

Tiludronate chez le cheval : Tolérance et effets à court terme sur le métabolisme osseux

VARELA A.^{1,2}, LEPAGE O.M.¹, DOUCET M.³, MARCOUX M.², GARNERO P.⁴

1 Département Hippique, École Nationale Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Étoile, France,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

INTRODUCTION

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

tions musculosquelettiques chez le cheval incite au développement de molécules thérapeutiques visant à prévenir et traiter ces maladies.

L'os joue un rôle de soutien essentiel dans l'organisme mais il convient de concevoir le tissu osseux autrement que comme une charpente amorphe. Au sein du tissu osseux, on distingue trois grandes activités qui sont la croissance, le modelage et le remaniement (Lepage *et al.*, 1997). Le tissu osseux par son renouvellement perpétuel, le remaniement, possède des capacités d'adaptation rapide. A la différence des activités de croissance et de modelage, le remaniement osseux est un phénomène continu qui a lieu durant toute la vie de l'indi-

vidu, à des endroits diffus, à la fois dans l'os cortical et trabéculaire. L'os est constitué d'une matrice protéique, essentiellement formée de collagène de type I, sur laquelle est déposée la substance cristalline phosphocalcique. Des molécules de pontage (pyridinoline et désoxypyridinoline) permettent de stabiliser les molécules de collagène au sein de la matrice protéique extracellulaire. Le métabolisme osseux est caractérisé par deux activités opposées et couplées : la dégradation ou résorption de l'os ancien par les ostéoclastes et les ostéocytes résorbants et la formation d'un nouvel os par les ostéoblastes qui synthétisent la matrice ostéoïde, nom que porte la matrice avant sa

minéralisation. Ce tissu ostéoïde subit secondairement une minéralisation avec formation d'un front de calcification. Le tissu osseux est une source d'ions calcium, disponibles en grande quantité et rapidement échangeables, source capitale pour l'homéostasie calcique de l'organisme. Le calcium sanguin est presque exclusivement plasmatique, séparé en deux fractions, le calcium lié aux protéines, surtout l'albumine et le calcium ultrafiltrable presque entièrement sous forme ionisée qui correspond à la fraction biologiquement active. Le calcium osseux et le calcium sanguin et interstitiel sont en échange permanent pour maintenir l'homéostasie calcique (Rosol et Capen, 1997). Le bilan calcique est donc le reflet du métabolisme osseux, une inhibition de la résorption osseuse peut entraîner une séquestration des ions calcium dans le tissu osseux, réduire les échanges avec le compartiment interstitiel et le sang, et l'homéostasie peut être affectée si les autres sources de calcium (reins et intestins) sont non fonctionnelles ou déficientes.

Les bisphosphonates constituent une classe thérapeutique aujourd'hui bien connue en médecine humaine pour le traitement des maladies métaboliques de l'os (Fleisch, 1997). Ces composés caractérisés par une forte activité anti-ostéoclastique, agissent principalement sur le tissu osseux, en inhibant la résorption osseuse par inhibition de l'activité des ostéoclastes (Ammann *et al.*, 1993). Les bisphosphonates sont très intéressants dans le traitement de certaines maladies de l'os où le remaniement est mis en cause (Bonjour *et al.*, 1995 ; Gatti et Adami, 1999) ou lors de métastases osseuses (Fleisch, 1991). Les bisphosphonates de première génération comme l'étridronate sont utilisés lors de calcification ectopique (Fleisch, 1997). Chez le cheval, ces composés pourraient être utilisés dans le traitement d'affections osseuses associées à des lésions de type ostéolytique ou de remaniement osseux anormal. C'est le cas pour les fractures de stress qui impliquent une activité de résorption intense et localisée (Stover, 1998), l'ostéopénie de non-usage, le syndrome naviculaire, l'éparvin, les kystes sous-chondraux et les sésamoïdites. Des études rapportent l'utilisation des bisphosphonates chez le cheval. Le pamidronate (AHPBP ou 3-amino-1-hydroxypropilidène-1,1-

bisphosphonate), un aminobisphosphonate inhibant la minéralisation osseuse a été utilisé dans le traitement d'exostose expérimentalement induite chez le poney. Il avait été observé une absence de toxicité du produit sur le remodelage osseux, une moindre croissance des exostoses chez les animaux traités et une diminution du taux de minéralisation de l'ostéoïde (Lepage et François, 1989). Le pamidronate a également été évalué mais sans succès dans le traitement du syndrome naviculaire (McGuigan *et al.*, 2000).

