

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**CONCENTRATION SYNOVIALE ET PLASMATIQUE
DE DICLOFÉNAC APRÈS SON UTILISATION
TOPIQUE ET ORALE CHEZ LE CHEVAL**

par

Marissa Bolduc

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

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

Avril, 2008

© Marissa Bolduc, 2008

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**CONCENTRATION SYNOVIALE ET PLASMATIQUE DE DICLOFÉNAC APRÈS
SON UTILISATION TOPIQUE ET ORALE CHEZ LE CHEVAL**

Présenté par :

Marissa Bolduc

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Alexander de Oliveira El Warrak, président-rapporteur

Sophie Morisset, directeur de recherche

Marcel Marcoux, membre du jury



Résumé

L'utilisation topique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) pourrait être une alternative à leur administration orale pour le traitement de l'ostéoarthrite (OA). Les objectifs de ce projet étaient de déterminer la concentration synoviale et plasmatique de diclofénac chez le cheval après son application topique répétée, après son administration orale répétée, et finalement de comparer les résultats obtenus suivant les deux modes d'administration.

Pour la partie topique, un ruban de 18 cm a été appliqué sur un carpe par cheval (n=9). Pour la partie orale, une dose de 2,2 mg/kg a été administrée par intubation nasogastrique (n=6). Les doses ont été répétées aux 12 heures pour un total de sept doses. Pour la partie topique et orale, des prélèvements sanguins et synoviaux ont été effectués avant la première application (pré dose), 12 heures après la sixième application (0 heure) et 4, 8, 12, 24 heures après la dernière dose.

Après l'application topique, les concentrations moyennes maximales de diclofénac dans le liquide synovial et le plasma étaient de $15,73 \pm 2,49$ ng/ml et $3,53 \pm 0,37$ ng/ml respectivement. Après l'administration orale, les concentrations moyennes maximales de diclofénac dans le liquide synovial et le plasma étaient de $286,4 \pm 40,94$ ng/ml et 11641 ± 1023 ng/ml respectivement.

Les résultats démontrent qu'après son application topique, le diclofénac se retrouve dans l'articulation à des niveaux détectables, sans produire d'augmentations importantes au niveau plasmatique. Cependant à la dose utilisée, l'administration orale de diclofénac résulte en des concentrations beaucoup plus élevées que celles obtenues après l'application topique, avec des niveaux plasmatiques potentiellement associés à des effets secondaires. Ces résultats suggèrent que l'utilisation topique des AINS est sécuritaire et pourrait être une alternative à leur utilisation orale si démontré efficace.

Mots-clés : anti-inflammatoire non stéroïdiens; topique; oral; diclofénac; ostéoarthrite; cheval; liquide synovial; plasma.

Abstract

Topical non-steroidal anti-inflammatory drugs could be a safer alternative for the treatment of osteoarthritis (OA) compared to traditional oral medications. The objectives of this study were to determine and compare synovial and plasmatic concentrations of diclofenac in horses after repeated topical application and oral administration.

For the topical part of the study, an 18 cm band of a 1% diclofenac cream was applied over one carpus of each horse (n=9). For the oral part of the study, a dose of 2.2 mg/kg of body weight of diclofenac was given to each horse (n=6) by nasogastric intubation. This procedure was repeated every twelve hours for a total of 12 doses. Synovial fluid and blood samples were obtained before the first dose (predose), immediately before the final dose (0 hour) and 4, 8, 12, and 24 hours after the final dose.

After topical application, mean maximal concentrations of diclofenac in the synovial fluid and plasma were 15.73 ± 2.49 ng/ml and 3.53 ± 0.37 ng/ml respectively. After oral administration, mean maximal concentrations of diclofenac in the synovial fluid and plasma were 286.4 ± 40.94 ng/ml and 11641 ± 1023 ng/ml respectively.

These results demonstrate that after topical application, diclofenac reached the synovial fluid without the high plasma concentrations as seen after oral administration. In conclusion, a 1% diclofenac topical anti-inflammatory cream is safe and if proven effective could be an alternative to their oral counterparts in the treatment of osteoarthritis in horses.

Keywords: non-steroidal anti-inflammatory drugs; oral; topical; diclofenac; osteoarthritis; horse; synovial fluid; plasma.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures	viii
Liste des sigles et des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
Chapitre I: Recension de la littérature.....	3
1. L'articulation synoviale	3
1.1. Le Cartilage articulaire.....	3
1.1.1. Composition du cartilage articulaire	3
1.1.1.1. Les chondrocytes.....	3
1.1.1.2. La matrice extracellulaire.....	5
1.1.1.2.1. L'eau	6
1.1.1.2.2. Le collagène	6
1.1.1.2.3. Les protéoglycanes.....	8
1.1.1.2.4. L'acide hyaluronique	10
1.1.2. Organisation structurale	11
1.1.3. Fonctions du cartilage articulaire.....	14
1.2. La capsule articulaire	15
1.3. Liquide Synovial.....	16
1.3.1. L'acide hyaluronique synovial.....	17
1.3.2. La lubricine	18
2. L'ostéoarthrite.....	19
2.1. L'épidémiologie et la pathogénie de l'ostéoarthrite chez le cheval.....	19
2.2. Le cartilage arthrosique.....	20
2.3. Facteurs cataboliques	21
2.3.1. Les cytokines pro inflammatoires	21
2.3.2. Les protéases	21
3. Les prostaglandines.....	24
3.1. La cascade de l'acide arachidonique.....	24
3.1.1. Les leukotriènes	25
3.2. Prostaglandine E ₂ et l'ostéoarthrite.....	27
3.3. Les cyclooxygénases.....	28

3.3.1. La cyclooxygénase-1.....	30
3.3.2. La cyclooxygénase-2.....	30
3.3.3. La cyclooxygénase-3.....	32
4. Traitements de l'ostéoarthrite	34
4.1. Généralité	34
4.1.1. Les agents chondroprotecteurs	34
4.1.2. Les corticostéroïdes.....	35
5. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens	36
5.1 Diclofénac	38
5.1.1. Généralité	38
5.1.2. Utilisation chez les humains	39
5.1.3. Utilisation chez les animaux	39
5.1.4. Métabolisme et excrétion	40
5.1.5. Toxicité	41
5.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens topiques.....	42
5.2.1. Généralité	42
5.2.2. Diclofénac topique	44
5.2.3. Mécanisme de pénétration.....	44
5.2.4. Facteurs affectant la pénétration topique	46
5.3. Surpass®	47
Chapitre II: Article	50
Chapitre III: Discussion	79
Conclusion	93
Projets futurs	93
Bibliographie.....	95

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I – agents inducteurs de l’expression génétique de la COX-2 33

adapté de Tanabe and Tohnai 2002.

Liste des figures

Chapitre I

- Figure 1** – (A) Diagramme d'une molécule de tropocollagènes avec ces trois chaînes alphas (Warburton). (B) Diagramme de l'organisation des molécules de tropocollagènes en fibrilles adapté de Myllyharju and Kivirikko 2001. 7
- Figure 2** – Schéma du protéoglycane aggrécane montrant la protéine centrale avec ces régions globulaires G1, G2 et G3 et les régions d'attachement pour le sulfate de chondroïtine et le sulfate de kératane adapté de Roughley *et al.* 2002. 8
- Figure 3** – Schéma de plusieurs molécules d'aggrécane attachées à une molécule d'acide hyaluronique adapté de Kantharaj 2003. 10
- Figure 4** – Schéma de l'organisation structurale du cartilage adapté de Poole *et al.* 2001. 11
- Figure 5** – Schéma de la cascade de l'acide arachidonique et sa conversion par l'action des cyclooxygénases et des lipoxygénases adapté de Martel-Pelletier *et al.* 2003. 27

Chapitre II

Figure 1 – Diclofenac concentrations over time after repeated topical applications (n = 9 horses) **A**) in synovial fluid and **B**) in plasma. 76

Each point represents the means \pm standard error of mean. An asterisk (*) denotes a statistical difference ($p < 0.05$) between the selected data points and the baseline value. Pre = before the first dose; 0 = before the last dose; 4, 8, 12 and 24 = hours after the last dose.

Figure 2 – Diclofenac concentrations over time after repeated oral administrations (n = 6 horses) **A**) in synovial fluid and **B**) in plasma. 77

Each point represents the means \pm standard error of mean. An asterisk (*) denotes a statistical difference ($p < 0.05$) between the selected data points and the baseline value. Pre = before the first dose; 0 = before the last dose; 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 = hours after the last dose.

Figure 3 – Synovial fluid protein concentrations over time after repeated **A**) topical application (n = 9 horses) and **B**) oral administration (n = 6 horses) of diclofenac. Each point represents the means \pm standard error of mean. An asterisk (*) denotes a statistical difference ($p < 0.05$) between the selected data points and the baseline value. Pre = before the first dose; 0 = before the last dose; 4, 8, 12 and 24 = hours after the last dose. 78

Liste des sigles et des abréviations

AA	Acide Arachidonique
AH	Acide Hyaluronique
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
ARNm	Acide RiboNucléique m essenger
COX	Cyclo- O Xygénase
COX-1	Cyclo- O Xygénase-1
COX-2	Cyclo- O Xygénase-2
COX-3	Cyclo- O Xygénase-3
CS	Sulfate de Chondroïtine
EGF	Epidermal G rowth F actor
GAG	GlycosAminoGlycanes
GAGPS	GlycosAminoGlycanes P oly S ulfatés
GS	Gluco S amine
HPLC-MS-MS	H igh P erformance L iquid C hromatography coupled to M ass S pectrometry (Chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse)
IC ₅₀	Median I nhibitory C oncentration (Concentration pour 50% d'inhibition)
IGF-1	I nsulin-like G rowth F actor-1

IL-1 β	InterLeukine-1 β
KS	Sulfate de Kératane
LPS	LipoPolySaccharide
MMP	Matrix MetalloProteinase (Métallo-protéase matricielle)
OA	OstéoArthrite
PG	ProstaGlandine
PGE ₂	ProstaGlandine E ₂
PGES	ProstaGlandine E Synthase
PGG ₂	Prostaglandine G ₂
PGH ₂	ProstaGlandine H ₂
RA	Rheumatoïd Arthritis (Arthrite rhumatoïde)
TIMP	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase (Inhibiteur tissulaire des métallo-protéases)
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α (Facteur onconécrosant- α)
TXA ₂	ThromboXane A ₂

Remerciements

J'aimerais remercier avant tout la Dr. Sophie Morisset, mon directeur de recherche, pour m'avoir acceptée comme son étudiante de maîtrise. Elle m'a donné l'opportunité d'étudier un sujet qui m'a toujours intéressée et m'a ouvert les yeux sur la médecine vétérinaire. Les connaissances acquises pendant mes études avec elle me suivront pour toujours. Son aide et ses conseils seront toujours forts appréciés.

Plusieurs personnes à l'université de Sherbrooke m'ont aidé pour le dosage du diclofénac, par contre j'aimerais remercier deux personnes en particulier : Dr. René Gagnon et Dr. Jean Morisset. Le Dr. Gagnon pour sa patience lors des longues journées au laboratoire et Dr. Morisset pour son hospitalité bien reconnue.

Je tiens aussi à remercier la Dr. Sheila Laverty qui m'a donné plusieurs conseils au niveau professionnel et personnel au cours de la maîtrise et qui a contribué à ma formation comme chercheure.

Je remercie Lisa, Stéphane et ma tante Gerry qui m'ont toujours accueilli pendant mes séjours à St-Hyacinthe. C'était un plaisir d'avoir de la famille si proche de moi.

Sans oublier mes parents et Robbie, qui me supportent constamment et qui continuent à me guider dans ma vie académique et personnelle. Votre amour, encouragement et confiance m'ont permis de réussir.

Merci

Introduction

L'ostéoarthrite (OA) est la principale cause de boiterie chez les chevaux de sport et de loisir. C'est une maladie dégénérative de l'articulation synoviale qui est caractérisée, entre autre, par la perte du cartilage articulaire. Au cours des dernières années de nombreuses découvertes ont été faites sur la structure et la biochimie du cartilage atteint d'OA, mais malheureusement, malgré ces nouvelles connaissances la destruction du cartilage demeure irréversible et un traitement curatif n'est toujours pas disponible. Pour l'instant la majorité des traitements contre l'OA visent à diminuer la douleur et à contrôler l'inflammation associée à cette maladie.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont les médicaments les plus souvent utilisés par les vétérinaires pour traiter les symptômes associés à l'OA. Jusqu'à tout récemment, pour le cheval, ces substances étaient principalement disponibles sous forme orale, intraveineuse ou intramusculaire, des voies d'administration susceptibles d'engendrer des effets secondaires aux niveaux rénal et digestif. Les AINS topiques pourraient être une alternative efficace et sécuritaire à leur administration systémique.

Les objectifs de ce projet étaient donc :

- 1) de déterminer, après son application répétée au niveau du carpe, la concentration synoviale et plasmatique d'un AINS topique à base de diclofénac, destiné pour usage équin.
- 2) de déterminer la concentration synoviale et plasmatique de diclofénac après son administration orale répétée.
- 3) de comparer les concentrations obtenues selon les deux modes d'administration.

Les hypothèses de départ étaient que :

- 1) l'application topique de diclofénac résulterait en des concentrations plus élevées dans le liquide synovial que dans le plasma.
- 2) l'administration orale de diclofénac résulterait en des concentrations plus élevées dans le plasma que le liquide synovial.
- 3) les concentrations obtenues suite à l'administration orale seraient en tout temps supérieures à celles obtenues suivant l'application topique et ce dans les deux matrices biologiques.

Chapitre I: Recension de la littérature

1. L'articulation synoviale

Les articulations synoviales ou diarthroses sont les articulations les plus nombreuses et les plus mobiles du corps. Leurs rôles principaux sont de permettre un mouvement avec peu de friction entre les os et d'absorber et distribuer les forces auxquelles l'articulation est soumise (Todhunter 1996). Elles sont composées des surfaces articulaires d'au moins deux os recouverts de cartilage hyalin. La capsule articulaire et les ligaments stabilisent et relient les os entre eux, et la membrane synoviale, qui tapisse l'intérieur de la capsule articulaire, est responsable de la synthèse du liquide synovial (Todhunter 1996). Le cartilage articulaire joue un rôle primordial dans le fonctionnement de l'articulation saine.

1.1. Le Cartilage articulaire

1.1.1. Composition du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif de type hyalin, avasculaire, aneural et alymphatique (Poole 1997). Il est composé de chondrocytes, le seul type de cellules du cartilage, implantés dans une matrice extracellulaire principalement composée d'eau et de macromolécules, incluant le collagène, les protéoglycanes et les glycoprotéines (Buckwalter and Mankin 1997).

1.1.1.1. Les chondrocytes

Les chondrocytes sont le seul type de cellule du cartilage articulaire. Ils occupent approximativement 1% du volume du cartilage adulte (Buckwalter and Mankin 1997). Leur densité à travers la matrice extracellulaire, grosseur, forme et activité métabolique

varient selon la zone du cartilage où ils se retrouvent (Aydelotte *et al.* 1992). Dans le cartilage adulte normal, les chondrocytes ont une faible capacité mitotique, par contre certaines études ont démontré qu'après la création de lésion, la mitose des chondrocytes peut être stimulée (Calandruccio and Gilmer 1962; Muldrew *et al.* 2001). Ce phénomène pourrait être utile comme moyen de régénération du cartilage (Muldrew *et al.* 2001).

Le cartilage étant avasculaire, les chondrocytes reçoivent tous leurs nutriments et oxygène par diffusion à partir du liquide synovial (O'Hara *et al.* 1990). Les molécules atteignant les chondrocytes doivent donc traverser une double barrière : la membrane synoviale et la matrice cartilagineuse. La taille et la charge des molécules déterminent lesquelles d'entre elles peuvent pénétrer la matrice. Comme elle est très restrictive, les chondrocytes ont une faible concentration d'oxygène et la glycolyse anaérobie est la voie principale par laquelle ils produisent leur énergie (Buckwalter and Martin 1995). Le glucose est la forme d'énergie la plus utilisée pour le métabolisme des chondrocytes. Il est aussi utilisé comme précurseur des glycosaminoglycans (GAGs) lors de la synthèse des protéoglycans (Windhaber *et al.* 2003).

Les chondrocytes sont englobés dans un espace péricellulaire, une mince région de matrice, dont l'ensemble est appelé chondrone (Poole 1997). Cet espace péricellulaire contient une haute concentration de protéoglycans (décorine et aggrecane), de glycoprotéines (fibronectine, laminine et anchorine CII) et contient en particulier le collagène type VI (Poole 1997). Les protéoglycans et le collagène de type VI, aident à ancrer la cellule à la matrice extracellulaire. L'espace péricellulaire aurait un rôle biologique, en contrôlant les signalisations biochimiques et biophysiques se rendant aux

chondrocytes. De plus, il aurait aussi un rôle biomécanique, en protégeant les chondrocytes des forces mécaniques excessives (Poole 1997).

Les chondrocytes produisent, organisent et maintiennent les composantes de la matrice extracellulaire du cartilage. Les chondrocytes sont capables de synthétiser à la fois les composantes de la matrice cartilagineuse, ainsi que les enzymes et molécules pro inflammatoires capables de détruire cette matrice. C'est grâce à l'équilibre entre les facteurs anaboliques (en particulier les facteurs de croissance, par exemple *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) et *transforming growth factor beta* (TGF- β)) qui sont responsables de la synthèse des composantes de la matrice et les facteurs cataboliques qui sont responsables de sa destruction, que les chondrocytes peuvent maintenir l'homéostasie du cartilage (Vignon 2000). Dans des cas pathologiques comme l'OA, cet équilibre entre les facteurs anaboliques et cataboliques est perdu, la sécrétion des facteurs cataboliques devient plus importante ce qui provoque la destruction du cartilage (McIlwraith 1996).

1.1.1.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est synthétisée par les chondrocytes. Elle est composée principalement d'eau et de macromolécules, les plus importantes étant le collagène et les protéoglycanes (Buckwalter and Mankin 1997). En ordre décroissant d'abondance, l'eau représente approximativement 65 à 80% du cartilage, le collagène 10 à 30% et les protéoglycanes 5 à 10% du poids humide du tissu (Kuettner *et al.* 1991; Vignon 2000). La composition de la matrice est très spécifique et l'interaction entre ses différentes composantes est importante pour maintenir la structure et la fonction du cartilage.

1.1.1.2.1. L'eau

L'eau peut circuler librement dans le cartilage articulaire ou peut être liée aux protéoglycanes (Newman 1998). Sous la forme libre, l'eau est responsable du transport des nutriments et des déchets métaboliques. L'eau liée aux protéoglycanes contribue à maintenir la rigidité et l'élasticité du cartilage articulaire (Vignon 2000).

1.1.1.2.2. Le collagène

Le collagène est constitué de protéines fibreuses qui aident à maintenir la forme et la structure du cartilage. Il produit la structure tridimensionnelle dans laquelle s'insèrent les protéoglycanes, les minéraux et glycoprotéines (von der Mark 2006). Son arrangement est spécifique à chaque zone du cartilage. Il y a plusieurs types de collagène présent dans le cartilage articulaire, notamment les types II, VI, IX, X, XI, XII et XIV (Poole *et al.* 2001). Les fonctions des types X, XII et XIV ne sont pas bien connues. Le type X pourrait avoir un rôle de support de la matrice et les types XII et XIV auraient des fonctions dans la stabilisation des fibrilles de collagène car ils peuvent interagir avec leur surface (Eyre 2002; Poole *et al.* 2001).

Le collagène de type II est le plus représenté dans la matrice extracellulaire, composant approximativement 90 à 95% du collagène total (Buckwalter and Mankin 1997). La molécule de base du collagène, appelé tropocollagène, consiste en un homotrimère composé de trois chaînes alpha identiques formant une triple hélice (Poole *et al.* 2001). Par la suite, ces molécules de tropocollagènes sont organisées en fibrilles, qui donnent au cartilage sa résistance aux forces de tension (Figure 1) (Vignon 2000). C'est l'interaction entre les protéoglycanes et les fibrilles de collagène type II qui permet au cartilage de remplir son rôle biomécanique.

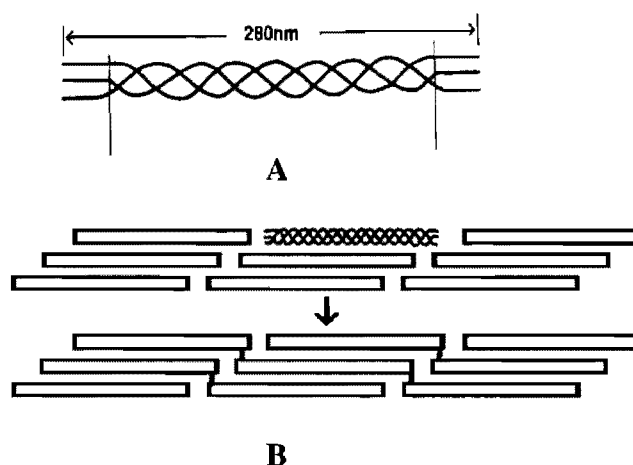


Figure 1 : (A) Diagramme d'une molécule de tropocollagène avec ses trois chaînes alphas formant une triple hélix (Warburton). (B) Diagramme de l'organisation des molécules de tropocollagènes en fibrilles (adapté de Myllyharju and Kivirikko 2001).

En plus du collagène de type II, les collagènes de type IX et XI participent à la formation du réseau de fibrilles de collagène. Ils correspondent à approximativement 3 à 10% du collagène total du cartilage (Aigner and Stove 2003). Le collagène de type IX se situe à l'extérieur des fibrilles, se liant de façon non covalente aux chaînes de collagène de type II (Vignon 2000). Ce collagène joue possiblement un rôle dans l'interaction des fibrilles de collagènes avec les protéoglycanes de la matrice (Vignon 2000). Le collagène de type XI se situe à l'intérieur des fibrilles de collagènes jouant un rôle dans l'organisation tridimensionnelle des fibrilles ainsi que dans la régulation de leur diamètre (Vignon 2000).

1.1.1.2.3. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont responsables de la rigidité et de l'élasticité du cartilage. Les protéoglycanes sont composés d'une protéine centrale sur laquelle une ou plusieurs chaînes de GAGs y sont attachées (Todhunter 1996). Les glycosaminoglycanes sont des chaînes de polysaccharides formées d'unités de disaccharides répétées, contenant un sucre aminé. Il y a cinq types de GAGs représentés dans le cartilage: le sulfate de chondroïtine (CS), le sulfate de dermatane, le sulfate d'héparane, le sulfate de kératane (KS) et l'acide hyaluronique (AH).

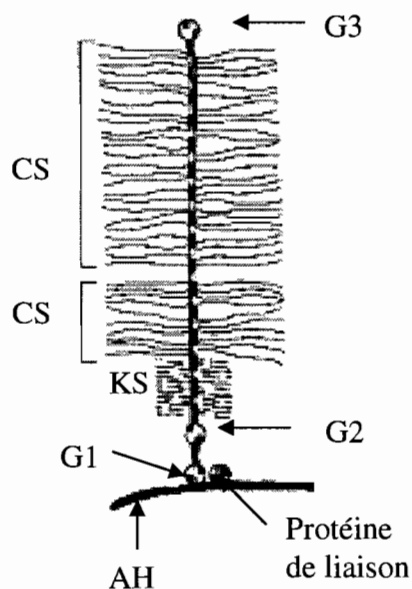


Figure 2: Schéma du protéoglycane agrégé montrant la protéine centrale avec ses régions globulaires G1, G2 et G3 et les régions d'attachement pour le sulfate de chondroïtine et le sulfate de kératane (adapté de Roughley *et al.* 2002).

