

## Pharmacologie clinique des bisphosphonates: revue de littérature axée sur le tiludronate chez le cheval.

DELGUSTE C.<sup>1</sup>, LEPAGE O. M.<sup>2</sup>, AMORY H.<sup>1</sup>, DOUCET M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Département des Sciences cliniques, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, Bât B41, 4000 Liège, Belgique

<sup>2</sup> Université de Lyon, 69003 Lyon, France ; Ecole nationale vétérinaire de Lyon, Département hippique, 69280 Marcy L'Etoile, France

<sup>3</sup> Département de Biomédecine vétérinaire, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Avenue Sicotte, C.P. 5000, St. Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

Correspondance : Dr. Catherine Delguste - Fax : +32(0)4/366 41 08 - E-mail : cdelguste@ulg.ac.be

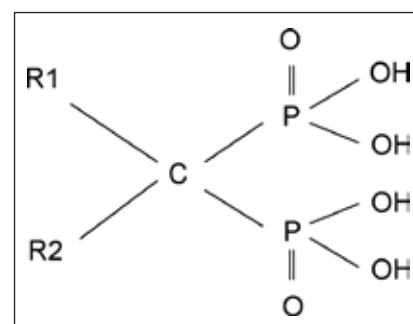
**RESUME :** Le tiludronate est un bisphosphonate récemment mis sur le marché vétérinaire dans plusieurs pays européens, mais pas en Belgique, pour le traitement du syndrome podotrochléaire (naviculaire) et de l'arthropathie dégénérative du tarse (éparvin) chez le cheval. Dans une première partie, cet article de synthèse passe en revue les principales caractéristiques pharmacologiques de cette classe de médicaments et leurs principales indications tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire. Ensuite, les différentes méthodes d'investigation de l'efficacité de ce type de traitement, ainsi que les difficultés encourues dans leur application chez le cheval, sont discutées. Enfin, une synthèse exhaustive des données pharmacologiques disponibles sur le tiludronate chez le cheval est présentée. En conclusion, le tiludronate ouvre des perspectives très intéressantes dans le domaine de la thérapeutique des pathologies locomotrices du cheval, mais d'autres études seront encore nécessaires pour en rationaliser et en optimiser l'usage.

### I. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES BISPHOSPHONATES

Les bisphosphonates sont des médicaments inhibiteurs de la résorption, et, dans une moindre mesure, de la minéralisation osseuse (Russell, 2007). De par leur structure chimique (figure 1), ce sont des analogues du pyrophosphate, dont la liaison P-O-P centrale est remplacée par une liaison P-C-P. C'est cette structure qui leur confère leur caractère non hydrolysable et leurs propriétés inhibitrices de la résorption, tout en conservant leur forte affinité pour les cristaux de calcium et

donc pour le minéral osseux (Russell *et al.*, 1970). Autour de ce carbone central s'articulent deux chaînes latérales, dont la composition détermine respectivement l'affinité pour l'hydroxyapatite (Ebrahimpour et Francis, 1995) et la puissance (van Beek *et al.*, 1994). De plus, selon la présence ou non d'un atome d'azote dans cette seconde chaîne latérale, les bisphosphonates sont subdivisés en deux catégories : les amino-bisphosphonates et les non-amino-bisphosphonates, qui se distinguent par leur puissance mais aussi par leur mode d'action intracellulaire (Russell, 2007).

**Figure 1.** Structure chimique générale des bisphosphonates.



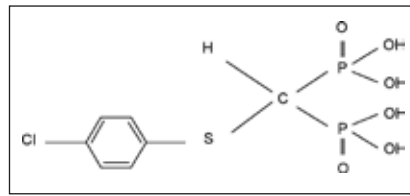
## Mode d'action

La principale cellule cible des bisphosphonates est l'ostéoclaste mature, même si certains effets sur les précurseurs de ce dernier (Boonekamp *et al.*, 1986) ou sur l'ostéoblaste (Vitte *et al.*, 1996 ; Tokuda *et al.*, 1998 ; Yoshida *et al.*, 2005) ont été décrits. Lors de leur administration, les bisphosphonates sont adsorbés à la surface osseuse par liaison au calcium de la phase minérale osseuse. Ils se distribuent préférentiellement dans les zones de résorption osseuse, où le calcium est bien exposé, mais la valeur du rapport de dépôt en zone de résorption vs. en zone de formation osseuse dépend de la molécule utilisée (Masarachia *et al.*, 1996). Lors du phénomène de résorption, les bisphosphonates sont libérés de la phase minérale osseuse sous l'effet de l'acidité produite dans la chambre de résorption par les ostéoclastes. Par ce phénomène, les ostéoclastes sont exposés à de fortes concentrations locales en bisphosphonates libres.

Les bisphosphonates pénètrent alors par endocytose dans l'ostéoclaste (Thompson *et al.*, 2006) où ils vont agir sur différentes voies métaboliques pour aboutir à l'inhibition et à l'apoptose de la cellule (Hughes *et al.*, 1995 ; Rogers *et al.*, 1999). C'est à ce stade que se différencient les deux catégories de bisphosphonates.

Les bisphosphonates ne contenant pas d'azote dans leur chaîne latérale (non-amino-bisphosphonates ; exemples : le tiludronate, l'etidronate ou le clodronate) sont métabolisés dans l'ostéoclaste et aboutissent à la formation de métabolites toxiques de l'adénosine triphosphate (ATP) (van Beek *et al.*, 2003). Ces métabolites, non hydrolysables, s'accumulent dans la cellule, l'inhibent et mènent à son apoptose (Russell, 2007). De plus, certains d'entre eux auraient un pouvoir de désorganisation du cytosquelette et d'inhibition de l'acidification de la chambre de résorption. Ainsi, le tiludronate (figure 2) inhibe *in vitro* l'activité de la tyrosine phosphatase ostéoclastique, impliquée dans la régulation de l'organisation du cytosquelette, et rompt les anneaux d'actine préformés (Murakami *et al.*, 1997). Le tiludronate est aussi un puissant inhibiteur de la pompe à protons présente dans la membrane de la bordure en brosse de l'ostéoclaste polarisé, la « vacuolar-type proton ATPase », responsable de l'acidification de la

**Figure 2.** Structure chimique du tiludronate.



chambre de résorption nécessaire à la dissolution de la phase minérale (David *et al.*, 1996).

Les bisphosphonates contenant de l'azote dans leur chaîne latérale (amino-bisphosphonates ; exemples : le pamidronate, l'alendronate, l'ibandronate, le risédronate ou encore le zolédronate), agissent principalement en inhibant une enzyme de la biosynthèse du mévalonate, la « *farnesyl pyrophosphate synthase* » (van Beek *et al.*, 2003). Cette inhibition enzymatique empêche la prénylation et inhibe la fonction de petites protéines régulatrices responsables de l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTP) (GTPases Ras, Rab, Rho et Rac), protéines indispensables au processus de signalisation intracellulaire. Ce phénomène perturbe la fonction cellulaire, et notamment désorganise le cytosquelette, fait disparaître la bordure en brosse, et aboutit à l'inactivation puis à l'apoptose de l'ostéoclaste (Hughes *et al.*, 1995 ; Russell, 2007). Au sein de cette classe, le pamidronate semble néanmoins se démarquer par un mécanisme d'action visant aussi une autre cible que la voie du mévalonate, encore indéterminée (van Beek *et al.*, 2003), tandis que le zolédronate, outre son action inhibitrice sur la voie du mévalonate, bloquerait également une translocase mitochondriale (Monkkonen *et al.*, 2006). La distance entre l'atome d'azote et le groupe P-C-P ainsi que la configuration spatiale de la chaîne latérale R2 semblent constituer les principaux déterminants de la puissance d'un amino-bisphosphonate (Ebetino, 1996). Les plus puissants connus actuellement sont ceux contenant un atome d'azote dans un anneau hétérocyclique comme le risédronate et le zolédronate (Russell, 2007).

Outre leurs différents modes d'action sur les ostéoclastes, il semblerait que les deux classes de bisphosphonates se distinguent également au niveau de leurs effets potentiels sur les macro-

phages. Les amino-bisphosphonates, à des concentrations non cytotoxiques, seraient capables d'augmenter la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés *in vitro*, et d'induire une réaction inflammatoire aiguë (syndrome grippal) lors de leur première administration *in vivo*. Au contraire, les non-amino-bisphosphonates seraient capables, *in vitro*, d'inhiber de façon dose-dépendante la libération de telles cytokines et d'oxyde nitreux (NO) par les macrophages activés, surtout s'ils sont véhiculés par des liposomes pour faciliter leur entrée dans ces cellules (Monkkonen *et al.*, 1998). Ils possèderaient ainsi une potentielle activité anti-inflammatoire *in vivo*. L'hypothèse avancée pour expliquer ces différences est que la métabolisation intracellulaire des non-amino-bisphosphonates en métabolites analogues de l'ATP inhibe le NFκB, et que cette inhibition est responsable de leurs propriétés anti-inflammatoires (Makkonen *et al.*, 1999).

## Pharmacocinétique

Les bisphosphonates possèdent des caractéristiques pharmacocinétiques très particulières, similaires dans toutes les espèces étudiées, de par leur grande affinité pour les tissus calcifiés, dont la phase minérale osseuse (Stepensky *et al.*, 2003). Suite à leur administration, ils se lient fermement à l'hydroxyapatite des surfaces osseuses, provoquant une phase de clairance initiale rapide du plasma (phase de distribution et d'élimination précoce) (Ravn *et al.*, 2002), et leur accumulation dans le compartiment profond que représente l'os (Stepensky *et al.*, 2003). Ces propriétés leur confèrent un très grand volume de distribution (Davi *et al.*, 1999). Concernant le tiludronate en particulier, il a été démontré que chez l'homme, environ la moitié de la dose absorbée est retenue au niveau osseux (Morales-Piga, 1999). Les bisphosphonates se lient préférentiellement aux sites où le minéral osseux est bien exposé (Lin *et al.*, 1992), soit plutôt dans l'os trabéculaire que dans l'os cortical, ainsi qu'aux sites en cours de résorption. Ils en sont progressivement libérés lors de la dégradation de la matrice minérale osseuse par les ostéoclastes actifs (Morales-Piga, 1999), sur lesquels ils exercent leur action inhibitrice. Entretemps, ils peuvent également être séquestrés sous de l'os nouvellement

formé, et rester ainsi stockés sous forme latente dans l'os pendant des années, ce qui leur confère une très longue demi-vie, comparable à celle des minéraux osseux. Ainsi, une demi-vie terminale de l'ordre de 11 ans a été rapportée pour l'alendronate (Lasseter *et al.*, 2005). Les bisphosphonates sont également caractérisés par une biodisponibilité orale très faible (celle du tiludronate chez l'homme est de l'ordre de 5 %) (Reginster, 1992), une absence de métabolisation et une excrétion par voie quasi exclusivement urinaire (Davi *et al.*, 1999).