Différentes méthodes d'évaluation non invasives du tissu osseux ont été décrites récemment chez le cheval (Lepage *et al.*, 2001). Le métabolisme osseux peut être évalué indirectement par l'évolution des concentrations sériques ou plasmatiques de marqueurs biochimiques. Ceux-ci font partie des composants de la matrice osseuse collagénique ou non-collagénique ou peuvent être des enzymes qui sont libérés dans la circulation durant la formation ou la résorption osseuse. Le dosage des marqueurs biochimiques osseux constitue une méthode simple, rapide et non-invasive d'investiguer le métabolisme osseux. Les marqueurs biochimiques du remaniement osseux reflètent le métabolisme osseux qui se modifie rapidement et ils sont utiles pour prédire l'efficacité des traitements antirésorbants à court terme (Taylor *et al.*, 1994). A plus long terme, l'ostéodensitométrie constitue la technique de choix pour évaluer le gain de masse osseuse (Reginster *et al.*, 1989). Dans l'ensemble du texte, nous utiliserons pour décrire les marqueurs la nomenclature internationale la plus récente (Delmas *et al.*, 2000). Chez le cheval, pour évaluer la synthèse osseuse, on peut doser l'isoenzyme osseuse de la phosphatase alcaline (Jackson *et al.*, 1996) (bone-ALP) et l'ostéocalcine (OC) (Lepage *et al.*, 1990). L'OC est petite protéine non-collagénique, qui est libérée par les ostéoblastes. Son rôle est déterminant dans la régulation de la formation osseuse mais elle ne semble pas intervenir lors de la résorption (Ducy *et al.*, 1996). Elle est incorporée dans la matrice durant sa formation et libérée de la matrice dans le courant sanguin lors de la résorption osseuse. Ainsi la concentration sérique en OC reflète l'activité globale du remaniement osseux. Les marqueurs de la

résorption osseuse sont essentiellement représentés par les produits de la dégradation du collagène de type I, les molécules de pontage et les télopeptides associés. Le CTX-MMP (*Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteases*), molécule de pontage pyridinoline liée à deux fragments télopeptidiques Carboxy-terminaux d'une chaîne de collagène I, appelé anciennement I-CTP (Price *et al.*, 1995) et le CTX-I (*Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*), octapeptide de l'extrémité C-terminale d'une chaîne de collagène I, impliqué dans la liaison avec une molécule de pontage (Kellerhouse *et al.*, 2000), ont été utilisés comme marqueurs de la résorption osseuse chez le cheval.

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

MATÉRIEL ET MÉTHODES

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

Animaux

Cinq chevaux sains adultes âgés de 6 à 11 ans hongres ou femelles de race Trotteur Français ont été sélectionnés. Seuls les chevaux cliniquement sains, ne présentant aucune évidence biochimique d'atteinte hépatique (mesure sérique de la gamma-glutamyltransférase et de l'aspartate aminotransférase par dosage colorimétrique) ou rénale (mesure de la créatinine sanguine par dosage colorimétrique), ont été acceptés pour l'étude. Les animaux n'avaient pas d'antécédent de pathologie locomotrice et n'avaient jamais été traités avec des bisphosphonates. Pendant une période d'exclusion de 6 semaines et pendant toute la durée de l'essai, aucun autre traitement médical connu à ce jour comme susceptible de modifier le métabolisme osseux, n'a été autorisé tels que les anti-inflammatoires stéroïdiens

(Lepage *et al.*, 1993) et non stéroïdiens, ou l'anesthésie générale. L'hébergement des animaux se faisait en box de 3x4 m. L'eau était fournie *ad libitum* et l'alimentation était constituée de foin de bonne qualité, distribué en deux repas quotidiens.

Traitement

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

Protocole

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

Les traitements étaient réalisés le matin entre 9h15 et 10h19 : les durées de la perfusion étaient de 33, 29, 32, 30 et 34 minutes respectivement pour chaque cheval, pour une moyenne de 31,6 min.

Suivi clinique

Un examen clinique était effectué au jour -1 (J-1) et au jour 1 (J1) avant le traitement, ainsi qu'au J1 +15 minutes (durant la perfusion), J1+30 min. (à la fin de la perfusion), J1+2 h, J1+6 h, et J1+24 h. Les chevaux étaient gardés sous surveillance continue dans un travail de contention durant les 3 heures suivant le

début de la perfusion. Chaque cheval était ensuite replacé dans son box et gardé sous surveillance médicale pendant 48 h.

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

Analyses biochimiques

Calcium ionisé, calcium total et des protéines totales

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

Autres paramètres biochimiques sanguins

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

Marqueurs du métabolisme osseux

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

L'OC a été dosée dans le plasma à

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

Analyse statistique

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

RÉSULTATS

Tolérance clinique du tiludronate

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

Quelques signes cliniques légers sont apparus durant les deux premières heures suivant la perfusion chez deux chevaux (101 et 102). Une heure trente après le début de la perfusion, un léger inconfort, associé à une augmentation de la fréquence cardiaque (± 7 battements par minute (bpm) en

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

Numéro	Age*	OC		bone-ALP	
		Avant	+ 24h	Avant	+ 24h
101	11	7,4	4,2	39,6	57,1
102	11	6,6	6,8	44,7	40,1
103	11	3,4	4,1	40,5	36,4
104	6	5,5	3,5	45,0	53,2
105	6	8,9	6,9	39,8	45,8

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

Numéro	Age*	CTX-MMP		CTX-MMP	
		Avant	+ 24h	Avant	+ 24h
101	11	5,4	4,8	0,083	0,039
102	11	5,8	6,7	0,085	0,001
103	11	5,4	7,7	0,062	0,011
104	6	9,5	8,3	0,280	0,114
105	6	9,0	7,1	0,241	0,076

