

Y-a-t-il un réel intérêt à utiliser les non-aminobisphosphonates chez le cheval de sport ayant des pathologies ostéo-articulaires ?

Auteur : Ledeck, Joy

Promoteur(s) : Scippo, Marie-Louise

Faculté : Faculté de Médecine Vétérinaire

Diplôme : Master en médecine vétérinaire

Année académique : 2019-2020

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/9542>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**Y-a-t-il un réel intérêt à utiliser les
non-aminobisphosphonates chez le cheval de sport
ayant des pathologies ostéo-articulaires ?**

**Is there a real interest in using non-aminobisphosphonates in sport horses
with osteo-articular pathologies ?**

Joy LEDECK

Travail de fin d'études

présenté en vue de l'obtention du grade

de Médecin Vétérinaire

ANNÉE ACADÉMIQUE 2019-2020

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

**Y-a-t-il un réel intérêt à utiliser les
non-aminobisphosphonates chez le cheval de sport
ayant des pathologies ostéo-articulaires ?**

**Is there a real interest in using non-aminobisphosphonates in sport horses
with osteo-articular pathologies ?**

Joy LEDECK

Professeur Scippo Marie-Louise

Travail de fin d'études

présenté en vue de l'obtention du grade

de Médecin Vétérinaire

ANNÉE ACADÉMIQUE 2019-2020

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

Y-a-t-il un réel intérêt à utiliser les non-aminobisphosphonates chez le cheval de sport ayant des pathologies ostéo-articulaires ?

OBJECTIF DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail est de réaliser une revue de la littérature concernant l'utilisation des non-aminobisphosphonates chez le cheval de sport ayant des pathologies ostéo-articulaires. La revue couvre spécifiquement leur pharmacocinétique et pharmacodynamique ainsi que les moyens de détection et le point de vue de la Fédération Equestre Internationale au sujet de cette thérapeutique.

RÉSUMÉ

Pour commencer, l'effet inhibiteur de la résorption osseuse, tout en maintenant l'activité ostéoblastique intacte, des non-aminobisphosphonates a été découvert dans les années soixante. Ils sont utilisés dans toute l'Europe ainsi qu'aux Etats-unis pour la prévention et le traitement de maladies osseuses telles que le syndrome naviculaire, l'éparvin, les fractures de stress, l'ostéopénie de non-usage, les douleurs associées à des lésions de la colonne thoraco-lombaire,...

Ensuite, il existe deux groupes de bisphosphonates selon qu'ils contiennent ou non un groupe aminé dans leur chaîne latérale. Les deux groupes se lient à l'os minéral mais possèdent deux mécanismes d'action distincts tout en agissant sur les mêmes cellules cibles c'est-à-dire les ostéoclastes matures, les ostéoblastes mais aussi les cellules cartilagineuses et les chondrocytes.

L'efficacité de l'utilisation des non-aminobisphosphonates est difficile à objectiver car il n'existe pas de modèle expérimental permettant la standardisation. De plus, l'évaluation clinique a une sensibilité limitée et des résultats subjectifs. L'efficacité est malgré tout prouvée pour l'ostéopénie de non-usage ainsi que pour les dorsalgies avec une amélioration

clinique de 80%. Le tiludronate est donc une option thérapeutique prometteuse pour prolonger l'espérance de vie ou la carrière sportive de chevaux affectés.

De plus, les effets des bisphosphonates sur le remodelage sont visibles entre deux et six mois principalement. Des études expérimentales parlent d'un potentiel analgésique pour cette thérapeutique mais il manque encore quelques preuves.

En ce qui concerne les sports équestres, il est d'une grande nécessité de trouver une méthode efficace pour la détection d'utilisation des non-aminobisphosphonates afin de réguler leur usage. Cependant, à cause de leurs propriétés hydrophiles, ils sont difficilement extraits des matrices biologiques. Dès lors, des scientifiques ont surmonté ce problème en utilisant une extraction en phase solide et méthylation avant l'analyse par chromatographie liquide en association avec la spectrométrie de masse.

Au niveau de la Fédération Equestre Internationale, les non-aminobisphosphonates peuvent être utilisés chez les chevaux de sport mais au minimum vingt-huit jours avant une compétition. Les aminobisphosphonates sont quant à eux toujours interdits.

Notons que de nombreuses données à propos de cette thérapeutique sont encore manquantes ou insuffisantes. Dès lors, des études multicentriques sont nécessaires afin d'obtenir plus d'informations sur leur efficacité, divers schémas thérapeutiques, des études avec davantage de chevaux et sur une plus longue période de temps.

Is there a real interest in using non-aminobisphosphonates in sport horses with osteo-articular pathologies ?

AIM OF THE WORK

The aim of the work is to achieve the literature review regarding the use of non-aminobisphosphonates in sport horses with osteo-articular pathologies. The review covers precisely their pharmacokinetics and pharmacodynamics as well as the means of detection and the point of view of the international equestrian federation about this therapy.

SUMMARY

Non-aminobisphosphonates were discovered in the 1960s for their inhibitory effect on bone resorption while keeping intact the osteoblastic activity. It is used throughout Europe and in the United States for the prevention and treatment of bone diseases such as navicular syndrome, bone spavin, stress fractures, long-term osteopenia in the immobilized limb, pain associated with lesions of the thoracolumbar spine, ...

There are two groups of bisphosphonates depending on whether or not they contain an amino group in their side chain. The two groups bind to the mineral bone but have two distinct mechanisms of action while acting on the same target cells such as mature osteoclasts, osteoblasts, but also cartilage cells and chondrocytes.

The effectiveness of the use of non-aminobisphosphonates is difficult to objectify because there are no experimental model allowing standardization. In addition, the clinical evaluation has limited sensitivity and subjective results. The effectiveness is still proven for osteopenia of non-use as well as for back pain with a clinical improvement of 80%. Tiludronate is therefore a promising therapeutic option for extending the life expectancy or sporting career of affected horses.

Their effect on bone remodeling is visible between two and six months. They also have an analgesic potential, however, some evidence are still lacking.

It is very necessary for equestrian sports to find an effective method for detecting the use of non-aminobisphosphonates in order to regulate their use. However, because of their hydrophilic properties, they are difficult to extract from biological matrices. Therefore, this problem was overcome by using solid phase extraction and methylation before analysis by liquid chromatography in combination with mass spectrometry.

For the International Equestrian Federation, non-aminobisphosphonates can be used in sport horses but at least twenty eight days before a competition. Aminobisphosphonates are still prohibited.

Note that many data about this therapy are still missing or insufficient. Therefore, multi-center studies are necessary in order to obtain more information on their effectiveness, various treatment regimens, studies with more horses and over a longer period of time.

Remerciements

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance, dans un premier temps, à ma promotrice Madame Scippo, M-L, Professeure à l'Université de Liège, pour la liberté du choix du sujet, pour sa patience, sa disponibilité et surtout pour ses conseils constructifs qui ont contribué à améliorer ce travail.

Je remercie toute l'équipe pédagogique de l'Université de Liège responsable de notre formation, la mise à disposition des installations ainsi que pour son soutien.

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué au succès du stage que j'ai pu effectuer cette année pour les savoirs qu'ils ont généreusement partagé, pour leur confiance ainsi que pour leur bonne humeur au quotidien.

Je remercie mes très chers parents, Olivier et Laurence, qui ont toujours été là pour moi, qui ont cru en moi, qui se sont battus pour que je ne baisse pas les bras, pour leur aller-retour jusque Liège pour aller manger un bout quand ça n'allait pas et surtout qui m'ont permis de réaliser mon rêve et de continuer ma passion.

Je voudrais également remercier mes grand-parents pour leur soutien, les lasagnes et galettes pour me remonter le moral.

Un grand merci à tous mes amis : Emilie, Thibaut, Maurine, Gilles, Anais, Kevin pour leurs attentions et leurs encouragements durant toute la durée de mes études, mais aussi de me changer les idées quand je rentrais de Liège.

Je voulais encore remercier mon groupe clinique : Aude, Julia, Sofia, Sélia, Delphine, Olivia, Léa, Manon, Clothilde, Mathilde, Audrey pour tous ces moments passés ensemble, nos soirées tartiflette/Mont d'Or, les marchés de Noël,...

Mes amis de bachelier, Camille, Elsa, Ambre et Aude pour ces années passées ensemble, nos sorties aux trottis, nos virées au restaurant et nos galères durant les examens.

Sommaire :

1. Que sont les (non)-aminobisphosphonates ?
2. Physiologie osseuse, quelques rappels
3. Mode d'action, pharmacocinétique et pharmacodynamique des non-aminobisphosphonates
 - 3.1. Mécanismes d'action
 - 3.1.1. Les non-aminobisphosphonates
 - 3.1.2. Les aminobisphosphonates
 - 3.2. Pharmacocinétique
 - 3.2.1. Profils de concentration
 - 3.3. Pharmacodynamique
4. Voies d'administration, posologie et présentation des non-aminobisphosphonates
5. Utilisation clinique des (non)-aminobisphosphonates
6. Effets secondaires des non-aminobisphosphonates
7. Efficacité des non-aminobisphosphonates
8. Technique de mesure des (non)-aminobisphosphonates et efficacité de ces techniques
9. Dopage : seuil de tolérance et délai avant compétition
10. Législation sur les non-aminobisphosphonates
11. Perspectives concernant les non-aminobisphosphonates
12. Conclusions
13. Références bibliographiques

1. Que sont les (non)-aminobisphosphonates ?

Découverts dans les années soixante, les bisphosphonates ont été utilisés, dans un premier temps, comme anti-corrosifs dans l'industrie puis en médecine humaine pour leur effet inhibiteur de la résorption osseuse (Mitchell *et al.*, 2019 ; Poircuitte, 2004).

D'abord, ces molécules sont approuvées par la "Food and Drug Administration" et sont utilisées aux Etats-unis ainsi qu'en Europe pour la prévention et le traitement de maladies osseuses (Mitchell *et al.*, 2019).

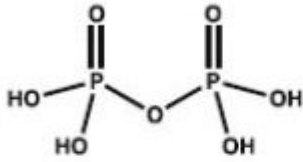
Les bisphosphonates ont une structure chimiquement proche du pyrophosphate inorganique (figure 1). Ce dernier est un inhibiteur de la calcification résistant, en raison de sa structure, à l'hydrolyse par la phosphatase alcaline.

La liaison P-O-P est remplacée par une liaison P-C-P pour les bisphosphonates. Autour du carbone, se trouve deux groupements latéraux, la première chaîne est responsable de l'affinité pour l'hydroxyapatite et la deuxième, des propriétés anti-résorptives. La structure et l'organisation spatiale déterminent l'activité biologique de cette médication et influencent la capacité à interagir avec les cellules cibles (Mitchell *et al.*, 2019 ; Delguste *et al.*, 2007 ; Poircuitte, 2004).