### Indications et utilisations cliniques

De façon générale, tant en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, l'utilisation des bisphosphonates peut trouver un intérêt dans le traitement des pathologies osseuses caractérisées par des phénomènes de résorption excessive.

#### Chez l'homme

En médecine humaine, les principales indications des bisphosphonates sont l'ostéoporose post-ménopausique chez la femme, la maladie de Paget, les tumeurs osseuses et le myélome multiple (Peris *et al.*, 2006 ; Terpos, 2006 ; Lein *et al.*, 2007 ; Russell, 2007), mais ils sont aussi utilisés dans le traitement d'autres pathologies telles que l'hypercalcémie maligne (Lambrinouadaki *et al.*, 2006), l'ostéogénèse imparfaite (DiMeglio et Peacock, 2006 ; Rauch et Glorieux, 2006 ; Choi *et al.*, 2007 ; Lowing *et al.*, 2007), la thalassémie  $\beta$  (Pennisi *et al.*, 2003 ; Voskaridou *et al.*, 2006), l'ostéoporose induite par les glucocorticoïdes (Devogelaer *et al.*, 2006), la spondylarthrite ankylosante (Toussiro et Wendling, 2007), ou encore l'insuffisance de régénération en ostéogénèse de distraction (Kiely *et al.*, 2007). De plus, les bisphosphonates ont une activité anti-tumorale et anti-métastatique intrinsèque qui dépasse la simple action inhibitrice de la résorption au niveau des métastases osseuses, ce qui élargit considérablement leurs bénéfices en oncologie et suscite un vif intérêt scientifique actuellement (Heikkila *et al.*, 2002 ; Reinholz *et al.*, 2002 ; Heikkila *et al.*, 2003 ; Clezardin *et al.*, 2005 ; Daubine *et al.*, 2007 ; Iguchi *et al.*, 2007 ; Merrell *et al.*, 2007 ; Molinuevo *et al.*, 2007 ; Veri

*et al.*, 2007). Certains de ces effets seraient dus à l'interférence avec la voie du mévalonate au sein des cellules tumorales, et ne concerneraient donc que les amino-bisphosphonates (Swanson et Hohl, 2006 ; Ishikawa *et al.*, 2007), tandis que d'autres effets seraient dus à une inhibition de métalloprotéinases matricielles (MMP) des cellules tumorales et concerneraient aussi les non-amino-bisphosphonates (Heikkila *et al.*, 2003). Notamment, un effet inhibiteur sur l'angiogénèse semble être un élément clef à la base des propriétés anti-tumorales des bisphosphonates (Veri *et al.*, 2007). Les bisphosphonates permettent une réduction d'incidence des fractures pathologiques, de compression médullaire, d'hypercalcémie maligne et de nécessité de radiothérapie ou d'intervention chirurgicale sur l'os notamment dans les cas de myélome, de métastases osseuses en cas de cancer du sein et de la prostate, de tumeurs pulmonaires et de carcinomes cellulaires rénaux (Russell, 2007). Ils ont également un effet analgésique et permettent un meilleur maintien de la qualité de vie des patients atteints de ces pathologies (Russell, 2007).

D'autre part, les amino-bisphosphonates, de par les inhibitions enzymatiques qu'ils entraînent, possèderaient également une activité inhibitrice des protozoaires (Montalvetti *et al.*, 2001 ; Rodriguez *et al.*, 2002 ; Sanz-Rodriguez *et al.*, 2007).

Un autre champ d'intérêt des bisphosphonates est encore l'immunologie. En effet, une action inhibitrice du clodronate liposomal sur les macrophages pourrait être mise à profit dans le cas de pathologies auto-immunes. Des résultats encourageants ont été rencontrés dans un modèle de thrombocytopenie auto-immune chez la souris (Alves-Rosa *et al.*, 2002) et lors d'anémie hémolytique auto-immune spontanée chez le chien (Mathes *et al.*, 2006).

Enfin, l'affinité des bisphosphonates pour les tissus calcifiés est mise à profit depuis très longtemps en imagerie médicale, où des bisphosphonates (médrionate, clodronate) liés à une molécule radioactive ( $^{99m}\text{Tc}$ ) sont utilisés pour la réalisation d'examens scintigraphiques (Fleisch, 1997 ; Kumar *et al.*, 2007). L'utilisation de ces bisphosphonates marqués permet ainsi le diagnostic de pathologies osseuses ou dentaires telles que les tumeurs, les fractures, les états inflammatoires, les

lésions de dégénérescence ou encore certaines infections, chez l'homme (Chavdarova *et al.*, 2006), mais aussi chez le cheval (Attenburrow *et al.*, 1984 ; Koblik *et al.*, 1988 ; Keegan *et al.*, 1996 ; East *et al.*, 1998 ; Weller *et al.*, 2001) et chez d'autres espèces animales (Berg *et al.*, 1990 ; Bakal *et al.*, 1998).

En particulier, le tiludronate est utilisé chez les patients atteints de la maladie de Paget, chez qui il s'est avéré efficace et bien toléré (Reginster *et al.*, 1988 ; Peris *et al.*, 2002). L'effet inhibiteur du tiludronate sur la résorption osseuse est dose-dépendant (Reginster *et al.*, 1992 ; Bonjour *et al.*, 1995). Cet effet est maximal à des concentrations voisines de 20  $\mu\text{g/ml}$  *in vitro* (Reginster, 1992), et perdure plusieurs mois après l'arrêt du traitement (Reginster, 1992 ; Reginster *et al.*, 1993). Six mois après la fin d'un traitement consistant en l'administration par voie orale de 400 mg/j pendant 3 mois, les marqueurs biochimiques du remaniement osseux sont normalisés chez 74 % des patients pagétiques, résultat comparable à celui obtenu suite à l'administration du puissant amino-bisphosphonate risédronate à la dose quotidienne de 30 mg/jour pendant deux mois (Peris, 2007). À la même dose, le tiludronate s'est également montré efficace dans la prévention de perte osseuse chez des patients paraplégiques, ceci sans perturber de façon significative la formation osseuse (Chappard *et al.*, 1995). Le tiludronate s'est par contre révélé inefficace tant pour réduire l'incidence des fractures ostéoporotiques vertébrales que pour augmenter la densité minérale osseuse (DMO) spinale chez des femmes souffrant d'ostéoporose post-ménopausique à la dose orale de 200 mg par jour pendant 7 jours consécutifs au début de chaque mois (Reginster *et al.*, 2001). Une étude antérieure avait pourtant montré sa capacité à prévenir une chute de DMO au niveau lombaire et à réduire l'excrétion urinaire d'hydroxyproline chez des femmes saines ménopausées à la dose de 100 mg/jour par voie orale pendant 6 mois (Reginster *et al.*, 1989). Enfin, de par son potentiel anti-inflammatoire, le tiludronate pourrait s'avérer utile dans les pathologies inflammatoires caractérisées par la production par les macrophages de cytokines de la phase aiguë, telles que par exemple l'arthrite rhumatoïde ou le relâchement des prothèses articulaires (Santini *et al.*, 2004).

### Chez le cheval

En médecine équine, les pathologies englobent certains stades du syndrome podotrochléaire (naviculaire) et de l'arthropathie dégénérative du tarse (éparvin), mais pourraient s'élargir à d'autres maladies avec remaniement osseux anormal telles que les fractures de fatigue, les lésions kystiques et l'ostéoporose induite par l'immobilisation (Gray *et al.*, 2002). Les tumeurs osseuses ou dentaires et l'hypercalcémie maligne, bien que relativement rares dans cette espèce, pourraient également constituer des indications pertinentes de ces molécules.

Le pamidronate est le premier bisphosphonate à avoir été utilisé chez le cheval. Ses capacités d'inhibition de la minéralisation osseuse avaient d'abord été testées dans un modèle d'induction d'exostoses (Lepage et François, 1989). Il s'était avéré efficace pour inhiber temporairement la néoprolifération osseuse induite par le modèle. Le pamidronate avait ensuite été testé, mais sans succès, sur des chevaux souffrant d'un syndrome podotrochléaire (McGuigan *et al.*, 2000).

Depuis quelques années, l'attention s'est focalisée sur le tiludronate pour une utilisation en médecine équine. Ce principe actif a été mis sur le marché dans la majorité des pays européens, mais pas en Belgique, pour le traitement du syndrome podotrochléaire (Denoix *et al.*, 2003) et de l'arthropathie dégénérative du tarse, mais sur le terrain son champ d'application s'est élargi à d'autres pathologies dont celles précitées. Récemment, son efficacité a été prouvée dans un modèle d'ostéopénie induite par l'immobilisation (Delguste *et al.*, 2007) et dans des cas de dorsalgie associée à des lésions ostéo-articulaires vertébrales (Coudry *et al.*, 2007).

### Chez les autres espèces animales

Chez le chien, le pamidronate a été utilisé avec succès dans des cas d'intoxication à la vitamine D (Rumbeiha *et al.*, 2000), d'hypercalcémie (Hostutler *et al.*, 2005) et d'ostéosarcome appendiculaire (Fan *et al.*, 2007) ; le risédronate dans le cadre de non-usage prolongé induit par immobilisation d'un membre sous plâtre pendant 12 mois (Yang Li *et al.*, 2005) ; l'alendronate pour le traitement de tumeurs osseuses (Tomlin *et al.*, 2000), d'ostéonécrose de la tête fémorale (Bowers *et al.*,

2004) et de perte osseuse autour de prothèses (Jensen *et al.*, 2007) ; et le zolédronate dans un modèle d'ostéo-arthrose secondaire à une pathologie des ligaments croisés (Agnello *et al.*, 2005) et dans la stabilisation des arthroplasties totales de hanches (Wise *et al.*, 2005). L'alendronate a également été proposé dans la prévention de l'ostéoporose de la poule pondeuse (Wilson *et al.*, 1998). Par contre, l'étidronate s'est avéré inefficace dans le contrôle des signes cliniques associés à de la myosite ossifiante progressive chez un chat (Waldron *et al.*, 1985).