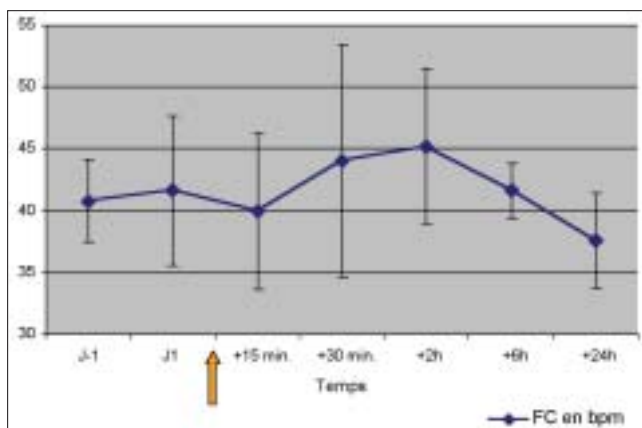


Figure 1 : Évolution de la fréquence cardiaque moyenne (FC) (moyenne±écart-type, n=5) en battements par minute (bpm), avant (J-1 et J1) et après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min. (flèche orange)

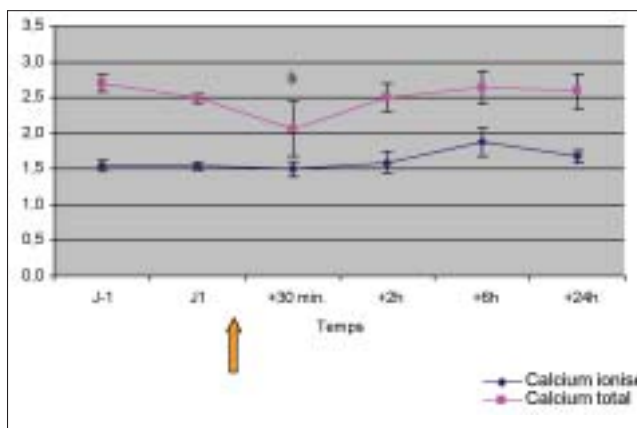


Figure 2 : Évolution des concentrations plasmatiques moyennes (moyenne±écart-type, n=5) du calcium ionisé et du calcium total en mmol/L avant (J-1 et J1) et après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min. (flèche orange).

* $p = 0,031$ indique une différence significative entre la concentration du calcium total à +30 min. par rapport à la valeur de base à J1 avant traitement.

moyenne) a été observé. Ces signes légers (cheval grattant le sol et se calmant à son abord) ont été de courte durée et se sont résolus spontanément en 5 et 10 minutes. Aucun autre signe anormal n'a été mis en évidence à l'examen général lors de ces manifestations.

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

Effets sur la calcémie

Chez tous les chevaux, une diminution modérée significative de la calcémie (calcium total) a été observée dès la fin de la perfusion à +30 min (jusqu'à 1,5 mmol/L chez le cheval 102 à +30 min). L'évolution des concentrations plasmatiques moyennes (moyenne±écart-type) du calcium ionisé et du calcium total est représentée en figure 2 comparant les valeurs moyennes avant (J-1 et J1) et après administration intraveineuse de tiludronate. En moyenne, une diminution de la calcémie de 2,60 mmol/L avant traitement à 2,06 mmol/L à +30 min a été notée, $p=0,031$ (figure 2). Le retour aux valeurs de base a été noté à +2h pour 4 individus (102, 103, 104 et 105) et à +6h pour le cheval 101.

Le dosage du calcium ionisé n'a pas démontré de diminution après traitement (figure 2). Pour le cheval 101, la concentration sérique en calcium ionisé a diminué légèrement au J1

+30 min et J1 +2h (1,31 et 1,38 mmol/L) avec une très légère diminution de la concentration du calcium total et de la concentration en protéines totales. Chez les chevaux 102, 103 et 105, la concentration sérique du calcium ionisé est demeurée stable avec une légère diminution de la concentration sérique du calcium total et une concentration sérique de protéines totales stable. Pour le cheval 104, les différentes concentrations sont restées stables, avec une très légère diminution de la concentration en calcium total et ionisé. Aucune diminution significative n'a été mise en évidence aux différentes échéances.

Effets sur la fonction rénale et hépatique

Chez tous les chevaux, les valeurs des paramètres biochimiques des fonctions hépatique (gamma-glutamyl-transférase sérique et de l'aspartate aminotransférase) et rénale (créati-

nine sanguine) sont demeurées dans les valeurs usuelles avant et durant les 24 heures suivant le traitement.

Effets sur les marqueurs biochimiques du métabolisme osseux

Aucune variation significative des marqueurs de la formation osseuse, bone-ALP ($p = 0,156$) et OC ($p = 0,125$) n'a été observée 24h après le traitement en comparaison aux valeurs initiales mesurées avant traitement au J1 (Tableau I).