L'aggrégane est le protéoglycane majeur du cartilage articulaire, constituant approximativement 90% des protéoglycanes du cartilage (Vignon 2000). Il est composé

d'une protéine centrale de 220 kDa sur laquelle les GAGs de CS et KS sont attachées (figure 2) (Vignon 2000). La protéine centrale possède trois régions globulaires, appelé G1, G2 et G3 (Doerge *et al.* 1991). La région G1 se situe à l'extrémité N-terminale de la protéine, et c'est la région où l'aggrécane peut se lier avec l'AH. Cette interaction est en plus stabilisée par une protéine de liaison (Poole *et al.* 2001). Les régions G2 et G3 sont séparées par une longue région où s'attachent les GAGs (Roughley 2006). La fonction de la région G2 n'est pas encore déterminée (Roughley 2006). La région G3, situé à l'extrémité C-terminale de la protéine, est impliquée dans la modification post-translationnelle de la protéine centrale (Zheng *et al.* 1998).

Des centaines de molécules d'aggrécane peuvent s'associer de façon non covalente à une molécule d' AH (figure 3) (Buckwalter and Rosenberg 1983). Les groupes sulfates et carboxyles des GAGs sont chargés négativement rendant la molécule d'aggrécane hydrophile (Newman 1998). Ce phénomène a pour effet d'attirer une importante quantité d'eau dans le tissu. L'hydratation du cartilage est limitée par les fibres de collagène et cela crée une pression osmotique qui donne au cartilage son élasticité et sa résistance à la compression (Poole *et al.* 2001).

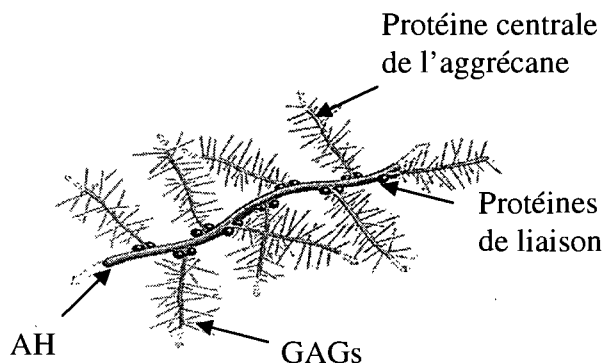


Figure 3 : Schéma de plusieurs molécules d'aggrécane attachées à une molécule d'acide hyaluronique (adapté de Kantharaj 2003).

Les autres protéoglycanes du cartilage sont principalement des grands protéoglycanes non agrégeant et de petits protéoglycanes. Les rôles exacts des grands protéoglycanes ne sont pas encore déterminés. Par contre ils possèdent une grande ressemblance à l'aggrécane. Les petits protéoglycanes, comme la biglycane, décorine et la fibromoduline peuvent se lier aux fibrilles de collagène, donc possiblement participent à l'organisation de la matrice cartilagineuse (Vignon 2000). En plus d'interagir avec le collagène, la décorine aurait peut-être un rôle régulateur de l'activité des chondrocytes en se liant avec le facteur de croissance TGF- β (Vignon 2000).

1.1.1.2.4. L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un GAG composé d'une longue chaîne de disaccharides qui diffère des autres GAGs par le fait qu'il n'est pas sulfaté et n'est pas attaché à une protéine centrale (Todhunter 1996). L'association entre l'AH et l'aggrécane résulte en de larges agrégats suite à des interactions moléculaires entre le domaine globulaire GI de la protéine centrale de l'aggrécane; qui possède de haute affinité pour la molécule d'AH

(Poole *et al.* 2001). L'acide hyaluronique assure la rétention des protéoglycanes dans la matrice extracellulaire par ses associations avec les fibrilles de collagène et par l'interaction avec les chondrocytes par le récepteur CD44 présent sur la surface des cellules (Chow *et al.* 1998; Poole *et al.* 2001).

1.1.2. Organisation structurale

Le cartilage articulaire est un tissu stratifié qui se divise en quatre couches histologiques : la zone superficielle (zone 1), la zone intermédiaire ou transitionnelle (zone 2), la zone profonde ou radiaire (zone 3) et la zone calcifiée (zone 4) (figure 4) (Vignon 2000). Chaque zone se différencie par la quantité d'eau qu'elle contient, le nombre et les caractéristiques de ses chondrocytes, l'orientation et la quantité de ses fibrilles de collagènes et sa quantité de protéoglycanes. La quantité de collagène diminue avec la profondeur, tandis que la quantité de protéoglycanes est faible dans la zone superficielle et augmente avec la profondeur du cartilage (Buckwalter and Mankin 1997). Ces différences donnent à chaque zone des rôles et propriétés qui leur sont uniques.

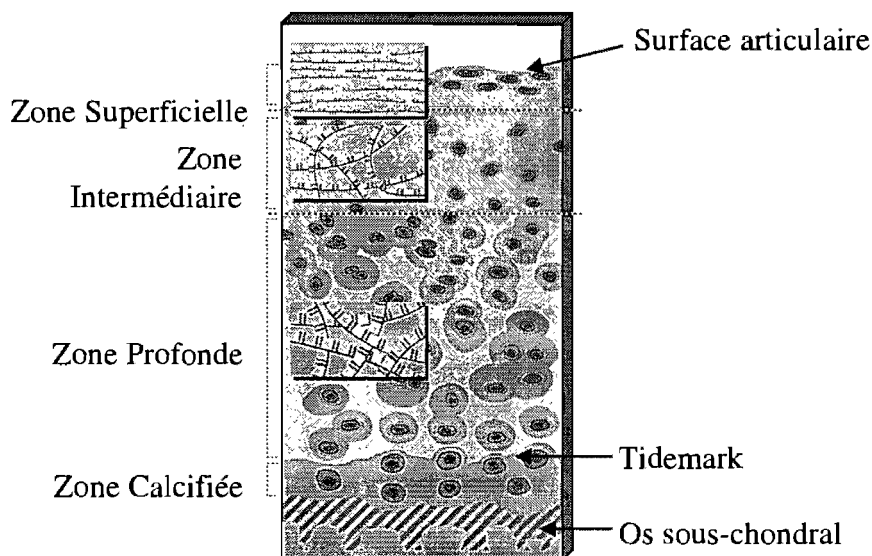


Figure 4 : Schéma de l'organisation structurale du cartilage (adapté de Poole *et al.* 2001).

La zone superficielle est en contact avec le liquide synovial (Poole *et al.* 2001). Cette couche est très mince et peut-être subdivisée en deux zones. La zone adjacente au liquide synovial, souvent appelé lamina splendens, est démunie de chondrocytes et de protéoglycanes, mais contient des fines fibrilles de collagène et une grande quantité d'eau (Edwards *et al.* 2002; Vignon 2000). Par contre, il est intéressant de noter que certains auteurs croient que la lamina splendens est seulement un artéfact de perception associé à la technique de microscopie (Aspden and Hukins 1979).

La deuxième subdivision de la zone superficielle comprend une grande quantité de fibrilles de collagène, arrangées parallèlement à la surface articulaire avec des chondrocytes petits, aplatis qui sont eux aussi arrangés parallèlement à la surface (Vignon 2000). Dans cette zone, les chondrocytes sont plus nombreux et métaboliquement moins actifs que ceux des autres zones. L'organisation particulière des fibrilles de collagène de cette zone est en partie responsable de la résistance aux forces de tension et à l'usure du cartilage lors des mouvements articulaires (Vignon 2000). L'organisation des fibrilles de la zone superficielle pourrait aussi limiter l'accès des grosses molécules et des anticorps au cartilage en formant une barrière entre le cartilage et le liquide synovial (Vignon 2000).

La zone intermédiaire ou transitionnelle possède une quantité importante de protéoglycanes. Les chondrocytes sont plus larges et arrondis que ceux de la zone superficielle, ce qui reflète leur activité métabolique plus importante (Todhunter 1996). Les chondrocytes de cette couche sont arrangés de façon aléatoire à l'intérieur de la matrice extracellulaire. Les fibrilles de collagène sont plus épaisses que celles de la zone superficielle et sont arrangées de façon aléatoire pour former un réseau tridimensionnel (Poole *et al.* 2001; Todhunter 1996).

La troisième couche appelée zone profonde ou radiaire possède aussi des chondrocytes qui sont larges et arrondis, par contre ils sont arrangés perpendiculaires à la surface (Vignon 2000). Les fibrilles de collagène de cette couche sont aussi arrangées perpendiculairement à la surface (Todhunter 1996). L'orientation des fibrilles de collagène et la forte quantité de protéoglycane rencontrés dans les zones intermédiaires et profondes, fournissent au cartilage la capacité de résister aux forces de compression (Todhunter 1996).

La zone calcifiée est la zone la plus profonde du cartilage et contribue à l'attachement du cartilage à l'os sous-chondral. En plus d'être responsable de l'attachement du cartilage à l'os sous-chondral, cette zone fonctionne aussi comme barrière, en limitant le passage des molécules de l'os sous-chondral aux zones profondes du cartilage et elle serait aussi responsable de transmettre les forces à travers l'articulation (Oegema *et al.* 1997). La zone calcifiée est séparée des zones non calcifiées par un front de calcification ou «tidemark». Les chondrocytes de la zone calcifiée sont petits et sont caractérisés par une activité métabolique faible. La production de protéoglycane ne se fait pas dans cette zone, par contre les chondrocytes synthétisent le collagène de type X (Poole *et al.* 2001). Le front entre le cartilage et l'os sous-chondral est très irrégulier. Le mécanisme d'ancrage entre ces deux tissus est mal connu, mais des études de microscopies nous laissent croire que c'est un entrelacement entre les deux tissus, sans aucune intervention de fibres, qui en est responsable (Clark and Huber 1990; Oegema *et al.* 1997; Vignon 2000).

1.1.3. Fonctions du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire a deux fonctions principales, la première est d'assurer le glissement des segments osseux entre eux et la deuxième de permettre la transmission et l'amortissement des charges lors des mouvements (Duparque 1998; Mansour 2004). Le cartilage articulaire et le liquide synovial produisent une surface lisse et glissante permettant un mouvement des surfaces articulaires avec un minimum de friction. Le cartilage est un tissu conjonctif caractérisé par deux phases, une phase liquide composée d'eau et d'électrolytes et une phase solide composée des macromolécules de la matrice (Newman 1998). Lors de compression, une partie de l'eau maintenue dans le cartilage est relâchée. Cette eau avec le liquide synovial vont créer une couche protectrice entre les surfaces articulaires, ce qui va contribuer à minimiser la friction entre les surfaces articulaires et protéger la phase solide du cartilage (Newman 1998).

La deuxième fonction du cartilage est assurée par les composantes de la matrice cartilagineuse, en particulier les fibrilles de collagène et les protéoglycanes. Normalement l'hydratation des protéoglycanes est contrôlée par le réseau de collagène, ce qui garde le tissu sous tension (Poole *et al.* 2001). Lorsque le cartilage est soumis à des forces de compression, la tension augmente, devient trop élevée et l'eau est expulsée des protéoglycanes pour se diriger à un endroit où la pression est plus faible (Duparque 1998; Newman 1998). Cela a pour effet d'augmenter la concentration de protéoglycanes, et subséquemment d'augmenter la force de répulsion entre ceux-ci (Mansour 2004). Cela contribue à l'augmentation de la force compressive du cartilage lui permettant de résister à la compression et de répartir les charges (Duparque 1998; Mansour 2004). Lorsque la charge est levée, la pression sur le cartilage diminue et l'eau peut revenir dans le tissu (Newman 1998).

1.2. La capsule articulaire

La capsule articulaire est une enveloppe qui entoure et délimite les articulations synoviales. Elle est composée de deux couches, la couche externe constituée de tissu fibreux dense est appelée membrane fibreuse et la couche interne est connue sous le nom de membrane synoviale (Iwanaga *et al.* 2000; Levick 2007). Cette dernière est composée de tissu conjonctif lâche et adipeux et est responsable de la formation du liquide synovial directement dans l'espace articulaire.

La membrane synoviale elle-même se divise en deux couches, la couche sous-intimale et la couche bordante (intima). La couche sous-intimale est bordée à l'extérieur par la membrane fibreuse de la capsule articulaire. Cette couche est innervée, vascularisée et peut être plus ou moins fibreuse selon l'articulation. Cette innervation joue un rôle dans l'expression de la douleur associée aux pathologies articulaires. L'intima est la couche intérieure de la membrane synoviale et est composée par deux types de synoviocytes, les synoviocytes de type A et de type B. Les cellules de type A sont des macrophages qui possèdent des extensions cytoplasmiques tels les microvillosités, filopodes et lamellipodes, caractéristiques des cellules macrophagiques (Iwanaga *et al.* 2000). Ce type de cellules contient plusieurs vacuoles et lysosomes nécessaires pour détruire les corps étrangers et les déchets pouvant se retrouver dans le liquide synovial (Southwick and Bensch 1971). Les cellules de type A occupent principalement la partie intimale qui est en contact avec la cavité synoviale, mais elles ne sont pas fixes dans la membrane synoviale (Curtiss 1964; Iwanaga *et al.* 2000). Elles peuvent migrer dans l'espace articulaire et contribuer à la population de macrophages dans le liquide synovial normal (Curtiss 1964).

Les cellules de type B sont les synoviocytes à caractère fibroblastique qui sont responsables de la sécrétion des composantes du liquide articulaire soit l'AH, la lubricine,

le collagène, la fibronectine, les phospholipides et des enzymes de dégradation secrétées lors des pathologies (Blom and van den Berg 2007; Iwanaga *et al.* 2000; Yielding *et al.* 1957). Ces cellules sont caractérisées par l'importance de leur réticulum endoplasmique (Iwanaga *et al.* 2000). Les cellules de type B sont les cellules les plus représentées dans l'intima, soit 75 à 80% des synoviocytes totaux chez le rat et la souris (Krey and Cohen 1973; Okada *et al.* 1981). Même si les deux types de synoviocytes peuvent contribuer à la production de synovite en libérant des médiateurs d'inflammation et des facteurs de croissance, il semble que les cellules de type B auraient un rôle plus important dans cette fonction (Ritchlin 2000).

1.3. Liquide Synovial

Le liquide synovial ou synovie est un ultrafiltrat du plasma qui est formé par les cellules de la membrane synoviale. Chez le cheval, le liquide synovial normal est un liquide clair, de couleur jaune pâle et possédant une haute viscosité (Van Pelt 1962). Le principal constituant du liquide synovial normal est l'AH, mais il contient aussi des protéines, glycoprotéines (en particulier la lubricine), des électrolytes, de l'urée, du glucose, des phospholipides, du cholestérol, des lipoprotéines et les déchets métabolique du cartilage (Fam *et al.* 2007). La quantité de protéines totales dans le liquide synovial normal chez le cheval est moins de 20 g/L (Van Pelt 1974). Il peut aussi contenir une faible quantité de cytokines, collagène, enzymes, protéoglycanes et cellules (moins de 500 cellules par μL) (Fam *et al.* 2007; Tulamo *et al.* 1996). La majorité des cellules (approximativement 90%) sont du type mononucléaire, comme les cellules synoviales, les monocytes et les lymphocytes les autres étant des leucocytes polymorphonucléaires (Todhunter 1996). La concentration synoviale de cellules, de cytokines, d'enzymes et de

macromolécules provenant du cartilage est augmentée lors de pathologies articulaires comme l'OA.

Le liquide synovial joue deux rôles principaux. Premièrement, comme le cartilage est avasculaire, le liquide synovial est responsable du transport de nutriments (glucose, acides aminés, oxygène) et des molécules de signalisation au cartilage, ainsi que de l'évacuation des déchets métaboliques (Levick 2007). Les petits solutés, le glucose et l'oxygène sont principalement apportés au cartilage via diffusion (Todhunter 1996). Par contre, pour les solutés de hauts poids moléculaires, leur transport à travers le cartilage pourrait être facilité par le mouvement de liquide lors de pressions cycliques générées par le mouvement des articulations (O'Hara *et al.* 1990).

Deuxièmement, le liquide synovial joue un rôle dans la lubrification des surfaces articulaires (Fam *et al.* 2007). Les deux principaux modes de lubrification sont la lubrification par surface (lorsque des molécules spécialisées forment une couche qui sépare les surfaces articulaires) et la lubrification par liquide interposé (lorsqu'une couche de liquide sépare les surfaces articulaires) (Wright and Dowson 1976). La lubrification par liquide interposé est principalement responsable de la lubrification lorsque de fortes charges sont appliquées sur les articulations et la lubrification par surface est responsable lorsqu'elles sont plus faibles (Todhunter 1996). Les deux principales composantes du liquide synovial impliquées dans la lubrification sont l'AH et la lubricine (Jay 2004; Levick 2007).

1.3.1. L'acide hyaluronique synovial

En plus d'être une composante importante de la matrice cartilagineuse, l'AH est la composante la plus importante et la plus grosse macromolécule du liquide synovial

(Laurent and Fraser 1992). L'acide hyaluronique est impliqué dans la lubrification par liquide interposé. La concentration et le poids moléculaire de l'AH sont deux facteurs importants pour la viscoélasticité du liquide synovial, ce qui en affecte la lubrification (Fam *et al.* 2007). Normalement la concentration d'AH dans le liquide synovial équin est de 0,5 mg/ml (Saari *et al.* 1989) et celle de l'humain et de lapin est de deux à quatre mg/ml (Levick 2007). Son poids moléculaire chez l'humain est approximativement de $3 \text{ à } 6 \times 10^6 \text{ Da}$ (Levick 2007). Dans l'OA et l'arthrite rhumatoïde (RA), ces deux facteurs sont diminués et cela pourrait contribuer à la perte de l'élasticité et de la viscosité du liquide synovial observées dans ces pathologies (Fam *et al.* 2007). L'acide hyaluronique peut se lier aux protéines et contribuer à la lubrification par surface (Fam *et al.* 2007). L'acide hyaluronique pourraient aussi agir comme un filtre, en minimisant le passage des bactéries et cellules inflammatoires dans le liquide synovial, mais permettant le passage des nutriments au cartilage (Laurent and Fraser 1992).

1.3.2 La lubricine

La lubricine est une glycoprotéine d'environ 227 kDa (Swann *et al.* 1985) synthétisée majoritairement par les synoviocytes, par contre les chondrocytes peuvent aussi contribuer à sa synthèse (Flannery *et al.* 1999; Jay 2004). La concentration de lubricine dans le liquide synovial est approximativement 200 $\mu\text{g/ml}$ (Elsaid *et al.* 2005). La lubricine peut être liée à l'AH du liquide synovial ou peut se retrouver dans le lamina splendens de la zone superficielle du cartilage (Jay 2004; Schumacher *et al.* 1994). La lubricine est impliquée dans la lubrification par surface, car elle a des propriétés lui permettant de s'attacher aux surfaces articulaires pour les séparer lors des mouvements (Jay 2004; Wright and Dowson 1976).

2. L'ostéoarthrite

2.1. L'épidémiologie et la pathogénie de l'ostéoarthrite chez le cheval

L'ostéoarthrite et l'ostéoarthrose sont souvent utilisés comme synonymes pour désigner la même maladie. Par contre, il y a plusieurs auteurs qui les distinguent en définissant l'ostéoarthrite comme étant une maladie où les processus inflammatoires surviendraient en premier suivis par des changements dégénératifs (Radin 1995). L'ostéoarthrose suivrait le cheminement contraire (Radin 1995). Cependant l'ordre des évènements est rarement connu, il est donc difficile de faire une distinction entre les deux (Radin 1995). Pour cette revue, le terme ostéoarthrite sera utilisé.

L'ostéoarthrite est une maladie de l'articulation synoviale caractérisée par la dégradation permanente du cartilage articulaire, accompagné par des changements des tissus mous telles la capsule articulaire (incluant la membrane synoviale), les ligaments, et les muscles péri-articulaires ainsi que de l'os sous-chondral (McIlwraith and Vachon 1988). Elle représente la maladie articulaire la plus importante chez le cheval; selon un sondage publié en 2003, l'OA a pu être relié à approximativement 60% des boiteries chez le cheval (Caron and Genovese 2003). Les articulations principalement affectées chez cette espèce sont les torses, les carpes, les boulets et les paturons (Schlueter and Orth 2003). Cliniquement l'OA est caractérisée par de la douleur et une perte de fonction de l'articulation affectée pouvant causer une boiterie plus ou moins sévère.

Depuis longtemps, l'OA a été défini comme une entité clinique n'ayant pas de composante inflammatoire importante. Par contre, plusieurs études ont démontré que l'inflammation pourrait significativement contribuer au développement et à la progression de l'OA notamment chez le cheval (Sutton *et al.* 2007).

2.2. Le cartilage arthrosique

Un des résultats dévastateurs de l'OA est la perte d'intégrité du cartilage articulaire. La destruction du cartilage est définie cliniquement par de la fibrillation, des lignes d'usure et des érosions partielles ou pleines épaisseurs, accompagnés ou non de formation d'ostéophytes (McIlwraith 1996). Les voies pouvant mener à cette destruction peuvent être divisées en deux groupes. La première voie implique l'action de facteurs anormaux sur du cartilage normal et la deuxième implique des facteurs normaux agissant sur du cartilage anormal (McIlwraith 1996). Les facteurs étiologiques impliqués dans la destruction du cartilage peuvent être de caractère traumatique, relié au développement ou infectieux (McIlwraith 1996).

Les chondrocytes sont responsables de l'homéostasie du cartilage, donc de maintenir l'équilibre entre les facteurs anaboliques et cataboliques. Les facteurs anaboliques sont responsables de la synthèse des composantes de la matrice cartilagineuse et les facteurs cataboliques sont responsables de la destruction de la matrice. Lors d'OA, il y a perte de cet équilibre en faveur des facteurs cataboliques, résultant en une perte de protéoglycanes et de collagène. Ces changements de la matrice cartilagineuses affectent les propriétés biomécaniques du tissu en diminuant sa résistance aux forces de compression, le rendant plus vulnérable à l'action des forces auxquelles il est soumis (McIlwraith 1996).

Les phénotypes et le métabolisme des chondrocytes subissent plusieurs changements lors de l'OA. Pour tenter de réparer les dommages tissulaires, les chondrocytes augmentent la synthèse des facteurs anaboliques, telles les cytokines anti-inflammatoires et les facteurs de croissance (Henrotin and Reginster 1999). Des études ont même démontré que la formation des ostéophytes serait le résultat de l'action des facteurs de croissance comme la TGF- β et l'IGF-1, sécrétés au début de l'OA (Bakker *et al.* 2001;

Shuler *et al.* 2000). Par contre les chondrocytes relâchent aussi des facteurs cataboliques qui contribuent à la dégradation du cartilage.

2.3. Facteurs cataboliques

Il y a une grande variété de molécules dites cataboliques impliquées dans la pathogénie de l'OA. Les plus importantes sont les cytokines pro inflammatoires, les protéases et les prostaglandines (PGs).

2.3.1. Les cytokines pro inflammatoires

Le facteur onconécrosant- α (TNF- α) et l'interleukine-1 β (IL-1 β) sont les cytokines pro inflammatoires les plus représentées dans la pathogénie de l'OA. Ceci est supporté par des niveaux élevés retrouvés dans le liquide synovial des articulations atteintes d'OA chez le cheval comparé aux articulations normales (Sutton *et al.* 2007). Ils sont synthétisés par les synoviocytes, les chondrocytes et les cellules mononucléaires (Sutton *et al.* 2007). Ils agissent sur ces derniers via leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules (Sutton *et al.* 2007). Le TNF- α et l'IL-1 β exercent plusieurs effets cataboliques sur le cartilage; par exemple, ils sont associés à l'apoptose des chondrocytes, l'induction de la production du monoxyde d'azote (une autre molécule catabolique impliqué dans l'OA), la stimulation des chondrocytes et des synoviocytes à augmenter la production d'autres cytokines inflammatoires, protéases et PGs (Fernandes *et al.* 2002; Malesud 2006; Sutton *et al.* 2007).

2.3.2. Les protéases

Les protéases sont des enzymes qui débutent le catabolisme des protéines en hydrolysant leurs liaisons peptidiques. Les protéases peuvent être classifiées en 5 groupes d'enzymes: les aspartates, les cystéines, les thréonines, les métalloprotéases matricielles

(MMPs) et les sérines (Malemud 2006). Les trois premières agissent de façon intracellulaire et les deux dernières de façon majoritairement extracellulaire (Malemud 2006). Toutes ces protéases peuvent contribuer à la destruction du cartilage, par contre les MMPs jouent un rôle important lors de l'OA.