### Principaux effets secondaires

Chez l'homme, les principaux effets secondaires des bisphosphonates administrés oralement sont d'origine digestive (ulcères oesophagiens et diarrhée). Avec les amino-bisphosphonates, ces désordres pourraient être dus à une apoptose des cellules épithéliales du tube digestif au même titre que celle induite sur les ostéoclastes par inhibition enzymatique de la voie du mévalonate (Suri *et al.*, 2001). De même, la première administration intraveineuse d'un amino-bisphosphonate peut être accompagnée d'un syndrome gripal (fièvre et douleurs musculaires) dû à un effet pro-inflammatoire de la substance (Santini *et al.*, 2004), phénomène également lié à l'inhibition de la farnesyl pyrophosphate synthase (Coxon *et al.*, 2006). Récemment, un nouvel effet secondaire plus grave a été observé : l'ostéonécrose de la mâchoire induite par les bisphosphonates (Dannemann *et al.*, 2007; Murad *et al.*, 2007). Cette entité est caractérisée par une infection et une nécrose avasculaire des maxillaires, et semble être précipitée par un trauma local comme par exemple une extraction dentaire. Dans 95 % des cas, elle est secondaire à un traitement par voie intraveineuse de bisphosphonates à haute dose pour traiter une pathologie tumorale, alors que son incidence est très faible chez des patients ostéoporotiques traités par des bisphosphonates oraux (Khosla, 2007).

D'autre part, l'administration de bisphosphonates en médecine humaine sans administration concomitante de calcium et/ou de vitamine D provoque une hyperparathyroïdie secondaire (Vasikaran, 2001).

Certaines études suggèrent que l'usage de certains bisphosphonates en cours de croissance pourrait également

s'avérer délétère et aboutir à des anomalies morphologiques de la plaque de croissance et à un ralentissement de la croissance osseuse (Smith *et al.*, 2005).

Sur base des résultats d'une étude sur un modèle canin de réparation de fracture (Monier-Faugere *et al.*, 1999), il semble que les bisphosphonates ne soient par contre pas préjudiciables à la cicatrisation osseuse. Une autre étude sur des chiens a montré que l'administration à long terme de bisphosphonates pouvait engendrer l'accumulation de micro-dégâts dans l'os, mais que ce phénomène était compensé d'un point de vue mécanique par l'augmentation de volume et de minéralisation de l'os (Allen *et al.*, 2006). Une étude similaire récente chez la femme ménopausée recevant des bisphosphonates à long terme n'a cependant pas mis en évidence d'augmentation de l'incidence de micro-fractures dans l'os iliaque (Chapurlat *et al.*, 2007).

Chez le cheval, certains cas de coliques ont été rapportés suite à l'administration de tiludronate à la dose de 1 mg/kg sous forme de perfusion (Varela *et al.*, 2002 ; Delguste *et al.*, 2007). La tolérance du tiludronate sera plus largement discutée dans un paragraphe prévu à cet effet de la section III.

## II. INVESTIGATION DE L'EFFICACITÉ D'UN TRAITEMENT AUX BISPHOSPHONATES

L'évaluation objective de l'efficacité d'un traitement aux bisphosphonates représente un défi, particulièrement chez le cheval, pour plusieurs raisons. Premièrement, aucun modèle expérimental permettant la standardisation des études n'existe pour les pathologies cibles du tiludronate, à savoir le syndrome podotrochléaire et l'arthropathie dégénérative du tarse. Ensuite, les moyens d'évaluation clinique de ces entités pathologiques, principalement les examens de boiterie et les radiographies, sont de sensibilité limitée et leurs résultats potentiellement subjectifs. Ainsi, s'ils permettent en général de poser le diagnostic de la pathologie, ils ne permettent pas d'en suivre étroitement l'évolution. Enfin, le caractère non coopératif et la taille de l'animal rendent indispensable une anesthésie générale pour la réalisation d'examens d'imagerie

plus sensibles tels que le scanner ou la résonnance magnétique. Or, le caractère pas ou peu invasif des techniques de suivi d'efficacité d'un traitement constituent un prérequis indispensable à leur application en routine sur les chevaux de sport candidats à ce type de traitement. De la même façon, l'analyse quantitative des caractéristiques osseuses, par histologie ou par des tests biomécaniques, nécessite des prélèvements osseux invasifs (Steiger *et al.*, 1999), voire l'euthanasie des animaux (Lepage et François, 1989) et de ce fait ne sont pas envisageables en essais cliniques. Le développement de moyens d'investigation non-invasifs pouvant montrer une corrélation avec l'histologie est donc indispensable pour assurer un suivi thérapeutique des bisphosphonates en situation clinique (Lepage *et al.*, 1998). La finalité de ce type d'investigation serait de parvenir à développer un modèle PK-PD du tiludronate chez le cheval, mettant en relation mathématique un paramètre de pharmacocinétique avec l'effet thérapeutique estimé par l'une de ces techniques non invasives. Aucune donnée de ce type n'est disponible actuellement chez le cheval, et celles disponibles en médecine humaine ne concernent que l'ibandronate (Pillai *et al.*, 2004 ; Cremers *et al.*, 2005 ; Reginster et Gieschke, 2006). Par contre, différents moyens d'évaluation non invasive du métabolisme osseux ont été testés chez le cheval. Ainsi, la mesure de la DMO du métacarpien principal par DEXA avec un appareil portable (Pixi, Lunar, France) a été validée sur chevaux debout (Donabedian *et al.*, 2005), et a ensuite été utilisée avec succès dans un modèle d'ostéopénie induite par immobilisation sous plâtre (Delguste *et al.*, 2007). Par contre, l'adaptation de cette technique pour d'autres régions d'intérêt comme le tarse ou le pied n'est pas réalisable avec l'appareil en question pour des raisons techniques de taille de chambre de mesure. La technique du DEXA repose sur l'atténuation par les tissus de deux rayons de photons d'énergie différente, permettant la distinction entre tissus osseux et mous. L'atténuation par le tissu osseux est proportionnelle à sa concentration en calcium, et le résultat (DMO) est exprimé en grammes de calcium par unité de surface. Les deux principales limitations de cette technique sont de ne pas tenir compte la troisième dimension du volume de l'os, et de mesurer simultanément

des densités osseuses corticales et médullaires au niveau du site évalué. Une autre technique d'imagerie utilisée en médecine humaine, la QUS, a également été testée chez le cheval (Carstansen *et al.*, 2002 ; Carstansen *et al.*, 2003a ; 2003b). Cette dernière permet une évaluation de la densité mais également de la microarchitecture osseuse dans sa partie superficielle. Le principe repose sur le temps de propagation (vitesse, *speed of sound* ou SOS) d'ultrasons entre 2 points fixes (un émetteur, un récepteur) situés dans une sonde longitudinale. Cette technique a été validée sur chevaux debout au niveau du métacarpien principal, du radius et du tibia (Carstansen *et al.*, 2002).

Outre ces techniques d'imagerie, les marqueurs sanguins du métabolisme osseux ont été étudiés avec grand intérêt ces dernières années chez le cheval (Lepage *et al.*, 2001 ; McIlwraith, 2005). Ils peuvent être subdivisés en marqueurs soit de la formation soit de la résorption osseuse selon le processus qu'ils reflètent. Ils présentent l'avantage de ne pas nécessiter d'appareillage coûteux ni de tranquillisation ou de manipulation difficile. Leur intérêt en médecine équine est d'autant plus évident qu'il se pourrait que, comme en médecine humaine (Garnero *et al.*, 1994), certains marqueurs de résorption soient des indicateurs précoces de l'effet d'un traitement aux bisphosphonates (Delguste *et al.*, 2007). Les marqueurs sanguins qui ont été le plus étudiés chez le cheval sont les suivants : les phosphatases alcalines osseuses (*bone ALP*), l'ostéocalcine (OC), et le peptide carboxy-terminal du procollagène de type I (PICP) en tant que marqueurs de la formation osseuse, et deux types de carboxy-télopeptides du collagène de type I (CTX-1 et CTX-MMP, anciennement appelé ICTP) en tant que marqueurs de la résorption osseuse (Lepage *et al.*, 2001 ; Price *et al.*, 2001 ; Jackson *et al.*, 2003a). En médecine humaine, les marqueurs de résorption sont communément dosés sur l'urine, par commodité. Cependant, cette commodité n'est pas une réalité chez le cheval, et une étude réalisée chez des chevaux traités au tiludronate suggère que le dosage du CTX-1 urinaire est moins sensible que le CTX-1 plasmatique pour évaluer l'inhibition de la résorption osseuse induite par les bisphosphonates dans cette espèce (Delguste *et al.*, 2008).

