, Carlier MC, Genty V, Jacob N, Kamel S, Kindermans C, Plouvier E, Pressac M, Souberbielle JC. Les marqueurs biologiques du remodelage osseux : variations pré-analytiques et recommandations pour leur utilisation. *Ann Biol Clin* 2000, **58**(6):683-704.
49. Garnero P, Borel O, Delmas PD. Evaluation of a fully automated serum assay for C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen in osteoporosis. *Clin Chem* 2001a, **47**(4):694-702.
50. Garnero P, Christgau S, Delmas PD. The bisphosphonate zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. *Bone* 2001b, **28**(5):461-464.
51. Garnero P, Delmas PD. Evaluation of an immunoassay for type I collagen alpha 1 heliocidal peptide 620-633 as a marker of bone resorption in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2001c, **16**(Suppl 1)S346.
52. Gasser AB, Morgan DB, Fleisch HA, Richelle LJ. The influence of two diphosphonates on calcium metabolism in the rat. *Clin Sci* 1972, **43**(1):31-45.
53. Gatti D, Adami S. New bisphosphonates in the treatment of bone diseases. *Drugs Aging* 1999, **15**(4):285-96.
54. Geusens P, Nijs J, Van der Perre G, Van Audekercke R, Lowet G, Goovaerts S, Barbier A, Lacheretz F, Remandet B, Jiang Y, et al. Longitudinal effect of tiludronate on bone mineral density, resonant frequency, and strength in monkeys. *J Bone Miner Res* 1992, **7**(6):599-609.
55. Girard C, Lepage OM, Rossier Y. Multiple vertebral osteochondrosis in a foal. *J Vet Diagn Invest* 1997, **9**(4):436-8.
56. Glorieux FH, Travers R, Lanoue G *et al.* Tartrate-resistant acid phosphatase levels are an index of the number but not of the activity of osteoclasts. *Bone* 1993, **16**(Suppl 1):1015.



57. Goer R, Hope E, Lauper L, Piela S, Klasen J, King V, Murphy M. Effects of glucocorticoids on serum osteocalcin concentration in horses. *Am J Vet Sci* 1995, **56**:1201-5.
58. Goodship AE, Walker PC, McNally D, Chambers T, Green JR. Use of a bisphosphonate (pamidronate) to modulate fracture repair in ovine bone. *Ann Oncol* 1994, **5**(Suppl 7):S53-5.
59. Grafenau P, Eicher R, Uebelhart B, Tschudi P, Lepage OM. General anaesthesia decreases osteocalcin plasma concentrations in horses. *Equine Vet J* 1999, **31**(6):533-6.
60. Hank A.M., Hoffmann W.E., Sanecki R.K., Schaeffer D.J., Dorner J.L. Quantitative determination of equine alkaline phosphatase isoenzymes in foal and adult serum. *J Vet Intern Med* 1993, **7**(1):20-4.
61. Hanson DA, Weis MA, Bollen AM, Maslan SL, Singer FR, Eyre DR. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption : quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J Bone Miner Res* 1992, **11**:1251-8.
62. Hiney KM, Potter GD, Gibbs PG, Bloomfield SM. Response of serum biochemical markers of bone metabolism to training in the juvenile racehorse. *J Equine Vet Sc* 2000, **20**(12):851-857.
63. Hoekstra KE, Nielsen BD, Orth MW, Rosenstein DS, Schott HC 2nd, Shelle JE. Comparison of bone mineral content and biochemical markers of bone metabolism in stall- vs. pasture-reared horses. *Equine Vet J Suppl* 1999, **30**:601-4.
64. Hope E, Johnston S.D., Hegstad R.L. *et al.* Effects of sample collection and handling on concentration of osteocalcin in equine serum. *Am J Vet Res* 1993, **54**:1017-20.
65. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, Mundy GR, Boyce BF. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995, **10**(10):1478-87.
66. Jackson B, Eastell R, Russel RG, Lanyon LE, Price JS. Measurement of bone specific alkaline phosphatase in horse: a comparison of two techniques. *Res Vet Sci* 1996, **61**(2):160-4.
67. Jackson B, Eastell RE, Wilson AM, Lanyon LE, Goodship AE, Price JS. The effect of exercise on biochemical markers of bone metabolism and insulin-like growth factor-I in two-year-old thoroughbreds. *J Bone Miner Res* 1998, **13**:521.