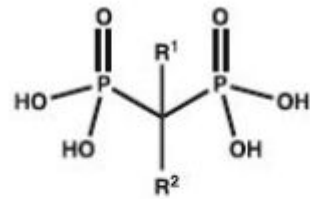
Il existe deux groupes de bisphosphonates en fonction qu'ils présentent ou pas un groupe aminé dans une chaîne latérale.

- Les non-aminobisphosphonates comportent le clodronate, l'etidronate ou encore le tiludronate, un bisphosphonate de troisième génération portant le nom chimique : [(4-chlorophenyl)thio] méthylène bisphosphonate (Delguste *et al.*, 2007).
- Les aminobisphosphonates sont représentés par le pamidronate, l'alendronate, l'ibandronate, le risédronate et le zolédronate. Ce sont des molécules plus récentes et plus puissantes. L'utilisation de ces dernières, chez le cheval, n'est pas autorisée même s'il existe quelques papiers (Nieto *et al.*, 2013) rapportant leurs utilisations (Mitchell *et al.*, 2019).

Pyrophosphate



Bisphosphonate General Structure



$R^1, R^2 = H$ MBP
 $R^1 = OH, R^2 = H$ MHBP
 $R^1 = OH, R^2 = CH_3$ etidronate
 $R^1 = OH, R^2 = 3\text{-pyridinyl}$ risedronate

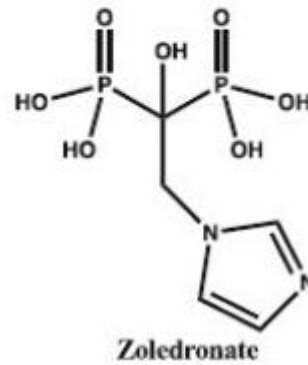
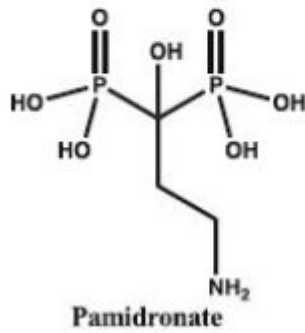
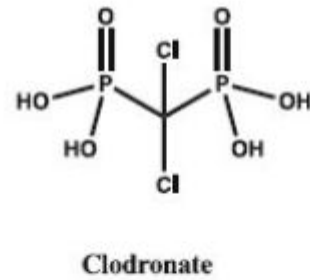
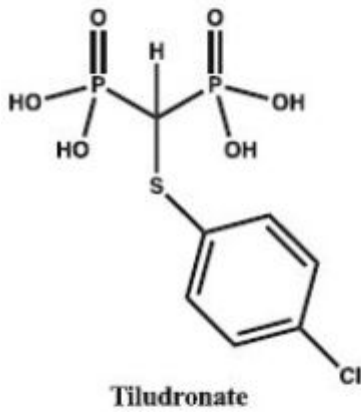


Figure 1. Structure chimique du pyrophosphate ainsi que les principaux bisphosphonates (Mitchell et al., 2019).

2. Physiologie osseuse, quelques rappels

Pour commencer, le rôle principal de l'os est le soutien de l'organisme mais il a aussi trois autres fonctions : la croissance, le remodelage ainsi que le remaniement. Avec cette dernière fonction, l'os a donc une capacité d'adaptation rapide et ce remaniement a lieu durant toute la vie, à plusieurs endroits sur l'os cortical et trabéculaire à la différence des deux autres fonctions.

Les cellules ayant un rôle au niveau osseux sont :

- Les ostéoclastes : dégradation et résorption osseuse.
- Les ostéoblastes : synthèse de la matrice ostéoïde qui subit une minéralisation et forme un front de calcification.

En somme, l'os est constitué d'une matrice protéique formée par des fibres de collagène de type 1 principalement, sur laquelle une substance cristalline phosphocalcique vient se déposer. Les molécules de collagène au sein de la matrice sont stabilisées à l'aide de molécules de pontage (Varela *et al.*, 2002).

Dans un cycle de remodelage, la résorption et la formation sont couplées c'est-à-dire que ce qui est résorbé est remplacé par de l'os nouvellement synthétisé. C'est un processus long : chez l'homme, ça prend plus ou moins sept mois. La résorption dure quelques semaines tandis que la formation, plusieurs mois.

De plus, les facteurs mécaniques jouent un rôle important dans le déclenchement du processus de remodelage. Lors du syndrome naviculaire, la phase de formation est sept fois plus importante que celle de résorption. Avec de telles circonstances, la formation n'est donc pas suffisante pour remplacer l'os résorbé. Ce découplage mène à une plus grande porosité de l'os, perte d'os ou diminution de sa résistance mécanique (Denoix *et al.*, 2003).

Notons que le *turn over* de l'os est un processus dynamique qui est affecté par l'âge (les jeunes ont un remodelage plus rapide), le sexe, la saison, l'exercice ainsi que l'alimentation (Mitchell *et al.*, 2019).

L'os est une réserve naturelle de calcium, disponible en grande quantité et rapidement.

C'est une source capitale pour l'homéostasie de l'organisme. Le reflet du métabolisme osseux peut être obtenu en calculant le bilan calcique. En effet, l'inhibition de la résorption entraîne une séquestration de calcium dans l'os et perturbe par conséquent l'homéostasie calcique. Cette perturbation peut être d'autant plus marquée si cela s'accompagne d'une déficience ou dysfonction des autres sources de calcium que sont les reins et les intestins (Varela *et al.*, 2002). L'inhibition du relargage de calcium osseux permet aussi d'augmenter la densité osseuse et donc la résistance de l'os aux contraintes mécaniques (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2012).

3. Mode d'action, pharmacocinétique et pharmacodynamique des non-aminobisphosphonates

3.1. Mécanismes d'action

Une fois administrés, les bisphosphonates se lient au calcium au niveau de la surface osseuse. Grâce aux groupements phosphates et éventuellement au groupe hydroxyle quand il est présent, ils se lient à l'os minéral. L'enthalpie de la liaison est dépendante de la charge et donc de l'état de protonation des molécules. Le groupe hydroxyle est le plus susceptible d'être impliqué dans la liaison hydrogène à la surface minérale. Lors du dépistage des propriétés de liaison aux minéraux osseux d'un nouveau bisphosphonate, il faut tenir compte de deux caractéristiques importantes : l'état de protonation et la conformation de la molécule liée. L'état de protonation des composés est facilement déterminé par les mesures de l'anisotropie par déplacement chimique du ^{31}P (Delguste *et al.*, 2007 ; Ironside *et al.*, 2010).

Dans cette optique, les bisphosphonates se lient avec fermeté à l'os minéral car ils ont une forte affinité. Ce type de liaison permet ainsi d'avoir des molécules très sélectives afin de fournir un haut degré de spécificité tissulaire et donc de faciliter l'accès des bisphosphonates dans les ostéoclastes (Mitchell *et al.*, 2019).

Les cellules cibles des bisphosphonates sont les ostéoclastes matures et les ostéoblastes.

Lors de la résorption, les ostéoclastes produisent une substance acide, ce qui induit la libération des bisphosphonates de la phase minérale osseuse. Les ostéoclastes sont donc exposés à de fortes concentrations de bisphosphonate libre. Ensuite, les ostéoclastes

endocytent les bisphosphonates entraînant leur apoptose et par conséquent, l'inhibition de la résorption osseuse se produit (Delguste *et al.*, 2007).

3.1.1. Les non-aminobisphosphonates

Les non-aminobisphosphonates ont un autre mécanisme d'action. Ils agissent en modifiant le métabolisme énergétique cellulaire menant à un effet cytotoxique. Une fois les bisphosphonates métabolisés dans l'ostéoclaste, il y a une production de métabolites toxiques non hydrolysables de l'adénosine triphosphate qui s'accumulent dans l'ostéoclaste et inhibent ce dernier. Finalement, l'apoptose des ostéoclastes se produit (Mitchell *et al.*, 2019 ; Delguste *et al.*, 2007).

3.1.2. Les aminobisphosphonates

Les bisphosphonates portant un groupe aminé inhibent la synthèse de cholestérol ce qui résulte en la perturbation du signal intracellulaire dans les ostéoclastes menant à la résorption osseuse. Les aminobisphosphonates inhibent la farnesyl pyrophosphate synthase, une enzyme responsable de la synthèse de mévalonate, ce qui entraîne l'absence d'ajout de groupe phénol à la molécule et inhibe des protéines responsables de la régulation de l'hydrolyse de la guanosine triphosphate, protéine indispensable au processus de signalisation intracellulaire. (tableau I) (Mitchell *et al.*, 2019 ; Delguste *et al.*, 2007).

Par ailleurs, le pamidronate inhibe la minéralisation osseuse; il a également un mécanisme d'action supplémentaire qui vise une autre cible que la voie du mévalonate mais qui est encore indéterminée. Le zolédronate a aussi une action sur une translocase mitochondriale (Delguste *et al.*, 2007).

Tableau I. Synthèse et comparaison du mode d'action du tiludronate avec ceux des autres bisphosphonates (Poircuite, 2004).

Mode d'action	Composés non nitrogénés			Composés nitrogénés		
	Chaîne R2 courte		tiludronate	Chaîne R2 longue		
	étidronate	clodronate		risedronate	pamidronate	alendronate
Inhibition des protéines tyrosine-phosphatases et altération du cytosquelette	NON		OUI	NON		OUI
Inhibition de la pompe à protons	NON		OUI (Il est 10.000 fois plus puissant que l'étidronate et l'alendronate et est spécifique de l'ostéoclaste)	NON		
Recrutement et formation des ostéoclastes	NON			OUI		
Action sur l'ostéoblaste	Pas complètement identifié		Inhibition de la synthèse de l'Interleukine-6 (l'IL-6 stimule la résorption osseuse et inhibe la formation osseuse)	Synthèse d'un facteur inhibiteur de l'ostéoclasie osseuse non clairement identifié		
Formation d'analogues d'ATP cytotoxiques	OUI (tous les composés à courte chaîne R2 à l'exception du tiludronate qui a une longue chaîne R2)			NON		
Inhibition de la voie du mévalonate	NON			OUI		
Inhibition d'enzymes dégradant le cartilage	Faiblement	Faiblement	OUI (Il est 10 fois plus actif que l'étidronate)	Non rapporté	Faiblement	Non rapporté
Action sur la taille du cristal d'hydroxyapatite	NON		Augmente la taille du cristal	NON		

Les deux groupes de bisphosphonates ont une puissance différente, elle est déterminée par la distance séparant l'azote de la chaîne P-C-P ainsi que la configuration spatiale de la chaîne latérale (Delguste *et al.*, 2007).