Les métalloprotéases matricielles sont les protéases les plus impliquées dans la pathogénie de l'OA. Il a été démontré que leur activité est élevée dans le cartilage et la membrane synoviale chez les humains atteints d'OA (Dean *et al.* 1989; Martel-Pelletier *et al.* 1986). Les métalloprotéases matricielles sont majoritairement synthétisées sous une forme inactive (pro-MMP) et doivent donc être activées pour entreprendre leur activité enzymatique (Malemud 2006). Toutes les MMPs requièrent une molécule de zinc pour leur activité enzymatique (Malemud 2006).

Il y a plusieurs catégories de MMPs et ensemble, elles peuvent dégrader toutes les composantes de la matrice cartilagineuse tels les collagènes, les protéoglycanes, l'AH, ainsi que plusieurs autres molécules par exemple d'autres protéases, des inhibiteurs de protéases et des molécules de chimiotaxie (Flannery *et al.* 1999; Rengel *et al.* 2007). Les collagénases (MMP-1, 8 et 13) ont comme action de dégrader les collagènes de type I, II, III, VII, VIII et X (Lovejoy *et al.* 1999; McIlwraith 1996). Les stromélysines (MMP-3, 10 et 11) agissent sur les protéoglycanes, la fibronectine et la laminine (Cawston and Wilson 2006). Les agrécanases agissent sur l'aggrécane et les gélatinases (MMP-2 et 9) agissent principalement sur le collagène dénaturé, appelé gélatine (Cawston and Wilson 2006). En plus de leur capacité à dégrader les composantes de la matrice cartilagineuse, les MMPs sont aussi impliquées dans la dégradation de plusieurs autres molécules, comme d'autres

protéases, des inhibiteurs de protéases et des facteurs de croissance (Sternlicht and Werb 2001).

Dans le cartilage normal, l'activité des MMPs est naturellement contrôlée par les inhibiteurs des MMPs (TIMPs). Il y a quatre TIMPs identifiés et ensemble ils peuvent inhiber les activités de toutes les MMPs connues en formant des complexes avec ces dernières avec une stœchiométrie de 1:1 (Brew *et al.* 2000; Cawston and Wilson 2006). Lors de l'OA, les niveaux de TIMPs sont diminués dans le cartilage, indiquant qu'un équilibre entre les TIMPs et les MMPs pourrait jouer un rôle important dans la progression de la pathologie (Dean *et al.* 1989; Rengel *et al.* 2007). Le déséquilibre entre les MMPs et les TIMPs pourrait aussi être le résultat de l'augmentation de la synthèse des MMPs et l'activation des pro-MMPs par l'action des cytokines pro inflammatoires présentes dans le cartilage atteint d'OA (Sutton *et al.* 2007).

3. Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des prostanoïdes, un groupe de molécules biologiques impliquées dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques (Bos *et al.* 2004; Martel-Pelletier *et al.* 2003). Les prostanoïdes peuvent être divisés en deux groupes: les PGs et les thromboxanes (Bos *et al.* 2004). Les prostaglandines sont des acides gras non saturés composés de 20 atomes de carbone avec une portion cyclique de cinq atomes de carbone (au lieu de six pour les thromboxanes) synthétisés à partir de l'acide arachidonique (AA) (Bos *et al.* 2004). Les prostaglandines sont des molécules paracrine ou autocrine qui agissent sur des récepteurs transmembranaires spécifiques à la surface des cellules (Bos *et al.* 2004; Martel-Pelletier *et al.* 2003). Ces récepteurs sont liés à une protéine G, qui transmet des signaux à la cellule lui permettant de changer son environnement biochimique (Bos *et al.* 2004).

Selon l'endroit où sont synthétisés les PGs et l'état physiologiques du système, les PGs peuvent avoir plusieurs rôles: l'homéostasie, l'inflammation ou des effets anti-inflammatoire (Miller 2006).

Les principales classes de PGs sont la PGD, PGE, PGF et la PGI (Bos *et al.* 2004). La prostaglandine E₂ (le suffixe deux désigne le nombre de doubles liaisons) est la prostanoïde la plus abondante dans le corps humain et est généralement considéré comme étant la PG la plus importante dans la pathogénie de l'OA (Martel-Pelletier *et al.* 2003; Park *et al.* 2006).

3.1. La cascade de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est un acide gras non saturé qui est lié aux phospholipides des membranes cellulaires de la majorité des cellules (Miller 2006). L'acide

arachidonique est relâché dans le cytoplasme de la cellule par l'action des phospholipases A₂ et C (Miller 2006). Les phospholipases sont activées par une grande variété de stimuli, tels les infections, l'inflammation, les hormones, et les traumatismes (Miller 2006). Lorsque l'AA, le précurseur des PGs, se retrouve dans le cytoplasme, l'action des cyclooxygénases (COXs) peut le convertir en PGs ou l'action des lipoxygénases peut le convertir en leukotriènes (Miller 2006). La cyclooxygénase est impliquée dans deux étapes de la conversion de l'AA en PGs. La première est de la cyclooxygénation de l'AA qui produira la prostaglandine G₂ (PGG₂), et la deuxième est la peroxydation de la PGG₂ qui produira la prostaglandine H₂ (PGH₂) (Botting 2006). La prostaglandine H₂ est le substrat final qui peut être converti par l'action des synthétases individuelles en toutes les prostanoïdes notées précédemment. La présence et la concentration des synthétases varient selon les tissus, ce qui va déterminer le taux des différentes prostanoïdes dans chaque tissu (Miller 2006).

3.1.1. Les leukotriènes

Les leukotriènes sont un autre groupe de médiateurs lipidiques impliqués dans plusieurs maladies inflammatoires, tels l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et dans les processus de défense immunitaire (Samuelsson 1983; Werz 2002). L'enzyme 5-lipoxygénase est l'enzyme principal requis pour la conversion de l'AA en leukotriènes.

Les leukotriènes principaux sont le LTB₄, considéré comme étant le plus important, et les leukotriènes cystéinés, incluant le LTC₄, LTD₄ et le LTE₄ (Claesson and Dahlen 1999). Le LTB₄ est impliqué dans les réponses inflammatoires en jouant un rôle dans l'activation et la migration des leucocytes, ainsi que l'adhésion des cellules inflammatoires à l'endothélium vasculaire (Funk 2001). Les leukotriènes cystéinés constituent le système

« slow-reacting substance of anaphylaxis » (Samuelsson 1983). Ils ont l'effet d'augmenter la contraction des muscles lisses du système vasculaire, gastro-intestinal et respiratoire (Needleman *et al.* 1986). En plus de l'effet de broncho-constriction, ils augmentent aussi la sécrétion muqueuse dans le système respiratoire, appuyant ainsi leur rôle dans l'asthme (Wenzel 2003). Les leukotriènes cystéinés peuvent aussi augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins, ce qui facilite le passage des cellules inflammatoires (Claesson and Dahlen 1999). Tout ceci marque l'importance de ces molécules biologiques dans les processus inflammatoires.

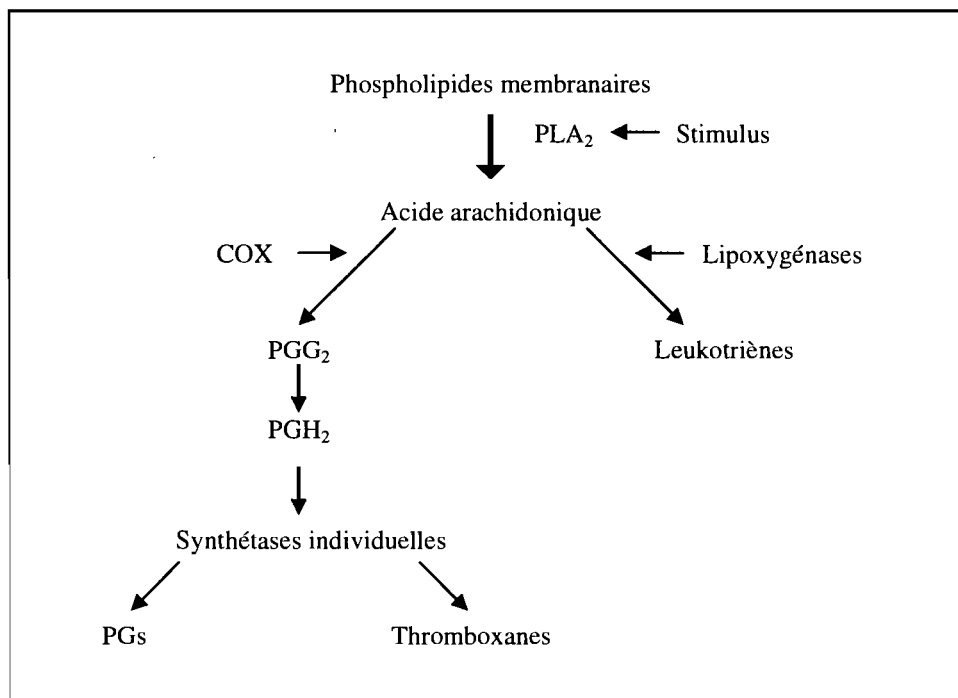


Figure 5: Schéma de la cascade de l'acide arachidonique et sa conversion par l'action des cyclooxygénases et des lipoxygénases (adapté de Martel-Pelletier *et al.* 2003)

3.2. Prostaglandine E₂ et l'ostéoarthrite

La prostaglandine E₂ (PGE₂) est la principale PG synthétisée par les chondrocytes et les fibroblastes synoviaux (Knott *et al.* 1994; Serhan and Levy 2003). Dans les maladies arthritiques, la synthèse de la PGE₂ est augmentée dans le cartilage et la membrane synoviale par l'action de la COX-2, la COX responsable de la majorité de sa production (Martel-Pelletier *et al.* 2003):

La prostaglandine E₂ est un médiateur important de douleur, de fièvre et d'inflammation et exerce plusieurs effets cataboliques au niveau du cartilage articulaire. Chez le cheval, la concentration synoviale de la PGE₂ est élevée dans les articulations arthrosiques lorsque comparée aux concentrations des articulations normales (McIlwraith

1996). La prostaglandine E_2 peut contribuer à la dégradation du cartilage en diminuant la synthèse de certains collagènes et en diminuant le taux de protéoglycanes dans le cartilage, ceci soit par l'inhibition de leur synthèse ou par leur dégradation (Martel-Pelletier *et al.* 2003). Elle est aussi reliée à l'augmentation de la synthèse des MMPs et à l'augmentation de l'apoptose, des facteurs qui contribuent significativement à la pathogénie de l'OA (Martel-Pelletier *et al.* 2003).

Par contre la PGE_2 pourrait aussi avoir des effets bénéfiques sur le cartilage. Par exemple la PGE_2 aurait inhibé la production de certaines MMPs dans les fibroblastes synoviaux humains et elle aurait aussi induit la production des protéoglycanes et collagène dans le cartilage par l'induction du facteur de croissance IGF-1 (DiBattista *et al.* 1994). Dans une étude *in vitro* utilisant des chondrocytes équins, la PGE_2 aurait inhibé l'expression génétique des MMP-1, 3, et 13 et de la TIMP-1 (Tung *et al.* 2002). Cependant, les concentrations de PGE_2 utilisées dans ces études *in vitro* ne sont pas comparables à celles mesurées *in vivo*. Par exemple dans une étude *in vitro* chez les chevaux, les concentrations de la PGE_2 nécessaires pour inhiber l'expression génétique des MMPs et de la TIMP-1 étaient dans l'ordre du $\mu\text{g/ml}$, alors que la concentration de PGE_2 dans le liquide synovial d'un cheval atteint d'OA est dans l'ordre du ng/ml (Tung *et al.* 2002). Donc le rôle physiologique de la PGE_2 dans les articulations demeure encore incertain.

3.3. Les cyclooxygénases

Les cyclooxygénases aussi appelées prostaglandines synthases sont des glycoprotéines membranaires (Tanabe and Tohnaï 2002). Elles sont le facteur limitant dans la conversion de l'AA en PGs. Leur activité est inhibée par l'action des AINS. Les

cyclooxygénases-1 et 2 sont les isoformes des COXs les plus connues, cependant une troisième isoforme, la COX-3, a récemment été découverte.

Il y a 60% d'homologie entre la séquence d'acides aminés des COX-1 et COX-2 humaines. Par contre elles sont encodées par des gènes situés sur des chromosomes différents. Le gène de la COX-1 est situé sur le chromosome 9 et celui de la COX-2 sur le chromosome 1 (Botting 2006). La plus importante différence dans leur séquence d'acides aminés se situe dans leur région promotrice. Celle de la COX-1 ne contient pas de séquence TATA ou CAAT, des éléments régulateur de la transcription. Ces caractéristiques lui confèrent les propriétés de gène constitutif (Park *et al.* 2006; Tanabe and Tohnai 2002). Par contre, la COX-2 contient plusieurs séquences de régulation de la transcription dans sa région promotrice, ce qui lui permet d'avoir une expression inductible (Park *et al.* 2006; Tanabe and Tohnai 2002).

Les protéines COX-1 et 2 sont des homodimères formés de deux unités de 70 kDa. Chaque unité comprend trois domaines: un domaine EGF (epidermal growth factor) à l'extrémité N-terminale, un domaine de liaison membranaire composé de quatre hélices α et un domaine catalytique à l'extrémité C-terminale de la protéine (Garavito *et al.* 2002). Le domaine EGF est responsable de dimériser la protéine. Le domaine de liaison membranaire est responsable de l'ancrage avec la membrane lipidique. C'est également à cette endroit que ce l'ouverture permettant à l'AA et les AINS de pénétrer le site actif (Park *et al.* 2006). Le domaine catalytique est une structure globulaire qui contient deux sites actifs: un site pour l'activité COX et un site pour l'activité peroxydase. L'activité de la cyclooxygénation a lieu à l'intérieur de la molécule et l'activité peroxydase se produit à la surface de cette dernière (Park *et al.* 2006). La structure tridimensionnelle et l'activité

enzymatique de la COX-1 et la COX-2 se ressemble beaucoup, par contre le site actif de la COX-2 est plus large, une distinction qui devient importante pour l'identification d'AINS sélectif pour la COX-2 (Botting 2006).

3.3.1. La cyclooxygénase-1

La cyclooxygénase-1 est considérée comme étant la forme constitutive des enzymes COXs car elle est responsable de maintenir le niveau basal de prostanoïdes nécessaires pour les processus physiologiques essentiels, tels la cytoprotection gastrique, l'agrégation plaquettaire et la fonction rénale (Miller 2006). En général, la concentration de la COX-1 demeure stable, par contre certaines hormones et facteurs de croissance peuvent augmenter son expression (DeWitt 1991).

Malgré ses rôles surtout physiologiques, des études récentes suggèrent que la COX-1 contribue aussi aux réponses inflammatoires. Par exemple, selon une étude *in vitro* chez les humains atteints d'OA, la COX-1 aurait contribué à la synthèse d'une importante proportion de la PGE₂ dans les tissus synoviaux (Knorth *et al.* 2004). Aussi des études utilisant un modèle d'œdème de pattes induites par le carraghénane chez des souris, ont démontré que les souris dépourvues du gène de la COX-2 produisaient des niveaux de PGs aux sites d'inflammation qui étaient équivalents aux niveaux des souris type «sauvage» et l'utilisation des AINS à des doses pouvant inhiber l'activité de la COX-1 pouvait significativement diminuer l'inflammation produite, démontrant que la COX-1 peut contribuer à la synthèse des PGs impliquées dans l'inflammation (Wallace *et al.* 1998).

3.3.2. La cyclooxygénase-2

La cyclooxygénase-2, a été la deuxième isoenzyme COX découverte. Comme mentionné plus tôt, elle est considérée comme étant la forme inductible. Cette isoforme est

plutôt absente ou présente en très faible quantité dans la majorité des cellules normales. Par contre son expression génétique peut-être induite par des agents impliqués dans l'inflammation, le stress et les dommages cellulaires (Miller 2006; Topper *et al.* 1996). Son expression peut donc être induite par plusieurs cytokines, facteurs de croissance, hormones et oncogènes (Tableau I). Ces derniers peuvent agir tant au niveau de la transcription du gène qu'en phase post-transcriptionnelle (Tanabe and Tohnai 2002). La cyclooxygénase-2 est particulièrement associée à la synthèse de la PGE₂, impliquées dans plusieurs processus pathologiques, incluant l'OA (Martel-Pelletier *et al.* 2003). Par exemple, chez les humains, l'expression de la COX-2 est minime dans les tissus articulaires normaux; par contre, lors des pathologies arthritiques, l'induction de la COX-2 dans ces tissus est augmentée et sa présence est associée à la production locale de la PGE₂ (Martel-Pelletier *et al.* 2003).

La COX-2 jouerait aussi un rôle dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs systèmes du corps, en étant présente de façon constitutive dans le système rénal, le système nerveux, le système reproducteur, le système cardiovasculaire et les os (Garavito *et al.* 2002; Miller 2006). Dans le système rénal, la COX-2 contribue à la synthèse des PGs essentielles pour le développement normal des reins chez la souris et est impliquée dans la fonction rénale normale chez l'humain (Dinchuk *et al.* 1995; Harris 2006). Dans le système reproducteur, l'augmentation de l'expression de l'acide ribonucléique messenger (ARNm) de la COX-2 est essentielle pour l'ovulation et l'accouchement (Gibb and Sun 1996; Lim *et al.* 1997). Il est donc erroné de penser que les fonctions de la COX-2 se limitent aux réponses inflammatoires. Ses rôles sont beaucoup plus complexes

qu'originellement décrits et son implication dans la physiologie normale, bien que maintenant évidente, demeure à être précisée.

3.3.3. La cyclooxygénase-3

La cyclooxygénase-3 est la dernière isoenzyme à avoir été découverte. Elle a été identifiée en premier chez le chien. La cyclooxygénase-3 provient du même gène que la COX-1, mais les deux enzymes diffèrent au niveau de l'épissage des introns (Chandrasekharan *et al.* 2002). La COX-3 canine est une protéine membranaire de 65 kDa (Chandrasekharan *et al.* 2002). L'ARNm de la COX-3 a été identifiée dans le cortex cérébral canin et humain, et dans le cœur humain (Chandrasekharan *et al.* 2002). Plusieurs paramètres régissant la COX-3 n'ont pas encore été élucidés, donc son rôle exact n'est pas encore pleinement défini. Par contre des études sur l'activité de la COX-3 canine ont démontré que cette enzyme serait la cible de plusieurs médicaments analgésiques/antipyrétiques, en particulier l'acétaminophène et certains AINS (Chandrasekharan *et al.* 2002). L'inhibition de la COX-3 pourrait donc être un autre mécanisme par lequel ces médicaments agissent.

Agents inducteurs	Type de cellules
TPA	Fibroblastes, monocytes, macrophages, cellules épithéliales, cellules des muscles lisses du système vasculaire, cellules endothéliales du système vasculaire, synoviocytes, kératinocytes, hépatocytes
LPS	Macrophages, cellules endothéliales du système vasculaire, neurones, cellules gliales, hépatocytes
Il-1 α , β	Fibroblastes, cellules épithéliales, cellules endothéliales du système vasculaire, synoviocytes, chondrocytes, ostéoblastes, cellules mésangiales glomérulaires, cellules endocrines du pancréas
TNF α , β	Cellules endothéliales du système vasculaire, cellules du mésothélium péritonéal
Wfy	Macrophages, cellules gliales
TGF α , β	Ostéoblastes, cellules épithéliales de l'intestin
EGF	Fibroblaste, cellules épithéliales des muscles lisses du système vasculaire, ostéoblastes
FGF	Cellules des muscles lisses du système vasculaire, ostéocytes
PDGF	Fibroblastes, Cellules des muscles lisses du système vasculaire
LH, FSH	Cellules folliculaires ovariennes
v-Ras	Fibroblastes, cellules épithéliales
v-Src	Fibroblastes, cellules épithéliales
Forskolm	Fibroblastes, ostéoblastes
Serum	Fibroblastes, cellules des muscles lisses du système vasculaire, ostéoblastes
NMDA	Neurone

Tableau I: agents inducteurs de l'expression génétique de la COX-2 (adapté de Tanabe and Tohnai 2002)

4. Traitements de l'ostéoarthrite

4.1. Généralité

Chez le cheval, le traitement de l'OA vise principalement à minimiser la douleur et à diminuer la boiterie. Par contre, les agents appelés chondroprotecteurs sont des agents thérapeutiques faisant maintenant preuve d'une grande popularité pour le traitement de l'OA tant chez les chevaux que chez les humains et les autres espèces animales. Il n'en demeure pas moins que les corticostéroïdes et les AINS demeurent les traitements de choix utilisés par les vétérinaires équins (Goodrich and Nixon 2006).

4.1.1. Les agents chondroprotecteurs

L'idée derrière ces produits est qu'en plus de minimiser la douleur associée à l'OA, ils posséderaient des rôles chondroprotecteurs en ralentissant ou même en éliminant la dégradation du cartilage (Dechant and Baxter 2007). Les agents chondroprotecteurs les plus utilisés sont les glycosaminoglycanes polysulfatés (GAGPS) et la glucosamine (GS) et ils sont le plus fréquemment administrés par voie orale sous forme de suppléments alimentaires.

L'utilisation de ces nutraceutiques est fortement controversée et ce pour plusieurs raisons. L'une d'entre elles est que la qualité de ces produits n'est pas surveillée par les agences gouvernementales des denrées alimentaires et des médicaments donc la qualité et la pureté de ces produits demeurent questionnables (Neil *et al.* 2005). Il y a aussi des doutes que les concentrations intra articulaires atteintes *in vivo* soient capables de produire les mêmes effets bénéfiques obtenus *in vitro*. Par exemple une étude a trouvé qu'après l'administration orale d'une dose recommandée de GS chez le cheval, la quantité mesurée

dans l'articulation était beaucoup moins élevée que la quantité réputée pouvant créer des effets bénéfiques sur le cartilage *in vitro* (Lavery *et al.* 2005).

4.1.2. Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont des anti-inflammatoires qui inhibent l'inflammation à plusieurs niveaux (Trotter 1996). Par conséquent, ils affectent des constituants du système immunitaire, donc lorsqu'ils sont utilisés systémiquement ils peuvent rendre l'animal plus susceptible à l'infection. Donc la voie intra-articulaire est souvent utilisée pour le traitement de l'OA (Trotter 1996). Cependant leur utilisation a pu être associée à des effets négatifs sur le cartilage donc leur utilisation doit être de façon avertie (Chunekamrai *et al.* 1989; Mankin and Conger 1966; Todhunter *et al.* 1996). Quelques corticostéroïdes souvent utilisés chez les équins sont l'acétate de méthylprednisolone, la bétaméthasone et la triamcinolone (Trotter 1996).

5. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires font des AINS les médicaments les plus souvent administrés aux humains et aux animaux pour traiter les arthropathies (Goodrich and Nixon 2006). Chez le cheval, la phénylbutazone est l'AINS le plus souvent administré. Plusieurs alternatives sont aussi disponibles, tels la flunixin, le kétoprofène, le naproxène et le carprofène (Caron 2000; Goodrich and Nixon 2006).

Les structures chimiques des AINS sont très diverses, comprenant les salicylates, les pyrozoles, les oxicams, les fenamates, les acides arylacétiques et les acides arylpropioniques (Davies and Skjodt 2000). Même avec ces structures très différentes, ils ont tous des actions biologiques très similaires (Davies and Skjodt 2000). Cependant ce n'est qu'en 1971 que Sir. John Vane a découvert leur principal mécanisme d'action : l'inhibition de l'activité des COXs (Vane, 1971). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens entrent en compétition avec l'AA pour se lier au site actif des COXs, bloquant ainsi la production des PGs. En général, les effets thérapeutiques des AINS sont considérés comme étant le résultat de l'inhibition de la COX-2, ce qui diminue le taux des PGs reliés à l'inflammation. Les effets secondaires sont associés à l'inhibition de l'activité de la COX-1, ce qui diminue le taux des PGs nécessaires pour l'homéostasie.