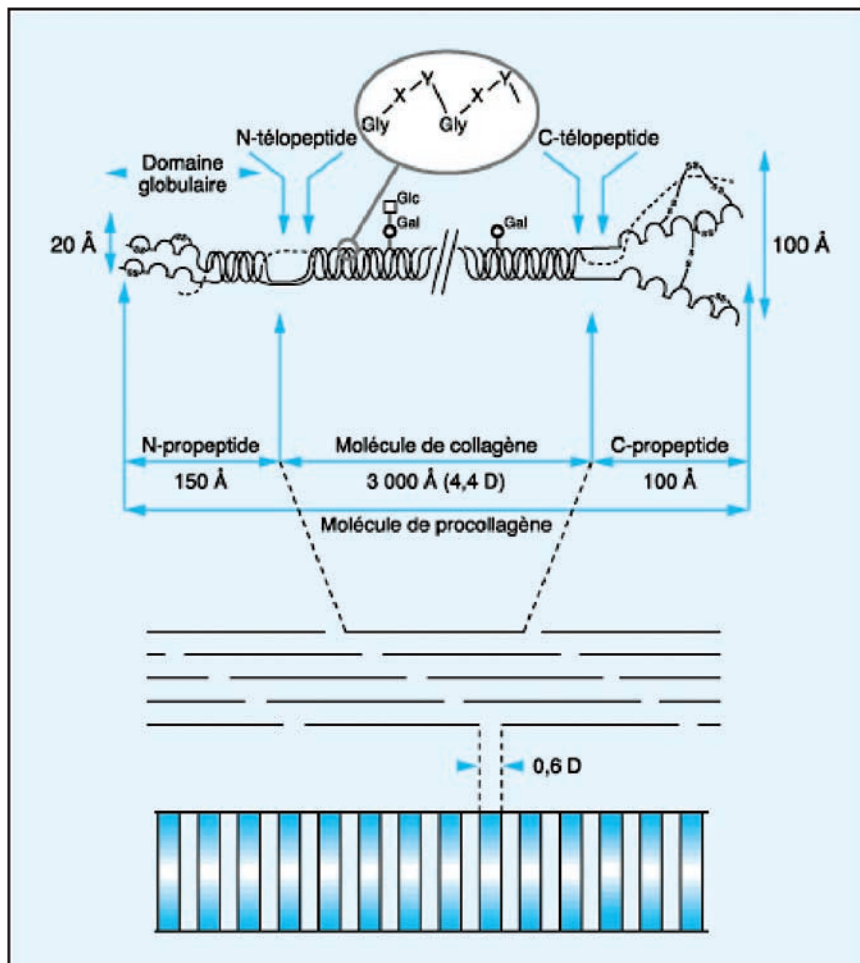
La *bone ALP* est une iso-enzyme associée aux membranes cellulaires des ostéoblastes dont l'activité est concentrée aux sites de minéralisation (Henson *et al.*, 1995), ce qui explique sa spécificité de marqueur de la formation osseuse. Cette iso-enzyme constitue jusqu'à 92 % des phosphatases alcalines totales chez le poulain nouveau-né, contre une vingtaine de pourcents chez les chevaux de plus de 5 ans (Price *et al.*, 1995a). L'OC est une petite protéine non collagénique synthétisée principalement par les ostéoblastes (Camarda *et al.*, 1987), et incorporée dans la matrice extracellulaire de l'os. Une fraction de l'OC nouvellement produite lors de la formation osseuse est libérée dans la circulation sanguine, ce qui permet sa détection en tant que marqueur de la formation osseuse. Cependant, aussi bien de l'OC intacte ainsi que des fragments d'OC sont retrouvés dans le sang (Lepage *et al.*, 2001), et le développement de méthodes de détection spécifiques de l'OC intacte pourrait permettre une évaluation encore plus spécifique de la formation osseuse.

Le collagène de type I est présent dans l'os sous forme de faisceaux assemblés entre eux par différents mécanismes de pontage spécifiques, dont les liaisons croisées hydroxypyridinium, pour former des fibres (figure 3). Lors de la résorption osseuse, cette trame organique est clivée, et différents produits de dégradation, dont le CTX-1, sont libérés dans la circulation pour être éliminés. Ce marqueur de la résorption osseuse, issu de l'extrémité carboxy-terminale du collagène de type I et contenant le site de pontage pyridinium, est très utilisé dans le cadre du suivi de traitements aux bisphosphonates en médecine humaine (Fink *et al.*, 2000 ; Greenspan *et al.*, 2000 ; Rosen *et al.*, 2000 ; Nenonen *et al.*, 2005 ; Lein *et al.*, 2007), et semble particulièrement intéressant dans le suivi d'un traitement au tiludronate chez le cheval également (Varela *et al.*, 2002 ; Delguste *et al.*, 2007).

### III. SYNTHÈSE DES DONNÉES SUR LE TILUDRONATE CHEZ LE CHEVAL

Le tiludronate est actuellement de plus en plus utilisé en pratique équine dans de nombreux pays européens. C'est pourquoi, afin d'en rationaliser l'administration et de bien en cerner les

**Figure 3.** Maturation extracellulaire des molécules de collagène de type I.



La molécule de procollagène de type I est constituée par l'association en triple hélice de deux chaînes alpha 1 et d'une chaîne alpha 2. Elle comprend une zone hélicoïdale, des parties linéaires aux deux extrémités (N et C télopeptides) et des propeptides N et C-terminaux. Lorsque la molécule de collagène est synthétisée et sécrétée dans l'espace extracellulaire, les propeptides amino et carboxy terminaux sont clivés par des enzymes spécifiques et libérés dans la circulation. Les molécules de collagène proprement dite (région hélicoïdale + télopeptides) s'assemblent pour former les microfibrilles de collagène qui se regroupent entre elles pour former la fibre de collagène. (D'après Garnerio *et al.*, 2000)

indications et les limites, il s'avère important de réaliser une synthèse des données disponibles dans la littérature sur ses propriétés pharmacocinétiques, d'efficacité et d'innocuité.

### Pharmacocinétique

Peu de données ont été publiées sur la pharmacocinétique du tiludronate chez le cheval. Cependant, les études réalisées rejoignent les données disponibles sur la souris, le rat, le lapin, le chien et le singe (Davi *et al.*, 1999). En raison de sa forte affinité pour les tissus calcifiés et d'un relargage lent de ce compartiment profond, le tiludronate possède un très grand volume de distribution, estimé à 1,9 L/kg chez le

cheval (Delguste *et al.*, 2008) et sa clairance plasmatique est faible, estimée à 0,026 L/kg/h chez le cheval (Delguste *et al.*, 2008). Sa pharmacocinétique est également caractérisée par une assez forte liaison aux protéines, de l'ordre de 80 % chez le cheval (Agence nationale du Médicament vétérinaire, 2006), une absence de métabolisation, et une élimination quasi exclusivement urinaire de la molécule intacte (Agence nationale du Médicament vétérinaire, 2006). Après dix administrations quotidiennes consécutives de 0,1 mg/kg par voie intraveineuse, 30 à 50 % de la dose administrée est fixée dans l'os (Agence nationale du Médicament vétérinaire, 2006). La distribution du tiludronate au sein de

l'os n'est pas homogène, avec des concentrations supérieures au niveau des sites de remodelage plus intense (Agence nationale du Médicament vétérinaire, 2006), et de l'os trabéculaire que de l'os cortical en règle générale (Delguste *et al.*, 2006). D'autre part, des concentrations osseuses plus faibles chez les sujets plus âgés ont été rapportées chez le rat (Davi *et al.*, 1999), mais ce paramètre n'a pas été étudié chez le cheval. La persistance osseuse du tiludronate est longue, comme en témoignent les concentrations élevées retrouvées au niveau de biopsies du *tuber coxae* chez un hongre sain, sept mois après traitement (Delguste *et al.*, 2006). Par ailleurs, la demi-vie plasmatique chez des chevaux sains a été estimée à environ 51 h (Delguste *et al.*, 2008). Cette dernière a cependant probablement été largement sous-estimée, faute d'une technique de sensibilité suffisante pour la détection de faibles concentrations plasmatiques (LOQ 0,025 mg/L), comme en témoignent des études sur l'alendronate chez l'homme (Lasseter *et al.*, 2005). La pharmacocinétique du tiludronate chez le cheval est linéaire pour des administrations allant de 0,05 à 0,2 mg/kg, soit des posologies comparables à la posologie actuellement enregistrée de 0,1 mg/kg/j (Delguste *et al.*, 2005). D'autre part, la pharmacocinétique semble stationnaire suite à l'administration de 10 doses quotidiennes consécutives de 0,1 mg/kg, lesquelles ne mènent pas à une accumulation notable, avec un ratio de l'ordre de 1,3 (Delguste *et al.*, 2005 ; 2008). Cette faible accumulation peut sembler étonnante sur base de la demi-vie estimée du tiludronate chez le cheval de 51 h (Delguste *et al.*, 2008), mais s'explique probablement par la grande différence entre la demi-vie plasmatique apparente lors des phases initiales de distribution et d'élimination, et la probable véritable demi-vie d'élimination terminale suite au relargage progressif et de faible intensité à partir du compartiment osseux, les 51 h rapportées étant vraisemblablement un « compromis » de fiabilité limitée entre ces valeurs (Delguste *et al.*, 2008). D'autre part, ce facteur d'accumulation est vraisemblablement sous-estimé du fait du nombre limité d'administrations quotidiennes consécutives par rapport à la probable véritable demi-vie terminale. De même, la demi-vie plasmatique de 4,5 h annoncée pour la formulation commerciale du tiludronate est une

estimation à partir des phases initiales de distribution et d'élimination et ne correspond pas à la véritable demi-vie d'élimination terminale de la molécule.

Récemment, une technique d'administration de tiludronate en injection loco-régionale sous garrot a également été décrite (Desbrosse, 2007). La technique consiste en l'administration de 150 mg de tiludronate par cheval dans la veine digitée latérale. Malheureusement, aucune étude pharmacocinétique n'est disponible pour ce type d'administration. S'il est certain que cette nouvelle voie d'administration recherche une action inhibitrice de la résorption locale plus importante au niveau de la zone osseuse affectée, en pratique il semble qu'elle donne également lieu à des effets généraux plus larges dont une action analgésique relativement rapide mais encore inexplicée (Godfrin *et al.*, 2000 ; Bender *et al.*, 2006).

### Innocuité

La tolérance suite à l'administration intraveineuse du tiludronate au cheval est bonne, que ce soit suite à 10 injections quotidiennes de 0,1 mg/kg ou à une perfusion lente de 1 mg/kg. Le principal effet secondaire pouvant être observé après l'administration de tiludronate est des signes de colique légers à modérés et régressant spontanément, chez moins de 5 % des chevaux après administration de 0,1 mg/kg (Agence nationale du Médicament vétérinaire, 2006), et chez 10 à 40 % des chevaux après administration de 1 mg/kg en perfusion lente (Varela *et al.*, 2002; Delguste *et al.*, 2007 ; 2008). Cette incidence est comparable à celle des effets secondaires gastro-intestinaux rencontrés chez l'homme après administration de tiludronate et d'autres bisphosphonates par voie orale, estimée à 20 à 25 % (Reginster, 1992).