3.2. Pharmacocinétique

La distribution des bisphosphonates a lieu dans tout l'organisme sauf dans le système nerveux et avec une préférence pour les tissus osseux et le cartilage. La vascularisation est importante car elle influence cette distribution tissulaire. Malheureusement, la distribution des bisphosphonates n'est pas homogène et ils se localisent préférentiellement où le *turn over* osseux est élevé car on a une plus grande exposition minérale (comme le calcium) à cet endroit, ainsi qu'au niveau de l'os trabéculaire plutôt que l'os cortical (Mitchell *et al.*, 2019 ; Poircuitte, 2004).

D'ailleurs, la biodisponibilité orale de cette médication est très faible; on l'estime à environ 5% chez l'homme pour l'acide tiludronique car son caractère hydrophile empêche son passage entre les cellules digestives et il n'y a pas de formation de complexes avec des cations divalents comme le calcium. La biodisponibilité de la formulation injectable est de 100%.

Les bisphosphonates sont très peu métabolisés et sont essentiellement éliminés par voie urinaire (figure 2) et de façon minime par voie biliaire. Cette élimination se fait très lentement à la vitesse du *turn over* osseux (Delguste *et al.*, 2007 ; Poircuitte, 2004). De plus, il y a un manque de sensibilité du test qui ne permet pas de mesurer avec précision les concentrations dans l'urine (Wong *et al.*, 2015).

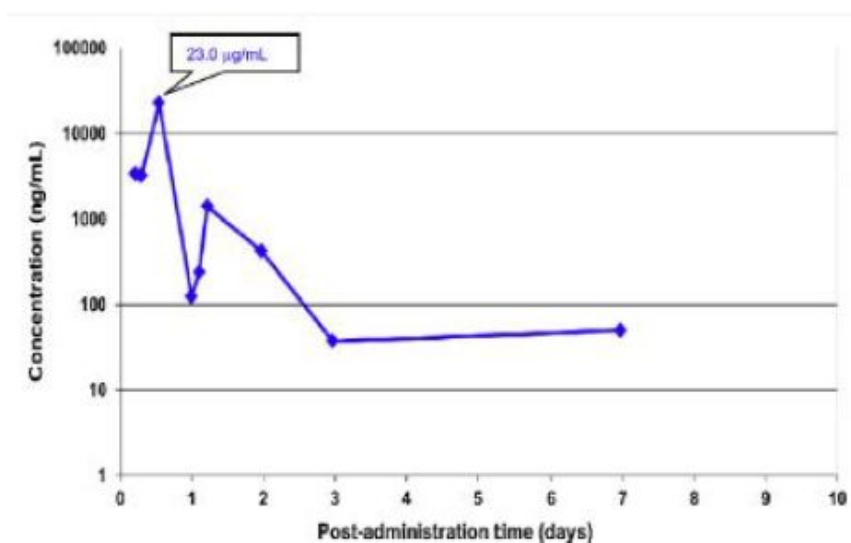


Figure 2. Profil d'excrétion urinaire d'acide tiludronique après l'administration intraveineuse d'une dose de 1,755 grammes (Wong *et al.*, 2015).

On observe un pic treize heures post-administration pour le tiludronate dans l'urine avec la concentration maximale de 23 µg/mL. L'acide tiludronique reste détectable durant sept jours post-administration dans l'urine et plus d'un jour pour le plasma (figure 3).

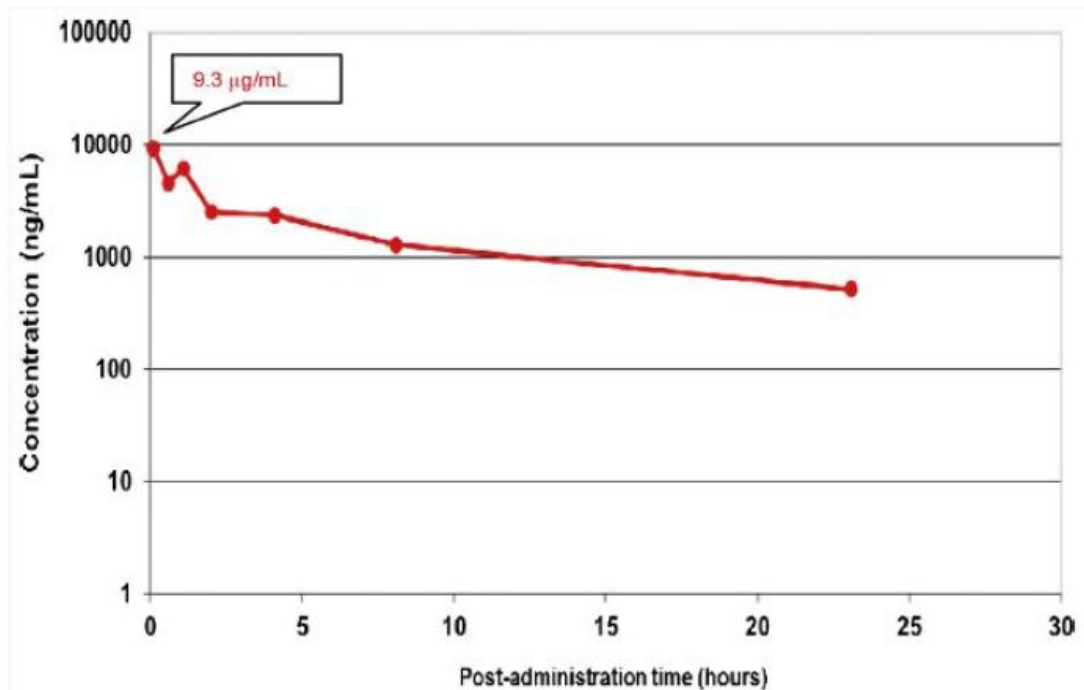


Figure 3. Profil d'élimination plasmatique d'acide tiludronique après l'administration intraveineuse d'une dose de 1,755 grammes (Wong et al., 2015).

3.2.1. Profils de concentration plasmatique de l'acide tiludronique

Les profils de concentration plasmatique en tiludronate ne reflètent pas leurs effets à long terme sur la résorption de l'os.

Ces profils ont été réalisés à l'aide d'un modèle pharmacocinétique-pharmacodynamique humain pour l'ibandronate.

Dans ces conditions, l'acide tiludronique a un comportement pharmacocinétique linéaire jusqu'à 3 mg/Kg mais à ce dosage, cela n'induit pas une saturation de l'os.

Toutefois, la diminution des concentrations est variable entre individus, plus que le temps. La variation de la concentration plasmatique est due à une longue persistance osseuse, identique

à ce qu'on observe chez l'homme car les bisphosphonates peuvent être séquestrés dans de l'os nouvellement formé et rester stockés pendant des années (Delguste *et al.*, 2011).

Lors de l'administration intraveineuse en bolus à la dose de 0.1 mg/Kg d'acide tiludronique une fois par jour pendant dix jours (figure 4 et 5) et une CRI (a constant rate infusion) de 1 mg/Kg (figure 6), l'exposition plasmatique et les effets pharmacologiques sont similaires. Cette réponse suggère que l'administration de dix doses peut être pratiquement remplacée par la CRI (Delguste *et al.*, 2017).

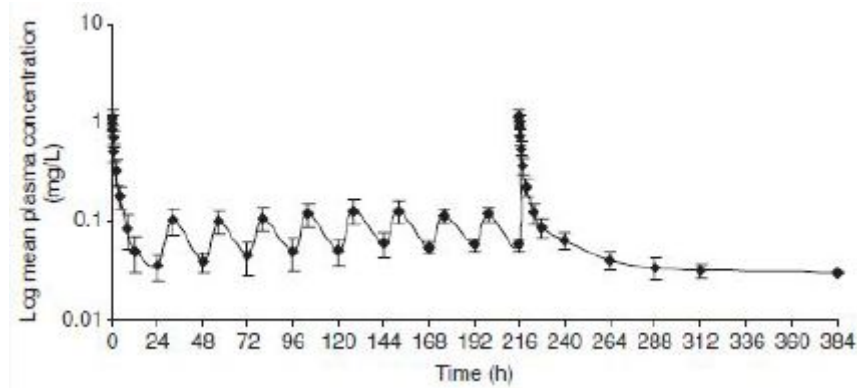


Figure 4. Graphique logarithmique de la concentration plasmatique moyenne en acide tiludronique en fonction du temps chez des chevaux de race standard après une administration intraveineuse pendant dix jours consécutifs de 0,1 mg/Kg d'acide tiludronique (Delguste *et al.*, 2007).

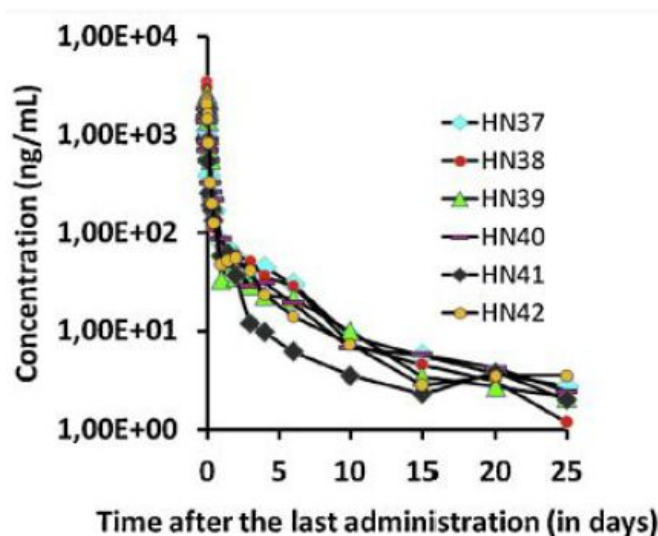


Figure 5. Graphique montrant les concentrations en acide tiludronique plasmatique suite à une administration intraveineuse pendant dix jours consécutifs de 0,1 mg/Kg d'acide tiludronique (Hunter *et al.*, 2015).

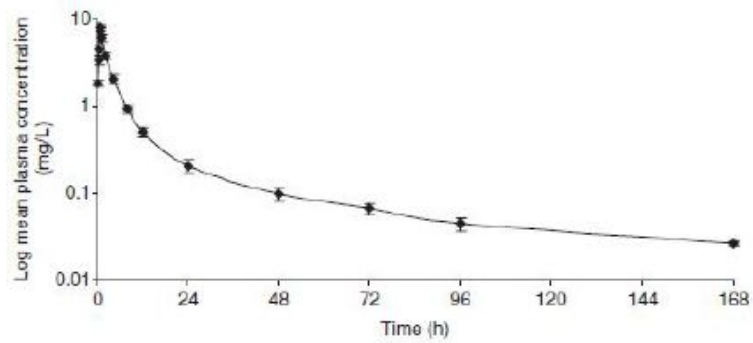


Figure 6. Graphique logarithmique de la concentration plasmatique moyenne en acide tiludronique en fonction du temps chez des chevaux de race standard après une administration intraveineuse en “constant rate infusion” à la dose de 1 mg/Kg (Delguste et al., 2007).