Les AINS sont classifiés selon leur capacité d'inhiber la COX-1 et la COX-2. Cette sélectivité pour l'une ou l'autre des isoenzymes est déterminée par des méthodes *in vitro* ou *ex vivo*. La sélectivité est exprimée par le IC_{50} soit la concentration d'AINS nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de la COX-1 ou la COX-2. Elle est souvent rapportée sous forme de ratio d' IC_{50} de la COX-1/COX-2. Plus le ratio est bas plus l'AINS est sélectif pour la COX-1 et inversement, plus il est élevé, plus il est sélectif pour la COX-2. Cette méthode de sélection a permis d'identifier quatre groupe d'AINS: (1) les

AINS sélectifs pour la COX-1 (par exemple l'aspirine ayant un ratio d'IC₅₀ COX-1/COX-2 de 0.01), (2) les AINS non sélectifs, pour la plupart ayant un ratio d'IC₅₀ COX-1/COX-2 entre 0.5 et 3 (l'ibuprofène et l'indométhacine), (3) les AINS relativement sélectifs pour la COX-2 (le méloxicam, le nimesulide et le diclofénac) ayant un ratio d'IC₅₀ COX-1/COX-2 entre 10 et 20 et (4) les inhibiteurs sélectifs pour la COX-2 comme le célécoxib et rofécoxib, ce dernier ayant un ratio d'IC₅₀ COX-1/COX-2 au-dessus de 400 (Suleyman *et al.* 2007). Par contre, la sélectivité d'un AINS peut varier d'une espèce à l'autre. Dans une étude *in vitro* évaluant la sélectivité de plusieurs AINS chez le cheval, le chien et le chat, les sélectivités différaient entre les espèces, possiblement à cause des différences dans les activités des COXs entre les espèces (Brideau *et al.* 2001). La sélectivité d'un AINS peut aussi varier chez une espèce d'une étude à l'autre car les variables et les conditions expérimentales utilisées ne sont pas toujours les mêmes (Brideau *et al.* 2001; Cronstein 2002).

La majorité des effets secondaires associés à l'administration des AINS sont causés par l'inhibition de la COX-1. En diminuant la synthèse des PGs importantes pour l'homéostasie des systèmes gastro-intestinal et rénal, les AINS peuvent causer des ulcères et hémorragies gastriques et de la nécrose des papilles rénales (Moses and Bertone 2002). Pour minimiser ces effets secondaires, les AINS sélectifs pour la COX-2 ont été développés. Bien que ces AINS aient minimisé les effets secondaires aux niveaux gastro-intestinal et rénal, ils démontrent de nouvelles toxicités, la plus importante étant l'infarctus du myocarde, causé par la diminution importante de la prostacycline, la prostaglandine nécessaire pour empêcher l'agrégation plaquettaire (Botting 2006).

5.1 Diclofénac

5.1.1. Généralité

Le diclofénac est un AINS, dans la classe des acides arylacétiques, plus spécifiquement des dérivés de l'acide phénylacétique tout comme l'acéclofénac (Davies and Anderson 1997; Frolich 1997). Le diclofénac entre en compétition avec l'acide arachidonique pour se fixer au site actif des COXs. Lorsque lié, il forme un complexe irréversible avec l'enzyme le rendant inactif (Ku *et al.* 1975). Les IC_{50} du diclofénac pour la COX-1 et la COX-2 varient beaucoup selon les études. Les IC_{50} ont été déterminés chez l'humain et le chien et les valeurs pour la COX-1 varient de 120 à 191 ng/ml et pour la COX-2 de 3,1 à 108,1 ng/ml (Brideau *et al.* 2001; Capone *et al.* 2007; Cronstein 2002; Henrotin *et al.* 2001; Urquhart 1991). Ces valeurs n'ont pas encore été déterminées pour le cheval. Chez l'humain, on considère le diclofénac comme un AINS non sélectif (Warner *et al.* 1999) où le diclofénac inhibe préférentiellement la COX-2, par contre il inhibe aussi la COX-1 à ces même concentrations thérapeutiques (Cronstein 2002). En plus de son inhibition de la COX-1 et la COX-2, le diclofénac démontre aussi un fort potentiel à inhiber la COX-3 (Schwab *et al.* 2003).

Les effets thérapeutiques du diclofénac sont aussi reliés à son implication dans la régulation fonctionnelle des récepteurs périphériques de la douleur (Tonussi and Ferreira 1994). Une des causes de la douleur est associée à une augmentation de la sensibilité des récepteurs de douleur causée par des stimuli comme les PGs. Le diclofénac, en inhibant la production des PGs, bloque l'augmentation de la sensibilité de ces récepteurs et par conséquent la perception de la douleur. De plus, le diclofénac pourrait aussi avoir un effet direct en diminuant l'activité des récepteurs de la douleur, possiblement par l'action du

système arginine-oxide nitrique- guanosine monophosphate cyclique (Tonussi and Ferreira 1994).

Le diclofénac a aussi des effets sur la fonction des leucocytes, en diminuant leur chimiotactisme et la production des superoxydes et protéases (Bell *et al.* 1991; Todd and Sorkin 1988). De plus des études *in vitro* ont démontré que le diclofénac aurait un effet sur le relâchement de l'AA en diminuant la quantité d'AA disponible pour être converti en PGs (Ku *et al.* 1986). Les effets analgésiques et anti-inflammatoires du diclofénac sont donc le résultat de la combinaison de ces différents mécanismes d'action.

5.1.2. Utilisation chez les humains

Le diclofénac est souvent utilisé chez l'humain pour traiter une variété d'entités cliniques, mais il s'emploie surtout pour soulager les symptômes de l'arthrite rhumatoïde et de l'OA (Brogden *et al.* 1980; Davies and Anderson 1997). Le diclofénac est le plus souvent administré oralement chez l'humain, cependant des formules topiques, intraveineuses, intramusculaires et intrarectales ont aussi été mises au point (Davies and Anderson 1997). La dose utilisée chez les humains varient selon l'entité clinique à traiter et le mode d'administration utilisé, mais le dosage est habituellement de 50 à 150 mg par jour ou 25 à 50 mg trois fois par jour (Anonymous 2003; Davies and Anderson 1997).

5.1.3. Utilisation chez les animaux

Quoi que moins répandu, le diclofénac est aussi utilisé en médecine vétérinaire. Il est disponible sous formes orales et intramusculaires et il est commercialisé pour le contrôle de la douleur chez les ruminants (vaches, moutons) lors de la castration ou pour la boiterie occasionnée par des arthroses (Mahajan *et al.* 1994; Molony *et al.* 1997). Comme chez l'humain, des formules topiques sont aussi disponibles pour le traitement de

problèmes oculaires chez les animaux, principalement pour le contrôle de la douleur post-opératoire (Gaynes and Fiscella 2002; Giuliano 2004).

5.1.4. Métabolisme et excrétion

Le diclofénac est fortement lié aux protéines sériques (>99.7%), et majoritairement à l'albumine (Davies and Anderson 1997). Ces liaisons affectent la distribution et la biodisponibilité de diclofénac (Warner *et al.* 2006). Par exemple une étude *in vitro* a démontré que la liaison du diclofénac aux protéines pouvait causer un changement de son efficacité relative pour la COX-1 et la COX-2; la puissance de diclofénac pour la COX-1, mais pas pour la COX-2 (en mesurant l'IC₅₀) était augmentée lorsque le niveau de protéines diminue (Warner *et al.* 2006). Il est généralement accepté que les molécules médicamenteuses liées aux protéines ne sont pas disponibles pour leurs actions pharmacologiques diminuant ainsi la biodisponibilité du produit (Grandison and Boudinot 2000). La distribution est aussi affectée par cette liaison aux protéines. Initialement, un médicament fortement lié aux protéines plasmatiques aura une plus grande concentration plasmatique et une concentration tissulaire moins importante donc un petit volume de distribution (Gunaratna 2001). Par contre ces liaisons sont réversibles, donc ce phénomène a principalement pour effet de retarder l'action des médicaments.

Chez les humains, l'absorption du diclofénac suite à son administration orale est complète mais seulement 50% de la dose absorbée est disponible systémiquement et ce à cause de l'effet du premier passage hépatique où la moitié des molécules subiront une métabolisation hépatique pré-systémique. Ce métabolisme se fait par deux voies: l'hydroxylation et la glucuronidation (Tang 2003). L'hydroxylation du diclofénac se fait par l'action du cytochrome p450 et la glucuronidation se fait principalement par l'action de

l'uridine 5'-diphosphoglucuronosyl transferase (Tang 2003). Le principal produit de la biotransformation de diclofénac est le 4-hydroxy-diclofénac (Menasse et al. 1978). Chez les humains, ce métabolite a de faibles effets thérapeutiques (Menasse et al. 1978). Quatre autres métabolites ont aussi été identifiés chez l'humain: le 5-hydroxy-,3'-hydroxy-, 4',5-dihydroxy- and 3'-hydroxy-4'-methoxy diclofénac (Davies and Anderson 1997).

Après ce passage au foie, le diclofénac prend la circulation systémique pour être transporté au site où il exerce son action. Au niveau de l'articulation, après une administration systémique, le diclofénac pénètre et sort du liquide synovial par diffusion. Cette diffusion vers l'espace intra-articulaire se produit lorsque la concentration de diclofénac dans le plasma est plus élevée que celle dans le liquide synovial. Le phénomène inverse se produit lorsque les concentrations synoviales deviennent plus élevées que les concentrations plasmatiques. Approximativement 65% du diclofénac est éliminé par excrétion rénale. L'excrétion du 35% restant se fait par voie biliaire avec très peu de la molécule excrétée intacte. (Anonymous 2003).

5.1.5. Toxicité

Selon certains auteurs, la toxicité du diclofénac serait très faible, causant relativement peu d'effets secondaire au système digestif (Frolich 1997; Menasse *et al.* 1978). D'après des études chez le rat et la souris, le dosage nécessaire pour causer des lésions gastro-intestinales serait huit fois la dose thérapeutique, indiquant une bonne tolérance pour ce médicament, même meilleure que plusieurs autres AINS (Menasse *et al.* 1978). Malgré ce fait, l'utilisation du diclofénac peut quand même être associé à des effets secondaires, les plus importants au niveau gastro-intestinal (Menasse *et al.* 1978). Les effets secondaires au niveau gastro-intestinal peuvent être minimes, comme la diarrhée, le

vomissement, la dyspepsie. Par contre ils peuvent être plus sévères incluant les ulcères et les perforations gastriques (Laine *et al.* 2007; Tugwell *et al.* 2004). Le diclofénac a aussi été associé à des toxicités aux niveaux rénal et hépatique (Menasse *et al.* 1978; Tugwell *et al.* 2004).

5.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens topiques

5.2.1. Généralité

L'utilisation des AINS topiques a comme but de diminuer les concentrations systémiques afin de minimiser les effets secondaires parfois associés à leur administration orale, intraveineuse ou intramusculaire. Afin de déterminer l'efficacité d'un AINS topique et de justifier son utilisation comme alternative à une administration orale, il est important de vérifier son efficacité et sa toxicité dans des essais cliniques et de les comparer à celles de l'AINS oral. Il est de première importance de déterminer au départ si le produit topique pénètre le site à traiter et si les concentrations obtenues sont thérapeutiques (Grahame 1995).

Plusieurs études chez les humains ont été effectuées pour comparer l'efficacité des AINS topiques. Une méta analyse évaluant plusieurs études à double aveugle a déterminé que l'utilisation des AINS topiques était significativement plus efficace que le placebo pour le traitement des maladies de l'appareil locomoteur, incluant l'OA (Mason *et al.* 2004). Par contre, les effets n'ont été évalués que sur une période de deux semaines. L'effet à long terme de ces médicaments reste donc à être validé. De plus, jusqu'à maintenant, il n'y a pas assez d'évidence pour affirmer que l'utilisation d'un AINS topique aurait la même efficacité que ce même AINS administré par voie orale (Heyneman *et al.* 2000).

L'utilisation d'AINS topique est associée à peu d'effets secondaires. La rougeur et les démangeaisons localisées aux sites d'application mais qui disparaissent après la cessation sont les complications les plus fréquemment rapportées (Heyneman *et al.* 2000). Une étude a déterminé que les effets secondaires systémiques contribueraient à seulement 5% des effets secondaires suite à l'application topique d'un AINS (Figueras *et al.* 1994). Cette faible incidence d'effets secondaires systémiques serait attribuable aux faibles concentrations systémiques atteintes lors de l'utilisation topique (Heyneman *et al.* 2000).

Plusieurs études chez les humains et espèces animales ont été faites pour déterminer les concentrations intra-articulaires après l'application topique des AINS. Par exemple, la pénétration intra-articulaire du kétoprofène a été étudiée chez l'humain après une seule application topique ou suite à son application topique répétée pendant 5 jours (Rolf *et al.* 1999). Des concentrations ont été mesurées dans le liquide synovial, dans le tissu synovial, dans le ménisque et dans le cartilage (Rolf *et al.* 1999). Aussi, dans une étude investiguant la pénétration topique du méthylsalicylate chez le chien, des concentrations de ce dernier et de l'acide salicylate (un de ses dérivés) ont été détectées dans le liquide synovial et les muscles des articulations traitées (Mills *et al.* 2005). Il est donc maintenant accepté que l'application topique d'un AINS peut résulter en des concentrations mesurables dans le liquide synovial et les tissus synoviaux, par contre il y a beaucoup de variabilité entre les individus et les produits (Heyneman *et al.* 2000). De plus, chez l'humain, l'effet thérapeutique de ces concentrations articulaires reste encore à être déterminé (Grahame 1995).

5.2.2. Diclofénac topique

Des études sur le diclofénac topique effectuées chez l'humain ont démontré que son utilisation, tout comme les autres AINS topiques, est associé à peu d'effets secondaires, les plus communs étant la sécheresse de la peau au site d'application (Bookman *et al.* 2004; Niethard *et al.* 2005; Tugwell *et al.* 2004). Ces études démontrent aussi que son utilisation topique a pu minimiser les symptômes associés à l'OA, comme la douleur, la fonction physique et la raideur évalués par l'index WOMAC (Western Ontario and Werstern University) (Bookman *et al.* 2004; Niethard *et al.* 2005; Tugwell *et al.* 2004). Pour le diclofénac, seulement des études chez l'humain ont été faites pour déterminer la concentration synoviale après son application topique. Les résultats de ces études démontrent des concentrations entre 1 et 26 ng/ml après l'application topique répétée de diclofénac sur des genoux atteints d'OA (Gallacchi and Marcolongo 1993; Radermacher *et al.* 1991). Selon certaines études *in vitro* chez l'humain, ces concentrations semblent avoir des effets anti-inflammatoires en inhibant la COX-2 (Capone *et al.* 2007; Henrotin *et al.* 2001).

5.2.3. Mécanisme de pénétration

La peau est un organe composé de trois parties principales : la partie superficielle ou l'épiderme, la partie interne ou le derme et la partie plus profonde ou l'hypoderme (Mills and Cross 2006). La peau fonctionne comme une barrière en protégeant le corps de l'environnement externe et en limitant la perte de substance importante, par exemple l'eau et les électrolytes du corps (Madison 2003). Cette capacité est surtout grâce au stratum corneum de l'épiderme (Cevc 2004). Le stratum corneum aussi appelée la couche cornée constitue la principale résistance à la pénétration des médicaments transcutanés, donc le

passage des médicaments à travers cette couche est principalement considéré comme l'étape cinétiquement limitante (Kalia and Guy 2001; Singh and Roberts 1994). Le transport du médicament topique jusqu'à son site d'action comprend plusieurs étapes. Les médicaments doivent traverser premièrement l'épiderme, principalement par diffusion, ensuite la membrane basale qui sépare l'épiderme du derme, pour finalement se rendre au derme (Singh and Roberts 1994). La diffusion des molécules dépend de leur polarité, leur taille et leur capacité de créer des liaisons hydrogènes (Cevc 2004). Le derme, contrairement à l'épiderme, est un tissu composé d'un système sanguin et lymphatique, et c'est ici que le médicament peut être absorbé dans la circulation sanguine ou pénétrer dans les tissus profonds (Mills and Cross 2006; Singh and Roberts 1994). La pénétration transcutanée peut aussi se faire via les follicules pileux et les glandes sudoripares, de cette façon le médicament évite le stratum corneum, cependant des études suggèrent que ce mode de pénétration est minime (Ranade 1991).

La pénétration d'un AINS topique à son site d'action peut être affectée par plusieurs paramètres: sa liaison aux protéines et aux tissus, son métabolisme et les véhicules médicamenteux utilisés. Les véhicules sont des substances qui contiennent le médicament actif et leur but est d'améliorer et faciliter le transport du médicament à travers la peau au site d'action (Mills and Cross 2006). Les véhicules peuvent être des solvants, des agents de conservation ou des stabilisateurs (Mills and Cross 2006). Un exemple de ces véhicules est les liposomes.

Le mécanisme par lequel les AINS topiques pénètrent les articulations est encore controversé, par contre il existe deux lignes de pensée. La première suggère que la pénétration du produit à son site d'action se fait par la redistribution systémique suivant

son absorption par la peau et le deuxième mécanisme serait que les AINS peuvent pénétrer directement dans les articulations en traversant les différentes épaisseurs de tissus de la peau jusqu'au liquide synovial. Cependant, les techniques utilisées pour évaluer ces mécanismes de pénétration ne sont pas toujours adéquates. Par exemple, Mills et al. suggèrent que l'utilisation de la mesure de la concentration systémique des AINS n'est pas adéquate et que pour déterminer le cheminement de la diffusion des AINS, il est important de vérifier les concentrations dans les vaisseaux sanguins locaux plutôt que seulement dans les veines centrales (Mills *et al.* 2005). Ces paramètres ont été mesurés dans leur étude sur la pénétration de l'acide méthylsalicylate chez le chien après son application topique. Les résultats ont déterminé que les concentrations locales étaient plus élevées que les concentrations systémiques, démontrant que le produit était capable de diffuser directement dans les tissus profonds sans auparavant être distribué au niveau systémique (Mills *et al.* 2005).

5.2.4. Facteurs affectant la pénétration topique

Le site et l'état de la peau elle-même peut aussi affecter la pénétration des préparations topiques (Mills and Cross 2006). Une étude *in vitro* chez le cheval a démontré que la pénétration topique de l'acide méthylsalicylate différait significativement entre les sites d'application, notamment la pénétration à travers la peau de la région métacarpienne dorsale était significativement plus élevée que la pénétration au niveau du thorax et la région inguinale (Mills and Cross 2007). L'état de la peau joue aussi un rôle important, par exemple l'utilisation de l'alcool pour les préparations aseptiques peut « délipidiser » et désorganiser le stratum corneum, la partie la plus superficielle de la peau, ce qui pourrait augmenter la pénétration d'un produit topique (Finnin and Morgan 1999;

Mills and Cross 2006). Le rasage serait aussi un facteur important en ce qui concerne la pénétration topique d'un AINS, car sans la barrière du poils, la pénétration peut être améliorée (Mills 2007). La plupart des études faites sur la pénétration des médicaments à travers la peau ont été faite sur la peau normale, par contre, toutes autres circonstances pouvant affecter l'intégrité du stratum corneum (par exemple des maladies de la peau) pourraient possiblement affecter la pénétration en diminuant la fonction barrière du stratum corneum (Mills and Cross 2006).

5.3. Surpass®

L'utilisation topique d'AINS chez les équins a plusieurs avantages; une méthode non invasive ne nécessite pas l'assistance d'un vétérinaire pour son utilisation et présente moins de risque de toxicité gastro-intestinale et rénale (Mills and Cross 2006; Moses and Bertone 2002). Le Surpass® est une nouvelle crème de 1% de diclofénac, destinée à l'usage équin. Cette crème est à base de liposome, des vésicules de transport préparées à partir de phospholipides. Dans le produit Surpass®, les liposomes sont du type multi lamellaire ou liposomes à multi compartiments. Chaque couche de phospholipides est séparée par des couches aqueuses où se retrouvent les médicaments hydrophiles, notamment le diclofénac.

Quelques études ont été effectuées pour déterminer le potentiel thérapeutique de ce produit chez le cheval. Premièrement, une étude à double aveugle avec placebo a été effectuée pour déterminer la sécurité et l'efficacité de la crème de 1% de diclofénac chez le cheval (Lynn *et al.* 2004). Les chevaux inclus dans cette étude souffraient de maladies articulaires. Le diagnostic de la maladie articulaire était basé sur l'anamnèse, des examens de boiterie, de douleur et mobilité, ainsi que des radiographies des articulations. Le

premier groupe de chevaux (n=40) a reçu un placebo et le deuxième groupe (n=42) a reçu la crème Surpass®. L'application des crèmes s'est faite deux fois par jour pour une période de cinq jours. Les paramètres de boiterie, de douleur et mobilité ont été évalués. Les résultats ont permis de déterminer que l'application topique répétée de cette crème a pu diminuer significativement la boiterie des chevaux souffrant d'OA. Le seul effet secondaire détecté chez le groupe de chevaux recevant la crème de 1% de diclofénac a été qu'un cheval a souffert d'une colique. Les auteurs de l'étude ne croient pas que cet effet était relié à l'utilisation du Surpass®.

L'efficacité de l'application de la crème Surpass® a aussi été démontrée dans une autre étude chez le cheval utilisant un modèle d'inflammation sous-cutanée (Caldwell *et al.* 2004). Des cages implantées dans l'encolure des chevaux ont été utilisées pour mesurer la concentration de diclofénac et de PGE₂ dans le transsudat après induction d'une réaction inflammatoire par l'injection de carraghénane. Après une application unique de Surpass® au dessus du site d'implantation des cages, la concentration de diclofénac a été mesurée dans les tissus à 6, 12, 18, 24, 30, 36 et 48 heures après l'application topique. La concentration moyenne maximale de diclofénac dans le transsudat a été de 76,2 ng/ml obtenue à 18 heures après l'application topique. Le diclofénac a aussi diminué l'inflammation créée, en diminuant significativement le niveau de la PGE₂ dans le transsudat des chevaux traités comparé au groupe contrôle. L'application unique de diclofénac topique n'a pas causé d'augmentation importante au niveau systémique, avec une concentration moyenne maximale de 4,3 ng/ml.

Une étude de pharmacocinétique a déterminé les concentrations de diclofénac dans le sérum et dans l'urine après l'administration de doses multiples de Surpass® chez le

cheval (Anderson *et al.* 2005). La crème a été appliquée sur un, deux ou quatre boulets deux fois par jours pour dix jours. Les concentrations moyennes maximales de diclofénac obtenu dans le sérum après une, deux et quatre fois la dose suggérée ont été de 2,6 ng/ml, 3,8 ng/ml et 9,1 ng/ml respectivement et les concentrations moyennes maximales dans l'urine étaient de 256,2 ng/ml, 283,6 ng/ml et 502,1 ng/ml respectivement. Cette étude a confirmé que les concentrations sériques de diclofénac obtenues en utilisant quatre fois la dose suggérée sont demeurées plus faibles que les concentrations associées à des effets secondaires. Par contre, à cette dose, les niveaux de diclofénac dépassaient les concentrations de diclofénac permises dans l'urine par la fédération équestre américaine, l'organisme qui régleme les sports équestres aux États-Unis.

Récemment, l'efficacité de Surpass® a été évaluée en utilisant un modèle connu d'OA chez le cheval, où des fragments ostéochondraux sont créés au niveau de l'os radial du carpe dans le but d'induire des changements ostéoarthritiques dans le temps et avec l'exercice (Frisbie *et al.* 2007; Mills *et al.* 2005). Les résultats préliminaires publiés de cette étude effectuée en double aveugle semblent démontrer que le Surpass® a pu diminuer significativement la boiterie chez ces chevaux lorsque comparé à la phénylbutazone. L'effet du Surpass® sur le métabolisme cartilagineux a aussi été étudié et le Surpass® aurait permis de conserver de plus haut niveau de GAGs dans le cartilage comparé au groupe placebo.