68. Jackson B, Lonnell ACC, Verheyen K, Wood JLN, Eastell R, Price JS. Can biochemical markers of bone turnover be used to predict fracture in 2-year-old thoroughbreds? *Proc Br Equine Vet Assoc Congr*, 2000, 195.
69. Jaechke G. Routine determination of free hydroxyproline in horse serum. Methods and normal values. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe A*. 1975, **22**:89-101.
70. Jeffcott LB, Rossdale PD, Freestone J, Frank CJ, Towers-Clark PF. An assessment of wastage in thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine Vet J* 1982, **14**(3):185-98.
71. Julen Day TR, Potter GD, Morris EL, Greene LW, Simmons JB. Physiologic and skeletal response to exogenous equine somatotropin (eST) in two-year-old Quarter Horse in race training. *J Equine Vet Sci* 1998, **18**:321-328.
72. Jung A, Bisaz S, Fleisch H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calcif Tissue Res* 1973, **11**(4):269-80.
73. Karmatschek M, Maier I, Seibel MJ, Woitge HW, Ziegler R, Armbruster FP. Improved purification of human bone sialoprotein and development of a homologous radioimmunoassay. *Clin Chem* 1997, **43**(11):2076-82.
74. Keegan KG, Wilson DA, Lattimer JC, Twardock AR, Ellersieck MR. Scintigraphic evaluation of <sup>99m</sup>Tc-methylene diphosphonate uptake in the navicular area of horses with lameness isolated to the foot by anesthesia of the palmar digital nerves. *Am J Vet Res* 1996, **57**(4):415-21.
75. Kellerhouse PL, Brown C, Newhall K, Judd K, Thompson D. Assessment of bone resorption marker assays in Thoroughbred horses. *J Bone Miner Res* 2000, **15**(suppl. 1):p526.
76. Koblik PD, Hornof WJ, Seeherman HJ. Scintigraphic appearance of stress-induced trauma of the dorsal cortex of the third metacarpal bone in racing Thoroughbred horses: 121 cases (1978-1986). *J Am Vet Med Assoc* 1988, **192**(3):390-5.
77. Koike T, Inui K, Uehara K, Tomita M, Yamano Y. Preclinical profile of bisphosphonates for cartilage metabolism. *J Bone Miner Res* 2000, **15**(suppl. 1):pS243.
78. Kraenzlin M, Lau KHW, Liang L. Development of an immunoassay for human serum osteoclastic tartrate-resistant phosphatase. *J Clin Endocrinol Metab* 1990, **71**:442-51.
79. Lanyon LE. Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodelling. *Journal of Biochemistry* 1987, **20**:1083-1093.

80. Lepage OM, François RJ. L'emploi d'un bisphosphonate (APD) dans la prévention des exostoses chez le poney Shetland. Etude préliminaire. *Ann Méd Vét* 1988, **132**:391-9.
81. Lepage OM, François RJ. Aspects microradiographiques et en microscopie de fluorescence d'une exostose expérimentale du métacarpien chez le poney Shetland et de son traitement par un bisphosphonate, l'AHPPrBP (APD). Applications possibles au cheval d'arme. *Ann Med Milit Belg* 1989, **3**:38-44.
82. Lepage OM. Dosage de l'ostéocalcine sérique chez le cheval standardbred. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, 1990, 95p.
83. Lepage OM, Marcoux M, Tremblay A. Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1990, **54**, 223-226.
84. Lepage O.M., Descoteaux L., Marcoux M., Tremblay A. Circadian rythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Can J Vet Res*, 1991, **55**:5-10.
85. Lepage OM, Marcoux M, Tremblay A, Dumas G. Sex does not influence serum osteocalcin levels in standardbred horses of different ages. *Can J Vet Res* 1992, **56**(4):379-81.
86. Lepage OM, Laverty S, Marcoux M, Dumas G. Serum osteocalcin concentration in horses treated with triamcinolone acetonide. *Am J Vet Res* 1993, **54**(8):1209-12.
87. Lepage OM, François RJ, Perron-Lepage M-F. Modelage et remaniement osseux. Observations sur les os métacapiens du poney Shetland. *Prat Vet Equine* 1997a, **29**(1);47-57.
88. Lepage OM, Eicher R, Uebelhart B, Tschudi P. Influence of type and breed of horse on serum osteocalcin concentration and evaluation of the applicability of bovine RIA and a human IRMA. *Am J Vet Res* 1997b, **58**:574-8.
89. Lepage OM, Hartmann DJ, Eicher R, Uebelhart B, Tschudi P, Uebelhart D. Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses. *Vet J*. 1998, **156**(3):169-75.
90. Lepage OM, Carstanjen B, Uebelhart D. Non-invasive assessment of equine bone: an update. *Vet. J*. 2001, **161**:10-23.
91. Li C, Mori S, Li J, Kaji Y, Akiyama T, Kawanishi J, Norimatsu H. Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *J Bone Miner Res* 2001, **16**(3):429-36.