Aucune variation du CTX-MMP ($p = 0,5$) n'a été observée 24h après le traitement en comparaison aux valeurs initiales (Tableau II). La concentration sérique du CTX-I était plus élevée chez deux chevaux de 6 ans que chez trois chevaux de 11 ans (Tableau II et figure 3). Vingt-quatre heures après le traitement, une diminution significative ($p = 0,0313$) et marquée $-72,4\%$ de la concentration sérique en CTX-I a été observée chez les 5 chevaux, passant en moyenne de $0,150$ ng/mL à $0,048$ ng/mL (Tableau III). Chez les 2 chevaux de 6 ans, une diminution moyenne en CTX-I de $68,4\%$ a été mesurée tandis que chez les 3 chevaux de 11 ans, une diminution moyenne de 78% a été notée (figure 3).

DISCUSSION

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

Aucune réaction tissulaire locale n'a été mise en évidence au cours de cette étude. Les réactions systémiques cliniques rapportées peuvent être considérées comme bénignes, avec un léger inconfort, une augmentation de la fréquence cardiaque et une hypocalcémie transitoires et modérés. Les augmentations de fréquence cardiaque au J1 avant traitement par rapport au J-1 observées peuvent être liées aux manipulations dans le travail de contention et à la mise en

Tableau III: Variation des marqueurs biochimiques osseux avant traitement au J1 et +24h après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min. m=moyenne; ET=écart-type (n=5), % de variation=pourcentage de variation 24 h après traitement par rapport aux valeurs de base mesurées au J1 avant traitement et p = degré de significativité.

* $p = 0,0313$ indique une diminution significative de la concentration sérique du CTX-I +24h après traitement par rapport à la valeur de base à J1 avant traitement.

	Avant	+ 24h	% de variation	p
	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*

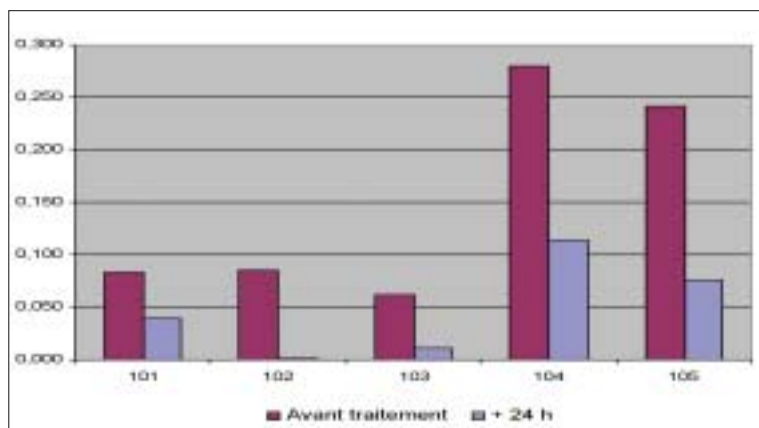


Figure 3: Concentration sérique en CTX-I (ng/mL) avant traitement au J1 et +24h après administration intraveineuse de tiludronate 1 mg/kg dans 1 L de chlorure de sodium en 30 min. pour les 5 individus étudiés

place du cathéter. Les augmentations de fréquence cardiaque observées après traitement n'ont pas été mises en relation avec l'hypocalcémie rapportée. En effet, l'augmentation de la fréquence cardiaque correspondait à une diminution du calcium total chez 4 des cinq chevaux sans que le taux de calcium ionisé ne soit diminué. Puisque la forme ionisée est la seule forme active du calcium sanguin total, l'augmentation de la fréquence cardiaque ne peut être expliquée par des effets de cet électrolyte sur la contractilité du muscle cardiaque (Rosol et Capen, 1997).

De plus toutes les valeurs de concentration sérique du calcium total et ionisé observées sur les cinq chevaux lors de l'étude sont supérieures à des valeurs d'hypocalcémie normalement associées à des signes cliniques. Chez le cheval, une hypocalcémie modérée de $1,996$ mmol/L de calcium total ou $1,1976$ mmol/L de calcium ionisé est bien toléré avec des signes cardiaques

modérés tels que tachycardie, arythmie et des fasciculations musculaires (Valberg et Hodgson, 1996). A $1,497$ mmol/L pour le calcium total et $0,8982$ mmol/L pour le calcium ionisé, on observe généralement un décubitus et des valeurs de $0,998$ et $0,5988$ mmol/L respectivement peuvent être fatales pour le cheval (Valberg et Hodgson, 1996).

L'hypocalcémie observée peut-être liée à l'action du produit. En effet, le tiludronate entraîne une forte inhibition de la résorption osseuse, bloquant ainsi transitoirement la réserve calcique que représente le tissu osseux (Fleisch, 1991). *In vitro*, le tiludronate additionné à des cultures de tissus osseux inhibe la libération de calcium (Bonjour *et al.*, 1995). En découplant la résorption de la formation osseuse, le tiludronate peut induire une balance calcique positive avec un risque d'hypocalcémie. Chez les sujets pagétiques traités avec de fortes doses de tiludronate, il est rap-

porté une diminution significative du calcium sérique (Audran *et al.*, 1989) et chez l'homme, les bisphosphonates sont indiqués dans le traitement de l'hypercalcémie maligne (Fleish, 1991). Chez le rat, leur administration est associée à une augmentation de l'absorption intestinale de calcium (Amman *et al.*, 1993). Chez l'homme, il est recommandé de maintenir un apport calcique alimentaire normal (Amman *et al.*, 1993).