Toutes ces études appuient le potentiel thérapeutique du diclofénac topique, néanmoins la vérification de sa pénétration articulaire chez le cheval reste à être évaluée. Notre étude a pour but d'effectuer cette vérification.

Chapitre II: Article

Présentation sous forme d'article.

Article soumis le 30 janvier 2008 à la revue « Equine Veterinary Journal ».

Synovial Fluid and Plasma Concentrations of Diclofenac after Repeated Topical and Oral Administration in Horses

Marissa Bolduc¹, Guy Beauchamp¹, René Gagnon², Sophie Morisset¹

¹*Département des Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada*

²*Service de Génétique, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, 3001 12e Avenue Nord, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4*

In preparation for submission to *Equine Veterinary Journal* (General Articles)

Keywords: horse, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, diclofenac, synovial fluid, osteoarthritis, topical application, per os

Word count: 296 words (summary), 4142 words (manuscript)

* Corresponding author: Sophie Morisset DVM, PhD, Diplomate ACVS

Département de Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire,
Université de Montréal, C.P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada.

Tel: [information retirée / information withdrawn], Fax: [information retirée / information withdrawn]

Email: [information retirée / information withdrawn]

Summary

Reason for performing the study: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used for the treatment of pain and inflammation associated with osteoarthritis (OA) in horses. However, oral NSAID use can sometime be associated with important side effects, possibly because of high systemic concentrations. The use of topical NSAIDs may be an alternative to avoid these negative effects by minimizing the amount of drug in the systemic circulation, while reaching the site of inflammation in sufficient quantities to provide clinical relief.

Objectives: To determine and compare synovial fluid and plasma concentrations of diclofenac following its repeated topical and oral administration in horses.

Methods: Two groups of horses were studied. The first group (n=9) received 1% topical diclofenac cream on one carpus, while the second group (n=6) received oral diclofenac (2.2 mg/kg bwt) by nasogastric intubation. Doses were given every twelve hours for a total of 7 doses. Synovial fluid and blood samples were taken before dosing, 12 hours after the 6th dose, and at 4, 8, 12, 24 hours following the final dose. Supplementary blood samples were taken at 0.25, 0.5, 1 and 2 hours following the final oral administration. Diclofenac concentrations in synovial fluid and blood were analyzed by HPLC-MS-MS.

Results: Mean peak synovial fluid concentrations following topical and oral administration were 15.73 ng/ml and 286.42 ng/ml respectively. Mean peak plasma

concentrations following topical and oral administration were 3.53 ng/ml and 11 641 ng/ml respectively.

Conclusion: After topical application, diclofenac reached the synovial fluid at concentrations potentially capable of anti-inflammatory effects, while producing significantly lower concentrations in the circulation compared to the oral route.

Potential relevance: 1% diclofenac topical cream may be a safe alternative for effective treatment of pain and inflammation associated with osteoarthritis and other musculoskeletal injuries in horses compared to traditional oral medications.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a common disease encountered in the horse. While there is currently no cure, non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used by veterinarians to help relieve the pain and inflammation associated with the disease (Goodrich and Nixon 2006; Moses and Bertone 2002). NSAIDs therapeutic potential, as well as their negative side effects, are due to their ability to inhibit both cyclooxygenase-1 and 2 (COX1 and COX-2), key enzymes involved in the conversion of arachidonic acid to prostaglandins (Botting 2006). Inhibition of COX-1, the COX isoform responsible for the synthesis of prostaglandins important for homeostatic functions, is associated with some negative side effects on the gastrointestinal and renal systems (Botting 2006; Miller 2006). However inhibition of inducible COX-2, the form upregulated during inflammatory responses, can aid in controlling the symptoms associated with OA (Botting 2006; Miller 2006).

Topical NSAIDs have been associated with fewer side effects compared to their oral administration, probably because of lower levels reaching the systemic circulation, while still producing therapeutic effects at their targeted site (Heyneman *et al.* 2000). Therefore use of topical NSAIDs may be a safer alternative for the treatment of OA in horses.

Diclofenac, a nonselective cyclooxygenase inhibitor, is an NSAID of the phenylacetic acid class, which has been shown to have anti-inflammatory, anti-pyretic and analgesic effects (Ku *et al.* 1986; Menasse *et al.* 1978). It is most commonly administered orally in humans and used for the management of a variety of disorders, such as rheumatoid arthritis and OA (Brogden *et al.* 1980; Davies and Anderson 1997). Diclofenac

has also been used in veterinary medicine to control pain during and after castration in lambs and for the treatment of arthritis in cattle (Mahajan *et al.* 1994; Molony *et al.* 1997). Human *in vitro* studies have reported IC₅₀ values for diclofenac varying between 120 and 191 ng/ml for inhibition of COX-1 and from 3.1 to 12.7 ng/ml for that of COX-2 (Capone *et al.* 2007; Henrotin *et al.* 2001; Urquhart 1991). However, such IC₅₀ values vary widely depending on experimental protocols and species studied. In a canine *in vitro* study, IC₅₀ values of diclofenac for inhibition of COX-1 and COX-2 were 130.4 ng/ml and 108.1 ng/ml respectively (Brideau *et al.* 2001; Cronstein 2002). There are no known IC₅₀ values for diclofenac COXs inhibitory effect in the horse.

A 1% diclofenac sodium topical anti-inflammatory cream (Surpass)¹ has recently been commercialized for use in horses. The product prepared as a liposomal cream may help in the penetration of the drug (Lynn *et al.* 2004). In a double-blind placebo-controlled study, topical application of this diclofenac cream significantly diminished lameness in horses suffering from OA, without producing any negative side effects (Lynn *et al.* 2004). Also, in a study of experimentally-induced subcutaneous inflammation in horses with a single cream application, diclofenac was able to reach the underlying tissue in sufficient amounts to diminish inflammation, without significantly increasing its concentration in the plasma (Caldwell *et al.* 2004). Furthermore, a study where as much as 4 times the labeled dose of a topical diclofenac cream was applied over a 10 day period, serum levels remained below 15 ng/ml, a concentration lower than the reported IC₅₀ values for COX-1 (Anderson *et al.* 2005). More recently, in an equine experimental OA model, horses receiving diclofenac cream had significantly lower lameness scores than those treated with

oral phenylbutazone and a significantly better cartilage glycoaminoglycan content when compared to the placebo group (Frisbie *et al.* 2007)

However, in order to ascertain the therapeutic potential of a topical NSAID for the control of intraarticular pain, it is important to determine if the drug is present in the joint after topical application and whether it is present at therapeutic levels. Studies have determined mean peak diclofenac concentrations in human synovial fluid to be between 1 and 26 ng/ml after repeated application of topical diclofenac onto osteoarthritic knees (Gallacchi and Marcolongo 1993; Radermacher *et al.* 1991); but to our knowledge, no such study has yet been undertaken in horses.

Therefore the objectives of this study were to determine diclofenac synovial fluid and plasma concentrations after repeated topical application of a 1 % diclofenac anti-inflammatory cream to the equine carpus and to compare them to synovial fluid and plasma concentrations obtained after repeated oral diclofenac administration. We hypothesized that topical application of diclofenac would result in therapeutic levels in synovial fluid but would remain below therapeutic levels in plasma. On the other hand, oral administration of diclofenac would result in high therapeutic levels in both synovial fluid and plasma.

Material and Methods

Animals

Two groups of horses were selected for this study. Horses had not received any medication for at least 2 weeks before the start of the project. All horses were clinically healthy without carpal skin disease, palpable carpal effusion and were free of significant

lameness before and after carpal joint flexion. Nine horses, with a median age of 16.5 years (range: 10-23 years) and a median body weight of 470 kg (range: 408-582 kg) were used in the topical treatment group and six horses with a median age of 12.5 years (range: 10-15 years) and a mean body weight of 446 kg (range: 432-518 kg) were used in the oral treatment group.

Topical treatment group

Prior to the start of the experiment, a square section at the dorsal aspect of a randomly selected carpus was clipped (1 carpus per horse) and the area of the shaven section was measured using a standard measuring tape.

One tube of 1 % diclofenac topical anti-inflammatory cream (Surpass)¹ was assigned to each horse; tubes were weighed before the first application and at the end of the study to obtain the total amount of cream applied. The cream, equivalent to a 7-inch ribbon, was applied to the clipped area of the carpus with a gloved hand and was massaged for 2 minutes to facilitate penetration into the skin, as recommended by the manufacturer. The same procedure was repeated every 12 hours for a total of 7 applications. Before each subsequent application, the horses were observed for rashes or other reactions associated with cream application. Any adverse reactions were recorded.

Synovial fluid and blood samples were collected 7-10 days before the first topical application (pre-dose), immediately before the last application (0 hour), and 4, 8, 12, 24 hours following the last application. Synovial fluid was collected by aseptic arthrocentesis from the chosen carpus, alternating between the radiocarpal and middle carpal joints, in order to minimize the effects of repeated arthrocentesis on the same joint. To avoid

contamination of samples with any remaining cream on the carpus, carpi were thoroughly brushed and washed before sterile preparation, and the needle used for aspiration was changed for another needle to deposit the sample into non-heparinized collection tubes. Blood samples were collected into heparinized tubes at the level of a jugular vein.

Synovial fluid and blood were centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes at 4°C after each collection. Total protein was measured in the synovial fluid using a refractometer. Cell-free synovial fluid and plasma was transferred into dry cryovials and kept at -80°C until analysis of diclofenac concentrations was performed.

Oral treatment group

The dorsal aspect of both carpi of each horse was clipped before the start of the study. A dose of 2,2 mg/kg bwt of diclofenac powder (Analytical-grade diclofenac sodium salt)² was weighed and dissolved to approximately 10 mg/ml in deionised water and administered by nasogastric intubation followed by 500 ml of water to ensure complete dose administration. Diclofenac solutions were prepared individually for each horse immediately before administration and were administered following the same schedule as for the topical treatment group.

As for the previous group, baseline synovial fluid and blood samples were collected 7-10 days before the first and immediately before the last administration (0 hour), as well as 4, 8, 12, 24 hours following the last dose. Additional blood samples were also taken 0.25, 0.5, 1 and 2 hours after the last dose. Synovial fluid was collected from both carpi, alternating between the right and left carpus, as well as between the radiocarpal and middle carpal joints.

For both groups, before each subsequent arthrocentesis, the horses were evaluated by palpation, flexion tests and hand walking for signs of heat, pain, effusion and lameness. If necessary, horses were tranquilized with a combination of xylazine (0.3-0.4 mg/kg bwt, IV) and butorphanol (0.01 mg/kg bwt IV) to perform the arthrocentesis. The horses were monitored daily for 10 days to ensure that there were no adverse reactions to the drugs or the procedures. The experimental protocol was preapproved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Montreal.

Quantification of diclofenac in synovial fluid and plasma

Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma were measured by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS) (HPLC 2795 System and High precision tandem quadrupole mass analyzer Quattro micro™)³ using modified methods from Roskar and Arcelloni (Arcelloni *et al.* 2001; Roskar and Kmetec 2003).

Briefly, for synovial fluid, 1 ml of concentrated orthophosphoric acid and 300 µl of isopropyl alcohol were added to 600 µl of synovial fluid and the tubes were briefly vortexed. Fifty microliter of the internal standard meclofenamic acid (10 µg/ml) was then added to each sample and tubes were vortexed again, 3 ml of hexane were added, the tubes were vortexed, and then centrifuged for 5 minutes at 5000 rpm. The upper phase of the solution was transferred to a new test tube and the solvent was evaporated to dryness. The residue was reconstituted with a 300 µl solution of 2 % formic acid in methanol/water (1:1). Each tube was vortexed, sonicated, then vortexed again. Approximately 200 µl of the solution were placed into an injection vial. Injections and chromatography were done

using an autosampler and a C8 3.5 μ m 2.1x50 mm column (SunFire C8 columnTM)⁴. Standard curves were prepared using drug free horse synovial fluid. Calibrators were prepared over the range of 0.75 to 100 ng/ml for the topical portion of the study and 1.02 to 1020 ng/ml for the oral portion of the study. For both curves the coefficient of determination (r^2) was over 0.997. The lower limit of quantification (LLOQ) for the synovial fluid assay was 0.75 ng/ml.

For plasma, 75 μ l of 2% orthophosphoric acid in water and 50 μ l of a solution containing the internal standard meclofenamic acid (10 μ g/ml) were added to 75 μ l of plasma sample. Tubes were briefly vortexed and solutions were transferred onto an Oasis MAX cartridge⁵. The solutions were allowed to completely penetrate the cartridge. Each cartridge was subsequently washed with 1 ml of a 2% solution of ammonium hydroxide in water. The products were eluted with a 900 μ l solution of 5% formic acid in methanol and the solution was collected in a fresh test tube. This solution was then evaporated to dryness and the residue was reconstituted with a 300 μ l solution of 2% formic acid in methanol/water (1:1). Subsequently, plasma samples were treated as previously described for synovial fluid samples. Standard curves were prepared using drug free horse plasma. Calibrators were prepared over the range of 0.75 to 100 ng/ml for the topical portion of the study and 0.1 to 10 μ g/ml for the oral portion of the study. For both curves the coefficient of determination (r^2) was over 0.999. The LLOQ for the plasma assay was 0.75 ng/ml.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SE) unless otherwise stated. A repeated measures linear model, with time as a within-subject factor and treatment as a

between-subject factor, was performed to determine the effect of time and treatment. A priori contrasts were used to examine differences between treatment means at different time periods. A Mann-Whitney test was performed to determine differences in age and weight between the two groups of horses. The level of statistical significance was set at 0.05.

Results

The age and weight of the two groups did not differ significantly ($p = 0.08$, $p = 0.38$). Animals in both treatment groups received all of their specified doses. The average total amount of cream used per horse was 39 ± 3.0 g, resulting in an average 5.59 ± 0.4 g of cream per application corresponding to an average dose of 0.23 mg/kg bwt of diclofenac per day. The cream was applied over a mean surface area of 146 cm² of carpus to give an average of 0.38 mg of diclofenac per cm². The average oral dose of diclofenac was 4.4 mg/kg bwt per day.

Diclofenac concentrations following topical application

Synovial fluid and plasma diclofenac concentrations were below the LLOQ for all pre-dose measures. Diclofenac concentrations were detected in all sampled carpal joints at all time points following topical applications except after 24 hours where it was detected in only 3 out of 9 joints. On average, maximal concentrations were attained 4 hours after the last application (15.73 ± 2.49 ng/ml) and were significantly different from pre-dose levels ($p < 0.0001$) (figure 1A). However for all other time points, measured concentrations were not considered statistically different from the pre-dose value (figure 1A).

Plasma diclofenac concentrations following topical applications were measured in all horses at all time points and were significantly different from the pre-dose values ($p < 0.0001$). Mean peak plasma concentrations also occurred 4 hours following the final dose and averaged 3.53 ± 0.37 ng/ml (figure 1B).

For the topical treatment group, synovial fluid diclofenac concentrations were significantly higher than those of plasma concentrations only when peak concentrations were attained 4 hours after the last application ($p < 0.0001$).

Diclofenac concentrations following oral administration

Diclofenac concentrations were not detected in any of the pre-dose samples but were measured at all time points in all samples for both synovial fluid and plasma. Synovial fluid diclofenac concentrations were significantly different from pre-dose for all time points except 24 hours following the last oral administration ($p < 0.0001$) (figure 2A). Mean peak diclofenac concentration in synovial fluid following oral dosing was 286.40 ± 40.94 ng/ml ($p < 0.0001$) and occurred at 4 hours following the final dose.

Maximal plasma concentrations following oral administration were $11\,641 \pm 1203$ ng/ml and occurred at 0.5 hour following the final dose (figure 2B). Concentrations at 12 and 24 hours following the final dose, although still well above the LLOQ were not considered statistically different from the pre-dose value.

For the oral treatment group, plasma diclofenac concentrations were significantly higher than those in the synovial fluid for all common time points ($p = 0.04$) except 24 hours after the last administration.

For each measured time point, mean synovial fluid diclofenac concentrations obtained following oral administration were significantly higher than after topical application ($p = 0.03$) reaching overall mean levels approximately thirty times higher than those after topical application. As for synovial fluid, mean plasma diclofenac concentrations obtained following oral administration were significantly higher compared to topical application for all common time points, reaching mean levels as much as 1 000 times higher than after topical application of diclofenac ($p < 0.0001$).

Synovial fluid total protein concentrations

Synovial fluid total protein concentrations remained within normal limits (< 20 g/l) throughout the experimental procedure for both the topical and oral experimental groups (figure 3A and 3B). Although there was a tendency toward a slight increase from baseline after 24 hours in the oral treatment group the difference was not statistically significant ($p = 0.07$)

Side effects

Following topical administration, no serious adverse events were reported. After the first day of application, one out of nine horses exhibited a withdrawal reaction each time the cream was applied, as well as a slightly warmer carpus at the end of the treatment period. No lameness, pain at flexion or decreased range of motion were noted. During the oral part of the study, three out of six horses had decreased appetite starting on the final day of dosing. Two days after the final dose of diclofenac, one horse suffered from laminitis of both front feet. As a result, the horse was placed on a thick combination of

saw dust and straw bedding, treated with intramuscular acepromazine (0.02 mg/kg bwt, BID) and intravenous phenylbutazone (2.2 mg/kg bwt, BID) for 4 days. On the fourth day of treatment the horse was recovering well, acepromazine was discontinued and phenylbutazone administered orally at the same dosage as previously mentioned. Seven days after the onset of laminitis the mare suffered from colic, fever and diarrhea. The mare was euthanized and necropsy examination showed severe right dorsal colitis and slight tubular and papillary renal necrosis.

Discussion

Although there have been some studies indicating that topical application of a diclofenac cream has value in treating joint pain and inflammation in horses (Caldwell *et al.* 2004; Lynn *et al.* 2004), it was unclear before our study whether this drug was capable of reaching the synovial cavity after its application in the horse. The results presented here are the first to describe synovial fluid diclofenac levels following application of clinically relevant doses of a 1% diclofenac topical AINS cream to the horse with comparison with oral administration.

After repeated topical applications in the horse, levels of diclofenac attained in equine synovial fluid are comparable to levels previously reported in a human study using a similar experimental approach (Radermacher *et al.* 1991). Peak concentrations were obtained four hours after the last application and were within concentrations previously shown to inhibit COX-2 activity *in vitro* while remaining well below the published inhibitory concentrations for COX-1 activity (Brideau *et al.* 2001; Capone *et al.* 2007; Henrotin *et al.* 2001; Urquhart 1991). Concentrations reportedly capable of COX-2

inhibition were still measured after 8 hours but had fallen below that level by 12 hours. On the other end, plasma levels although detectable at all measured time points barely reached the lowest reported COX-2 inhibitory concentration of 3.05 ng/ml (Urquhart 1991) and that happened only 4 hours after the last application. These results imply that topical diclofenac can have anti-inflammatory effects at the joint level without the risk of causing systemic side effects. These results could therefore explain the improvement in lameness obtained in the two previous studies evaluating the efficacy of topical diclofenac cream in controlling pain associated with OA in horses as well as their lack of reported side effects (Frisbie *et al.* 2007; Lynn *et al.* 2004).

It could be debated that it is unlikely that the low anti-inflammatory levels attained for at best 4 hours even after repeated application may be responsible for the analgesic effects of the cream seen in the two experimental studies. However, even if each study used the manufacturer recommended posology, the length of application varied between studies and, it is possible that with a longer application, higher synovial concentrations could be reached and remained within therapeutic range for a longer interval. Another possible explanation may lie in the fact that our study used healthy carpal joints where synovial fluid concentrations of diclofenac may have been an underestimate of what may be expected in an osteoarthritic joint. Inflamed joints have been described as having increased synovial membrane vascularity (Errecalde *et al.* 2001; Owens *et al.* 1995), which may facilitate drug penetration into deep tissues via a phenomenon of local enhanced topical delivery where local vasculature creates a convective force drawing the drugs into the underlying tissues before they are distributed in the systemic circulation (McNeill *et al.* 1992). Another factor which may lead to higher concentrations in OA joints is that a

decrease in matrix proteoglycan content could increase the permeability of cartilage to acidically charged NSAIDs such as diclofenac (Blot *et al.* 2000). Diclofenac may also have exerted its analgesic effect via another known mechanism of action: the direct functional down regulation of peripheral hyperalgesic nociceptors (Tonussi and Ferreira 1994). However it remains unclear what is the minimal dose required to produce such an effect.

As hypothesized, oral administration of diclofenac resulted in significantly higher concentrations of diclofenac in both synovial fluid and plasma when compared to topical application. There are a number of IC_{50} values reported for COX inhibition by diclofenac, ranging from 120 ng/ml to 191 ng/ml for COX-1 and 3.1 ng/ml to 108.1 ng/ml for COX-2 (Brideau *et al.* 2001; Capone *et al.* 2007; Henrotin *et al.* 2001; Urquhart 1991). Although considered no different than baseline at certain time points by statistical analysis, plasma diclofenac concentrations nevertheless remained well above IC_{50} values for both COX-1 and COX-2 inhibition even 24 hours after the last administration when the mean concentration still reached 720 ng/ml. These persistent high levels may explain the increased incidence of systemic side effects noticed in the oral administration group.

Although the objectives of our study were not to determine the mechanisms of penetration of diclofenac into the joint, synovial fluid concentrations higher than systemic concentrations after topical application suggest that direct diffusion of diclofenac from the skin to the synovial compartment may be implicated along with redistribution via the systemic circulation (Mills *et al.* 2005).

Laminitis has never been reported as a direct complication associated with NSAIDS administration. However, the laminitic horse did suffer from right dorsal colitis seven days after the onset of laminitis, a well described sign of NSAID toxicity (Karcher *et al.* 1990)

and a possible cause of laminitis. Since this horse received phenylbutazone for the treatment of laminitis, it is impossible to determine which of the two NSAIDs was responsible for the colitis. Although speculative, we hypothesized that the administration of diclofenac caused intestinal mucosal damage leading to a subclinical endotoxemia resulting in laminitis. The subsequent administration of a second NSAID exacerbated the initial mucosal damage leading to the clinical manifestation of intestinal disease.

There is no pharmacokinetic study on the use of diclofenac in horses and only one published report on its oral use, where a single dose of 2.2 mg/kg bwt was administered (Rosa *et al.* 2003). Since it was comparable to the dose of the most commonly orally administered NSAIDs in the horse (phenylbutazone; 2.2 to 4.4 mg/kg bwt, BID and flunixin; 1.1 mg/kg bwt, BID) (Caron 2000; Moses and Bertone 2002) as well as the recommended oral diclofenac dosage in human (100 to 225 mg/day administered BID or TID) (Anonymous 2003), we chose to use that dosage as our clinically relevant oral dose. However, that posology may not be adequate for repeated administration as our results show a high incidence of side effects and sustained plasmatic concentrations above COX-1 IC₅₀ values. Further studies would be needed to determine the safest therapeutic dose for oral diclofenac administration in horses.

Although arthrocentesis was alternatively performed in the radiocarpal and middle carpal joints, repeated arthrocentesis within a same joint (1 every 8 hours for a maximum of 2 to 3 per joint) were inevitable to be able to establish a time concentration curve of diclofenac in synovial fluid. Limitations of this design include possible blood contamination, induction of inflammation and dilution, all factors potentially capable of affecting our results (Brama *et al.* 2004; van den Boom *et al.* 2005). As a control for these

factors, synovial fluid total protein concentrations were measured in all samples. Statistical analysis showed no significant increase in protein levels overtime therefore, these factors were not considered in the analysis of our results.

Contamination of synovial fluid by the needle after skin penetration has been mentioned as a possible complication of this type of study (Caldwell *et al.* 2004). Therefore care was taken to thoroughly brush and wash the skin of all cream residues before aseptic preparation for arthrocentesis. Furthermore, the needle was changed between aspiration and deposition of samples into test tubes decreasing the chance of inadvertent contamination. If contamination occurred it most likely did at time 0 (12 hours after the 6th application) where there was a 3 day-cream build up over the carpus which necessitated the most extensive wash. However, since diclofenac concentrations measured at this time point were no different than the ones measured at 12 hours after the last application where three sterile scrubs had been performed prior to skin puncture significant contamination is unlikely but cannot completely be ruled out.