Après une injection intra articulaire, le tiludronate est détectable dans toutes les articulations traitées pendant plusieurs jours voire mois pour la haute dose et uniquement pendant vingt quatre heures pour les petites doses (Tableau II) (Hunter et al., 2015).

Tableau II. Concentrations d'acide tiludronique mesurées dans le liquide synovial avant et après une infusion locorégionale avec une solution saline (contrôle) ou de l'acide tiludronique (Hunter et al., 2015).

Metacarpophalangeal joint			
	Baseline	30–35 min	24 h
LDC	0.0	0.0*	0.0
LDT	0.0	39.6 [0.0–101.8]	0.0
HDC	0.0	24.6 [0.0–67.3]	0.0*
HDT	0.0	3,745.1 [763.2–10,850.0]	70.8 [48.4–92.7]

Distal interphalangeal joint			
	Baseline	30–35 min	24 h
LDC	0.0	0.0*	0.0
LDT	0.0	118.1 [26.6–449.6]	0.0
HDC	0.0	76.6 [38.9–155.6]	0.0*
HDT	0.0	16,274.0 [4,390.0–33,700.0]	16.5 [0.0–30.6]

Navicular bursa		
	Baseline	35–45 min
LDC	0.0	0.0*
LDT	0.0	82.1 [0.0–195.8]
HDC	0.0	89.0 [12.6–182]
HDT	0.0	6,049.3 [211.0–11,187.0]

LDC : low dose control; LDT : low dose tiludronate; HDC high dose control; HDT : high dose tiludronate. * : concentration sous le niveau de limite de quantification (10 ng/mL). Concentration moyenne [la plus basse - la plus haute].

Les informations à soustraire de ce tableau sont que les concentrations en acide tiludronique sont plus élevées 30 à 45 minutes après l'infusion. Les concentrations moyennes sont plus faibles chez les chevaux ayant reçu la petite dose d'acide tiludronique par rapport à ceux avec la haute dose. Le tiludronate n'est mesurable après 24 heures que chez les chevaux ayant reçu la haute dose.

3.3. Pharmacodynamique

Pour commencer, les bisphosphonates permettent de réguler le métabolisme osseux tel que l'inhibition de la résorption osseuse mais en laissant l'activité ostéoblastique intacte (maintien de la minéralisation), ce qui pourrait potentiellement aider, lors de pathologies osseuses, à la restauration d'un équilibre entre la résorption et la formation. Ils permettent aussi d'augmenter la masse osseuse en favorisant la fixation osseuse de calcium ce qui permet d'augmenter la taille des cristaux d'hydroxyapatite formés ou en cours de formation (Denoix *et al.*, 2003 ; Poircuitte, 2004).

De plus, l'interleukine-6 est une cytokine aux multiples fonctions produite par différentes cellules. Elle stimule la résorption osseuse, induit la formation des ostéoclastes et inhibe la formation osseuse. Les prostaglandines (PGF2 alpha) sont aussi des agents de la résorption osseuse. Le tiludronate inhibe la synthèse d'interleukine-6 induite par les PGF2alpha (Poircuitte, 2004).

Notons que la persistance d'un stimulus mécanique empêche la normalisation du remodelage avec un traitement thérapeutique seul. Il convient donc de compléter cette thérapie avec une ferrure correctrice et une adaptation de la charge de travail afin d'avoir de meilleurs résultats.

Quant au remodelage, c'est un long processus, l'effet du traitement sur les changements de remodelage pourrait ne pas avoir lieu avant quelques semaines ou mois. Le bénéfice le plus significatif du traitement s'observe deux à six mois après injection (Denoix *et al.*, 2003).

Ensuite, lors de l'administration intraveineuse de bisphosphonates, il n'y a pas d'action sur les marqueurs biochimiques de la formation osseuse comme l'ostéocalcine et l'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline ainsi que sur le carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases (CTX MMP), un marqueur de résorption osseuse.

Cependant, le télopeptide C-terminal du collagène de type I (CTX-I) est un produit de dégradation du collagène de type I qui voit sa concentration sérique diminuer. Ce marqueur est considéré comme le marqueur le plus pertinent du renouvellement osseux chez l'homme dans le cadre de la surveillance de l'utilisation des bisphosphonates et a été utilisée avec

succès chez le cheval pour montrer l'efficacité anti-résorptive des bisphosphonates et des inhibiteurs de la cathepsine K.

Il convient de mentionner que le dosage de CTX-1 urinaire est moins sensible que le plasmatique.

Il a été observé dans différentes études, des réductions significatives de CTX-I ont été démontrées après l'administration de tiludronate à 1 mg/Kg (Tableau III) ou 0,1 mg/Kg une fois par jour pour 10 jours en intraveineux. Ensuite, l'administration du tiludronate à 1 mg/Kg en intraveineux au jour 1 et ensuite au 28ème jours, démontre une réduction similaire de CTX-I après la deuxième dose, tant en ampleur qu'en durée (Mitchell *et al.*, 2019 ; Varela *et al.*, 2002).

Tableau III. Variation des marqueurs biochimiques osseux au cours du temps suite à l'injection intraveineuse sur 30 min à la dose de 1 mg/Kg (Varela *et al.*, 2002).

	Avant	+ 24h	% de variation	<i>p</i>
	m ± ET	m ± ET	m ± ET	
OC	6,4 ± 2,07	5,1 ± 1,62	-15,7 ± 26,92	0,125
bone-ALP	41,9 ± 2,7	46,5 ± 8,67	11,4 ± 22,74	0,156
CTX-MMP	7 ± 2,05	6,9 ± 1,33	2,7 ± 26,21	0,5
CTX-I	0,15 ± 0,102	0,048 ± 0,047	-72,4 ± 18,43*	0,0313*

Légende : *m* : moyenne (ng/mL), *ET* : écart-type (*n*=5), % de variation : pourcentage de variation 24 heures après le traitement par rapport aux valeurs de base mesurées au J1, *p* : significativité des résultats, * : diminution significative de la concentration en CTX-I 24 heures après le traitement, OC : ostéocalcine, bone-ALP : isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline, CTX MMP : Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases, CTX-I : télopeptide C-terminal du collagène de type I.

Toutefois, pour le clodronate, aucun rapport n'a été publié sur les effets anti-résorption chez le cheval. Il y a une absence de changement dans la concentration en CTX-I, ce qui pourrait être dû au fait que la dose approuvée pour le traitement de la boiterie est inférieure au seuil thérapeutique. Cela semble probable car la dose de clodronate intramusculaire chez les

patients humains pour l'inhibition des ostéoclastes est environ le double de la dose équine en mg/Kg, et est répétée quotidiennement pendant dix jours, puis pendant six jours tous les trois mois, alors que les chevaux reçoivent une dose unique.

Au niveau du recrutement des ostéoblastes dans les cellules traitées à la fois *in vivo* puis *in vitro* avec du clodronate, il n'y a aucune différence significative. Cela est probablement dû à la stimulation directe de l'ostéoblastogenèse par le clodronate. On a des effets similaires sur l'ostéoclastogenèse et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses qui étaient attendus mais ils ne se sont pas produits à la dose que nous avons utilisée. Cela suggère qu'il y ait soit une sensibilité spécifique à l'espèce soit à la dose chez le cheval (Mitchell *et al.*, 2019).

En addition, des mécanismes d'action des bisphosphonates pour l'analgésie ont été suggérés mais aucun consensus n'a été obtenu. La diminution de la sensation de douleur pourrait être due à l'inhibition des ostéoclastes ou à un effet totalement indépendant de ces derniers comme l'inhibition *in vitro* de la libération de cytokines et d'oxyde nitreux par les macrophages activés par les non aminobisphosphonates. Ils ont donc une activité potentielle anti-inflammatoire *in vivo*. Le clodronate a un effet analgésique en agissant sur le glutamate ou l'adénosine triphosphate, voies de transmission de la douleur. Le tiludronate par contre n'a pas encore montré ses effets analgésiques.

De plus, il se peut que la dose thérapeutique nécessaire pour l'analgésie soit différente de celle de l'inhibition des ostéoclastes (Mitchell *et al.*, 2019 ; Richbourg *et al.*, 2018).

Les aminobisphosphonates seraient eux capables d'augmenter la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés *in vitro* et d'induire une réaction inflammatoire aiguë lors de la première administration *in vivo* (Delguste *et al.*, 2007).

L'interleukine-6 a un rôle pro-inflammatoire dans le développement de l'arthrose via la modulation de l'expression de métalloprotéases matricielles (MMP). Les MMP sont associées à des dommages au cartilage : MMP-1 dégrade le collagène, MMP-3, les protéoglycanes, et MMP-13 dégrade les deux.

L'interleukine-8, quant à elle, est une chimiokine puissante attractrice de neutrophiles. Elle joue un rôle important dans les inflammations aiguës des articulations. Le tiludronate à la concentration de 1900 mg/L dans les articulations peut provoquer une réaction inflammatoire aiguë dans les chondrocytes ce qui a entraîné une régulation positive dans l'expression de l'interleukine-8 (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2012).

Les non azotés sont plus efficaces pour la réduction de la douleur par rapport aux azotés qui sont des anti-résorptifs plus puissants (Mitchell *et al.*, 2019).

L'os est la cible des bisphosphonates mais ils exercent aussi un effet direct sur les chondrocytes et les cellules cartilagineuses, surtout après l'utilisation d'une autre voie d'administration comme l'injection intra-articulaire qui résulte en une concentration plus grande en médication dans le liquide synovial.

On observe certains effets chondroprotecteurs avec de petites doses de tiludronate, tandis que des concentrations élevées (= ou >19 000 ng/mL) nuisent plutôt aux cartilages articulaires équin. Ces nuisances sont : une augmentation de l'apoptose des chondrocytes et de la libération de GAGS des explants de cartilage.

L'augmentation de la concentration en GAGS peut résulter d'une augmentation de leur dégradation (le plus fréquemment) ou l'augmentation du *turn over* qui serait associée à une augmentation de leur synthèse. Notons que ce phénomène peut aussi être dû aux arthrocentèses répétées.

Lors d'injections dans l'articulation, on peut aussi observer une augmentation de la concentration en solides totaux dans le fluide synovial et de la chondroïtine sulfate ainsi qu'une diminution temporaire de la concentration en collagène de type 2.

L'analyse histologique du cartilage articulaire et des membranes synoviales ne montre aucune différence entre les contrôles et les traités avec une haute dose. L'absence de différence entre les groupes rend la signification clinique de ces changements questionnable car aucun dommage articulaire n'a été produit lors de cette étude.

Par contre aux doses recommandées, l'acide tiludronique diminue la résorption osseuse sans influencer négativement la formation osseuse normale (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2014).