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

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

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

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

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

Le CTX-I est un marqueur de la résorption osseuse récemment utilisé chez le cheval (Kellerhouse *et al.*, 2000). Le dosage du CTX-I permet de quantifier dans le sérum des fragments du collagène de type I contenant un octapeptide spécifique des C-télopeptides impliqués dans le pontage intermoléculaire des fibres de collagène (Christau *et al.*, 1998 ; Rosenquist *et al.*, 1998). Les molécules de pontage et les télopeptides collagéniques impliquant le site de

pontage sont considérés en médecine humaine comme les marqueurs les plus sensibles de la résorption notamment pour suivre l'efficacité des traitements antirésorbants comme les bisphosphonates (Garnero et Delmas, 1998). Les variations physiologiques de ces marqueurs chez le cheval ne sont pas connues, mais on constate dans notre étude des valeurs initiales plus élevées chez les chevaux adultes plus jeunes suggérant un métabolisme osseux plus actif. Les concentrations sériques en CTX-I sont les plus augmentées à la ménopause chez la femme comparée aux autres marqueurs (Déoxyypyridinoline DPD) et identifient le plus grand nombre de femmes chez qui le métabolisme osseux est anormalement augmenté dans les premiers stades de la ménopause (Fink *et al.*, 2000). Chez le cheval, notre étude démontre son intérêt dans le suivi des traitements au tiludronate, avec une diminution marquée et précoce des concentrations sériques 24 heures après l'administration de tiludronate par voie intraveineuse. Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux définir l'utilisation de ce marqueur chez le cheval.

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

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

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate intravenous tolerance of tiludronate in horses and its effects on bone metabolism. Five French Trotters received 1 mg/kg of tiludronate intravenously during 30 min. Complete physical examination was performed, blood calcium as well as renal and hepatic parameters were monitored before and after treatment. Bone metabolism was evaluated before and 24 hours after treatment by measu-

ring biochemical bone formation markers, osteocalcin and bone resorption markers, CTX-MMP (Carboxy-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen generated by matrix metalloproteinases) and CTX-I (Carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen).

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

creatinine or hepatic parameters during the study.

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

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

BIBLIOGRAPHIE

- AMMANN P., RIZZOLI R., CAVERZASIO J., SHIGEMATSU T., SLOSMAN D., BONJOUR J.P. Effects of the bisphosphonate tiludronate on bone resorption, calcium balance and bone density. *J. Bone Miner. Res.*, 1993, **8**, 1491-1498.
- AUDRAN M., CLOCHON P., ETGHEN D., MAZIERES B., RENIER J.C. Treatment of Paget's disease of bone with (4-chloro-phenyl) thiomethylene bisphosphonate. *Clin. Rheumatol.*, 1989, **8**, 71-79.
- BATHE A.P. 245 fractures in Thoroughbred racehorses: Results of a 2 year prospective study in Newmarket. *Proc. Annual Am. Assoc. Equine Pract. Conv.*, 1994, 175.
- BLACK A., SCHOKNECHT P.A., RALSTON S.L., SHAPES S.A. Diurnal variation and age differences in biochemical markers of bone turnover in horses. *J. Anim. Sci.*, 1999, **77**, 75-83.
- BLUMSOHN A., NAYLOR K.E., ASSIRI A.M., EASTELL R. Different responses of biochemical markers of bone resorption to bisphosphonate therapy in Paget disease. *Clin. Chem.*, 1995, **41**, 1592-1598.
- BONJOUR J.P., AMMANN P., BARBIER A., CAVERZASIO J., RIZZOLI R. Tiludronate : Bone pharmacology and safety. *Bone*, 1995, **17**, 473S-477S.
- CHRISTGAU S., ROSENQUIST C., ALEXANDERSEN P., BJARNASON N.H., RAVN P., FLEDELIUS C., HERLING C., QVIST P., CHRISTIANSEN C. Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin. Chem.*, 1998, **44**, 2290-2300.
- DELMAS P.D., EASTELL R., GARNERO P., SEIBEL M.J., STEPAN J., COMMITTEE OF SCIENTIFIC ADVISORS OF THE INTERNATIONAL OSTEOPO-
- ROSIS FOUNDATION. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos. Int.*, 2000, **11** : Suppl 6, S2-17.
- DUCY P., DESBOIS C., BOYCE B., PINERO G., STORY B., DUNSTAN C., SMITH E., BONADIO J., GOLDSTEIN S., GUNDBERG C., BRADLEY A., KARSENTY G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 1996, **382**, 448-452.
- ESTBERG L., STOVER S.M., GARDNER I.A., DRAKE C.M., JOHNSON B., ARDANS A. High-speed exercise history and catastrophic racing fracture in thoroughbreds. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 1549-1555.
- FINK E., CORMIER C., STEINMETZ P., KINDERMANS C., LE BOUC Y., SOUBERBIELLE J.C. Differences in the capacity of several biochemical bone markers to assess high bone turnover in early menopause and response to alendronate therapy. *Osteoporos. Int.*, 2000, **11**, 295-303.
- FLEISCH H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumour-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs*, 1991, **42**, 919-944.
- FLEISCH H. Bisphosphonates in bone disease, from laboratory to the patient. 3rd edition. The Parthenon Publishing Group Eds : New York, 1997, 184 p.
- GARNERO P., DELMAS P.D. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new direct immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, **77**, 1046-1053.
- GARNERO P., GINEYTS E., RIOU J.P., DELMAS P.D. Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone

- disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, **79**, 780-785.
- GARNERO P., DELMAS P.D. Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 1998, **27**, 303-323.
- GARNERO P., BOREL O., DELMAS P.D. Evaluation of a fully automated serum assay for C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen in osteoporosis. *Clin. Chem.*, 2001, **47**, 694-702.
- GATTI D., ADAMI S. New bisphosphonates in the treatment of bone diseases. *Drugs Aging*, 1999, **15**, 285-296.
- JACKSON B., WILSON A.M., EASTELL R.E., RUSSEL R.G., LANYON L.E., GOODSHIP A.E., PRICE J.S. The effects of exercise on biochemical markers of bone metabolism in the horse. *Proc. Annu. Meet. Orthop. Res. Soc.*, 1995, **20**, 201-234.
- JACKSON B., EASTELL R., RUSSEL R.G., LANYON L.E., PRICE J.S. Measurement of bone specific alkaline phosphatase in horse: a comparison of two techniques. *Res. Vet. Sci.*, 1996, **61**, 160-164.
- JEFFCOTT L.B., ROSSDALE P.D., FREESTONE J., FRANK C.J., TOWERS-CLARK P.F. An assessment of wastage in thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine Vet. J.*, 1982, **14**, 185-198.
- KELLERHOUSE P.L., BROWN C., NEWHALL K., JUDD K., THOMPSON D. Assessment of bone resorption marker assays in Thoroughbred horses. *J. Bone Miner. Res.*, 2000, **15** : suppl.1, 526.
- LEPAGE O.M., FRANÇOIS R.J. Aspects microradiographiques et en microscopie de fluorescence d'une exostose expérimentale du métacarpien chez le poney Shetland et de son traitement par un bisphosphonate, l'AHPrBP (APD). Applications possibles au cheval d'arme. *Ann. Med. Milit. Belg.*, 1989, **3**, 38-44.
- LEPAGE O.M., MARCOUX M., TREMBLAY A. Serum osteocalcin or bone Gla-protein, a biochemical marker for bone metabolism in horses: differences in serum levels with age. *Can. J. Vet. Res.*, 1990, **54**, 223-226.
- LEPAGE O.M., DESCOTEAUX L., MARCOUX M., TREMBLAY A. Circadian rhythms of osteocalcin in equine serum. Correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Can. J. Vet. Res.*, 1991, **55**, 5-10.
- LEPAGE O.M., LAVERTY S., MARCOUX M., DUMAS G. Serum osteocalcin concentration in horses treated with triamcinolone acetone. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 1209-12.
- LEPAGE O.M., FRANÇOIS R.J., PERRON-LEPAGE M-F. Modelage et remaniement osseux. Observations sur les os métacarpiens du poney Shetland. *Prat. Vet. Equine*, 1997, **29**, 47-57.
- LEPAGE O.M., HARTMANN D.J., EICHER R., UEBELHART B., TSCHUDI P., UEBELHART D. Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses. *Vet. J.*, 1998, **156**, 169-175.
- LEPAGE O.M., CARSTANJEN B., UEBELHART D. Non-invasive assessment of equine bone: an update. *Vet. J.*, 2001, **161**, 10-22.
- MCGUIGAN M.P., CAUVIN E., SCHRAMME M.C., PARDOE C.H., MAY S.A., WILSON A.M. A double-blind placebo-controlled trial of bisphosphonate in the treatment of navicular syndrome. *Proc. Br. Equine Vet. Assoc. Congr.*, 2000, 207.
- PATTERSON-ALLEN P., BRAUTIGAM C.E., GRINDELAND R.E., ASLING C.W., CALLAHAN P.X. A specific radioimmunoassay for osteocalcin with advantageous species crossreactivity. *Anal. Biochem.*, 1982, **120**, 1-7.
- PHYSICK-SHEARD P.W., RUSSELL M. Career profile of the Canadian Standardbred. III. Influence of temporary absence from racing and season. *Can. J. Vet. Res.*, 1986, **50**, 471-478.
- PRICE J.S., JACKSON B., EASTELL R., GOODSHIP A.E., BLUMSOHN A., WRIGHT I., STONEHAM S., LANYON L.E., RUSSELL R.G. Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses. *Equine Vet. J.*, 1995, **27**, 201-207.
- PRICE J.S., JACKSON B., GRAY J., WRIGHT I., HARRIS P.E., RUSSELL R.G., EASTELL R., MCILWRAIGHT C.W., RICKETTS S.W., LANYON L.E. Serum levels of molecular markers in growing horses: the effects of age, season and orthopaedic disease. *Proc. Annu. Meet. Orthop. Res. Soc.*, 1997, 587.
- REGINSTER J.Y., LECART M.P., DEROISY R., SARLET N., DENIS D., ETHGEN D., COLLETTE J., FRANCHIMONT P. Prevention of postmenopausal bone loss by tiludronate. *Lancet*, 1989, **2**(8678-8679), 1469-1471.
- RIGGS C.M. Implications of bone adaptation in the thoroughbred racehorse. In: Robinson E.D. (Eds), *Current therapy in equine medicine 4*. W.B. Saunders Company: Philadelphia, 1997, 99-103.
- ROSENQUIST C., FLEDELIUS C., CHRISTGAU S., PEDERSEN B.J., BONDE M., QVIST P., CHRISTIANSEN C. Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin. Chem.*, 1998, **44**, 2281-2289.
- ROSOL T.J., CAPEN C.C. Calcium-regulating hormones and diseases of abnormal mineral metabolism. In: Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. (Eds.), *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th Ed. Academic Press: San Diego, 1997, 619-702.
- ROSSDALE P.D., HOPES R., DIGBY N.J., OFFORD K. Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Vet. Rec.*, 1985, **116**, 66-69.
- SANSOM L.N., NECCIARI J., THIERCELIN J.F. Human pharmacokinetics of tiludronate. *Bone*, 1995, **17** : Suppl, 479S-483S.
- STOVER S.M. Stress fractures. In: White N.A., Moore J.N. (Eds), *Current techniques in equine surgery and lameness*, Second Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998, 451-459.
- TAYLOR A.K., LUEKEN S.A., LIBANATI C., BAYLINK D.J. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of bone metabolism. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 1994, **20**, 589-607.
- VALBERG S.J., HODGSON D.R. Hypocalcemia in horses. In: Smith B.P. (Eds), *Large animal internal medicine*, Second Edition. Mosby Year Book: St-Louis, 1996, 1498-1499.