We have determined that diclofenac reached the joint compartment at concentrations reportedly capable of anti-inflammatory effects after repeated application of a 1% diclofenac cream designed for horses. The lack of systemic side effects when compared to its oral administration at a dose of 2.2 mg/kg bwt suggests that topical use of NSAIDs may be a safe and effective alternative to their oral administration for the treatment of joint disease in the horse. However future investigations are warranted with the objective of identifying the best posology for (increase in application frequency or cream concentration) achieving better therapeutic and more sustained levels of diclofenac

in the joint without substantially increasing plasma levels thereby increasing the efficacy of the product and minimizing its detrimental side effects.

Acknowledgements

This study was supported by le Fond de démarrage de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Pfizer Canada. The diclofenac cream, Surpass, was a generous gift from Idexx Pharmaceuticals.

Manufactures' addresses

¹ Idexx Pharmaceuticals, Greensboro, NC, USA

² Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada

³ Waters, Milford, MA, USA

⁴ Waters, Milford, MA, USA

⁵ Waters, Milford, MA, USA

References

- Anderson, D., Kollias-Baker, C., Colahan, P., Keene, R.O., Lynn, R.C. and Hepler, D.I. (2005) Urinary and serum concentrations of diclofenac after topical application to horses. *Vet Ther* **6**, 57-66.
- Anonymous (2003) Food and Drug Administration Cataflam® Voltaren® Voltaren® -XR. www.fda.gov/cder/foi/label/2001/20254s2lbl.pdf
- Arcelloni, C., Lanzi, R., Pedercini, S., Molteni, G., Fermo, I., Pontiroli, A. and Paroni, R. (2001) High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **763**, 195-200.
- Blot, L., Marcelis, A., Devogelaer, J.P. and Manicourt, D.H. (2000) Effects of diclofenac, aceclofenac and meloxicam on the metabolism of proteoglycans and hyaluronan in osteoarthritic human cartilage. *Br J Pharmacol* **131**, 1413-1421.
- Botting, R.M. (2006) Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *Journal of Thermal Biology* **31**, 208-219.
- Brama, P.A., van den Boom, R., DeGroot, J., Kiers, G.H. and van Weeren, P.R. (2004) Collagenase-1 (MMP-1) activity in equine synovial fluid: influence of age, joint pathology, exercise and repeated arthrocentesis. *Equine Vet J* **36**, 34-40.
- Brideau, C., Van Staden, C. and Chan, C.C. (2001) In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats. *Am J Vet Res* **62**, 1755-1760.
- Brogden, R.N., Heel, R.C., Pakes, G.E., Speight, T.M. and Avery, G.S. (1980) Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. *Drugs* **20**, 24-48.
- Caldwell, F.J., Mueller, P.O., Lynn, R.C. and Budsberg, S.C. (2004) Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses. *Am J Vet Res* **65**, 271-276.
- Capone, M.L., Tacconelli, S., Di Francesco, L., Sacchetti, A., Sciulli, M.G. and Patrignani, P. (2007) Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **82**, 85-94.
- Caron, J.P. (2000) Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. In: *Proceedings of the 46th American Association of Equine Practitioners Annual Convention*, San Antonio, Texas. pp 243-249.
- Cronstein, B.N. (2002) Cyclooxygenase-2-selective inhibitors: translating pharmacology into clinical utility. *Cleve Clin J Med* **69 Suppl 1**, S113-19.

- Davies, N.M. and Anderson, K.E. (1997) Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet* **33**, 184-213.
- Errecalde, J.O., Carmely, D., Marino, E.L. and Mestorino, N. (2001) Pharmacokinetics of amoxicillin in normal horses and horses with experimental arthritis. *J Vet Pharmacol Ther* **24**, 1-6.
- Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M. and McIlwraith, C.W. (2007) Evaluation of Topical Diclofenac Liposomal Cream for Treatment of Osteoarthritis Using an Equine Experimental Model. In: *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Orlando, FL. pp 256-257.
- Gallacchi, G. and Marcolongo, R. (1993) Pharmacokinetics of diclofenac hydroxyethylpyrrolidine (DHEP) plasters in patients with monolateral knee joint effusion. *Drugs Exp Clin Res* **19**, 95-97.
- Goodrich, L.R. and Nixon, A.J. (2006) Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* **171**, 51-69.
- Henrotin, Y., de Leval, X., Mathy-Hartet, M., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., Dogne, J.M., Delarge, J. and Reginster, J.Y. (2001) In vitro effects of aceclofenac and its metabolites on the production by chondrocytes of inflammatory mediators. *Inflamm Res* **50**, 391-399.
- Heyneman, C.A., Lawless-Liday, C. and Wall, G.C. (2000) Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. *Drugs* **60**, 555-574.
- Karcher, L.F., Dill, S.G., Anderson, W.I. and King, J.M. (1990) Right dorsal colitis. *J Vet Intern Med* **4**, 247-253.
- Ku, E.C., Lee, W., Kothari, H.V. and Scholer, D.W. (1986) Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med* **80**, 18-23.
- Lynn, R.C., Hepler, D.I., Kelch, W.J., Bertone, J.J., Smith, B.L. and Vatistas, N.J. (2004) Double-blinded placebo-controlled clinical field trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied 1% diclofenac liposomal cream for the relief of lameness in horses. *Vet Ther* **5**, 128-138.
- Mahajan, D.N., Ali, M.S. and Singh, B. (1994) Therapeutic efficacy of diclofenac sodium in clinical and experimental cases of arthritis and myositis in cattle and buffaloes. *Indian Vet J* **71**, 703-707.
- McNeill, S.C., Potts, R.O. and Francoeur, M.L. (1992) Local enhanced topical delivery (LETD) of drugs: does it truly exist? *Pharm Res* **9**, 1422-1427.

- Menasse, R., Hedwall, P.R., Kraetz, J., Pericin, C., Riesterer, L., Sallmann, A., Ziel, R. and Jaques, R. (1978) Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol Suppl*, 5-16.
- Miller, S.B. (2006) Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin Arthritis Rheum* **36**, 37-49.
- Mills, P.C., Magnusson, B.M. and Cross, S.E. (2005) Penetration of a topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drug into local tissues and synovial fluid of dogs. *Am J Vet Res* **66**, 1128-1132.
- Molony, V., Kent, J.E., Hosie, B.D. and Graham, M.J. (1997) Reduction in pain suffered by lambs at castration. *Vet J* **153**, 205-213.
- Moses, V.S. and Bertone, A.L. (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Vet Clin North Am Equine Pract* **18**, 21-37, v.
- Owens, J.G., Kamerling, S.G. and Barker, S.A. (1995) Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis. *J Vet Pharmacol Ther* **18**, 187-195.
- Radermacher, J., Jentsch, D., Scholl, M.A., Lustinetz, T. and Frolich, J.C. (1991) Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. *Br J Clin Pharmacol* **31**, 537-541.
- Rosa, P.C.S., Peiro, J.R., Campebell, R.C., Valadao, C.A.A. and Bechara, G.H. (2003) Effects of diclofenac and dexamethasone on horse experimental endotoxemia. *Arq Bras Med Vet Zootec* **55**, 279-281.
- Roskar, R. and Kmetec, V. (2003) Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **788**, 57-64.
- Tonussi, C.R. and Ferreira, S.H. (1994) Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* **251**, 173-179.
- Urquhart, E. (1991) A comparison of synovial fluid concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs with their in vitro activity. *Agents Actions* **32**, 261-265.
- van den Boom, R., van de Lest, C.H., Bull, S., Brama, R.A., van Weeren, P.R. and Barneveld, A. (2005) Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints. *Equine Vet J* **37**, 250-256.

Figure legends

Figure 1

Diclofenac concentrations over time after repeated topical applications (n = 9 horses) **A**) in synovial fluid and **B**) in plasma. Each point represents the means \pm standard error of mean. An asterisk (*) denotes a statistical difference ($p < 0.05$) between the selected data points and the baseline value. Pre = before the first dose; 0 = before the last dose; 4, 8, 12 and 24 = hours after the last dose.

Figure 2

Diclofenac concentrations over time after repeated oral administrations (n = 6 horses) **A**) in synovial fluid and **B**) in plasma. Each point represents the means \pm standard error of mean. An asterisk (*) denotes a statistical difference ($p < 0.05$) between the selected data points and the baseline value. Pre = before the first dose; 0 = before the last dose; 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 and 24 = hours after the last dose.

Figure 3

Synovial fluid protein concentrations over time after repeated **A**) topical application (n = 9 horses) and **B**) oral administration (n = 6 horses) of diclofenac. Each point represents the means \pm standard error of mean. An asterisk (*) denotes a statistical difference ($p < 0.05$) between the selected data points and the baseline value. Pre = before the first dose; 0 = before the last dose; 4, 8, 12 and 24 = hours after the last dose.

Figure 1

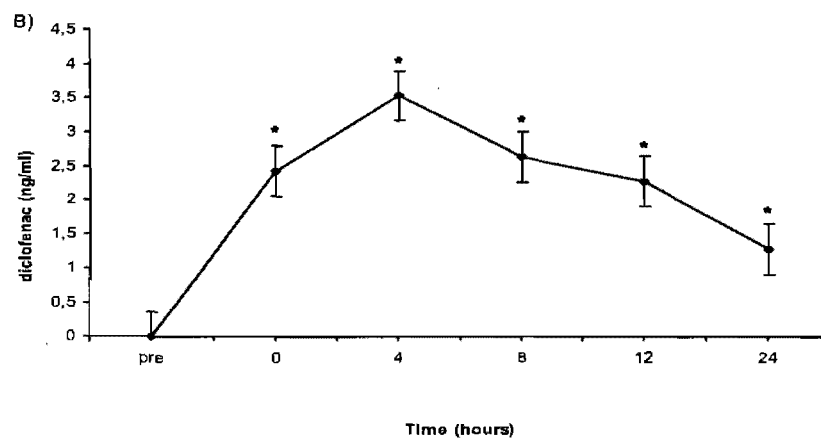
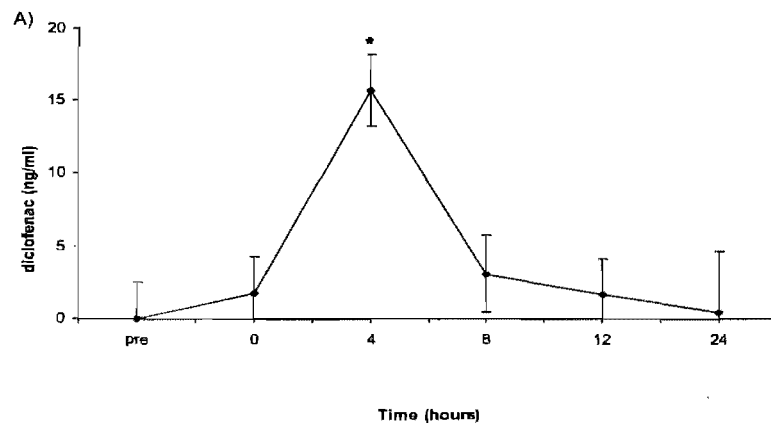


Figure 2

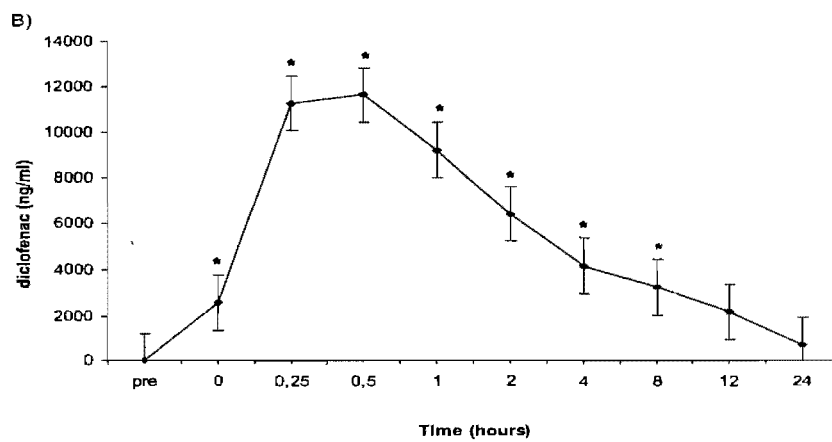
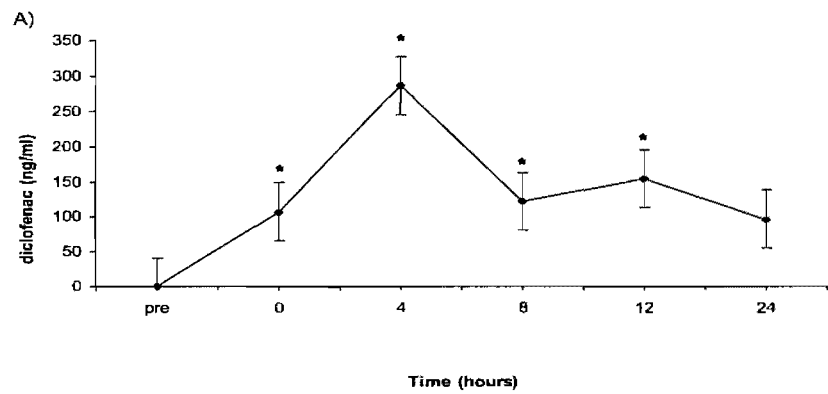
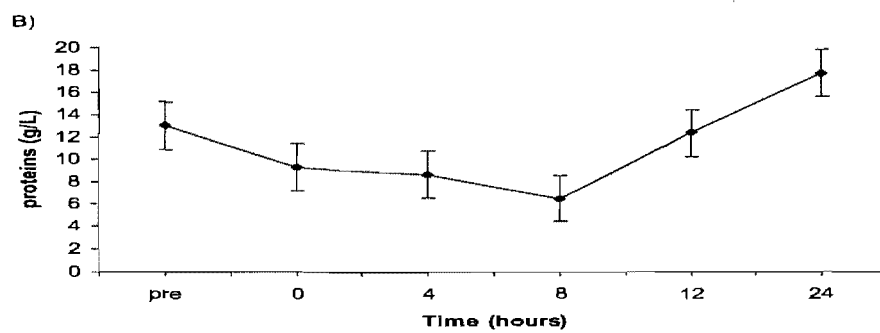
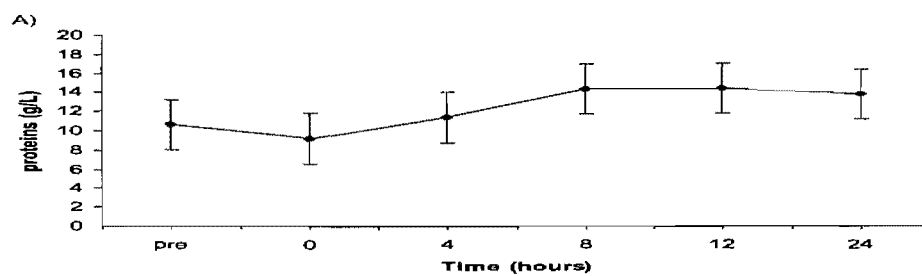


Figure 3



Chapitre III: Discussion

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont les médicaments les plus souvent utilisés chez le cheval pour traiter l'OA, par contre leur administration par voie systémique est parfois associée à d'importants effets secondaires. L'effet thérapeutique d'une crème de diclofénac, un AINS topique commercialisé pour le traitement de l'OA chez le cheval, a été évalué dans une étude clinique (Lynn *et al.* 2004) et un modèle expérimental d'OA chez le cheval (Frisbie *et al.* 2007). Cependant la pénétration du produit dans l'espace articulaire, le site d'action attendu, n'a pas été déterminée. Notre projet est le premier à démontrer des concentrations synoviales de diclofénac et à les comparer à celle obtenues après une administration orale répétée.

Après l'application topique répétée de diclofénac, les concentrations de diclofénac détectées dans le liquide synovial équin sont comparables à celles mesurées dans l'étude de Radermacher *et al.* effectuée chez les humains (Radermacher *et al.* 1991). La concentration moyenne maximale de 15,7 ng/ml obtenue quatre heures suivant la dernière application de crème, est une concentration capable d'inhiber la COX-2 selon certaines études *in vitro* effectuées chez l'humain, par contre elles demeurent inférieures aux concentrations capables d'inhiber la COX-1 dans ces mêmes études (Capone *et al.* 2007; Henrotin *et al.* 2001; Urquhart 1991). Néanmoins, comme l'efficacité de ces concentrations à inhiber la COX-1 et la COX-2 chez le cheval reste à être déterminée, nous ne pouvons conclure à l'atteinte de concentrations thérapeutiques chez le cheval malgré les effets cliniques bénéfiques du produit notés lors de deux études *in vivo* (Frisbie *et al.* 2007; Lynn *et al.* 2004). De plus, les résultats d'une étude chez les humains utilisant le kétoprofène topique ont suggéré que l'articulation pourrait se comporter comme un

réservoir en retenant le kétoprofène dans le cartilage et les ménisques (Rolf *et al.* 1999). Il est possible que ce phénomène se produise aussi chez les chevaux après l'application topique du diclofénac et contribue à ses effets cliniques.

L'application topique répétée de diclofénac a mis en évidence des niveaux détectables de diclofénac dans le plasma à chaque temps de prélèvement, par contre ils sont demeurés inférieurs aux concentrations nécessaires pour inhiber la COX-1 et la COX-2 dans les études *in vitro* chez l'humain (Brideau *et al.* 2001; Capone *et al.* 2007; Henrotin *et al.* 2001). De plus, après l'application topique, les concentrations plasmatiques obtenues dans notre étude sont comparables à celles obtenues de l'étude évaluant l'effet de l'application de cette même crème dans un modèle d'inflammation sous-cutanée créée chez le cheval (Caldwell *et al.* 2004). Il en est de même lorsque nous comparons nos résultats à ceux de l'étude de doses répétées de Surpass® chez le cheval qui a déterminé les concentrations de diclofénac dans l'urine et le sérum après une, deux et quatre fois la dose suggérée par le manufacturier (Anderson *et al.* 2005). Les concentrations plasmatiques que nous avons obtenues sont comparables aux concentrations sériques obtenues après l'application d'une fois la dose recommandée dans l'étude précitée. L'ensemble des résultats de la partie topique du projet indique que non seulement l'utilisation topique d'une crème de 1% de diclofénac pourrait avoir des effets anti-inflammatoires dans les articulations, mais que le risque d'effets secondaires est minime à cause des faibles concentrations plasmatiques détectées.

Le seul effet secondaire détecté lors de la partie topique de l'étude a été une sensibilité cutanée à l'application de la crème chez un des neuf chevaux. Ce cheval réagissait à l'application par un retrait de la patte et une légère chaleur a été notée au site

d'application pendant quelques jours après l'arrêt de l'application de la crème. Cet effet secondaire est similaire à ceux démontrés chez les humains ayant reçu des applications topiques répétées de diclofénac (Bookman *et al.* 2004; Radermacher *et al.* 1991).

Pour comparer les concentrations de diclofénac après une application topique, nous avons déterminé la concentration synoviale et plasmatique de diclofénac suite à une administration orale répétée. Comme prévue, les concentrations synoviales et plasmatiques de diclofénac obtenues suivant l'administration orale sont significativement plus élevées lorsque comparé à celles de l'application topique. La concentration moyenne maximale dans le liquide synovial était de 286,42 ng/ml et a été détectée 4 heures suivant la dernière application. Cette concentration est capable d'inhiber la COX-1 et la COX-2 selon les études *in vitro* chez les humains (Capone *et al.* 2007; Henrotin *et al.* 2001; Urquhart 1991). Cette concentration est comparable à la concentration moyenne maximale de diclofénac de 276 ng/ml obtenu 3 heures après la dernière dose dans une étude de dose répétée de diclofénac orale chez l'humain (Fowler *et al.* 1983). Par contre, il est difficile de donner beaucoup d'importance à cette comparaison puisque les doses utilisées n'étaient pas les mêmes et que la pharmacocinétique du diclofénac chez les deux espèces est probablement différente.

La concentration moyenne maximale plasmatique de diclofénac suivant l'administration orale était de 11 641 ng/ml. Cette concentration et les concentrations à chaque heure de prélèvement, sauf pour la pré dose, ont atteint des niveaux capables d'inhiber la COX-1 et la COX-2 selon les même études *in vitro* chez l'humain citées précédemment. Les concentrations plasmatiques obtenues après l'administration orale dans notre étude sont plus élevées que celle obtenue dans l'étude de Fowler *et al.*, par

contre la dose utilisée dans l'étude humaine de 50 mg de diclofénac administrée trois fois par jour est moins élevée que la dose que nous avons utilisée ce qui pourrait expliquer une partie de la différence (Fowler *et al.* 1983). Cependant le protocole suivi par Fowler *et al.* n'était pas uniforme. Par exemple la durée de l'administration du diclofénac orale n'était pas la même pour tous les patients et l'unique information donnée à cet effet est que la durée minimum d'administration pour chaque patient était de 24 heures. Aussi le moment de l'administration de la dernière dose n'était pas le même pour chaque patient. Donc, il est difficile de faire une comparaison entre cette étude et la nôtre.

Les hauts niveaux plasmatiques obtenus dans notre étude pourraient expliquer les effets secondaires détectés lors de l'administration orale du diclofénac. En demeurant assez élevé pour inhiber la COX-1 pendant plus de 24 heures, il est possible que le diclofénac soit responsable de la fourbure qui est survenue chez un des chevaux 48 heures suivant la dernière administration. La fourbure n'est pas un effet secondaire rapporté suite à l'administration d'AINS chez le cheval, mais elle pourrait être secondaire à des dommages gastro-intestinaux ayant causé une endotoxémie sous-clinique et subséquemment une fourbure. La fourbure est une entité clinique affectant la troisième phalange du pied qui est caractérisée par de la douleur sévère, rendant le mouvement et même la capacité de l'animal de se tenir debout difficile (Pollitt and Dyson 2003). Les mécanismes qui entraînent la fourbure ne sont pas bien compris, par contre il est connu que l'étiologie de cette maladie a un aspect gastro-intestinal important, en particulier relié à des changements de l'intégrité de l'intestin ((Elliott and Bailey 2006). Une théorie suggère que lorsqu'il y a des dommages à l'intestin, la perméabilité de ce dernier peut augmenter, permettant l'accès aux toxines dans la circulation sanguine, pouvant se rendre jusqu'au

sabot, diminuant son apport de sang, causant une fourbure (Bailey *et al.* 2004). L'administration des AINS pour le traitement de la fourbure est souvent utilisée par les vétérinaires, par contre leur effet toxique sur le système gastro-intestinal questionne leur utilisation (Harman and Ward 2001).

De plus, sept jours après l'apparition de la fourbure, le cheval a souffert d'une colite du colon dorsal droit, un signe de toxicité de l'administration des AINS et un facteur pouvant mener à une fourbure (Karcher *et al.* 1990). Par contre comme le cheval a reçu de la phénylbutazone pour traiter la fourbure, il est impossible de déterminer si le diclofénac est la cause de cette pathologie ou si elle a été causée par l'effet cumulatif des deux AINS.

Malgré le fait que l'effet toxique du diclofénac sur le système gastro-intestinal est bien connu, la dose menant à des lésions gastro-intestinales chez le rat est de 17 mg/kg *per os*, (Menasse *et al.* 1978). Cette dose n'est pas connue chez le cheval. Donc il serait important de déterminer les doses toxiques chez le cheval, et si c'est le cas celles pouvant causer la fourbure. De plus, il faudrait sans doute vérifier s'il y a une association directe entre l'administration du diclofénac orale et la fourbure, si jamais L'utilisation de ce produit était considérée dans le futur.

Pour entreprendre ce projet, deux groupes de chevaux différents ont été utilisés. L'idéal aurait été de faire une étude croisée où les chevaux auraient été utilisés dans la partie topique et ensuite dans la partie orale après une période de sevrage. De cette façon, les chevaux auraient été leur propre contrôle minimisant ainsi la variabilité entre les individus. Cependant, la disponibilité des chevaux ne nous a pas permis de suivre ce protocole. Par contre, selon les statistiques, le poids et de l'âge des chevaux des deux groupes n'étaient pas significativement différents et nous estimons que la variation induite

par l'utilisation d'individus différents pour les deux parties de l'étude n'a eu aucun impact significatif sur les résultats obtenus.