92. Liberman UA, Weiss SR, Broll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, Rodriguez-Portales J, Downs RW Jr, Dequeker J, Favus M. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med* 1995, **333**(22):1437-43.
93. Mäenpää PE, Pirskanen A, Koskinen E. Biochemical indicators of bone formation in foals after transfer from pasture to stables for the winter months. *Am J Vet Res* 1988, **49**(11):1990-2.
94. Mäkkönen N, Hirvonen MR, Teravainen T, Savolainen K, Monkkonen J. Different effects of three bisphosphonates on nitric oxide production by RAW 264 macrophage-like cells in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, **277**(2):1097-102.
95. McGuigan MP, Cauvin E, Schramme MC, Pardoe CH, May SA and Wilson AM. A double-blind placebo-controlled trial of bisphosphonate in the treatment of navicular syndrome. *Proc Br Equine Vet Assoc Congr*, 2000, 207.
96. Melick RA, Farrugia W, Heaton CL, Quelch KJ, Scoggins BA, Wark JD. The metabolic clearance rate of osteocalcin in sheep. *Calcif Tissue Int* 1988, **42**(3):185-90.
97. Mönkkönen J, Pennanen N, Lapinjoki S, Urtti A. Clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) inhibits LPS-stimulated IL-6 and TNF production by RAW 264 cells. *Life Sci* 1994, **54**(14):229-34.
98. Mönkkönen J, Simila J, Rogers MJ. Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sci* 1998, **62**(8):PL95-102.
99. Murakami H, Nakamura T, Tsurukami H, Abe M, Barbier A, Suzuki K. Effects of tiludronate on bone mass, structure, and turnover at the epiphyseal, primary, and secondary spongiosa in the proximal tibia of growing rats after sciatic neurectomy. *J Bone Miner Res* 1994, **9**(9):1355-64.
100. Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T. A possible mechanism of the specific action of bisphosphonates on osteoclasts: tiludronate preferentially affects polarized osteoclasts having ruffled borders. *Bone* 1995, **17**(2):137-44.
101. Neer RM. Skeletal safety of tiludronate. *Bone* 1995, **17**(5 Suppl):501S-503S.

102. Ohnishi H, Nakamura T, Narusawa K, Murakami H, Abe M, Barbier A, Suzuki K. Bisphosphonate tiludronate increases bone strength by improving mass and structure in established osteopenia after ovariectomy in rats. *Bone* 1997, **21**(4):335-43.
103. Österman T, Virtamo T, Lauren L, Kippo K, Pasanen I, Hannuniemi R, Vaananen K, Sellman R. Slow-release clodronate in prevention of inflammation and bone loss associated with adjuvant arthritis. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, **280**(2):1001-7.
104. Patterson-Allen P, Brautigam CE, Grindeland RE, Asling CW, Callahan PX. A specific radioimmunoassay for osteocalcin with advantageous species crossreactivity. *Anal Biochem* 1982, **120**:1-7.
105. Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA. Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *J Orthop Res* 1996, **14**(1):74-9.
106. Physick-Sheard PW, Russell M. Career profile of the Canadian Standardbred. III. Influence of temporary absence from racing and season. *Can J Vet Res* 1986, **50**(4):471-8.
107. Porr CA, Kronfeld DS, Lawrence LA, Pleasant RS, Harris PA. Deconditioning reduces mineral content of third metacarpal bone in horses. *J Anim Sci* 1998, **76**:1875-1879.
108. Price PA, Baukol SA. 1,25-dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1980, **255**:12760-12766.
109. Price JS, Colwell A, Eastell R, Goodship AE, Russell RGG. Urinary excretion of deoxypyridinoline as a marker of bone resorption in the thoroughbred racehorse. *Bone* 1992, **13**:279.
110. Price JS, Jackson B, Eastell R, Goodship AE, Blumsohn A, Wright I, Stoneham S, Lanyon LE, Russell RG. Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine Vet J* 1995a, **27**(3):201-7.
111. Price JS, Jackson B, Eastell R, Wilson AM, Russell RGG, Lanyon LE, Goodship AE. The reponse of the skeleton to physical training : a biochemical study in horses. *Bone*, 1995b, **17**(3):221-227.
112. Price JS, Jackson B, Gray J, Wright I, Harris PE, Russell RG, Eastell R, McIlwraith CW, Ricketts SW, Lanyon LE. Serum levels of molecular markers in growing horses: the effects of age, season and orthopaedic disease. *Proc Annu Meet Orthop Res Soc*, 1997, 587.