Ensuite, l'effet protecteur des bisphosphonates sur le cartilage articulaire peut être un effet supplémentaire de l'inhibition de l'activité des ostéoclastes dans l'os sous-chondral. Cette inhibition des ostéoclastes permet de créer un milieu adapté pour le cartilage (inhibition de l'activité des protéases qui dégradent les protéoglycanes ou inhibition de leur sécrétion) et empêche sa dégradation.

Le traitement aux bisphosphonates a également été associé à la régulation négative de l'expression des gènes pour les enzymes protéolytiques.

De faibles concentrations de tiludronate semblaient avoir un effet anti-apoptotique pour les chondrocytes, ce qui peut sembler contre-intuitif étant donné que les non aminobisphosphonates induisent l'apoptose des ostéoclastes par la perturbation des processus dépendants de l'adénosine triphosphate.

Cependant, d'autres études indiquent que l'administration de bisphosphonates diminue l'apoptose dans les ostéocytes et ostéoblastes.

Les effets pro- et anti-apoptotiques des bisphosphonates dépendent de la concentration et du type de cellules évaluées. Les ostéoclastes endocytant les bisphosphonates voient une augmentation de la concentration de bisphosphonates intracellulaires suffisantes pour provoquer l'apoptose. À l'inverse, on ne retrouve pas d'apoptose des ostéocytes, ostéoblastes et chondrocytes épiphysaires hypertrophiques qui n'intériorisent pas les bisphosphonates. Par conséquent, ce sont des mécanismes totalement différents qui provoquent ou empêchent l'apoptose.

Une autre explication est que les bisphosphonates se lient à la connexine située dans les membranes cellulaires des ostéocytes et des ostéoblastes et activent une voie de signalisation pro-survie. Les membranes cellulaires des chondrocytes articulaires contiennent également cette connexine.

L'incubation avec l'interleukine-1 β augmente l'expression de cette connexine dans les chondrocytes articulaires *in vitro* (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2012).

4. Voies d'administration, posologie et présentation des non-aminobisphosphonates

Il existe plusieurs voies d'administration, posologies et schémas thérapeutiques. Voici, les principales qui ont été étudiées pour l'acide clodronique et tiludronique.

D'une part, l'acide clodronique est administré une fois par jour par voie intramusculaire à la dose de 3 mL/100 Kg avec un maximum de 15 mL par cheval, en plusieurs sites d'injection. Il est contre-indiqué d'utiliser des aminoglycosides ou des tétracyclines dans les trois jours post-injection. Ce principe actif a montré un effet positif dans les deux mois chez 75% des chevaux traités pour un syndrome naviculaire (Dechra, 2015).

D'autre part, le tiludronate disodium est quant à lui présenté sous forme de poudre lyophilisée pour injection :

4.1.

Une dose de 1mg/Kg peut être administrée en intraveineux sur nonante minutes. Cette dose a été choisie sur base de l'extrapolation de la dose qui a produit au moins 75% de l'inhibition de résorption osseuse chez le rat. Pour ce qui concerne le cheval, la concentration osseuse obtenue est située dans un range de concentration connue pour inhiber la résorption osseuse *in vivo* chez la souris (Freedom of information summary, 2014).

4.2.

La dose utilisée au point précédent peut aussi s'administrer en trente minutes ou en deux injections à vingt huit jours d'intervalle en infusion lente. La seconde injection permet un maintien d'une concentration suffisante sur une durée minimale de cinq mois en comparaison de l'injection unique (Delguste *et al.*, 2011)..

4.3.

Lors de l'administration intraveineuse en bolus à la dose de 0.1 mg/Kg une fois par jour pendant dix jours ou d'une CRI (a constant rate infusion) de 1 mg/Kg, aucune différence n'est observée dans les effets indésirables entre les deux schémas posologiques. Par contre, il ne faut jamais administrer plus de 1 mg/Kg par perfusion car il y aura une augmentation de la fréquence d'apparition des effets secondaires et des risques liés au manque de respect des précautions d'utilisation, il vaut donc mieux répéter l'administration que d'augmenter la dose (Delguste, 2007).

4.4.

La comparaison d'une dose totale de 0,5 mg/Kg administrée pendant cinq jours et de 1 mg/Kg administrée pendant dix jours soit 0,1 mg/Kg/jour dans la jugulaire pour le traitement de la maladie naviculaire montre que la plus haute dose permet une amélioration de la boiterie et un retour à un niveau d'exercice identique au niveau initial quelques mois après le traitement (Denoix *et al.*, 2003).

4.5.

L'administration de 1 mg/Kg de tiludronate en intraveineux dans la jugulaire ou de 0,1 mg/Kg dans la veine digitale latérale de chaque membre antérieur chez des chevaux souffrant du syndrome naviculaire permet d'observer une augmentation de la force de réaction appliquée par chaque membre antérieur mais aucune différence significative n'a été observée pour l'infusion loco-régionale. L'infusion loco-régionale est communément utilisée afin d'obtenir une concentration en médicaments plus grande localement. En diminuant la distribution, on diminue l'apparition d'effets secondaires potentiels. Cependant, aucune étude pharmacocinétique n'existe pour cette technique (Delguste *et al.*, 2007 ; Whitfield *et al.*, 2016).

4.6.

Une injection dans l'articulation intercarpienne est réalisée soit avec une petite dose (0,017 mg) de tiludronate, soit avec une haute dose (50 mg). La haute dose produit des concentrations dans le liquide synovial de 2 677 500 ng/mL. Cette valeur dépasse les concentrations qui sont sans danger pour le cartilage *in vitro*. La petite dose quant à elle produit une concentration dans le liquide synovial de 1353 ng/mL, ce qui est une concentration considérée comme sûre et bénéfique pour le cartilage articulaire *in vitro* mais ces concentrations restent à ce taux uniquement pendant 24-48h ce qui n'est pas assez pour fournir un effet bénéfique assez longtemps (figure 7). Cette dose pourrait être suffisante pour affecter le remodelage de l'os sous chondral si le tiludronate diffuse à travers les membranes hyalines et le cartilage calcifié jusqu'à l'os sous chondral bien qu'on ne sache pas si la diffusion a lieu ou pas (Duesterdieck-Zellmer, 2014).

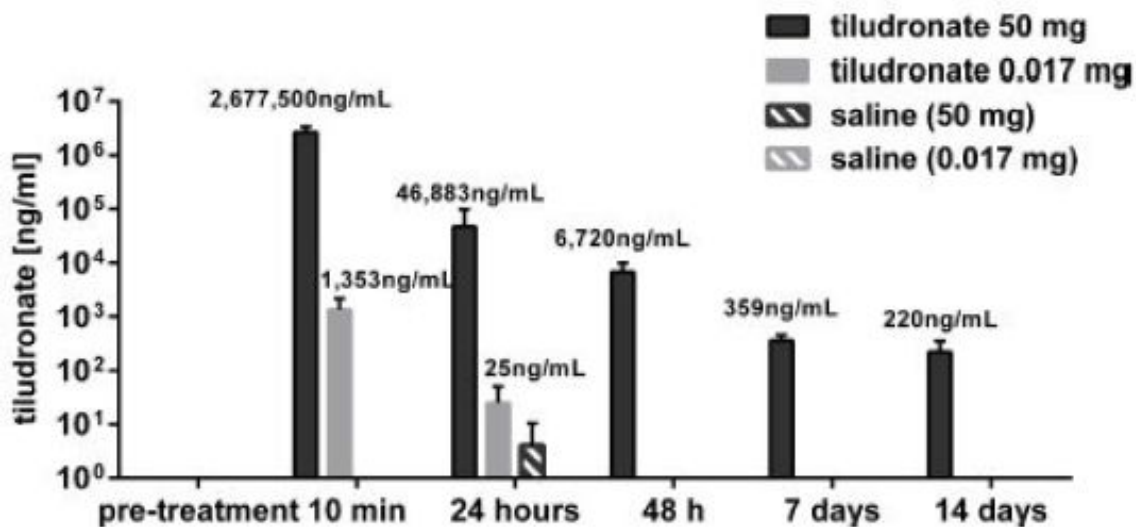


Figure 7. Graphique à bâtonnet semi logarithmique de la concentration moyenne en acide tiludronique dans le liquide synovial. On a performé une injection d'acide tiludronique dans l'articulation intercarpienne chez quatre chevaux ainsi qu'une injection au niveau de l'articulation controlatérale avec une solution saline pour que ça soit une articulation contrôle. La concentration en acide tiludronique est mesurée à l'aide de la chromatographie liquide haute performance suivi par de la spectrométrie de masse. L'intervalle de confiance est de 95% (Dueterdieck-Zellmer, 2014).

5. Utilisation clinique des (non)-aminobisphosphonates

Les pathologies affectant le système locomoteur (particulièrement les pathologies ostéo-articulaires) du cheval ont de nombreuses répercussions notamment économiques à la suite des pertes de performances, écarts temporaires des terrains de concours, mise prématurée à la retraite,...

Dans cette perspective, les bisphosphonates sont utiles pour le traitement de pathologie où le remaniement osseux est en cause tel que le syndrome naviculaire, l'éparvin, les fractures de stress/fatigue, ostéopénie de non-usage, les kystes sous-chondraux, les sésamoïdites, les affections osseuses de type ostéolytique ou lors de métastases osseuses, pour le traitement des chevaux ayant des signes de douleurs associés à des lésions de la colonne thoraco-lombaire.

En particulier, l'étidronate est utilisé plus particulièrement pour des calcifications ectopiques et le pamidronate pour le traitement d'exostoses induites expérimentalement afin de diminuer leur croissance et diminution de la minéralisation de la matrice ostéoïde (Varela *et al.*, 2002).

En médecine humaine, les bisphosphonates sont utilisés pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopause, le cancer de la prostate et les métastases pulmonaires, la maladie de Paget, les tumeurs osseuses, le myélome multiple, l'hypercalcémie maligne, défaut d'ostéogenèse, de l'arthrose et enfin de la spondylarthrite ankylosante avec une très bonne efficacité (Mitchell *et al.*, 2019 ; Delguste *et al.*, 2007).

6. Effets secondaires des non-aminobisphosphonates

- Une légère tachycardie est observée avant le traitement et peut être causée par les manipulations du cheval (mise dans le travail, pose du cathéter,...) ainsi qu'après le traitement. Cela ne peut être mis en relation avec l'hypocalcémie modérée et transitoire qui est observée car le calcium ionisé ne voit pas sa concentration modifiée et n'a donc pas d'effet sur la contractilité du myocarde.
- La forte inhibition de la résorption osseuse entraîne un blocage de la réserve calcique. Il y a une diminution uniquement du calcium total (figure 8). Cette diminution pourrait être due à la libération du calcium lié aux protéines plasmatiques à cause de la forte affinité de l'acide tiludronique pour ces protéines (90% de l'acide tiludronique est lié *in vitro* aux protéines plasmatiques). L'acide tiludronique, lorsqu'il est injecté rapidement, peut aussi former avec des ions divalents comme le calcium, un complexe pouvant expliquer cette hypocalcémie et pouvant aussi induire une insuffisance rénale (Varela *et al.*, 2002).