Les chevaux utilisés dans cette étude avaient des articulations saines, sans évidence d'OA. Il est possible que ce fait résulte en une sous-estimation de la concentration synoviale de diclofénac pouvant être obtenues chez des chevaux ayant des articulations enflammées ou atteintes d'OA. Par exemple, des études ont démontré que la pénétration articulaire d'un AINS pouvait être augmentée dans des articulations enflammées car la vascularité de la membrane synoviale est augmentée, ce qui favorise la pénétration d'un produit topique vers les tissus profonds (Errecalde *et al.* 2001; McNeill *et al.* 1992; Owens *et al.* 1995). Par contre l'alternative qu'une augmentation de vascularité pourrait causer une accumulation systémique plus importante ainsi qu'une élimination plus rapide des articulations est aussi possible. En plus, des concentrations plus élevées pourraient être le résultat d'une diminution de la quantité de protéoglycanes dans le cartilage atteint d'OA. Il est rapporté que la quantité d'AINS pouvant se rendre dans les tissus est inversement proportionnelle aux niveaux de protéoglycanes du cartilage (Brandt 1987). La perte de protéoglycanes observée dans le cartilage ostéoarthritique pourrait augmenter la perméabilité de ce dernier aux AINS résultant en des concentrations plus élevées d'AINS pouvant se rendre aux articulations (Blot *et al.* 2000). Il est aussi possible que les changements tissulaires associés à des processus d'inflammation chronique diminuent la pénétration profonde du diclofénac et que la concentration de diclofénac atteinte dans les articulations des chevaux souffrant d'OA chronique soit plus faible que celle obtenue chez les sujets ayant des articulations saines.

Le carpe a été choisi comme articulation destinée à recevoir l'application topique de la crème de diclofénac. C'est une articulation naturellement atteinte par l'OA (Garvican and Clegg 2007), facile d'accès, pour laquelle les techniques d'arthrocentèses sont relativement faciles à effectuer et dont le volume du liquide synovial aspiré se maintient entre deux et quatre millilitres même après des aspirations répétées. Cependant les concentrations synoviales de diclofénac obtenues pour le carpe pourraient différer d'avec celles obtenues pour d'autres articulations car celles-ci diffèrent dans leur volume de liquide synovial, l'épaisseur de la peau et des tissus mous les recouvrant ainsi que la surface sur laquelle la crème peut être appliquée. Comme cette crème est destinée pour usage sur les carpes, boulets, jarrets et paturons, ils seraient nécessaires de vérifier la différence de pénétration entre ces sites.

Les arthrocentèses répétées dans les mêmes articulations sont souvent utilisées chez les animaux et les humains pour déterminer les concentrations intra articulaires de médicaments (Bianchi *et al.* 2006; Dawson *et al.* 1988; Laverty *et al.* 2005). Dans notre étude, les arthrocentèses ont été effectuées en alternant entre les articulations radiocarpienne et intercarpienne d'un même carpe pour la partie topique et en plus, entre le carpe droite et gauche pour la partie orale. Ces techniques ont été effectuées pour minimiser les effets d'arthrocentèses répétées sur une même articulation, telle la contamination sanguine et l'inflammation, des phénomènes qui pourraient affecter nos résultats (Francoz *et al.* 2007; van den Boom *et al.* 2005). Par contre, le fait d'avoir alterné entre l'articulation droite et gauche lors de la partie orale sans l'avoir faite pour la partie topique introduit un facteur de variation supplémentaire entre les deux groupes. Le plus grand nombre de ponctions effectuées dans les articulations des chevaux recevant le

diclofénac topique pourraient avoir eu deux effets, 1) une sous estimation de la concentration de diclofénac du à un effet de dilution ou 2) une surestimation de sa concentration associée à une inflammation et/ou contamination sanguine. Cependant, comme le niveau des protéines synoviales, utilisé comme marqueur d'inflammation et de contamination sanguine, n'a pas augmenté de façon significative durant la période expérimentale, nous pouvons assumer que l'importance de ces deux variables était minime et non significatif. Par contre, notre protocole ne nous a pas permis d'évaluer l'effet de dilution sur la concentration synoviale de diclofénac. Mais comme les différences de concentrations synoviales de diclofénac entre les deux groupes étaient tellement grandes, les variations occasionnées par la différence de nombre de ponctions entre les groupes se devait d'être très importante pour avoir des répercussions significatives sur les résultats.

Pour minimiser le risque d'infection lors des arthrocentèses répétées, les carpes ont été rasés avant l'application de la crème. Pour la partie topique, cette intervention aurait pu augmenter les concentrations articulaires obtenues, car sans la barrière du poil, la pénétration de la crème pourrait être améliorée (Mills 2007). Aussi, le rasage n'est pas une recommandation du manufacturier donc, en général, les clients achetant ce produit ne feront pas cette étape. En plus du rasage, les préparations aseptiques des carpes pour les arthrocentèses aurait aussi pu affecter la pénétration topique. Par exemple, l'alcool peut délipidiser et désorganiser le stratum corneum et ainsi augmenter la pénétration d'un produit topique (Finnin and Morgan 1999; Mills and Cross 2006). Il est donc possible que la combinaison de la tonte du poil et de la préparation aseptique de la région avant l'application de la dernière dose et des ponctions articulaires subséquentes aient augmenté la pénétration articulaire de la crème. Par conséquent, il se peut que les concentrations

synoviales mesurées lors de nos conditions expérimentales ne reflètent pas celles d'une situation clinique.

Pour contrôler le risque de contamination de nos prélèvements synoviaux par les résidus de crème ayant pu demeurer sur la peau lors de la partie topique, nous avons pris les deux précautions suivantes. Premièrement, nous avons bien brossé et lavé les carpes avant de faire les préparations aseptiques. Deuxièmement, nous avons utilisé deux aiguilles lors des prélèvements, une aiguille pour ponctionner l'articulation, et ensuite, une nouvelle aiguille pour déposer les échantillons dans les tubes de collection. Une contamination des échantillons par la crème comme telle aurait résulté en des valeurs aberrantes lors du dosage du diclofénac et lors de nos analyses statistiques. Comme ce phénomène ne s'est pas produit, nous considérons que la contamination par la crème n'a pas été significative.

Nous avons choisi d'étudier les concentrations synoviales de diclofénac suite à des applications topiques répétées plutôt qu'après une application unique. Ce choix peut se justifier par le fait que les effets thérapeutiques du produit ne sont rapportés qu'après quelques jours d'utilisation indiquant qu'il est possible que des applications répétées soient nécessaires pour atteindre des concentrations intra-articulaires (Lynn *et al.* 2004). De plus, la majorité des études humaines investiguant la pénétration articulaire des AINS topique utilise un protocole de 3 à 4 jours d'application avant de procéder à l'échantillonnage du liquide synovial. (Dominkus *et al.* 1996; Osterwalder *et al.* 2002).

La dose topique administrée dans notre étude correspond à celle recommandée par le fabricant, ainsi que celle utilisée lors des études précédentes de ce produit effectuées chez le cheval. (Anderson *et al.* 2005; Lynn *et al.* 2004). Par contre, pour la

partie orale, la dose utilisée a du être extrapolée car le diclofénac oral n'est pas un médicament normalement utilisé chez les chevaux. Nous avons utilisé le diclofénac oral au lieu d'un autre AINS utilisé chez cette espèce car le comportement des AINS diffèrent beaucoup et nous croyons que la comparaison de deux AINS différents n'était pas fiable. Aussi la plupart des études comparant les voies d'administration topique et oral ont utilisé le même AINS (Brunner *et al.* 2005; Erdogan *et al.* 2006; Rolf *et al.* 1999). Nous avons donc basé notre dose sur la seule étude publiée ayant utilisé le diclofénac oral chez le cheval, soit 2,2 mg/kg (Rosa *et al.* 2003). Nous avons aussi comparé cette dose à celles utilisées chez les humains (100 à 225 mg SID ou BID) (Anonymous 2003) et chez d'autres espèces animales: 1 à 5 mg/kg SID chez le rat, le chien et le singe (Riess *et al.* 1978; Takahashi *et al.* 2001) et 0,25 mg/kg BID chez le chien (Fernandez *et al.* 1995). Comme la plupart des doses étaient similaires à la seule rapportée chez le cheval, cette dernière a été choisie pour notre étude. Il est certain qu'une étude pilote avec l'administration de plusieurs doses différentes de diclofénac visant à déterminer la meilleure posologie pour l'administration orale du diclofénac chez le cheval aurait été idéal mais s'avérait impossible dans notre contexte expérimental.

Le mode par lequel les AINS topiques pénètrent dans les articulations est encore incertain. Jusqu'à maintenant deux mécanismes ont été suggérés; une pénétration directe dans l'articulation et une redistribution dans l'articulation après une absorption systémique (Heyneman *et al.* 2000). Une étude effectuée chez les humains par Radermacher *et al.* suggère que la pénétration articulaire du diclofénac topique se ferait principalement par une redistribution suite à l'absorption systémique (Radermacher *et al.* 1991). En effet, dans cette étude où le protocole d'application était similaire au nôtre, les concentrations

plasmatiques étaient à tout moment plus élevées que celles dans le liquide synovial. De plus, des niveaux mesurables ont été détectés dans le genou contralatéral non traité (Radermacher *et al.* 1991). Nous n'avons pas mesuré les concentrations de diclofénac dans les articulations opposées à celles traitées, par contre des concentrations plus élevées dans le liquide synovial que dans le plasma obtenues quatre heures après l'application suggèrent du moins qu'une partie de la pénétration se fait de façon directe, de la peau à l'articulation. Nos résultats sont en accord avec Mills *et al.* qui avait émis des conclusions similaires lors de leur étude sur la pénétration du méthylsalicylate chez le chien (Mills *et al.* 2005). Comme notre projet n'avait pas pour but de déterminer les mécanismes de pénétration du diclofénac suite à son application topique, des études futures seront nécessaires pour vérifier l'implication de chacun de ces mécanismes suggérés.

Nos résultats ont démontré que seule la concentration synoviale de diclofénac quatre heures suivant la dernière application topique était significativement différente de la concentration pré dose et, à l'intérieur des valeurs considérées thérapeutiques chez d'autres espèces. Cela suggère que la fréquence d'application n'est peut-être pas adéquate puisque qu'elle ne se fait qu'au 12 heures. C'est pourquoi des études de pharmacocinétiques plus poussées seraient intéressantes et permettraient de déterminer si une augmentation de la fréquence d'application ou si une crème plus concentrée de diclofénac pourrait améliorer la performance du médicament, sans causer d'augmentation importante des niveaux systémiques.

D'autres études seraient aussi nécessaires pour étudier la capacité du diclofénac appliqué localement à contrôler l'inflammation intra-articulaire. En effet, cliniquement l'utilisation d'un AINS a comme but principal de se rendre dans les articulations atteintes

d'OA pour diminuer la production de la PGE₂ et diminuer l'inflammation et la douleur. Il serait donc important de vérifier si l'application topique de la crème de diclofénac est capable de diminuer la PGE₂ dans les articulations traitées chez le cheval. Ceci est d'autant plus important que les études cliniques chez le cheval démontrent des effets thérapeutiques et que notre étude montre des concentrations intra-articulaires de diclofénac dans la limite inférieure des concentrations considérées thérapeutiques chez l'humain. C'est aussi une des raisons pour laquelle les IC₅₀ de la COX-1 et la COX-2 chez le cheval devrait être déterminées en plus de nous permettre de valider nos résultats.

Il y a encore des débats sur les effets que les AINS pourraient avoir sur le cartilage articulaire, surtout sur le métabolisme des protéoglycanes. Par exemple des études *in vitro* sur le cartilage normal canin ont démontré que plusieurs AINS, incluant les salicylates, le fénoprofène, l'isoxicame, le tolmetin et l'ibuprofène ont pu inhiber la synthèse des protéoglycanes (Brandt 1987). Par contre l'indométhacine, le piroxicame et le diclofénac n'ont pas eu d'effet sur ce paramètre (Brandt 1987). Une étude *in vitro* sur des tissus humains a étudié l'effet de plusieurs AINS sur des paramètres du métabolisme des protéoglycanes dans des explants de cartilage atteint d'OA (Mastbergen *et al.* 2006). Les résultats ont démontré que l'indométhacine aurait des effets néfastes sur le cartilage, en inhibant la synthèse des protéoglycanes mais que le naproxène n'aurait pas cet effet. L'acéclofénac et le célécoxib, des AINS plus sélectifs pour la COX-2, auraient eu des effets bénéfiques sur le cartilage, en augmentant la synthèse des protéoglycanes, en favorisant une meilleure rétention de ces protéoglycanes nouvellement synthétisés et en diminuant leur dégradation et relâchement. Les auteurs ont donc conclu que la sélectivité d'un AINS pour la COX-1 et la COX-2 pourrait être un important facteur en ce qui

concerne l'effet positif ou négatif des AINS sur le cartilage (Mastbergen *et al.* 2006). Par contre il se peut que l'effet néfaste des AINS ne soit pas dû à leur effet sur les protéoglycans mais via l'inhibition des PGs pouvant avoir un effet bénéfique sur le cartilage. Par exemple ces dernières aurait peut-être un rôle protecteur en inhibant l'expression des MMPs lors de l'OA (DiBattista *et al.* 1994). Par contre l'effet précis des prostaglandines sur les articulations et leurs rôles exacts dans la pathologie de l'OA reste à être déterminé (Caron 2000).

Une étude *in vitro* visant à établir l'effet du diclofénac sur le métabolisme articulaire semblent affirmer que cet AINS n'aurait aucun effet sur le métabolisme des protéoglycans et de l'acide hyaluronique dans le cartilage atteint d'OA (Blot *et al.* 2000). Par contre les résultats d'une étude récente, utilisant un modèle équin d'OA, ont démontré des effets positifs sur le cartilage lorsque la crème de diclofénac utilisée dans notre étude a été appliquée sur les articulations lésées (Frisbie *et al.* 2007). Le cartilage des articulations ayant reçues du diclofénac avaient un niveau de GAGs significativement plus élevé que celui du placebo. Aussi, il y avait une tendance pour le groupe traité d'avoir une amélioration de l'apparence histologique du cartilage comparé au groupe placebo. Par contre, il est difficile de comparer des études *in vitro* à des études *in vivo* et chacune de ces études a ses lacunes. C'est pourquoi il est nécessaire de poursuivre des études dont les objectifs sont de démontrer les effets du diclofénac sur le métabolisme du cartilage et des autres tissus articulaires.

Conclusion

En conclusion, nous avons déterminé que le diclofénac peut se rendre dans l'articulation à des concentrations capables d'effet anti-inflammatoires après l'application topique répétée d'un crème de 1% de diclofénac sur le carpe équin. Le manque d'effet secondaire comparé à l'administration d'une dose orale de 2,2 mg/kg de diclofénac nous suggère que l'application topique pourrait être une alternative efficace et sécuritaire pour le traitement de l'OA chez le cheval.

Projets futurs

Les projets futurs devraient viser premièrement à déterminer les IC_{50} de la COX-1 et la COX-2 chez le cheval car cela n'a pas encore été déterminé et, selon une étude, les IC_{50} peuvent différer entre les espèces (Brideau *et al.* 2001).

Il faudrait aussi déterminer si la pénétration articulaire de Surpass varie dans un modèle d'OA ou d'inflammation, surtout car il est possible que les articulations enflammées accumulent de plus haute concentration d'AINS que les articulations saines (Errecalde *et al.* 2001; McNeill *et al.* 1992; Owens *et al.* 1995). En plus, le produit Surpass est destiné pour être utilisé sur des chevaux souffrant de maladies articulaires, donc il serait important de vérifier la pénétration du produit chez des animaux avec des articulations semblables.

Et finalement, il serait important de déterminer si l'application topique de Surpass peut diminuer l'inflammation créée dans un modèle d'inflammation articulaire. Cela pourrait être réalisé en étudiant les concentrations de certains médiateurs d'inflammation,

tels la PGE₂, les cytokines ou le niveau de protéine dans les articulations. Cette étude pourrait valider l'effet anti-inflammatoire de ce produit.

Bibliographie

- Aigner, T. and Stove, J. (2003) Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* **55**, 1569-1593.
- Anderson, D., Kollias-Baker, C., Colahan, P., Keene, R.O., Lynn, R.C. and Hepler, D.I. (2005) Urinary and serum concentrations of diclofenac after topical application to horses. *Vet Ther* **6**, 57-66.
- Anonymous (2003) Food and Drug Administration Cataflam® Voltaren® Voltaren® -XR. www.fda.gov/cder/foi/label/2001/20254s2lbl.pdf
- Arcelloni, C., Lanzi, R., Pedercini, S., Molteni, G., Fermo, I., Pontiroli, A. and Paroni, R. (2001) High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **763**, 195-200.
- Aspden, R.M. and Hukins, D.W. (1979) The lamina splendens of articular cartilage is an artefact of phase contrast microscopy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **206**, 109-113.
- Aydelotte, M.B., Schumacher, B.L. and Kuettner, K.E. (1992) Heterogeneity of articular chondrocytes. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, Raven Press, New York. pp 237-249.
- Bailey, S.R., Marr, C.M. and Elliott, J. (2004) Current research and theories on the pathogenesis of acute laminitis in the horse. *Vet J* **167**, 129-142.
- Bakker, A.C., van de Loo, F.A., van Beuningen, H.M., Sime, P., van Lent, P.L., van der Kraan, P.M., Richards, C.D. and van den Berg, W.B. (2001) Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: Evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis and Cartilage* **9**, 128-136.
- Bell, A.L., Adamson, H., Kirk, F., McCaigue, M.D. and Rotman, H. (1991) Diclofenac inhibits monocyte superoxide production ex vivo in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* **11**, 27-30.
- Bianchi, M., Ferrario, P., Balzarini, P. and Brogгинi, M. (2006) Plasma and synovial fluid concentrations of nimesulide and its main metabolite after a single or repeated oral administration in patients with knee osteoarthritis. *J Int Med Res* **34**, 348-354.
- Blom, A.B. and van den Berg, W.B. (2007) The Synovium and Its Role in Osteoarthritis. In: *Bone and Osteoarthritis*, Eds: F. Bronner and M.C. Farach-Carson, Springer London.

- Blot, L., Marcelis, A., Devogelaer, J.P. and Manicourt, D.H. (2000) Effects of diclofenac, aceclofenac and meloxicam on the metabolism of proteoglycans and hyaluronan in osteoarthritic human cartilage. *Br J Pharmacol* **131**, 1413-1421.
- Bookman, A.A., Williams, K.S. and Shainhouse, J.Z. (2004) Effect of a topical diclofenac solution for relieving symptoms of primary osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. *CMAJ* **171**, 333-338.
- Bos, C.L., Richel, D.J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M.P. and Versteeg, H.H. (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 1187-1205.
- Botting, R.M. (2006) Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *Journal of Thermal Biology* **31**, 208-219.
- Brama, P.A., van den Boom, R., DeGroot, J., Kiers, G.H. and van Weeren, P.R. (2004) Collagenase-1 (MMP-1) activity in equine synovial fluid: influence of age, joint pathology, exercise and repeated arthrocentesis. *Equine Vet J* **36**, 34-40.
- Brandt, K.D. (1987) Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on chondrocyte metabolism in vitro and in vivo. *Am J Med* **83**, 29-34.
- Brew, K., Dinakarandian, D. and Nagase, H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 267-283.
- Brideau, C., Van Staden, C. and Chan, C.C. (2001) In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats. *Am J Vet Res* **62**, 1755-1760.
- Brogden, R.N., Heel, R.C., Pakes, G.E., Speight, T.M. and Avery, G.S. (1980) Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. *Drugs* **20**, 24-48.
- Brunner, M., Dehghanyar, P., Seigfried, B., Martin, W., Menke, G. and Muller, M. (2005) Favourable dermal penetration of diclofenac after administration to the skin using a novel spray gel formulation. *Br J Clin Pharmacol* **60**, 573-577.
- Buckwalter, J.A. and Mankin, H.J. (1997) Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons. Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume* **79**, 600-611.
- Buckwalter, J.A. and Martin, J. (1995) Degenerative joint disease. *Clin Symp* **47**, 1-32.
- Buckwalter, J.A. and Rosenberg, L. (1983) Structural changes during development in bovine fetal epiphyseal cartilage. *Coll Relat Res* **3**, 489-504.

- Calandruccio, R.A. and Gilmer, W.S. (1962) Proliferation, Regeneration, and Repair of Articular Cartilage of Immature Animals. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* **44**, 431-455.
- Caldwell, F.J., Mueller, P.O., Lynn, R.C. and Budberg, S.C. (2004) Effect of topical application of diclofenac liposomal suspension on experimentally induced subcutaneous inflammation in horses. *Am J Vet Res* **65**, 271-276.
- Capone, M.L., Tacconelli, S., Di Francesco, L., Sacchetti, A., Sciulli, M.G. and Patrignani, P. (2007) Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **82**, 85-94.
- Caron, J.P. (2000) Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. In: *Proceedings of the 46th American Association of Equine Practitioners Annual Convention*, San Antonio, Texas. pp 243-249.
- Caron, J.P. and Genovese, R.L. (2003) Principles and practices of joint disease treatment. In: *Diagnosis and management of lameness in the horse*, Eds: R.W. Ross and S.J. Dyson, Saunders, Philadelphia. pp 746-763.
- Cawston, T.E. and Wilson, A.J. (2006) Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**, 983-1002.
- Cevc, G. (2004) Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev* **56**, 675-711.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S. and Simmons, D.L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13926-13931.
- Chow, G., Nietfeld, J.J., Knudson, C.B. and Knudson, W. (1998) Antisense inhibition of chondrocyte CD44 expression leading to cartilage chondrolysis. *Arthritis Rheum* **41**, 1411-1419.
- Chunekamrai, S., Krook, L.P., Lust, G. and Maylin, G.A. (1989) Changes in articular cartilage after intra-articular injections of methylprednisolone acetate in horses. *Am J Vet Res* **50**, 1733-1741.
- Claesson, H.E. and Dahlen, S.E. (1999) Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs. *J Intern Med* **245**, 205-227.
- Clark, J.M. and Huber, J.D. (1990) The structure of the human subchondral plate. *J Bone Joint Surg Br* **72**, 866-873.

- Cronstein, B.N. (2002) Cyclooxygenase-2-selective inhibitors: translating pharmacology into clinical utility. *Cleve Clin J Med* **69 Suppl 1**, S113-19.
- Curtiss, P.H., Jr. (1964) Changes Produced in the Synovial Membrane and Synovial Fluid by Disease. *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume* **46**, 873-888.
- Davies, N.M. and Anderson, K.E. (1997) Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet* **33**, 184-213.
- Davies, N.M. and Skjodt, N.M. (2000) Choosing the right nonsteroidal anti-inflammatory drug for the right patient: a pharmacokinetic approach. *Clin Pharmacokinet* **38**, 377-392.
- Dawson, M., McGee, C.M., Vine, J.H., Nash, P., Watson, T.R. and Brooks, P.M. (1988) The disposition of biphenylacetic acid following topical application. *Eur J Clin Pharmacol* **33**, 639-642.
- Dean, D.D., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P., Howell, D.S. and Woessner, J.F., Jr. (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* **84**, 678-685.
- Dechant, J.E. and Baxter, G.M. (2007) Glucosamine and chondroitin sulphate as structure modifying agents in horses. *Equine Veterinary Education* **19**, 90-96.
- DeWitt, D.L. (1991) Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim Biophys Acta* **1083**, 121-134.
- DiBattista, J.A., Martel-Pelletier, J., Fujimoto, N., Obata, K., Zafarullah, M. and Pelletier, J.P. (1994) Prostaglandins E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest* **71**, 270-278.
- Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.J., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Contel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J., Czerniak, P.M. and et al. (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* **378**, 406-409.
- Doege, K.J., Sasaki, M., Kimura, T. and Yamada, Y. (1991) Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Human-specific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem* **266**, 894-902.
- Dominkus, M., Nicolakis, M., Kotz, R., Wilkinson, F.E., Kaiser, R.R. and Chlud, K. (1996) Comparison of tissue and plasma levels of ibuprofen after oral and topical administration. *Arzneimittelforschung* **46**, 1138-1143.