Si aucun effet délétère n'a été constaté sur les fonctions hépatique et rénale, une légère augmentation de la fréquence cardiaque et une légère hypocalcémie, toutes deux transitoires, ont été démontrées dans une étude réalisée chez des chevaux où le tiludronate a été administré sous forme de perfusion intraveineuse lente de 1 mg/kg (Varela *et al.*, 2002). L'hypocalcémie ne concernait que le calcium total et pas l'ionisé, ce qui expliquait l'absence de signes cliniques associés. Toutefois, les auteurs de cette étude recomman-

dent, en raison du risque d'hypocalcémie plus sévère, un respect rigoureux des précautions d'administration du tiludronate à cette posologie en termes de volume de solution et de vitesse de perfusion, à savoir 1 litre en 20 à 30 minutes minimum quels que soient l'âge et la taille de l'animal.

### Efficacité

Dans l'espèce équine, une première étude a été réalisée sur 5 chevaux adultes sains (Varela *et al.*, 2002) pour étudier les effets à court terme d'une perfusion intraveineuse de 1 mg/kg de tiludronate sur différents marqueurs sanguins du métabolisme osseux (OC, *bone* ALP, ICTP et CTX-1). Seul un effet significatif sur le CTX-1 a été observé, avec une chute moyenne de 72,4 % du taux de ce marqueur par rapport à la valeur basale 24 heures après le traitement.

Une autre étude a ensuite été menée sur un modèle expérimental d'ostéopénie induite par immobilisation sous plâtre d'un membre antérieur, suivie par un retour à l'entraînement (Delguste *et al.*, 2007). Seize hongres adultes sains ont été immobilisés pendant 8 semaines. Huit d'entre eux ont reçu un placebo et les 8 autres du tiludronate à raison de deux perfusions intraveineuses de 1 mg/kg, l'une en début et l'autre à mi-immobilisation, soit à 4 semaines d'intervalle. Contrairement à l'administration de placebo, chaque administration de tiludronate a induit une chute significative du CTX-1 sérique de l'ordre de 50 % en 24 heures. Tandis que les taux de ce marqueur sont restés supérieurs à leur valeur basale pendant les 6 premières semaines d'immobilisation chez les animaux ayant reçu le placebo, les taux de CTX-1 des chevaux traités au tiludronate sont restés sous leur niveau basal pendant la quasi-totalité de l'étude. La différence entre les deux groupes de traitements était significative pendant au minimum 1 semaine après chaque administration. Par contre, aucun effet du traitement sur la *bone* ALP n'a été mis en évidence, suggérant l'absence d'effet indésirable du tiludronate sur la formation osseuse à cette dose. Le traitement au tiludronate a également permis de prévenir la chute de DMO observée à long terme (soit 12 semaines après la fin de l'immobilisation) sur le métacarpien principal du membre plâtré. Ainsi, une chute de presque 10 % de la DMO moyenne a

été constatée dans le groupe placebo, contre une diminution de 2 % dans le groupe traité au tiludronate. Par contre, cet effet préventif ne s'est pas marqué au niveau du membre controlatéral, où une chute modérée de DMO (de l'ordre de 5 %) a été constatée aussi bien dans le groupe placebo que dans le groupe traité, confirmant l'affinité plus importante du tiludronate pour les sites subissant un processus de résorption plus intense, en l'occurrence le membre plâtré dans cette étude. Aucun effet de l'immobilisation ni du traitement n'a par contre été mesuré par QUS sur la face latérale du métacarpien principal, suggérant l'absence de remaniement significatif dans le cortex osseux superficiel de cet os. Enfin, aucun effet significatif du traitement sur les scores de boiterie n'a pu être mis en évidence au travers de cette étude, malgré les hypothèses d'effet analgésique des bisphosphonates en général (Bender *et al.*, 2006), et d'effet anti-inflammatoire des non-amino-bisphosphonates, dont fait partie le tiludronate, en particulier (Monkkonen *et al.*, 1998).

Deux études cliniques ont été menées afin de tester l'efficacité du tiludronate dans le cadre de différentes pathologies à composante osseuse chez le cheval. La première concernait le syndrome naviculaire (Denoix *et al.*, 2003), et comparait l'efficacité de 2 posologies (10 injections quotidiennes consécutives de 0,05 et 0,1 mg/kg, respectivement) sur deux sous-groupes de chevaux souffrant du syndrome naviculaire soit en forme aiguë (n = 33), soit en forme chronique (n = 17). Le suivi clinique était de 6 mois, et l'efficacité était évaluée en fonction de la réponse au traitement en termes de lésions radiographiques, de scores de boiterie, de réponse aux tests de flexion et d'extension des membres, et de retour à un niveau d'activité normal. La posologie la plus élevée s'est avérée efficace, contrairement à la plus faible et au placebo, pour améliorer les boiteries d'apparition récente (< 6 mois) et favoriser le retour à un niveau d'activité normal. Par contre, aucun effet statistiquement significatif du traitement sur les lésions radiographiques ou sur les réponses aux tests de flexion n'a pu être mis en évidence chez ces mêmes chevaux. Aucun effet significatif du traitement n'a pu être mis en évidence non plus sur les cas chroniques, possiblement à cause du

nombre restreint de sujets dans cette catégorie et de la nécessité d'administrer plusieurs traitements en cas de pathologie chronique.

La seconde étude clinique a testé l'efficacité du tiludronate sur 15 chevaux versus un placebo administré à 14 chevaux dans des cas de dorsalgie associée à des lésions d'ostéo-arthrose au niveau de la colonne thoraco-lombaire (Coudry *et al.*, 2007). La posologie était de 1 mg/kg en perfusion intraveineuse lente, et le suivi clinique de 4 mois. Le tiludronate s'est avéré efficace en termes d'amélioration clinique de la flexibilité dorsale suite au traitement. Par contre, aucune évolution n'a pu être objectivée sur les images radiographiques et scintigraphiques.

En résumé, chez le cheval, l'administration intraveineuse lente de tiludronate à la dose de 1 mg/kg est bien tolérée et provoque une chute significative et reproductible du taux de CTX-1 dans le sang, ce qui suggère d'une part que ce marqueur est un indicateur sensible de l'effet du traitement et d'autre part que le tiludronate est un inhibiteur efficace de la résorption osseuse dans cette espèce. L'administration de cette dose sous forme de 10 administrations quotidiennes consécutives de 0,1 mg/kg donne lieu à des résultats moins reproductibles sur le CTX-1, mais à des expositions plasmatiques similaires. La capacité du tiludronate à prévenir l'ostéopénie objectivée par des mesures de DMO en modèle expérimental confirme son efficacité en tant qu'inhibiteur de la résorption osseuse. Une efficacité clinique a également été démontrée à la dose totale de 1 mg/kg administrée en 10 administrations quotidiennes consécutives de 0,1 mg/kg dans des cas de syndrome podotrochléaire provoquant une boiterie d'apparition récente, ainsi que dans certains cas de dorsalgie associée à des

lésions radiographiques de la colonne sous forme d'administration en perfusion unique. Par contre, l'amélioration clinique chez ces animaux n'a pu être objectivée par les techniques d'imagerie classiques. Dans l'état actuel des connaissances, l'adaptation des posologies et la fréquence de répétition des traitements en situation clinique restent à déterminer.

#### IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les bisphosphonates, et le tiludronate en particulier puisqu'il est le seul actuellement disponible en Europe avec une autorisation de mise sur le marché pour les chevaux, constituent une classe de médicaments dont les champs d'applications sont multiples, comme en témoignent les études réalisées en médecine humaine (Russell, 2007). Cette classe de médicament est probablement sous-exploitée chez le cheval, mais la réalisation d'études cliniques probantes chez cette espèce est limitée par les difficultés considérables d'évaluation objective de leurs effets. D'autre part, aucun modèle expérimental n'existe pour les principales pathologies-cibles actuelles du tiludronate chez le cheval, dont le syndrome podotrochléaire et l'arthropathie dégénérative du tarse. De larges études multicentriques seront donc encore nécessaires pour mieux documenter l'efficacité du tiludronate sur différentes pathologies ostéo-articulaires chez le cheval en situation clinique et en optimiser la posologie. D'autre part, la possibilité d'une action analgésique et/ou anti-inflammatoire du tiludronate restant ouverte, son administration en tant que tel pourrait être mise à profit dans un cadre dépassant celui des pathologies locomotrices à composante osseuse. De là découle-

rait la question d'un éventuel effet dopant chez les chevaux athlètes en compétition, et, le cas échéant, de la nécessité d'une méthode sensible de sa détection chez ces chevaux. Enfin, il se pourrait que d'autres molécules fassent leur apparition sur le marché vétérinaire, et notamment des aminobisphosphonates, qui en tant qu'inhibiteurs plus puissants de la résorption osseuse, pourraient s'avérer plus efficaces dans le traitement de certaines pathologies osseuses du cheval.

#### SUMMARY

Tiludronate, a bisphosphonate, has recently been licensed in several European countries, but not in Belgium, for the treatment of navicular disease and osteoarthritis of the hock joints (bone spavin) in horses. In a first part, this review article summarizes the main pharmacological properties of this class of drugs, as well as their indications in both human and veterinary medicine. In a second part, the methods of efficacy assessment of bisphosphonates, along with the difficulties encountered in their application in horses, are discussed. Finally, a review of available data about pharmacology of tiludronate in horses is presented. In conclusion, tiludronate seems to be promising in the field of locomotor diseases therapy in horses, but further studies are still required in order to better document their potentials and limitations.

#### BIBLIOGRAPHIE

AGENCE NATIONALE DU MEDICAMENT VETERINAIRE (FRANCE) Tildren. [en ligne] (2006) Adresse URL : [http://www.anmv.afssa.fr/ircpweb/SpFrame.asp?Product\\_Identifier=11823](http://www.anmv.afssa.fr/ircpweb/SpFrame.asp?Product_Identifier=11823), consulté le 11/12/2007.

AGNELLO K.A., TRUMBLE T.N., CHAMBERS J.N., SEEWALD

W., BUDSBERG S.C. Effects of zoledronate on markers of bone metabolism and subchondral bone mineral density in dogs with experimentally induced cruciate-deficient osteoarthritis. *Am. J. Vet. Res.*, 2005, **66**, 1487-1495.

ALLEN M.R., IWATA K., PHIPPS R., BURR D.B. Alterations in

canine vertebral bone turnover, microdamage accumulation, and biomechanical properties following 1-year treatment with clinical treatment doses of risedronate or alendronate. *Bone*, 2006, **39**, 872-879.