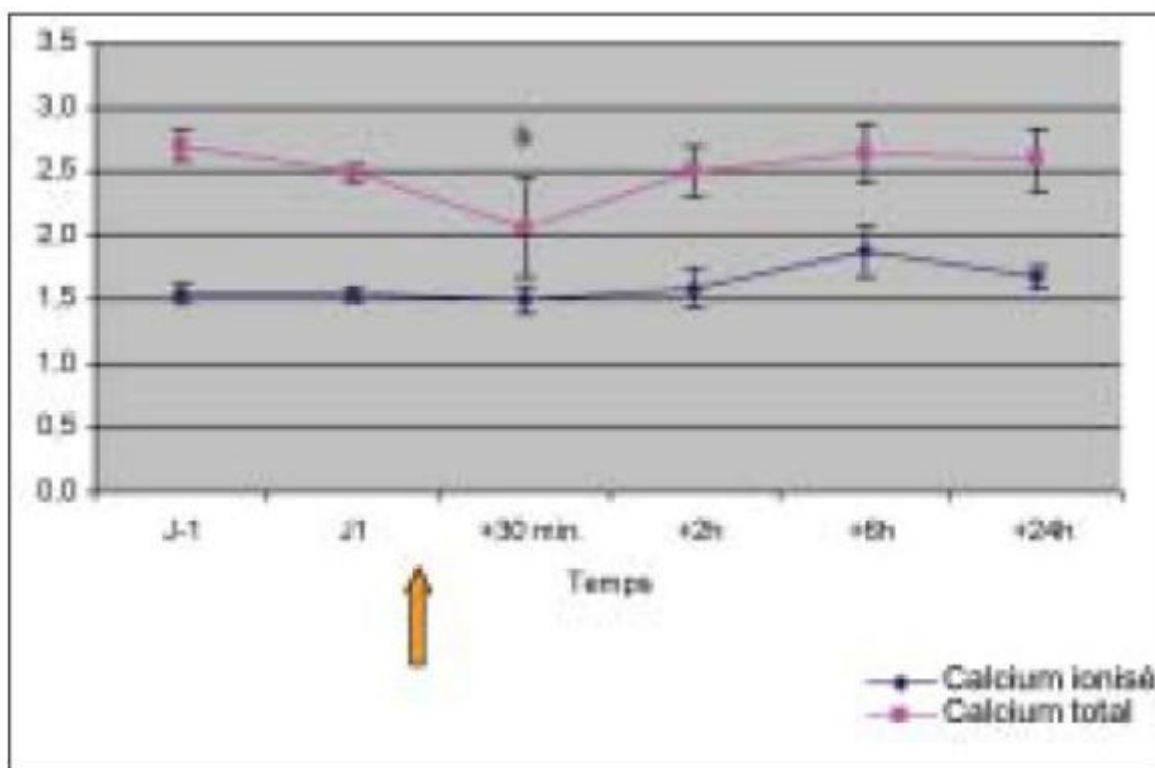


Figure 8. Evaluation des concentrations plasmatiques moyennes du calcium total et ionisé en mmol/L au cours du temps après une injection intraveineuse d'acide tiludronique à la dose de 1 mg/Kg (flèche orange) (Varela et al., 2002).

* : différence significative entre la concentration du calcium total à plus trente minutes par rapport à la valeur de base (Jour 1 avant traitement).

- Des signes de colique peuvent être observés durant l'infusion ou en post-infusion. Lors de l'administration sur trente minutes, 58% des chevaux montrent des signes de coliques, 28% sur soixante minutes. Il y a une association significative entre le temps d'infusion et l'incidence de coliques mais pas de différence pour la durée des signes cliniques en fonction de la durée de la perfusion. Les signes de coliques sont auto-limitants ou peuvent être minimisés en utilisant des infusions lentes. Le dosage peut quant à lui être associé à plus de signes de colique.
- Il y a aussi une petite incidence d'hématomes ou gonflements au niveau du site d'injection, des fasciculations musculaires, de la polyurie/polydypsie, de la fièvre, des ulcères gastriques voire la mort.

- Il n'y a pas de preuve claire de toxicité rénale induite par l'acide tiludronique. Le traitement concomitant avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens pourrait affecter négativement la fonction rénale et ainsi précipiter une insuffisance rénale aiguë.
- L'administration intraveineuse de Tildren® à la dose de 1 mg/Kg n'induit pas d'épisode d'hyperkaliémie périodique paralysante (HYPP) chez les chevaux hétérozygotes. Une deuxième dose peut par contre augmenter le risque ou la sévérité des signes cliniques (parfois la mort) chez le cheval avec le gène HYPP. Une attention particulière doit donc être portée aux chevaux souffrant de troubles minéraux et/ou électrolytiques (Freedom of information summary, 2014).
- Selon des résultats *in vitro*, l'utilisation de l'acide tiludronique via une perfusion régionale du membre ou injection intra-articulaire, spécialement avec des hautes doses, peut résulter en des effets délétères pour le cartilage. Des concentrations de tiludronate dans le liquide synovial $\geq 19\ 000$ ng / mL peuvent être dangereuses pour un cartilage articulaire sain et des concentrations $\geq 1\ 900\ 000$ ng / mL peuvent l'être pour le cartilage arthrosique. Cependant, beaucoup de vétérinaires ont utilisé ces voies d'administration sans preuve scientifique et ils ne rapportent aucun effet secondaire si ce n'est une effusion des articulations intercarpiennes qui est d'autant plus marquée que la dose de Tildren® est grande (Tableau IV) (Dueterdieck-Zellmer *et al.*, 2015).

Tableau IV. Quantification des chevaux présentant une effusion de l'articulation intercarpienne avant et après une injection intra-articulaire avec une solution saline, une faible dose et haute dose d'acide tiludronique (Dueterdieck-Zellmer *et al.*, 2015).

Day of study	LDT control joints <i>n</i> = 4		LDT treated joints <i>n</i> = 4		HDT control joints <i>n</i> = 4		HDT treated joints <i>n</i> = 4	
	Mild	Moderate	Mild	Moderate	Mild	Moderate	Mild	Moderate
0 ^a	0	0	0	0	0	0	0	0
1 ^b	3	0	3	0	0	0	1	1
2 ^b	2	2	2	2	4	0	4	0
3	1	0	2	0	2	0	4	0
4	0	0	0	0	2	0	2	0
5	0	0	0	0	2	0	2	0
6	1	0	0	0	0	0	1	0
7 ^b	1	0	0	0	0	0	0	0
8	4	0	2	0	2	0	4	0
9	2	0	1	0	0	0	1	0
10	0	0	0	0	0	0	1	0
11	1	0	0	0	0	0	0	0
12	1	0	1	0	0	0	0	0
13	1	0	0	0	0	0	0	0
14 ^d	1	0	0	0	0	0	0	0

LDT : low dose tiludronate ; HDT : high dose tiludronate

a : L'observation est faite avant toutes injections intra-articulaires ou arthrocentèse

b : Jour où on a fait une arthrocentèse répétée mais l'observation est faite avant toutes injections intra-articulaires ou arthrocentèse.

- Les ostéoclastes sont des composants nécessaires pour une ossification endochondrale efficace pendant la réparation de fracture chez la souris. A long terme, une thérapie aux bisphosphonates sur une durée de 5 ans ou plus peut compromettre le remodelage osseux physiologique à un tel point qu'une diminution de la cicatrisation osseuse endogène peut se produire (Richbourg *et al.*, 2018 ; Mitchell *et al.*, 2019).

En définitive, il n'est pas conseillé d'utiliser les non-aminobisphosphonates chez des chevaux de moins de quatre ans, des juments gestantes ou allaitantes mais encore des chevaux producteurs de denrées alimentaires car on ne dispose pas de preuve d'utilisation sécuritaire (Freedom of information summary, 2014 ; CEVA Santé Animale, 2014).

7. Efficacité des non-aminobisphosphonates

L'efficacité est difficile à objectiver chez le cheval car on n'a pas de modèle expérimental permettant la standardisation pour le syndrome podotrochléaire et l'éparvin.

Par ailleurs, l'évaluation clinique a une sensibilité limitée (radiographie, examen de boiterie) et les résultats sont subjectifs. La radiographie ne permet pas de suivre l'évolution de la pathologie au cours du temps. De plus, il faut des changements de densité minérale de 20 à 30% afin de détecter toutes anomalies. Quant à la scintigraphie, elle est utile pour détecter les changements de remodelage plus tôt dans l'évolution d'une pathologie mais aussi pour les changements du taux de remodelage. Cela dit, aucune étude ne permet de dire si cette technique d'imagerie est assez sensible pour juger de l'efficacité du traitement au tiludronate.

Ensuite, afin de procéder à un scanner ou une imagerie par résonance magnétique, une sédation du cheval est nécessaire. Or, le caractère peu ou pas invasif des techniques de suivi de l'efficacité d'un traitement constitue un prérequis indispensable à leur application en routine sur les chevaux de sport. Souvent, l'euthanasie ou des biopsies osseuses invasives

sont nécessaires pour analyser quantitativement les caractéristiques de l'os par histologie ou par des tests biomécaniques (Delguste *et al.*, 2007).

Au plus les signes cliniques sont récents dans l'évolution de la maladie, au plus l'efficacité du traitement est grande. Le pamidronate n'est pas efficace s'il est administré trois mois après le début de la maladie même s'il est accompagné d'une ferrure orthopédique. Pour les maladies chroniques, un traitement répété avec de l'acide tiludronique produit une amélioration significative des signes cliniques car l'effet du tiludronate est dose dépendante (Denoix *et al.*, 2003).

En ce qui concerne l'efficacité de l'acide tiludronique, elle a été prouvée dans un modèle d'ostéopénie induite par l'immobilisation car il réduit significativement la résorption osseuse et prévient la chute significative de la densité minérale osseuse et en cas de dorsalgie associée à des lésions ostéo-articulaires vertébrales, on observe une amélioration significative de la flexibilité du dos et du score de réduction de boiterie chez les chevaux traités. Il y a une amélioration clinique chez 80% des chevaux (Delguste *et al.*, 2007 ; Coudry *et al.*, 2007).

Le traitement de 1 mg/Kg en une infusion simple sur trente/soixante minutes en intraveineux est efficace pour le contrôle des signes cliniques associés à l'éparvin et/ou au syndrome naviculaire chez le cheval en association avec un programme d'exercice contrôlé et/ou une ferrure corrective. Que ce soit trente, soixante, nonante ou cent vingt minutes d'infusion, il n'y a pas de changement d'efficacité du Tildren® même si la concentration maximale est plus basse avec les infusions plus longues (Coudry *et al.*, 2007 ; Freedom of information summary, 2014).