BERNARD LIMBOURG



Bernard Limbourg a disparu brutalement le 8 avril 2001 fauché par une moto alors qu'il s'adonnait à son sport favori, la randonnée à vélo. Bernard débuta sa carrière comme médecin vétérinaire praticien en 1975 à Mariembourg. Désireux d'améliorer le diagnostic des maladies bovines et attiré par un approfondissement de la recherche des étiologies de ces maladies, il décida d'entrer à la Fédération de lutte contre les maladies du bétail, dénommée la Namuroise, en 1984. Depuis lors, il s'est attaché à développer un service de qualité pour les éleveurs et les médecins vétérinaires. Ses nombreux stagiaires ont eu l'oc-

casion d'apprécier, au travers de ses conseils, sa rigueur et sa grande disponibilité. Le projet de construction du nouveau laboratoire à Biron (Ciney) fut l'occasion pour lui de mettre au point un système d'autopsie faisant appel aux techniques les plus modernes.

Son souci d'accroître ses connaissances le mena à suivre les cours de la licence en médecine vétérinaire expérimentale et il en obtint le diplôme en 1992, après la défense d'un mémoire intitulé: «Le diagnostic sérologique de la rhinotrachéite infectieuse bovine par la méthode ELISA : détermination du seuil de positivité et mesure des critères de qualité des trousseaux de diagnostic». Dans l'intervalle, il contribua à la mise sur pied de l'Association d'épidémiologie et de santé animale (AESA) dont il fut administrateur dès le début, en 1991. Devenu trésorier de cette association en 1999, il fut la cheville ouvrière des groupes de travail sur la diarrhée virale bovine et la rhinotrachéite infectieuse bovine. Son activité dans les associations scientifiques et pro-

fessionnelles s'étendait aussi à la Société royale namuroise de médecine vétérinaire (SRNMV) dont les membres ont toujours apprécié son investissement dans l'organisation de leurs réunions.

Il fut à la base de nombreux projets : étude sur les entérotoxémies du veau, étude sur les maladies respiratoires bovines, lutte contre la diarrhée virale bovine, lutte contre la paratuberculose, recherches sur les agents responsables des réactions faussement positives en brucellose, étude étiologique des avortements dans l'espèce bovine, pour n'en citer que quelques-uns.

La profession garde le souvenir d'un confrère intègre, osant exprimer son opinion, même si elle était difficile à défendre, dont la carrière fut tout entière consacrée à l'amélioration du diagnostic et des méthodes de lutte contre les maladies majeures du bétail.