113. Price JS, Jackson BF, Gray JA, Harris PA, Wright IM, Pfeiffer DU, Robins SP, Eastell R, Ricketts SW. Biochemical markers of bone metabolism in growing thoroughbreds: a longitudinal study. *Res Vet Sci* 2001, **71**(1):37-44.
114. Reginster JY, Jeugmans-Huynen AM, Albert A, Denis D, Deroisy R, Lecart MP, Fontaine MA, Collette J, Franchimont P. Biological and clinical assessment of a new bisphosphonate, (chloro-4 phenyl) thiomethylene bisphosphonate, in the treatment of Paget's disease of bone. *Bone* 1988, **9**(6):349-54.
115. Reginster JY, Lecart MP, Deroisy R, Sarlet N, Denis D, Ethgen D, Collette J, Franchimont P. Prevention of postmenopausal bone loss by tiludronate. *Lancet* 1989, **2**(8678-8679):1469-71.
116. Reginster JY, Colson F, Morlock G, Combe B, Ethgen D, Geusens P. Evaluation of the efficacy and safety of oral tiludronate in Paget's disease of bone. A double-blind, multiple-dosage, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 1992, **35**(8):967-74.
117. Reynolds JJ, Murphy H, Muhlbauer RC, Morgan DB, Fleisch H. Inhibition by diphosphonates of bone resorption in mice and comparison with grey-lethal osteopetrosis. *Calcif Tissue Res* 1973, **12**(1):59-71.
118. Richards PJ, Amos N, Williams AS, Williams BD. Pro-inflammatory effects of the aminobisphosphonate ibandronate in vitro and in vivo. *Rheumatology* 1999, **38**(10):984-91.
119. Riggs CM. Implications of bone adaptation in the thoroughbred racehorse. In Robinson E.D. (Eds) Current therapy in equine medicine 4. W.B. Saunders Company : Philadelphia, 1997,99-103.
120. Risteli J, Niemi S, Elomaa I, Ristelli L. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clin Chem* 1993, **39**:635-40.
121. Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Monkkonen J, Auriola S, Chilton KM, Russell RG. Molecular mechanisms of action bisphosphonates. *Bone* 1999, **24**:73S-79S.
122. Rohanizadeh R, LeGeros RZ, Bohic S, Pilet P, Barbier A, Daculsi G. Ultrastructural properties of bone mineral of control and tiludronate-treated osteoporotic rat. *Calcif Tissue Int* 2000, **67**(4):330-6.

123. Rosen H, Moses A, Garber J, Ross D, Lee S, Greenspan S. Utility of biochemical markers of bone turnover in the follow-up of patients treated with bisphosphonates. *Calcif Tissue Int* 1998, **63**:363-8.
124. Rosen HN, Moses AC, Garber J, Iloputaife ID, Ross DS, Lee SL, Greenspan SL. Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif Tissue Int* 2000, **66**(2):100-3.
125. Rosenquist C, Fledelius C, Christgau C, *et al.* Serum crosslaps one step Elisa : first application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem* 1998, **44**:2281-9.
126. Rosol TJ, Capen CC. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral metabolism. In Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5<sup>th</sup> Ed, Academic Press: San Diego, 1997, 619-702.
127. Rosedale PD, Hopes R, Digby NJ, offord K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet Rec* 1985, **116**(3):66-9.
128. Sansom LN, Necciari J, Thiercelin JF. Human pharmacokinetics of tiludronate. *Bone* 1995, **17**(5 Suppl):479S-483S.
129. Sauty A, Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I, Fioroni P, Juillerat L, Markert M, Ludwig H, Leuenberger P, Burckhardt P, Thiebaud D. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy. *Bone* 1996, **18**(2):133-9.
130. Schenk R, Merz WA, Muhlbauer R, Russell RG, Fleisch H. Effect of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphate (EHDP) and dichloromethylene diphosphate (Cl 2 MDP) on the calcification and resorption of cartilage and bone in the tibial epiphysis and metaphysis of rats. *Calcif Tissue Res* 1973, **11**(3):196-214.
131. Schweitzer DH, Oostendorp-van de Ruit M, Van der Pluijm G, Lowik CW, Papapoulos SE. Interleukin-6 and the acute phase response during treatment of patients with Paget's disease with the nitrogen-containing bisphosphonate dimethylaminohydroxypropylidene bisphosphonate. *J Bone Miner Res* 1995 **10**(6):956-62.