Finalement, le tiludronate et le clodronate n'ont pas d'impact considérable sur la cinétique et le remodelage osseux normal évalué par la microtomographie aux rayons X ou l'histomorphométrie dynamique, la morphologie et sur les cellules osseuses chez les jeunes chevaux soixante jours post-traitement car les marqueurs du *turn over* sont identiques mais on observe toutefois une diminution de la boiterie (figure 9). L'efficacité n'est pas directement liée à l'activité de l'inhibition des ostéoclastes. Le clodronate diminue significativement la boiterie des membres antérieurs et donc il améliore les performances (Mitchell *et al.*, 2019 ; Ironside *et al.*, 2010).

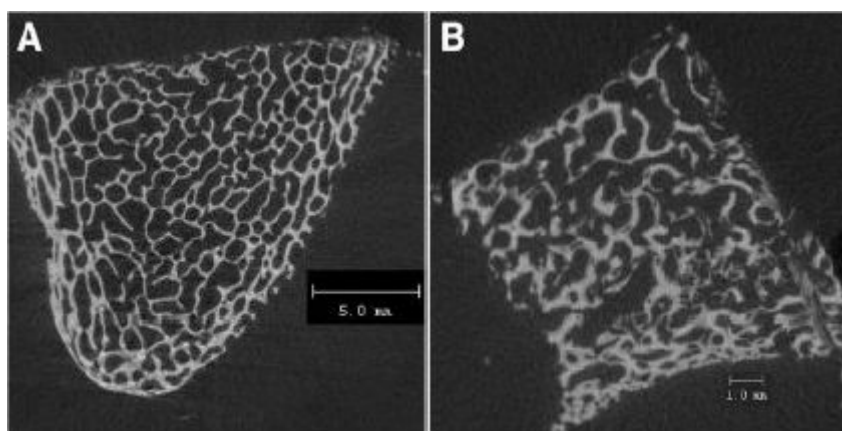


Figure 9. Échantillon de biopsie osseuse du tuber coxae (A) et re-biopsie (B) analysé par microCT. L'image B montre qu'il y a une modification de la structure trabéculaire évidente, ce qui signifie qu'il y a un remodelage osseux actif suivant la première biopsie (Richbourg *et al.*, 2018).

En définitive, le tiludronate est une option thérapeutique prometteuse pour prolonger l'espérance de vie ou la carrière athlétique des chevaux affectés (Whitfield *et al.*, 2016).

8. Technique de mesure des (non)-aminobisphosphonates et efficacité de ces techniques

Il est d'une grande nécessité pour les sports équestres de trouver une méthode efficace pour la détection de l'utilisation des bisphosphonates afin de réguler leurs usages.

Cependant, ce sont des médicaments difficiles à détecter à cause de leurs propriétés hydrophiles. C'est à cause de ces propriétés que les bisphosphonates sont difficilement extraits des matrices biologiques.

Il est possible d'isoler les bisphosphonates des matrices osseuses par extraction en phase solide. Après une étape de méthylation au moyen de triméthylsilyldiazométhane, les bisphosphonates sont analysés par chromatographie liquide en association avec la spectrométrie de masse. A cause de la robustesse de l'acide tiludronique, la chromatographie en phase inversée a un certain potentiel.

De plus, la méthylation est une technique fiable pour réduire la polarité des bisphosphonates qui rend si complexes l'analyse de ces molécules. Un fois moins polaires, ils sont plus facilement analysables par la méthode de chromatographie classique. Les bisphosphonates

sont détectables dans 0,5 mL d'urine ou de plasma, à des niveau de l'ordre du ng/mL (Wong *et al.*, 2015).

Jusqu'à présent, les concentrations en acide tiludronique sont mesurées *ex vivo* afin de créer un modèle pharmacocinétique et ce pour cause d'un échantillonnage qui est trop invasif, non répétable dans le temps et dès lors, on est dans l'impossibilité de suivre la pharmacocinétique dans les tissus de ces molécules.

Récemment, une technique minimalement invasive de biopsie osseuse a été réalisée au niveau de quatre sites de prélèvements :

- Le métacarpien principal : la biopsie est difficile car l'os cortical est très dur. Ensuite, le dosage du tiludronate est techniquement difficile et les résultats sont peu fiables.
- La biopsie de la treizième côte est de petite taille car c'est un os de faible épaisseur et qui demande beaucoup de dissection mais c'est quand même réalisable *in vivo*, et on y retrouve une concentration intermédiaire en tiludronate.
- La tubérosité coccygienne fournit un accès facile pour l'échantillonnage car il est composé d'un os trabéculaire couvert par une fine couche d'os cortical. Une concentration en tiludronate plus importante est obtenue chez tous les chevaux au niveau de la biopsie de la tubérosité coccygienne.
- L'os cuboïde nécessite quant à lui une dissection qui n'est pas faisable *in vivo* et une concentration très basse en tiludronate.

Dans ces conditions, la concentration osseuse est un meilleur prédicteur des effets cliniques que la concentration plasmatique. Cette technique est fiable et permet une collecte des points de pharmacodynamique plus facilement afin de les utiliser pour réaliser un modèle pharmacocinétique/pharmacodynamique chez le cheval. Elle aiderait à déterminer le dosage optimal de l'acide tiludronique pour le traitement des affections osseuses (Delguste *et al.*, 2011).

Il convient de rappeler que la concentration osseuse n'est pas homogène entre et dans les os ce qui rend l'effet pharmacologique comme dépendant du site car il dépend à la fois de la concentration locale du médicament et de l'activité de résorption. Le montant total de tiludronate stocké dans les os peut néanmoins refléter l'effet total (Delguste *et al.*, 2007).

Enfin, une autre technique largement utilisée mais avec une procédure d'extraction fastidieuse est de répéter des co-précipitations de bisphosphonates avec des sels calciques sous condition alcaline suivi par un lavage ou dérivatisation afin d'isoler les bisphosphonates de la matrice humaine (Wong *et al.*, 2015).

9. Dopage : seuil de tolérance et délai avant compétition

Selon la Fédération Equestre Internationale (FEI), le Tildren® et l'Osphos® sont inscrits sur la liste des substances prohibées et des médicaments contrôlés de la FEI. L'utilisation chez le cheval de sport est autorisée mais ils doivent être administrés vingt huit jours au minimum avant la compétition. Les aminobisphosphonates sont quant à eux interdits, leur utilisation n'est jamais autorisée (Laboratoire Audevard).

Ces substances sont dosées dans le plasma. C'est lors d'une course d'endurance qu'Araco's Roman a été testé positivement à l'acide tiludronique (Fédération équestre internationale, 2017).

Selon l'European Horserace Scientific Liaison Committee (EHSLC), les bisphosphonates sont des substances prohibées dans les codes de course. Caballion, célèbre cheval de course a été déchu de sa victoire pour cause d'un test antidopage positif pour l'acide tiludronique (Delachaume, 2014).

Il est difficile de calculer une concentration plasmatique efficace compte tenu du mécanisme d'action de ces molécules. Selon l'étude menée par l'EHSLC, trente jours après la dernière administration, la concentration plasmatique est inférieure à la limite de screening fixée. Le nouveau temps de détection établi et approuvé est donc de trente jours (Association Vétérinaire Equine Française).

10. Législation concernant les non-aminobisphosphonates

“Selon le règlement 37/2010 de la commission du 22 décembre 2009, relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale”, on y retrouve dans la liste des substances pharmacologiquement actives autorisées, l'acide clodronique et tiludronique, 2 non-aminobisphosphonates, enregistrés pour leur utilisation chez le cheval. Aucune limite

maximale de résidus n'est requise ($\mu\text{g}/\text{Kg}$). Quant à l'acide clodronique, il ne peut être utilisé chez les animaux producteurs de lait destiné à la consommation humaine.

11. Perspectives avec les non-aminobisphosphonates

Afin d'acquérir plus d'informations sur l'efficacité de l'acide tiludronique sur des pathologies touchant le système arthro-squelettique chez le cheval en situation clinique et ce pour optimiser la posologie, des études multicentriques sont nécessaires (Delguste *et al.*, 2007).

Pour commencer, il faudrait porter une attention particulière à la mesure de la densité minérale osseuse ou une évaluation plus détaillée d'un représentant mieux adapté à la mesure de la masse osseuse comme l'imagerie par résonance magnétique, le scanner ou les marqueurs de renouvellement osseux sérique chez le cheval. En effet, les résultats positifs obtenus après un traitement aux bisphosphonates peuvent être dus à leur propriété analgésique et/ou anti-inflammatoire et non de leur efficacité à inhiber la résorption osseuse (Mitchell *et al.*, 2019).

Les quatre études qui suivent permettraient de développer un modèle pharmacocinétique / pharmacodynamique (Delguste, 2008).

- Envisager une étude de biopsie osseuse répétée sur du plus long terme après une infusion de 0,5, 1 et 2 mg/Kg en associant le dosage de tiludronate osseux, le CTX-1 sérique et les paramètres histomorphométriques.
- Réaliser une étude comparant divers schémas thérapeutiques avec 1 mg/Kg de tiludronate (une, deux ou trois perfusions) au niveau des concentrations osseuses et effets sur le CTX-1.
- Faire une étude de validation de la mesure de la densité minérale osseuse de l'os naviculaire et os du tarse chez des chevaux de petits gabarits.
- Mener une étude sur la réponse du CTX-1 au traitement versus placebo chez des chevaux présentant un syndrome naviculaire ou de l'éparvin,...

Ensuite, la signification clinique des changements observés après une injection intra-articulaire sur les composants du liquide synovial est questionnable car les chercheurs n'ont pas abouti à des dommages articulaires. D'autres études plus poussées sur la sécurité de

la haute dose intra-articulaire avec un plus grand nombre de chevaux est nécessaire ainsi qu'une investigation pour déterminer le contenu en acide tiludronique dans l'os sous-chondral pour confirmer la diffusion du Tildren® à travers les membranes hyalines et le cartilage calcifié jusqu'à l'os sous-chondral (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2014).

Comme l'os est la cible thérapeutique du tiludronate, des études évaluant la sécurité de l'injection loco-régionale de la veine digitale latérale avec différentes doses de tiludronate sont essentielles avant de déterminer la possibilité d'une efficacité thérapeutique et de créer des profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2015).

En ce qui concerne les effets à long terme des bisphosphonates sur la fonction rénale, ils sont inconnus et méritent d'être étudiés.

L'effet du Tildren® sur les chevaux homozygotes pour le gène de la paralysie périodique hyperkaliémique est inconnu et devrait être étudié (Freedom of information summary, 2014).

En raison de la longue demi-vie des bisphosphonates, l'effet dose multiple sur le remodelage et la boiterie doit être investigué. Il est possible que le clodronate ait un effet significatif sur le renouvellement osseux après un nouveau dosage en raison de sa longue demi-vie. Il faudrait donc voir l'impact sur la morphologie osseuse dans le temps du clodronate (Mitchell *et al.*, 2019).