ALVES-ROSA F., STANGANELLI C., CABRERA J.,



- CYMBERKNOP D., RUBEL C., VANZULLI S., VAN ROOIJEN N., PALERMO M., ISTURIZ M.A. Rapid recovery of platelet count following administration of liposome-encapsulated clodronate in a mouse model of immune thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.*, 2002, **116**, 357-366.
- ATTENBURROW D.P., BOWRING C.S., VENNART W. Radioisotope bone scanning in horses. *Equine Vet. J.*, 1984, **16**, 121-124.
- BAKAL R.S., LOVE N.E., LEWBART G.A., BERRY C.R. Imaging a spinal fracture in a Kohaku Koi (*Cyprinus carpio*): techniques and case history report. *Vet. Radiol. Ultrasound*, 1998, **39**, 318-321.
- BENDER T., DONATH J., BARNA I., GERGELY P., JR., POOR G. The analgesic effect of pamidronate is not caused by the elevation of beta endorphin level in Paget's disease: a controlled pilot study. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 2006, **27**, 513-515.
- BERG J., LAMB C.R., O'CALLAGHAN M.W. Bone scintigraphy in the initial evaluation of dogs with primary bone tumors. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1990, **196**, 917-920.
- BONJOUR J.P., AMMANN P., BARBIER A., CAVERZASIO J., RIZZOLI R. Tiludronate: bone pharmacology and safety. *Bone*, 1995, **17**, 473S-477S.
- BOONEKAMP P.M., VAN DER WEE-PALS L.J., VAN WIJK-VAN LENNEP M.M., THESING C.W., BIJVOET O.L. Two modes of action of bisphosphonates on osteoclastic resorption of mineralized matrix. *Bone Miner.*, 1986, **1**, 27-39.
- BOWERS J.R., DAILIANA Z.H., MCCARTHY E.F., URBANIAK J.R. Drug therapy increases bone density in osteonecrosis of the femoral head in canines. *J. Surg. Orthop. Adv.*, 2004, **13**, 210-216.
- CAMARDA A.J., BUTLER W.T., FINKELMAN R.D., NANJI A. Immunocytochemical localization of gamma-carboxyglutamic acid-containing proteins (osteocalcin) in rat bone and dentin. *Calcif. Tissue Int.*, 1987, **40**, 349-355.
- CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., DETILLEUX J., DUBOEUF F., AMORY H. Use of multisite quantitative ultrasonography for noninvasive assessment of bone in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 2002, **63**, 1464-1469.
- CARSTANJEN B., DUBOEUF F., DETILLEUX J., LEPAGE O.M. Equine third metacarpal bone assessment by quantitative ultrasound and dual energy X-ray absorptiometry: an ex vivo study. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2003a, **50**, 42-47.
- CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., HARS O., LANGLOIS P., DUBOEUF F., AMORY H. Speed of sound measurements of the third metacarpal bone in young exercising thoroughbred racehorses. *Bone*, 2003b, **33**, 411-418.
- CHAPPARD D., MINAIRE P., PRIVAT C., BERARD E., MENDOZA-SARMIENTO J., TOURNEBISE H., BASLE M.F., AUDRAN M., REBEL A., PICOT C., ET AL. Effects of tiludronate on bone loss in paraplegic patients. *J. Bone Miner. Res.*, 1995, **10**, 112-118.
- CHAPURLAT R.D., ARLOT M., BURT-PICHAT B., CHAVASSIEUX P., ROUX J.P., PORTERO-MUZY N., DELMAS P.D. Microcrack frequency and bone remodeling in postmenopausal osteoporotic women on long-term bisphosphonates: a bone biopsy study. *J. Bone Miner. Res.*, 2007, **22**, 1502-1509.
- CHAVDAROVA L., PIPERKOVA E., TSONEVSKA A., TIMCHEVA K., DIMITROVA M. Bone scintigraphy in the monitoring of treatment effect of bisphosphonates in bone metastatic breast cancer. *J. Buon.*, 2006, **11**, 499-504.
- CHOI J.H., SHIN Y.L., YOO H.W. Short-term efficacy of monthly pamidronate infusion in patients with osteogenesis imperfecta. *J. Korean Med. Sci.*, 2007, **22**, 209-212.
- CLEZARDIN P., EBETINO F.H., FOURNIER P.G. Bisphosphonates and cancer-induced bone disease: beyond their antiresorptive activity. *Cancer Res.*, 2005, **65**, 4971-4974.
- COUDRY V., THIBAUD D., RICCIO B., AUDIGIE F., DIDIERLAURENT D., DENOIX J.M. 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.*, 2007, **68**, 329-337.
- COXON F.P., THOMPSON K., ROGERS M.J. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2006, **6**, 307-312.
- CREMERS S.C., PILLAI G., PAPAPOULOS S.E. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin. Pharmacokinet.*, 2005, **44**, 551-570.
- DANNEMANN C., GRATZ K.W., RIENER M.O., ZWAHLEN R.A. Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy: a severe secondary disorder. *Bone*, 2007, **40**, 828-834.
- DAUBINE F., LE GALL C., GASSER J., GREEN J., CLEZARDIN P. Antitumor effects of clinical dosing regimens of bisphosphonates in experimental breast cancer bone metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2007, **99**, 322-330.
- DAVI H., TRONQUET C., CAIX J., SIMIAND J., BRIOT C., BERGER Y., THIERCELIN J.F. Disposition of tiludronate (Skelid) in animals. *Xenobiotica*, 1999, **29**, 1017-1031.
- DAVID P., NGUYEN H., BARBIER A., BARON R. The bisphosphonate tiludronate is a potent inhibitor of the osteoclast vacuolar H(+)-ATPase. *J. Bone Miner. Res.*, 1996, **11**, 1498-1507.
- DELGUSTE C., AMORY H., GUYONNET J., THIBAUD D., GARNERO P., DETILLEUX J., LEPAGE O.M., DOUCET M. 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.*, 2008, **31**, 108-116.
- DELGUSTE C., DOUCET M., AMORY H., GUYONNET J., THIBAUD D. Linearity and stationarity of the pharmacokinetics of tiludronate in horses. In : American Academy

- of Veterinary Pharmacology & Therapeutics 14th Biennial Symposium, Washington D.C., USA, 2005.
- DELGUSTE C., DOUCET M., GABRIEL A., LEPAGE O.M., THIBAUD D., AMORY H. Assessment of a bone biopsy technique for tiludronic acid dosage in horses: a preliminary study. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 2006, **29**, Suppl. 1, 299-300.
- DELGUSTE C., AMORY H., DOUCET M., PICCOT-CREZOLLET C., THIBAUD D., GARNERO P., DETILLEUX J., LEPAGE O.M. Pharmacological effects of tiludronate in horses after long-term immobilization. *Bone*, 2007, **41**, 414-421.
- DENOIX J.M., THIBAUD D., RICCIO B. Tiludronate as a new therapeutic agent in the treatment of navicular disease: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Equine Vet. J.*, 2003, **35**, 407-413.
- DESBROSSE F. Les traitements du syndrome naviculaire. In : 10<sup>e</sup> Congrès de médecine et chirurgie équine, 11-13 décembre 2007, Genève, Suisse, 192-200.
- DEVOGELAER J.P., GOEMAERE S., BOONEN S., BODY J.J., KAUFMAN J.M., REGINSTER J.Y., ROZENBERG S., BOUTSEN Y. Evidence-based guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Osteoporos. Int.*, 2006, **17**, 8-19.
- DIMEGLIO L.A., PEACOCK M. Two-year clinical trial of oral alendronate versus intravenous pamidronate in children with osteogenesis imperfecta. *J. Bone Miner. Res.*, 2006, **21**, 132-140.
- DONABEDIAN M., DELGUSTE C., PERONA G., LEBECQUE P., DUBOEUF F., LEPAGE O.M., MARTIN-ROSSET W. Third metacarpal bone mineral density assessment in the standing horse by dual X-ray absorptiometry - Suitability, precision and accuracy. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.*, 2005, **18**, 26-30.
- EAST L.M., STEYN P.F., DICKINSON C.E., FRANK A.A. Occult osseous metastasis of a colonic adenocarcinoma visualized with technetium tc 99m hydroxymethylene diphosphate scintigraphy in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **213**, 1167-1170, 1132-1163.
- EBETINO F.H. Elucidation of a pharmacophore for the bisphosphonate mechanism of bone antiresorptive activity. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.*, 1996, **110**, 217-220.
- EBRAHIMPOUR A., FRANCIS M.D. Bisphosphonate therapy in acute and chronic bone loss: Physical chemical considerations in bisphosphonate-related therapies. In : Bijvoet O., Fleisch H.A., Canfield R.E., Russell R.G.G. (Eds.), *Bisphosphonate on Bones*. Elsevier : Amsterdam, 1995.
- FAN T.M., DE LORIMIER L.P., O'DELL-ANDERSON K., LACOSTE H.I., CHARNEY S.C. Single-agent pamidronate for palliative therapy of canine appendicular osteosarcoma bone pain. *J. Vet. Intern. Med.*, 2007, **21**, 431-439.
- FINKE., 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 in bone disease: from the laboratory to the patient. The Parthenon Publishing Group : New York, 1997, 59 p.
- GARNERO P., SHIH W.J., GINEYTS E., KARP F. D.B., DELMAS P.D. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1994, **79**, 1693-1700.
- GODFRIN B., ALVAREZ M., LAROCHE M., OLLIER S., DINGREMONT C., SAILLER L., ARLET P. Effet antalgique d'une perfusion de bisphosphonates à la phase aiguë d'un tassement vertébral ostéoporotique chez le sujet âgé. *Rev. Med. Interne*, 2000, **21**, 1004-1005.
- GRAY A.W., DAVIES M.E., JEFFCOTT L.B. Generation and activity of equine osteoclasts in vitro: effects of the bisphosphonate pamidronate (APD). *Res. Vet. Sci.*, 2002, **72**, 105-113.
- GREENSPAN S.L., ROSEN H.N., PARKER R.A. Early changes in serum N-telopeptide and C-telopeptide cross-linked collagen type I predict long-term response to alendronate therapy in elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, **85**, 3537-3540.
- HEIKKILA P., TERONEN O., MOILANEN M., KONTTINEN Y.T., HANEMAAIJER R., LAITINEN M., MAISI P., VAN DER PLUIJM G., BARTLETT J.D., SALO T., SORSA T. Bisphosphonates inhibit stromelysin-1 (MMP-3), matrix metalloelastase (MMP-12), collagenase-3 (MMP-13) and enamelysin (MMP-20), but not urokinase-type plasminogen activator, and diminish invasion and migration of human malignant and endothelial cell lines. *Anticancer. Drugs*, 2002, **13**, 245-254.
- HEIKKILA P., TERONEN O., HIRN M.Y., SORSA T., TERVAHARTIALA T., SALO T., KONTTINEN Y.T., HALTTUNEN T., MOILANEN M., HANEMAAIJER R., LAITINEN M. Inhibition of matrix metalloproteinase-14 in osteosarcoma cells by clodronate. *J. Surg. Res.*, 2003, **111**, 45-52.
- HENSON F.M., DAVIES M.E., SKEPPER J.N., JEFFCOTT L.B. Localisation of alkaline phosphatase in equine growth cartilage. *J. Anat.*, 1995, **187** (Pt 1), 151-159.
- HOSTUTLER R.A., CHEW D.J., JAEGER J.Q., KLEIN S., HENDERSON D., DIBARTOLA S.P. Uses and effectiveness of pamidronate disodium for treatment of dogs and cats with hypercalcemia. *J. Vet. Intern. Med.*, 2005, **19**, 29-33.
- HUGHES D.E., WRIGHT K.R., UY H.L., SASAKI A., YONEDA T., ROODMAN G.D., MUNDY G.R., BOYCE B.F. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.*, 1995, **10**, 1478-1487.