132. Schwietert HR, Peeters PA, Dingemanse J, Thiercelin JF, Necciari J, de Bruin H, Jonkman JH Multiple dose pharmacokinetics of tiludronate in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 1996, **51**(2):175-81.
133. Seibel MJ, Woitge HW, Pecherstorfer M, Karmatschek M, Horn E, Ludwig H, Armbruster FP, Ziegler R. Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, **81**(9):3289-94.
134. Smith SM, Nillen JL, LeBlanc A, *et al.* Collagen cross-link excretion during space flight and bed rest. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, **83**:3584-91.
135. Stover S.M. Stress fractures, In White N.A. and Moore J.N. (Eds), Current techniques in equine surgery and lameness, Second Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia 1998, 451-459.
136. Taylor AK, Lueken SA, Libanati C, Baylink DJ. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of bone metabolism. *Rheum Dis Clin North Am* 1994, **20**(3):589-607.
137. Thibaud D, Denoix JM, Riccio B, Tapprest J. Etude de l'efficacité d'un bisphosphonate dans le traitement du syndrome naviculaire dans un essai clinique contrôlé en double aveugle versus placebo. *Proc Ass Vet Eq Franç* 2001.
138. Thorén-Tolling K. Serum alkaline phosphatase isoenzymes in the horse - variation with age, training and in different pathological conditions. *J Vet Med* 1988, **35**:13-23.
139. Todhunter RJ, Altman NS, Kallfelz FA, Nersesian P, Lust G. Use of scintimetry to assess effects of exercise and polysulfated glycosaminoglycan on equine carpal joints with osteochondral defects. *Am J Vet Res* 1993, **54**(7):997-1006.
140. Tokuda H, Kozawa O, Harada A, Uematsu T. Tiludronate inhibits interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of phospholipase D activation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem* 1998, **69**(3):252-9.
141. Tsuchimoto M, Azuma Y, Higuchi O, Sugimoto I, Hirata N, Kiyoki M, Yamamoto I. Alendronate modulates osteogenesis of human osteoblastic cells in vitro. *Jpn J Pharmacol* 1994, **66**(1):25-33.
142. Uebelhart D, Demiaux-Domenech B, Roth M, Chantaine A. Bone metabolism in spinal cord injured individuals and in others who have prolonged immobilisation. A review. *Paraplegia* 1995, **33**:669-673.



143. Uhlhorn H, Eksell P, Carlsten J. Scintigraphic characterization of distal radial physal closure in young Standardbred racehorses. *Vet Radiol Ultrasound* 2000, **41**(2):181-6.
144. Valberg SJ and Hodgson DR. Hypocalcemia in horses, In Smith BP (Eds), Large animal internal medicine, Second Edition. Mosby-Year book Inc., St-Louis, 1996, 1498-1499.
145. Van Beek E, Hoekstra M, van de Ruit M, Lowik C, Papapoulos S. Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. *J Bone Miner Res* 1994, **9**(12):1875-82.
146. Van der Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Wee-Pals L, Lowik C, Papapoulos S. Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrices in vitro. *J Clin Invest* 1996, **98**(3):698-705.
147. Van Gelder JM, Breuer E, Schlossman A, Ornoy A, Monkkonen J, Simila J, Klenner T, Stadler H, Krempien B, Patlas N, Golomb G. In vitro and in vivo effects of tetrakisphosphonates on bone resorption, tumor osteolysis, ectopic calcification, and macrophages. *J Pharm Sci* 1997, **86**(3):283-9.
148. Varela A., Lepage O.M., Doucet M., Marcoux M., Garnero P. Tiludronate chez le cheval : Tolérance et effets à court terme sur le métabolisme osseux. *Annales de Médecine Vétérinaire* 2002, In press.
149. Vitté C, Fleisch H, Guenther HL. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology* 1996, **137**(6):2324-33.
150. Wallace J, Cuneo R, Lundberg PA, et al. Responses of markers of bone and collagen turnover to exercise, growth hormone (GH) administration, and GH withdrawal in trained adult males. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**:124-33.
151. Weitz, Benham P, Leung SS. Total deoxypyridinoline in serum and urine as measured by a novel adaptation of the Pylinks-D enzyme immunoassay. *J Bone Miner Res* 1999, **14**(suppl.1):371.
152. Werhaya G, Klein F, Guillemin F, Leclère J. L'ostéoporose cortisonique de l'adulte. *Presse Méd* 1998, **27**:1641-6.
153. Woitge W, Friedmann B, Suttner S, et al. Changes in bone turnover induced by aerobic and anaerobic exercise in young males. *J Bone Miner Res* 1998, **13**:1797-804.
154. Woitge HW, Scheidt-Nave C, Kissling C, et al. Seasonal variation of biochemical indexes of bone turnover : results of a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998b, **83**:68-75.