12. Conclusions

Les bisphosphonates sont connus pour leur effet inhibiteur de la résorption osseuse tout en conservant la formation osseuse à son niveau physiologique. Ils sont très largement utilisés pour la prévention et le traitement de maladies ostéo-articulaires dans lesquelles l'équilibre entre résorption et formation est déstabilisé.

En ce qui concerne la pharmacocinétique et pharmacodynamique, de nombreuses données restent hélas toujours manquantes du fait de nombreuses variables difficiles à contrôler.

De plus, il manque encore quelques preuves qui pourraient confirmer le potentiel analgésique de cette thérapeutique. Il est déjà prouvé que les non-aminobisphosphonates sont plus efficaces pour diminuer la douleur et les aminobisphosphonates pour leurs effets anti-résorption plus puissants.

Selon Duesterdieck-Zellmer *et al.*, 2014, de petites doses de bisphosphonates intra-articulaire ont un effet chondroprotecteur tandis qu'une dose égale ou supérieure à 19 000 ng/mL nuisent aux cartilages articulaires. Cependant, les analyses histologiques du cartilage articulaire et les membranes synoviales traités avec une haute dose n'ont rien montré. On ne peut donc pas prouver l'effet néfaste de l'acide tiludronique.

En outre, il convient de relever que l'utilisation des bisphosphonates peut être accompagné d'effets secondaires tels qu'une hypocalcémie modérée et transitoire, des coliques, une toxicité rénale si utilisation conjointe avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens, une diminution de la cicatrisation osseuse suite à un traitement prolongé,...

L'efficacité de leur utilisation est difficile à objectiver car on ne possède pas de modèle expérimental permettant la standardisation. En plus, l'évaluation clinique a une sensibilité limitée et des résultats subjectifs. L'efficacité est cependant prouvée pour l'ostéopénie de non usage ainsi que pour les dorsalgies avec une amélioration clinique de 80%.

En ce qui concerne les sports équestres, il est d'une grande nécessité de trouver une méthode efficace pour la détection de l'utilisation des bisphosphonates afin de réguler leur usage. En effet, seul les non-aminobisphosphonates sont autorisés et leur utilisation doit au moins être

terminée vingt huit jours avant une compétition. La technique actuelle est une extraction en phase solide et méthylation avant l'analyse par chromatographie liquide en association avec des analyses de spectrométrie de masse. La méthode est efficace pour le screening et la confirmation de la présence de bisphosphonates dans les échantillons biologiques équins.

Pour terminer, il y a un certain intérêt à utiliser les bisphosphonates mais au vu des nombreux points d'ombre restants, des études multicentriques sont nécessaires afin d'obtenir plus d'informations sur leur efficacité, divers schémas thérapeutiques applicables sur le terrain ainsi que des études avec une plus grande cohorte de chevaux et sur une plus longue période de temps.

Quoi qu'il en soit, le tiludronate reste une option thérapeutique prometteuse pour prolonger l'espérance de vie ou la carrière sportive de chevaux affectés.

Références bibliographiques

Argüellesa, D., Saitua, A., Medina, A.S., Muñoz, J.A., Muñoz, A., 2019. Clinical efficacy of clodronic acid in horses diagnosed with navicular syndrome: A field study using objective and subjective lameness evaluation. *Res Vet Sci.* 125, 298-304.

Coudry, V., Thibaud, D., Riccio, B., Audigie, F., Didierlaurent, D., Denoix, J.M., 2007. Efficacy of tiludronate in the treatment of horses with signs of pain associated with osteoarthritic lesions of the thoracolumbar vertebral column. *Am. J. Vet. Res.* 68, 329-337.

Delguste, C., 2007. Contribution à l'étude pharmacologique et clinique du tiludronate chez le cheval. (Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences vétérinaires) Université de Liège : Liège, 95p.

Delguste, C., Amory, H., Guyonnet, J., Thibaud, D., Garnero, P., Detilleux, J., Lepage, O.M., Doucet, M., date. Comparative pharmacokinetics of two intravenous administration regimens of tiludronate in healthy adult horses and effects on the bone resorption marker CTX-1. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 31, 108-116.

Delguste, C., Doucet, M., Gabriel, A., Lepage, O.M., Thibaud, D., Amory, H., 2006. Assessment of a bone biopsy technique for tiludronic acid dosage in horses : a preliminary study. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29, suppl. 1, 299-300.

Delguste, C., Amory, H., Doucet, M., Piccot-Crézollet, C., Thibaud, D., Garnero, P., Detilleux, J., Lepage, O.M., 2007. Pharmacological effects of tiludronate in horses after long-term immobilization. *Elsevier.* 41, 414-421.

Delguste, C., Lepage, O.M., Amory, H., Doucet, M., 2007. Pharmacologie clinique des biphosphonates : revue de littérature axée sur le tiludronate chez le cheval. *Ann. Med. Vet.* 151, 269-280.

Denoix, J.M., Thibaud, D., Riccio, B., 2003. Tiludronate as a new therapeutic agent in the treatment of navicular disease : a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Equine Vet. J.* 35, 407-413.

Duesterdieck-Zellmer, K.F., Driscoll, N., Ott, J.F., 2012. Concentration-dependent effects of tiludronate on equine articular cartilage explants incubated with and without interleukin-1beta. *Am. J. Vet. Res.* 73 (10), 1530-1539

Duesterdieck-zellmer, K.F., Moneta, L., Ott, J.F., Larson, M.K., Gorman, E.M., Hunter, B., Lohr, C.V., Payton, M.E., Morre, J.T., Maier, C.S., 2014. Effects of low and high dose intraarticular tiludronate on synovial fluid and clinical variables in healthy horses-a preliminary investigation. *PeerJ* 2:e534

Freedom of information summary, original new animal drug application, NADA, 141-420, for Tildren. February 13, 2014.

Gough, M.R., Thibaud, D., Smith, R.K.W., 2010. Tiludronate infusion in the treatment of bone spavin: a double blind placebo-controlled trial. *Equine Vet. J.* 42(5), 381–387. doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00120.x.

Hunter, B.G., Duesterdieck-Zellmer, K.F., Larson, M.K., 2015. Tiludronate concentrations and cytologic findings in synovial fluid after intravenous regional limb perfusion with tiludronate in horses. *PeerJ* 3:e889 <https://doi.org/10.7717/peerj.889>

Ironside, M. S., Duer, M. J., Reid, D. G. & Byard, S., 2010. Bisphosphonate protonation states, conformations, and dynamics on bone mineral probed by solid-state NMR without isotope enrichment. *Eur J Pharm Biopharm* 76, 120–126

Mitchell, A., Watts, A., Ebetino, F.H., Suva, L.J., 2019. Bisphosphonate use in the horse : what is good and what is not ? *BMC Vet. Res.* 15,211.

Mitchell, A., Wright, G., Sampson, S. N., Martin, M., Cummings, K., Gaddy, D., and Watts, A. E., 2019. Clodronate improves lameness in horses without changing bone turnover markers. *Equine Vet. J.* 51, 356-363.

Poircuitte, G., 2004. Le tiludronate : mode d'action et utilisation thérapeutique dans l'espèce équine en pathologie locomotrice. (Thèse pour le doctorat vétérinaire) Ecole nationale vétérinaire d'Alfort : Paris, 79p.

Popot, M.A., Garcia, P., Hubert, C., Bolopion, A., Bailly-Chouriberry, L., Bonnaire, Y., Thibaud, D., Guyonnet, J., 2014. HPLC/ESI-MS(n) method for non-amino biphosphonates : application to the detection of tiludronate in equine plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 958, 108-116.

Popot, M.A., Jacobs, M., Garcia, P., Loup, B., Guyonnet, J., Toutain, P.L., Bailly-Chouriberry, L., Bonnaire, Y., 2018. Pharmacokinetics of tiludronate in horses : a field population study. *Equine Vet. J.* 50, 488-492.

Richbourg, H.A., Mitchell, C.F., Gillett, A.N., McNulty, M.A., 2018. Tiludronate and clodronate do not affect bone structure or remodeling kinetics over a 60 day randomized trial. *BMC Vet. Res.* 14, 105.

Varela, A., Lepage, O.M., Doucet, M., Marcoux, M., Garnero, P., 2002. Tiludronate chez le cheval : tolérance et effets à court terme sur le métabolisme osseux. *Ann. Med. Vet.* 147, 123-130.

Whitfield, C.T., Schoonover, M.J., Holbrook, T.C., Payton, M.E., Sippel, K.M., 2016. Quantitative assessment of two methods of tiludronate administration for the treatment of lameness caused by navicular syndrome in horses. *Am. J. Vet. Res.* 77(2), 167–173. doi: 10.2460/ajvr.77.2.167

Wong, A.S., Ho, E.N., Wan, T.S., Lam, K.K., Stewart, B.D., 2015. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of five bisphosphonates in equine urine and plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 998-999, 1-7.

Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, avril 2020. Limites maximales de résidus ou LMR de médicament vétérinaire

<https://www.anses.fr/fr/content/limites-maximales-de-résidus-ou-lmr-de-médicament-vétérinaire> Consulté le 05 mai 2020 à 11h58.

Association Vétérinaire Equine Française, 2017. FNCH communiqué : Temps de détection du tiludronate

<https://www.avef.fr/index.php/commissions/anti-dopage/849-fnch-communique-temps-de-detection-du-tiludronate> Consulté le 25 mars 2020 à 21h14.

Ceva Santé Animale, 2014. Tildren reçoit l'approbation de la FDA pour le contrôle des signes cliniques du syndrome naviculaire.

<https://www.ceva.com/fr/Actualites-et-medias/Communiqués-de-presse/Tildren-R-recoit-l-approbation-de-la-FDA-pour-le-contrôle-des-signes-cliniques-du-syndrome-naviculaire>

Consulté le 25 mars 2020 à 21h22.

Delachaume, 2014. Caballion perd son titre dans la Copenhagen Cup.

<https://www.zone-turf.fr/actualite/trot/caballion-perd-son-titre-dans-la-copenhague-cup-69466.html> Consulté le 25 mars 2020 à 21h31.

Kent Allen. Tildren and Tiludronic Acid: A Clinical Update.

https://www.tildren.us/images/Tildren_Talk_AAEP_San_Antonio_2017.pdf Consulté le 25 mars 2020 20h55.

Les laboratoires Audevard. Le tildren, une substance toujours autorisée.

<https://www.tildrenfacts.fr/> Consulté le 25 mars 2020 à 20h53.

Shauna Curran-Cooper, 2019. Programme de contrôle des médicaments équins | Importantes mises à jour pour 2019.

http://cheval.quebec/Actualites-Loisirs-Sports/Medicaments_Equins_Programme_Controlé_Mise_A_Jour_Canada_Equestre Consulté le 25 mars 2020 à 22h07.