- IGUCHI T., MIYAKAWA Y., SAITOK., NAKABAYASHI C., NAKANISHI M., SAYA H., IKEDA Y., KIZAKI M. Zoledronate-induced S phase arrest and apoptosis accompanied by DNA damage and activation of the ATM/Chk1/cdc25 pathway in human osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.*, 2007, **31**, 285-291.
- ISHIKAWA C., MATSUDA T., OKUDAIRA T., TOMITA M., KAWAKAMI H., TANAKA Y., MASUDA M., OHSHIRO K., OHTAT., MORIN. Bisphosphonate incadronate inhibits growth of human T-cell leukaemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukaemia cells by interfering with the mevalonate pathway. *Br. J. Haematol.*, 2007, **136**, 424-432.
- JACKSON B.F., GOODSHIP A.E., EASTELL R., PRICE J.S. Evaluation of serum concentrations of biochemical markers of bone metabolism and insulin-like growth factor I associated with treadmill exercise in young horses. *Am. J. Vet. Res.*, 2003a, **64**, 1549-1556.
- JENSEN T.B., BECHTOLD J.E., CHEN X., SOBALLE K. Systemic alendronate treatment improves fixation of press-fit implants: a canine study using nonloaded implants. *J. Orthop. Res.*, 2007, **25**, 772-778.
- KEEGAN K.G., WILSON D.A., LATTIMER J.C., TWARDOCK A.R., ELLERSIECK M.R. Scintigraphic evaluation of <sup>99m</sup>Tc-methylene diphosphonate uptake in the navicular area of horses with lameness isolated to the foot by anesthesia of the palmar digital nerves. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 415-421.
- KHOSLA S. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J. Bone Miner. Res.*, 2007, **22**, 1479-1491.
- KIELY P., WARD K., BELLEMORE C.M., BRIODY J., COWELL C.T., LITTLE D.G. Bisphosphonate rescue in distraction osteogenesis: a case series. *J. Pediatr. Orthop.*, 2007, **27**, 467-471.
- KOBLIK P.D., HORNOF W.J., SEEHERMAN H.J. Scintigraphic appearance of stress-induced trauma of the dorsal cortex of the third metacarpal bone in racing Thoroughbred horses: 121 cases (1978-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1988, **192**, 390-395.
- KUMAR V., KUMAR D., HOWMANGILES R.B., LITTLE D.G. Is (99m)Tc-labelled pamidronate a better agent than (99m)Tc-medronate for bone imaging? *Nucl. Med. Commun.*, 2007, **28**, 101-107.
- LAMBRINOUDAKI I., CHRISTODOULAKOS G., BOTSIS D. Bisphosphonates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, **1092**, 397-402.
- LASSETER K.C., PORRAS A.G., DENKER A., SANTHANAGOPAL A., DAIFOTIS A. Pharmacokinetic considerations in determining the terminal elimination half-lives of bisphosphonates. *Clin. Drug Investig.*, 2005, **25**, 107-114.
- LEIN M., WIRTH M., MILLER K., EICKENBERG H.U., WEISSBACH L., SCHMIDT K., HAUS U., STEPHAN C., MEISSNER S., LOENING S.A., JUNG K. Serial markers of bone turnover in men with metastatic prostate cancer treated with zoledronic acid for detection of bone metastases progression. *Eur. Urol.*, 2007, **52**, 1381-1387.
- 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'AHPBP (APD). Applications possibles au cheval d'arme. *Ann. Med. Milit. Belg.*, 1989, **3**, 38-44.
- 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.
- LIN J.H., CHEN I.W., DUGGAN D.E. Effects of dose, sex, and age on the disposition of alendronate, a potent antiosteolytic bisphosphonate, in rats. *Drug Metab. Dispos.*, 1992, **20**, 473-478.
- LOWING K., ASTROM E., OSCARSSON K.A., SODERHALL S., ELIASSON A.C. Effect of intravenous pamidronate therapy on everyday activities in children with osteogenesis imperfecta. *Acta Paediatr.*, 2007, **96**, 1180-1183.
- MAKKONEN N., SALMINEN A., ROGERS M.J., FRITH J.C., URTTI A., AZHAYEVA E., MONKKONEN J. Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 1999, **8**, 109-118.
- MASARACHIA P., WEINREB M., BALENA R., RODAN G.A. Comparison of the distribution of <sup>3H</sup>-alendronate and <sup>3H</sup>-etidronate in rat and mouse bones. *Bone*, 1996, **19**, 281-290.
- MATHES M., JORDAN M., DOW S. Evaluation of liposomal clodronate in experimental spontaneous autoimmune hemolytic anemia in dogs. *Exp. Hematol.*, 2006, **34**, 1393-1402.
- 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. In: **Proceedings of the 39<sup>th</sup> British Equine Veterinary Association Congress**, Birmingham, UK, 2000, 207.
- MCILWRAITH C.W. Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Vet. J.*, 2005, **37**, 473-482.
- MERRELL M.A., WAKCHOURE S., LEHENKARI P.P., HARRIS K.W., SELANDER K.S. Inhibition of the mevalonate pathway and activation of p38 MAP kinase are independently regulated by nitrogen-containing bisphosphonates in breast cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, **570**, 27-37.
- MOLINUEVO M.S., BRUZZONE L., CORTIZO A.M. Alendronate induces anti-migratory effects and inhibition of neutral phosphatases in UMR106 osteosarcoma cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007, **562**, 28-33.
- MONIER-FAUGERE M.C., GENG Z., PASCHALISE P., QIQ., ARNALA

- I., BAUSS F., BOSKEY A.L., MALLUCHE H.H. Intermittent and continuous administration of the bisphosphonate ibandronate in ovariectomized beagle dogs: effects on bone morphometry and mineral properties. *J. Bone Miner. Res.*, 1999, **14**, 1768-1778.
- MONKKONEN H., AURIOLA S., LEHENKARI P., KELLINSALMI M., HASSINEN I.E., VEPSALAINEN J., MONKKONEN J. A new endogenous ATP analog (AppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, **147**, 437-445.
- MONKKONEN J., SIMILA J., ROGERS M.J. Effects of tiludronate and ibandronate on the secretion of proinflammatory cytokines and nitric oxide from macrophages in vitro. *Life Sci.*, 1998, **62**, PL95-102.
- MONTALVETTI A., BAILEY B.N., MARTIN M.B., SEVERIN G.W., OLDFIELD E., DOCAMPO R. Bisphosphonates are potent inhibitors of Trypanosoma cruzi farnesyl pyrophosphate synthase. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 33930-33937.
- MORALES-PIGA A. Tiludronate. A new treatment for an old ailment: Paget's disease of bone. *Expert Opin. Pharmacother.*, 1999, **1**, 157-170.
- MURAD O.M., ARORA S., FARAG A.F., GUBER H.A. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: a retrospective study. *Endocr. Pract.*, 2007, **13**, 232-238.
- MURAKAMI H., TAKAHASHI N., TANAKA S., NAKAMURA I., UDAGAWA N., NAKAJO S., NAKAYA K., ABE M., YUDA Y., KONNO F., BARBIER A., SUDA T. Tiludronate inhibits protein tyrosine phosphatase activity in osteoclasts. *Bone*, 1997, **20**, 399-404.
- NENONEN A., CHENG S., IVASKA K.K., ALATALO S.L., LEHTIMAKI T., SCHMIDT-GAYK H., UUSI-RASI K., HEINONEN A., KANNUS P., SIEVANEN H., VUORI I., VAANANEN H.K., HALLEEN J.M. Serum TRACP 5b is a useful marker for monitoring alendronate treatment: comparison with other markers of bone turnover. *J. Bone Miner. Res.*, 2005, **20**, 1804-1812.
- PENNISI P., PIZZARELLI G., SPINA M., RICCOBENE S., FIORE C.E. Quantitative ultrasound of bone and clodronate effects in thalassemia-induced osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.*, 2003, **21**, 402-408.
- PERIS P., ALVAREZ L., MONEGAL A., GUANABENS N., DURAN M., ECHEVARRIA M., ROS I., BALLESTA A.M., MUNOZ-GOMEZ J. Effect of surgical menopause and Paget's disease of bone on the isomerization of type I collagen carboxyterminal telopeptide: evolution after antiresorptive therapy. *J. Bone Miner. Metab.*, 2002, **20**, 116-120.
- PERIS P., ALVAREZ L., VIDAL S., KASPER D., LEEMING D.J., MONEGAL A., ANGELES MARTINEZ M., PONS F., GUANABENS N. Biochemical response to bisphosphonate therapy in pagetic patients with skull involvement. *Calcif. Tissue Int.*, 2006, **79**, 22-26.
- PERIS P. Treatment with tiludronate has a similar effect to risedronate on Paget's disease activity assessed by bone markers and bone scintigraphy. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2007, **25**, 206-210.
- PILLAI G., GIESCHKE R., GOGGIN T., JACQMIN P., SCHIMMER R.C., STEIMER J.L. A semimechanistic and mechanistic population PK-PD model for biomarker response to ibandronate, a new bisphosphonate for the treatment of osteoporosis. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2004, **58**, 618-631.
- 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.*, 1995a, **27**, 201-207.
- PRICE J.S., JACKSON B.F., GRAY J.A., HARRIS P.A., WRIGHT I.M., PFEIFFER D.U., ROBINS S.P., EASTELL R., RICKETTS S.W. Biochemical markers of bone metabolism in growing thoroughbreds: a longitudinal study. *Res. Vet. Sci.*, 2001, **71**, 37-44.
- RAUCH F., GLORIEUX F.H. Treatment of children with osteogenesis imperfecta. *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2006, **4**, 159-164.
- RAVN P., NEUGEBAUER G., CHRISTIANSEN C. Association between pharmacokinetics of oral ibandronate and clinical response in bone mass and bone turnover in women with postmenopausal osteoporosis. *Bone*, 2002, **30**, 320-324.
- REGINSTER J.Y., JEUGMANS-HUYNEN A.M., ALBERT A., DENIS D., DEROISY R., LECART M.P., FONTAINE M.A., COLLETTE J., FRANCHIMONT P. Biological and clinical assessment of a new bisphosphonate, (chloro-4 phenyl) thiomethylene bisphosphonate, in the treatment of Paget's disease of bone. *Bone*, 1988, **9**, 349-354.
- 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**, 1469-1471.
- REGINSTER J.Y. Oral tiludronate: pharmacological properties and potential usefulness in Paget's disease of bone and osteoporosis. *Bone*, 1992, **13**, 351-354.
- REGINSTER J.Y., COLSON F., MORLOCK G., COMBE B., ETHGEN D., GEUSENS P. Evaluation of the efficacy and safety of oral tiludronate in Paget's disease of bone: a double-blind, multiple-dosage, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum.*, 1992, **35**, 967-974.
- REGINSTER J.Y., LECART M.P., DEROISY R., ETHGEN D., ZEGELS B., FRANCHIMONT P. Paget's disease of bone treated with a five day course of oral tiludronate. *Ann. Rheum. Dis.*, 1993, **52**, 54-57.
- REGINSTER J.Y., CHRISTIANSEN C., ROUX C., FECHTENBAUM J., ROUILLON A., TOU K.P. Intermittent cyclic tiludronate