Yves Botton, Marc Lomba et Etienne Thiry

PUBLICATIONS DE BERNARD LIMBOURG

- LIMBOURG B., KERKHOFS P., MASSARD C., MICHELET S., SAEGERMAN C., THIRY E. Avantages et inconvénients d'un plan de lutte contre la rhinotrachéite infectieuse bovine en Belgique. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **147**, 57-69.
- MANTECA C., DAUBE G., PIRSON V., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. *Vet. Microbiol.*, 2001, **81**, 21-32.
- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A., MAINIL J.G. Etude de l'entérotoxémie bovine en Belgique : II) Epizootiologie élémentaire et pathologie descriptive. *Ann. Méd. Vét.*, 2000, **144**, 75-82.
- SCHREIBER P., DUBOIS F., DREZE F., LACROIX N., LIMBOURG B., COPPE P. Prevalence of bovine virus diarrhoea virus infection in Belgian white blue cattle in southern Belgium. *Vet Q.*, 1999, **21**, 28-32.
- COETSIER C., HAVAUX X., MATTELARD F., SADATTE S., CORMONT F., BUERGELT K., LIMBOURG B., LATINNE D., BAZIN H., DENEFF J.F., COCITO C. Detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in infected tissues by new species-specific immunohistological procedures. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1998, **5**, 446-451.
- SCHREIBER P., ROBERT B., BUGHIN J., LIMBOURG B., COPPE P. Etiologie des avortements non bruceliques chez la vache dans le sud de la Belgique. *Bull. GTV*, 1998, **2-B-591**, 39-53.
- LEMAIRE M., DE WERGIFOSSE B., LIMBOURG B., DEBLICQUY P., ONCLIN M., CZAPLICKI G., BUGHIN J., ANTOINE H., WELLEMANS G., PASTORET P.-P., THIRY E. A study of the seroprevalence of bovine herpesvirus 1 infection in Walloon region in Belgium. *Epidémiol. Santé anim.*, 1997, **31-32**, 11.C21.
- SAEGERMAN C., THIANGE P., LIMBOURG B., CONOTTE G., PETIT N., THIRY G., BOTTON Y., PELZER P., MULLIER P., GODFROID J., DUFÉY J.

- Etude épidémiologique descriptive et identification de facteurs de risque des réactions sérologiques faussement positive en brucellose bovine dans le sud de la province de Namur. *Epidémiol. Santé anim.*, 1997, **31-32**, 08.04.1-08.04.3.
- DAUBE G., GINTER A., MANTECA C., LIMBOURG B., COPPE P., MAINIL J., KAECKENBEECK A. L'entérotoxémie bovine: rôle de *Clostridium perfringens*. Edité par le Ministère de l'Agriculture et des Classes Moyennes, Administration Recherche et Développement, 1996. 105p.
- DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., MANTECA C., MAINIL J., KAECKENBEECK A. Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (alpha, beta, epsilon, iota, theta, mu, and enterotoxin) and for sialidase. *Am. J. Vet. Res.*, 1996 **57**, 496-501.
- LEMAIRE M., MEYER G., ERNST E., VANHERREWEGHE V., LIMBOURG B., PASTORET P.-P., THIRY E. Latent bovine herpesvirus 1 infection in calves protected by colostral immunity. *Vet. Rec.*, 1995, **137**, 70-71.
- ONCLIN M., LAMBOT M., LIMBOURG B., ANTOINE H., CZAPLICKI G., PASTORET P.-P. Prévalence des bovins immunotolérants infectés permanents par le pestivirus responsable de la diarrhée virale bovine, dans l'Est de la Belgique, au sein des troupeaux infectés. *Ann. Méd. Vét.*, 1995, **139**, 429-431.
- WEYNANTS V., GODFROID J. LIMBOURG B., SAEGERMAN C., LETESSON J.-J. Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *J. Clin. Microbiol.*, 1995, **33**, 706-712.
- DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., RENIER K., KAECKENBEECK A. Apports de la génétique moléculaire dans la caractérisation de l'espèce *Clostridium perfringens*. In: Papa El Hassane Diop, Kaeckenbeeck A. (Eds), Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. John Libbey: Eurotext, 1994, 159-175.
- DAUBE G., SIMON P., LIMBOURG B., RENIER K., KAECKENBEECK A. Typage moléculaire de *Clostridium perfringens*. *Ann. Méd. Vét.*, 1994, **138**, 183-191.
- GINTER A., RENIER K., COLLARD A., LIMBOURG B., DAUBE G., SIMON P., MANTECA C., COPPE P. Caractérisation et typage de souches de *Clostridium perfringens* par la méthode ELISA. In : Papa El Hassane Diop, Kaeckenbeeck A. (Eds), Biotechnologies du diagnostic et de la prévention des maladies animales. John Libbey : Eurotext, 1994, 31-47.
- VANNUFFEL P., GILOT P., LIMBOURG B., NAEHRHUYZEN B., DIETERICH C., COENE M., MACHTELINCKX L., COCITO C. Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 1994, **32**, 1211-1216.
- DAUBE G., MAINIL J., LIMBOURG B., KAECKENBEECK A. Etude de l'antibiorésistance de *Clostridium perfringens* par l'emploi de sondes génétiques. *Ann. Méd. Vét.*, 1992, **136**, 53-56.
- THIRY E., WELLEMANS G., LIMBOURG B., BROES A., PASTORET P.-P. Effect of repeated intradermal injections of bovine herpesvirus type 1 antigen on seronegative cattle. *Vet. Rec.*, 1992, **130**, 372-375.