- Duparque, P. (1998) La greffe de cartilage par OATS®.
- Edwards, R.B., 3rd, Lu, Y. and Markel, M.D. (2002) The basic science of thermally assisted chondroplasty. *Clin Sports Med* **21**, 619-647, viii.
- Elliott, J. and Bailey, S.R. (2006) Gastrointestinal derived factors are potential triggers for the development of acute equine laminitis. *J Nutr* **136**, 2103S-2107S.
- Elsaid, K.A., Jay, G.D., Warman, M.L., Rhee, D.K. and Chichester, C.O. (2005) Association of articular cartilage degradation and loss of boundary-lubricating ability of synovial fluid following injury and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **52**, 1746-1755.
- Erdogan, F., Ergun, H., Gokay, N.S., Gulmez, S.E., Bolay, B. and Tulunay, F.C. (2006) The diffusion of nimesulide gel into synovial fluid: a comparison between administration routes. *Int J Clin Pharmacol Ther* **44**, 270-275.
- Errecalde, J.O., Carmely, D., Marino, E.L. and Mestorino, N. (2001) Pharmacokinetics of amoxicillin in normal horses and horses with experimental arthritis. *J Vet Pharmacol Ther* **24**, 1-6.
- Eyre, D. (2002) Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* **4**, 30-35.
- Fam, H., Bryant, J.T. and Kontopoulou, M. (2007) Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology* **44**, 59-74.
- Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J. and Pelletier, J.P. (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* **39**, 237-246.
- Fernandez, J.C., Martel-pelletier, J., Otterness, I.G., Lopezanaya, A., Mineau, F., Tardif, G. and Pelletier, J.P. (1995) Effects of Tenidap on Canine Experimental Osteoarthritis .1. Morphologic and Metalloprotease Analysis. *Arthritis and Rheumatism* **38**, 1290-1303.
- Figueras, A., Capella, D., Castel, J.M. and Laorte, J.R. (1994) Spontaneous reporting of adverse drug reactions to non-steroidal anti-inflammatory drugs. A report from the Spanish System of Pharmacovigilance, including an early analysis of topical and enteric-coated formulations. *Eur J Clin Pharmacol* **47**, 297-303.
- Finnin, B.C. and Morgan, T.M. (1999) Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. *J Pharm Sci* **88**, 955-958.
- Flannery, C.R., Hughes, C.E., Schumacher, B.L., Tudor, D., Aydelotte, M.B., Kuettner, K.E. and Caterson, B. (1999) Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional

- proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* **254**, 535-541.
- Fowler, P.D., Shadforth, M.F., Crook, P.R. and John, V.A. (1983) Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its major hydroxylated metabolites during long-term treatment of rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol* **25**, 389-394.
- Francoz, D., Desrochers, A. and Latouche, J.-S. (2007) Effect of repeated arthrocentesis and single joint lavage on cytologic evaluation of synovial fluid in 5 young calves. *The Canadian Journal of Veterinary Research* **71**, 129-134.
- Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Werpy, N.M. and McIlwraith, C.W. (2007) Evaluation of Topical Diclofenac Liposomal Cream for Treatment of Osteoarthritis Using an Equine Experimental Model. In: *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, Orlando, FL. pp 256-257.
- Frolich, J.C. (1997) A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 30-34.
- Funk, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871-1875.
- Gallacchi, G. and Marcolongo, R. (1993) Pharmacokinetics of diclofenac hydroxyethylpyrrolidine (DHEP) plasters in patients with monolateral knee joint effusion. *Drugs Exp Clin Res* **19**, 95-97.
- Garavito, R.M., Malkowski, M.G. and DeWitt, D.L. (2002) The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 129-152.
- Garvican, E. and Clegg, P. (2007) Clinical aspects of the equine carpal joints. *UK Vet* **12**, 1-5.
- Gaynes, B.I. and Fiscella, R. (2002) Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for ophthalmic use: a safety review. *Drug Saf* **25**, 233-250.
- Gibb, W. and Sun, M. (1996) Localization of prostaglandin H synthase type 2 protein and mRNA in term human fetal membranes and decidua. *J Endocrinol* **150**, 497-503.
- Giuliano, E.A. (2004) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in veterinary ophthalmology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **34**, 707-723.
- Goodrich, L.R. and Nixon, A.J. (2006) Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Vet J* **171**, 51-69.

- Grahame, R. (1995) Transdermal non-steroidal anti-inflammatory agents. *Br J Clin Pract* **49**, 33-35.
- Grandison, M.K. and Boudinot, F.D. (2000) Age-related changes in protein binding of drugs: implications for therapy. *Clin Pharmacokinet* **38**, 271-290.
- Gunaratna, C. (2001) Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Drug Discovery: A Primer For Bioanalytical Chemists: Part II. *Current Separations* **19**, 87-92.
- Harman, J. and Ward, M. (2001) The role of nutritional therapy in the treatment of equine Cushing's syndrome and laminitis. *Altern Med Rev* **6 Suppl**, S4-16.
- Harris, R.C. (2006) COX-2 and the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol* **47 Suppl 1**, S37-42.
- Henrotin, Y., de Leval, X., Mathy-Hartet, M., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., Dogne, J.M., Delarge, J. and Reginster, J.Y. (2001) In vitro effects of aceclofenac and its metabolites on the production by chondrocytes of inflammatory mediators. *Inflamm Res* **50**, 391-399.
- Henrotin, Y. and Reginster, J.Y. (1999) Anabolic events in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 310-312.
- Heyneman, C.A., Lawless-Liday, C. and Wall, G.C. (2000) Oral versus topical NSAIDs in rheumatic diseases: a comparison. *Drugs* **60**, 555-574.
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H. and Nozawa-Inoue, K. (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Archives of Histology and Cytology* **63**, 17-31.
- Jay, G.D. (2004) Lubricin and surfacing of articular joints. *Current Opinion in Orthopaedics* **15**, 355-359.
- Kalia, Y.N. and Guy, R.H. (2001) Modeling transdermal drug release. *Adv Drug Deliv Rev* **48**, 159-172.
- Kantharaj, G.R. (2003) Molecular Biology for Masters: Glycosylation of Proteins.
- Karcher, L.F., Dill, S.G., Anderson, W.I. and King, J.M. (1990) Right dorsal colitis. *J Vet Intern Med* **4**, 247-253.
- Knorth, H., Dorfmueller, P., Lebert, R., Schmidt, W.E., Wittenberg, R.H., Heukamp, M., Wiese, M. and Willburger, R.E. (2004) Participation of cyclooxygenase-1 in prostaglandin E2 release from synovitis tissue in primary osteoarthritis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 658-666.

- Knott, I., Dieu, M., Burton, M., Houbion, A., Remacle, J. and Raes, M. (1994) Induction of cyclooxygenase by interleukin 1: comparative study between human synovial cells and chondrocytes. *J Rheumatol* **21**, 462-466.
- Krey, P.R. and Cohen, A.S. (1973) Fine structural analysis of rabbit synovial cells. I. The normal synovium and changes in organ culture. *Arthritis & Rheumatism* **16**, 324-340.
- Ku, E.C., Lee, W., Kothari, H.V. and Scholer, D.W. (1986) Effect of diclofenac sodium on the arachidonic acid cascade. *Am J Med* **80**, 18-23.
- Ku, E.C., Wasvary, J.M. and Cash, W.D. (1975) Diclofenac sodium (GP 45840, Voltaren), a potent inhibitor of prostaglandin synthetase. *Biochem Pharmacol* **24**, 641-643.
- Kuettner, K.E., Aydelotte, M.B. and Thonar, E.J. (1991) Articular cartilage matrix and structure: a minireview. *J Rheumatol Suppl* **27**, 46-48.
- Laine, L., Curtis, S.P., Cryer, B., Kaur, A. and Cannon, C.P. (2007) Assessment of upper gastrointestinal safety of etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet* **369**, 465-473.
- Laurent, T.C. and Fraser, J.R. (1992) Hyaluronan. *FASEB J* **6**, 2397-2404.
- Lavery, S., Sandy, J.D., Celeste, C., Vachon, P., Marier, J.F. and Plaas, A.H. (2005) Synovial fluid levels and serum pharmacokinetics in a large animal model following treatment with oral glucosamine at clinically relevant doses. *Arthritis Rheum* **52**, 181-191.
- Levick, J.R. (2007) Hyaluronan, the guardian of joints. In: *Physiology News*, Cambridge, UK. pp 18-21.
- Lim, H., Paria, B.C., Das, S.K., Dinchuk, J.E., Langenbach, R., Trzaskos, J.M. and Dey, S.K. (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* **91**, 197-208.
- Lovejoy, B., Welch, A.R., Carr, S., Luong, C., Broka, C., Hendricks, R.T., Campbell, J.A., Walker, K.A., Martin, R., Van Wart, H. and Browner, M.F. (1999) Crystal structures of MMP-1 and -13 reveal the structural basis for selectivity of collagenase inhibitors. *Nat Struct Biol* **6**, 217-221.
- Lynn, R.C., Hepler, D.I., Kelch, W.J., Bertone, J.J., Smith, B.L. and Vatistas, N.J. (2004) Double-blinded placebo-controlled clinical field trial to evaluate the safety and efficacy of topically applied 1% diclofenac liposomal cream for the relief of lameness in horses. *Vet Ther* **5**, 128-138.

- Madison, K.C. (2003) Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol* **121**, 231-241.
- Mahajan, D.N., Ali, M.S. and Singh, B. (1994) Therapeutic efficacy of diclofenac sodium in clinical and experimental cases of arthritis and myositis in cattle and buffaloes. *Indian Vet J* **71**, 703-707.
- Malemud, C.J. (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* **11**, 1696-1701.
- Mankin, H.J. and Conger, K.A. (1966) The acute effects of intra-articular hydrocortisone on articular cartilage in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* **48**, 1383-1388.
- Mansour, J.M. (2004) Biomechanics of cartilage. In: *Kinesiology : the mechanics and pathomechanics of human movement* Ed: C.A. Oatis, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia pp 66-79.
- Martel-Pelletier, J., Cloutier, J.M. and Pelletier, J.P. (1986) Neutral proteases in human osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* **29**, 1112-1121.
- Martel-Pelletier, J., Pelletier, J.P. and Fahmi, H. (2003) Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* **33**, 155-167.
- Mason, L., Moore, R.A., Edwards, J.E., Derry, S. and McQuay, H.J. (2004) Topical NSAIDs for chronic musculoskeletal pain: systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord* **5**, 28.
- Mastbergen, S.C., Jansen, N.W., Bijlsma, J.W. and Lafeber, F.P. (2006) Differential direct effects of cyclo-oxygenase-1/2 inhibition on proteoglycan turnover of human osteoarthritic cartilage: an in vitro study. *Arthritis Res Ther* **8**, R2.
- McIlwraith, C.W. (1996) General pathobiology of the joint and response to injury. In: *Joint disease in the horse*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, WB Saunders, Philadelphia, PA. pp 40-70.
- McIlwraith, C.W. and Vachon, A. (1988) Review of pathogenesis and treatment of degenerative joint disease. *Equine Vet J Suppl*, 3-11.
- McNeill, S.C., Potts, R.O. and Francoeur, M.L. (1992) Local enhanced topical delivery (LETD) of drugs: does it truly exist? *Pharm Res* **9**, 1422-1427.
- Menasse, R., Hedwall, P.R., Kraetz, J., Pericin, C., Riesterer, L., Sallmann, A., Ziel, R. and Jaques, R. (1978) Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol Suppl*, 5-16.

- Miller, S.B. (2006) Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin Arthritis Rheum* **36**, 37-49.
- Mills, P.C. (2007) Vehicle effects on the in vitro penetration of testosterone through equine skin. *Vet Res Commun* **31**, 227-233.
- Mills, P.C. and Cross, S.E. (2006) Transdermal drug delivery: basic principles for the veterinarian. *Vet J* **172**, 218-233.
- Mills, P.C. and Cross, S.E. (2007) Regional differences in the in vitro penetration of methylsalicylate through equine skin. *Vet J* **173**, 57-61.
- Mills, P.C., Magnusson, B.M. and Cross, S.E. (2005) Penetration of a topically applied nonsteroidal anti-inflammatory drug into local tissues and synovial fluid of dogs. *Am J Vet Res* **66**, 1128-1132.
- Molony, V., Kent, J.E., Hosie, B.D. and Graham, M.J. (1997) Reduction in pain suffered by lambs at castration. *Vet J* **153**, 205-213.
- Moses, V.S. and Bertone, A.L. (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Vet Clin North Am Equine Pract* **18**, 21-37, v.
- Muldrew, K., Chung, M., Novak, K., Schachar, N.S., Zernicke, R.F., McGann, L.E., Rattner, J.B. and Matyas, J.R. (2001) Evidence of chondrocyte repopulation in adult ovine articular cartilage following cryoinjury and long-term transplantation. *Osteoarthritis Cartilage* **9**, 432-439.
- Myllyharju, J. and Kivirikko, K.I. (2001) Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* **33**, 7-21.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R. and Lefkowitz, J.B. (1986) Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* **55**, 69-102.
- Neil, K.M., Caron, J.P. and Orth, M.W. (2005) The role of glucosamine and chondroitin sulfate in treatment for and prevention of osteoarthritis in animals. *J Am Vet Med Assoc* **226**, 1079-1088.
- Newman, A.P. (1998) Articular cartilage repair. *Am J Sports Med* **26**, 309-324.
- Niethard, F.U., Gold, M.S., Solomon, G.S., Liu, J.M., Unkauf, M., Albrecht, H.H. and Elkik, F. (2005) Efficacy of topical diclofenac diethylamine gel in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* **32**, 2384-2392.
- O'Hara, B.P., Urban, J.P. and Maroudas, A. (1990) Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* **49**, 536-539.

- Oegema, T.R., Jr., Carpenter, R.J., Hofmeister, F. and Thompson, R.C., Jr. (1997) The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microsc Res Tech* **37**, 324-332.
- Okada, Y., Nakanishi, I. and Kajikawa, K. (1981) Ultrastructure of the mouse synovial membrane. Development and organization of the extracellular matrix. *Arthritis & Rheumatism* **24**, 835-843.
- Osterwalder, A., Reiner, V., Reiner, G. and Lualdi, P. (2002) Tissue absorption and distribution of ketoprofen after patch application in subjects undergoing knee arthroscopy or endoscopic carpal ligament release. *Arzneimittelforschung* **52**, 822-827.
- Owens, J.G., Kamerling, S.G. and Barker, S.A. (1995) Pharmacokinetics of ketoprofen in healthy horses and horses with acute synovitis. *J Vet Pharmacol Ther* **18**, 187-195.
- Park, J.Y., Pillinger, M.H. and Abramson, S.B. (2006) Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* **119**, 229-240.
- Pollitt, C. and Dyson, S. (2003) Laminitis. In: *Diagnosis and management of lameness in the horse*, Eds: R.W. Ross and S. Dyson. pp 325-331.
- Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Lavery, S. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, S26-33.
- Poole, C.A. (1997) Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* **191** (Pt 1), 1-13.
- Radermacher, J., Jentsch, D., Scholl, M.A., Lustinetz, T. and Frolich, J.C. (1991) Diclofenac concentrations in synovial fluid and plasma after cutaneous application in inflammatory and degenerative joint disease. *Br J Clin Pharmacol* **31**, 537-541.
- Radin, E.L. (1995) Osteoarthrosi-the orthopedic surgeon's perspective. *Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum*. **266**, 6-9.
- Ranade, V.V. (1991) Drug delivery systems. 6. Transdermal drug delivery. *J Clin Pharmacol* **31**, 401-418.
- Rengel, Y., Ospelt, C. and Gay, S. (2007) Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther* **9**, 221.
- Riess, W., Stierlin, H., Degen, P., Faigle, J.W., Gerardin, A., Moppert, J., Sallmann, A., Schmid, K., Schweizer, A., Sulc, M., Theobald, W. and Wagner, J. (1978) Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren. *Scand J Rheumatol Suppl*, 17-29.

- Ritchlin, C. (2000) Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res* **2**, 356-360.
- Rolf, C., Engstrom, B., Beauchard, C., Jacobs, L.D. and Le Liboux, A. (1999) Intra-articular absorption and distribution of ketoprofen after topical plaster application and oral intake in 100 patients undergoing knee arthroscopy. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 564-567.
- Rosa, P.C.S., Peiro, J.R., Campebell, R.C., Valadao, C.A.A. and Bechara, G.H. (2003) Effects of diclofenac and dexamethasone on horse experimental endotoxemia. *Arq Bras Med Vet Zootec* **55**, 279-281.
- Roskar, R. and Kmetec, V. (2003) Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **788**, 57-64.
- Roughley, P.J. (2006) The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater* **12**, 92-101.
- Roughley, P.J., Alini, M. and Antoniou, J. (2002) The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. *Biochem Soc Trans* **30**, 869-874.
- Saari, H., Konttinen, Y.T., Tulamo, R.M., Antti-Poika, I. and Honkanen, V. (1989) Concentration and degree of polymerization of hyaluronate in equine synovial fluid. *Am J Vet Res* **50**, 2060-2063.
- Samuelsson, B. (1983) Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **220**, 568-575.
- Schlueter, A.E. and Orth, M.W. (2003) Equine Osteoarthritis: a brief review of the disease and its causes. *Equine and Comparative Exercise Physiology* **1**, 221-231.
- Schumacher, B.L., Block, J.A., Schmid, T.M., Aydelotte, M.B. and Kuettner, K.E. (1994) A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* **311**, 144-152.
- Schwab, J.M., Schluesener, H.J. and Laufer, S. (2003) COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol? *Lancet* **361**, 981-982.
- Serhan, C.N. and Levy, B. (2003) Success of prostaglandin E2 in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8609-8611.
- Shuler, F.D., Georgescu, H.I., Niyibizi, C., Studer, R.K., Mi, Z., Johnstone, B., Robbins, R.D. and Evans, C.H. (2000) Increased matrix synthesis following adenoviral

- transfer of a transforming growth factor beta1 gene into articular chondrocytes. *J Orthop Res* **18**, 585-592.
- Singh, P. and Roberts, M.S. (1994) Skin permeability and local tissue concentrations of nonsteroidal anti-inflammatory drugs after topical application. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 144-151.
- Southwick, W.O. and Bensch, K.G. (1971) Phagocytosis of colloidal gold by cells of synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* **53**, 729-741.
- Sternlicht, M.D. and Werb, Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 463-516.
- Suleyman, H., Demircan, B. and Karagoz, Y. (2007) Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Rep* **59**, 247-258.
- Sutton, S., Clutterbuck, A., Harris, P., Gent, T., Freeman, S., Foster, N., Barrett-Jolley, R. and Mobasher, A. (2007) The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*.
- Swann, D.A., Silver, F.H., Slayter, H.S., Stafford, W. and Shore, E. (1985) The molecular structure and lubricating activity of lubricin isolated from bovine and human synovial fluids. *Biochem J* **225**, 195-201.
- Takahashi, M., Umehara, N., Suzuki, S. and Tezuka, M. (2001) Analgesic Action of a Sustained Release Preparation of Diclofenac Sodium in a Canine Urate-Induced Gonarthrosis. *Journal of Health Science* **47**, 464-467.
- Tanabe, T. and Tohnai, N. (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 95-114.
- Tang, W. (2003) The metabolism of diclofenac--enzymology and toxicology perspectives. *Curr Drug Metab* **4**, 319-329.
- Todd, P.A. and Sorkin, E.M. (1988) Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* **35**, 244-285.
- Todhunter, R.J. (1996) Anatomy and physiology of synovial joints. In: *Joint disease in the horse*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, WB Saunders, Philadelphia, PA. pp 1-28.
- Todhunter, R.J., Fubini, S.L., Wootton, J.A. and Lust, G. (1996) Effect of methylprednisolone acetate on proteoglycan and collagen metabolism of articular cartilage explants. *J Rheumatol* **23**, 1207-1213.

- Tonussi, C.R. and Ferreira, S.H. (1994) Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* **251**, 173-179.
- Topper, J.N., Cai, J., Falb, D. and Gimbrone, M.A., Jr. (1996) Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10417-10422.
- Trotter, G.W. (1996) Intra-articular corticosteroids. In: *Joint disease in the horse*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, WB Saunders, Philadelphia, PA. pp 237-256.
- Tugwell, P.S., Wells, G.A. and Shainhouse, J.Z. (2004) Equivalence study of a topical diclofenac solution (pennsaid) compared with oral diclofenac in symptomatic treatment of osteoarthritis of the knee: a randomized controlled trial. *J Rheumatol* **31**, 2002-2012.
- Tulamo, R.M., Houttu, J., Tupamaki, A. and Salonen, M. (1996) Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. *Am J Vet Res* **57**, 932-937.
- Tung, J.T., Arnold, C.E., Alexander, L.H., Yuzbasiyan-Gurkan, V., Venta, P.J., Richardson, D.W. and Caron, J.P. (2002) Evaluation of the influence of prostaglandin E2 on recombinant equine interleukin-1beta-stimulated matrix metalloproteinases 1, 3, and 13 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 expression in equine chondrocyte cultures. *Am J Vet Res* **63**, 987-993.
- Urquhart, E. (1991) A comparison of synovial fluid concentrations of non-steroidal anti-inflammatory drugs with their in vitro activity. *Agents Actions* **32**, 261-265.
- van den Boom, R., van de Lest, C.H., Bull, S., Brama, R.A., van Weeren, P.R. and Barneveld, A. (2005) Influence of repeated arthrocentesis and exercise on synovial fluid concentrations of nitric oxide, prostaglandin E2 and glycosaminoglycans in healthy equine joints. *Equine Vet J* **37**, 250-256.
- Van Pelt, R.W. (1962) Properties of equine synovial fluid. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **141**, 1051-1061.
- Van Pelt, R.W. (1974) Interpretation of synovial fluid findings in the horse. *J Am Vet Med Assoc* **165**, 91-95.
- Vignon, E. (2000) Structure et métabolisme du cartilage articulaire. *Rev Rhum [Éd Fr] Suppl* **67**, 112-118.

- von der Mark, K. (2006) Structure, Biosynthesis and Gene Regulation of Collagens in Cartilage and Bone. In: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism* Second Edition edn., Eds: M.J. Seibel, S.P. Robins and J.P. Bilezikian, Academic Press. pp 3-26.
- Wallace, J.L., Bak, A., McKnight, W., Asfaha, S., Sharkey, K.A. and MacNaughton, W.K. (1998) Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology* **115**, 101-109.
- Warburton, M. Extracellular Matrix Proteins I: Fibrous Proteins
- Warner, T.D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J.A. and Vane, J.R. (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7563-7568.
- Warner, T.D., Vojnovic, I., Bishop-Bailey, D. and Mitchell, J.A. (2006) Influence of plasma protein on the potencies of inhibitors of cyclooxygenase-1 and -2. *FASEB J* **20**, 542-544.
- Wenzel, S.E. (2003) The role of leukotrienes in asthma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **69**, 145-155.
- Werz, O. (2002) 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **1**, 23-44.
- Windhaber, R.A., Wilkins, R.J. and Meredith, D. (2003) Functional characterisation of glucose transport in bovine articular chondrocytes. *Pflugers Arch* **446**, 572-577.
- Wright, V. and Dowson, D. (1976) Lubrication and cartilage. *J Anat* **121**, 107-118.
- Yielding, K.L., Tomkins, G.M. and Bunim, J.J. (1957) Synthesis of hyaluronic acid by human synovial tissue slices. *Science* **125**, 1300.
- Zheng, J., Luo, W. and Tanzer, M.L. (1998) Aggrecan synthesis and secretion. A paradigm for molecular and cellular coordination of multiglobular protein folding and intracellular trafficking. *J Biol Chem* **273**, 12999-13006.