- in the treatment of osteoporosis. *Osteoporos. Int.*, 2001, **12**, 169-177.
- REGINSTER J.Y., GIESCHKE R. Clinical utility of a pharmacostatistical model for ibandronate in postmenopausal osteoporosis. *Curr. Drug Metab.*, 2006, **7**, 827-836.
- REINHOLZ G.G., GETZ B., SANDERS E.S., KARPEISKY M.Y., PADYUKOVA N., MIKHAILOV S.N., INGLE J.N., SPELSBERG T.C. Distinct mechanisms of bisphosphonate action between osteoblasts and breast cancer cells: identity of a potent new bisphosphonate analogue. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2002, **71**, 257-268.
- RODRIGUEZ N., BAILEY B.N., MARTIN M.B., OLDFIELD E., URBINA J.A., DOCAMPO R. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the bisphosphonate pamidronate. *J. Infect. Dis.*, 2002, **186**, 138-140.
- ROGERS M.J., FRITH J.C., LUCKMAN S.P., COXON F.P., BENFORD H.L., MONKKONEN J., AURIOLA S., CHILTON K.M., RUSSELL R.G. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*, 1999, **24**, 73S-79S.
- ROSENH.N., MOSESA.C., GARBER J., ILOPUTAIFE I.D., ROSS D.S., LEE S.L., GREENSPAN S.L. Serum CTX: a new marker of bone resorption that shows treatment effect more often than other markers because of low coefficient of variability and large changes with bisphosphonate therapy. *Calcif. Tissue Int.*, 2000, **66**, 100-103.
- RUMBEIHA W.K., FITZGERALD S.D., KRUGER J.M., BRASELTON W.E., NACHREINER R., KANEENE J.B., FRESE K.K. Use of pamidronate disodium to reduce cholecalciferol-induced toxicosis in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 2000, **61**, 9-13.
- RUSSELL R.G., MUHLBAUER R.C., BISAZ S., WILLIAMS D.A., FLEISCH H. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif. Tissue Res.*, 1970, **6**, 183-196.
- RUSSELL R.G. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics*, 2007, **119** Suppl 2, S150-162.
- SANTINI D., FRATTO M.E., VINCENZI B., LA CESA A., DIANZANI C., TONINI G. Bisphosphonate effects in cancer and inflammatory diseases: in vitro and in vivo modulation of cytokine activities. *BioDrugs*, 2004, **18**, 269-278.
- SANZ-RODRIGUEZ C.E., CONCEPCION J.L., PEKERAR S., OLDFIELD E., URBINA J.A. Bisphosphonates as inhibitors of Trypanosoma cruzi hexokinase: kinetic and metabolic studies. *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 12377-12387.
- SMITH E.J., LITTLE D.G., BRIODY J.N., MCEVOY A., SMITH N.C., EISMAN J.A., GARDINER E.M. Transient disturbance in physal morphology is associated with long-term effects of nitrogen-containing bisphosphonates in growing rabbits. *J. Bone Miner. Res.*, 2005, **20**, 1731-1741.
- STEIGER R., GEYER H., PROVENCHER A., PERRONLEPAGE M.-F., VON SALIS B., LEPAGE O.M. Equine bone core biopsy: Evaluation of collection sites using a new electric drilling machine. *Equine Pract.*, 1999, **21**, 14-21.
- STEPENSKY D., KLEINBERG L., HOFFMAN A. Bone as an effect compartment: models for uptake and release of drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, 2003, **42**, 863-881.
- SURI S., MONKKONEN J., TASKINEN M., PESONEN J., BLANK M.A., PHIPPS R.J., ROGERS M.J. Nitrogen-containing bisphosphonates induce apoptosis of Caco-2 cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway: a model of bisphosphonate-induced gastrointestinal toxicity. *Bone*, 2001, **29**, 336-343.
- SWANSON K.M., HOHL R.J. Anti-cancer therapy: targeting the mevalonate pathway. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2006, **6**, 15-37.
- TERPOS E. Biochemical markers of bone metabolism in multiple myeloma. *Cancer Treat. Rev.*, 2006, **32** Suppl 1, 15-19.
- THOMPSON K., ROGERS M.J., COXON F.P., CROCKETT J.C. Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. *Mol. Pharmacol.*, 2006, **69**, 1624-1632.
- TOKUDA H., KOZAWA O., HARADA A., UEMATSU T. Tiludronate inhibits interleukin-6 synthesis in osteoblasts: inhibition of phospholipase D activation in MC3T3-E1 cells. *J. Cell. Biochem.*, 1998, **69**, 252-259.
- TOMLIN J.L., STURGEON C., PEAD M.J., MUIR P. Use of the bisphosphonate drug alendronate for palliative management of osteosarcoma in two dogs. *Vet. Rec.*, 2000, **147**, 129-132.
- TOUSSIROT E., WENDLING D. Antiinflammatory treatment with bisphosphonates in ankylosing spondylitis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2007, **19**, 340-345.
- VAN BEEK E., HOEKSTRA M., VAN DE RUIT M., LOWIK C., PAPAPOULOS S. Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, 1994, **9**, 1875-1882.
- VAN BEEK E.R., COHEN L.H., LEROY I.M., EBETINO F.H., LOWIK C.W., PAPAPOULOS S.E. Differentiating the mechanisms of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone*, 2003, **33**, 805-811.
- VARELA A., LEPAGE O.M., DOUCET M., MARCOUX M., GARNERO P. Tiludronate chez le cheval: Tolérance et effets à court terme sur le métabolisme osseux. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **147**, 123-130.
- VASIKARAN S.D. Bisphosphonates: an overview with special reference to alendronate. *Ann. Clin. Biochem.*, 2001, **38**, 608-623.
- VERI A., D'ANDREA M.R., BONGINELLI P., GASPARINI G. Clinical usefulness of bisphosphonates in oncology: treatment of bone metastases, antitumoral activity and effect on

- bone resorption markers. *Int. J. Biol. Markers*, 2007, **22**, 24-33.
- VITTE C., FLEISCH H., GUENTHER H.L. Bisphosphonates induce osteoblasts to secrete an inhibitor of osteoclast-mediated resorption. *Endocrinology*, 1996, **137**, 2324-2333.
- VOSKARIDOU E., ANAGNOSTOPOULOS A., KONSTANTOPOULOS K., STOUPA E., SPYROPOULOU E., KIAMOURIS C., TERPOS E. Zoledronic acid for the treatment of osteoporosis in patients with beta-thalassemia: results from a single-center, randomized, placebo-controlled trial. *Haematologica*, 2006, **91**, 1193-1202.
- WALDRON D., PETTIGREW V., TURK M., TURK J., GIBSON R. Progressive ossifying myositis in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1985, **187**, 64-65.
- WELLER R., LIVESEY L., MAIERL J., NUSS K., BOWEN I.M., CAUVIN E.R., WEAVER M., SCHUMACHER J., MAY S.A. Comparison of radiography and scintigraphy in the diagnosis of dental disorders in the horse. *Equine Vet. J.*, 2001, **33**, 49-58.
- WILSON S., SOLOMON S.E., THORP B.H. Bisphosphonates: a potential role in the prevention of osteoporosis in laying hens. *Res. Vet. Sci.*, 1998, **64**, 37-40.
- WISE L.M., WALDMAN S.D., KASRA M., CHEUNG R., BINNINGTON A., KANDEL R.A., WHITE L.M., GRYPAS M.D. Effect of zoledronate on bone quality in the treatment of aseptic loosening of hip arthroplasty in the dog. *Calcif. Tissue Int.*, 2005, **77**, 367-375.
- YANG LI C., MAJESKA R.J., LAUDIER D.M., MANN R., SCHAFFLER M.B. High-dose risedronate treatment partially preserves cancellous bone mass and microarchitecture during long-term disuse. *Bone*, 2005, **37**, 287-295.
- YOSHIDA M., TOKUDA H., ISHISAKI A., KANNO Y., HARADA A., SHIMUZU K., KOZAWA O. Tiludronate inhibits prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2005, **236**, 59-66.