

EFFICACITE COMPAREE DE LA FLUNIXINE MEGLUMINE ET DE L'ACIDE TOLFENAMIQUE CHEZ LES BOVINS : ETUDE A L'AIDE DE CAGES TISSULAIRES

J. ESPINASSE*, J.P. THOUVENOT**, S. DALLE***, J. GARCIA**,
F. SCHELCHER*, O. SALAT*, J.F. VALARCHER*, S. DAVAL*

- * Département de Physiopathologie Animale, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 chemin des Capelles, 31076 Toulouse Cédex, France
- ** Laboratoire Central de Biochimie, Hôpital Purpan Place du Docteur Baylac, 31059 Toulouse Cedex France
- *** Schering Plough, 111-113 rue Anatole France, 92300 Levallois-Perret, France

INTRODUCTION

En pathologie bovine les antiinflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont aujourd'hui beaucoup plus largement utilisés que les antiinflammatoires stéroïdiens (AIS). Il en est tout spécialement ainsi dans le traitement des maladies respiratoires ¹ en raison du risque d'action défavorable des AIS sur les mécanismes de défense de l'hôte ².

Les AINS actuellement disponibles sur le marché appartiennent, soit à la série des acides carboxyliques, soit à celle des acides énoïques ³. Parmi les acides carboxyliques, deux AINS du groupe des acides fénamiques : la flunixin méglumine (FM) et l'acide tolfénamique (AT) sont couramment utilisés en France.

L'évaluation de l'efficacité des AINS est difficile à réaliser au cours d'essais cliniques sur le terrain. Ces molécules sont en effet rarement indiquées seules car l'antibiothérapie demeure le traitement de fond des maladies respiratoires les plus prévalentes ⁴. Dans ces conditions, l'utilisation de modèles expérimentaux apparaît comme une solution séduisante. Dans le but de renseigner le praticien sur l'efficacité respective de FM et AT chez les bovins nous les avons comparés à l'aide de la technique des cages tissulaires ⁵ en prenant comme critère de jugement leur action inhibitrice sur la synthèse des prostaglandines, en l'occurrence la prostaglandine E2 (PGE2).

MATERIEL ET METHODES

ANIMAUX

12 taureillons en bon état de santé de race Prim'Holstein, âgés de 3-4 mois, pesant au départ de l'expérience 188 kg en moyenne, entretenus en stabulation libre et répartis après randomisation dans trois box contigus, sont alimentés avec fourrage sec, aliment concentré en granulés (de 2 à 4 kg/jour selon la période) et eau à volonté. Tous les animaux ont été régulièrement pesés avant chaque essai.

CAGES TISSULAIRES

Les balles de golf practice (25 trous) en polypropylène sont stérilisées à l'oxyde d'éthylène et conditionnées dans un emballage étanche.

Pour chaque animal trois cages tissulaires ont été implantées en ligne et en position équivalente dans le tissu conjonctif sous-cutané de l'encolure gauche après anesthésie locale (solution de lignocaïne à 2 %).

SCHEMA EXPERIMENTAL

Pour diminuer la variabilité liée aux animaux, l'expérience a été menée en cross-over : à la fin des trois phases d'observation tous les animaux avaient reçu le même traitement.

Après un délai de 3 semaines suivant la mise en place des cages tissulaires, délai nécessaire à une bonne cicatrisation de la plaie et à la stabilisation du contenu liquidien de celles-ci, les essais se sont déroulés sur 3 phases de 48 h séparées par deux périodes de repos de 3 semaines.

Au cours de chaque phase, une réaction inflammatoire aiguë a été provoquée dans toutes les cages tissulaires par une injection dans leur centre de 0,5 ml d'une solution stérile de carragénine à 2 %, les animaux recevant en même temps par voie intramusculaire (IM), soit 10 ml d'eau distillée stérile (témoins : T), soit 2 mg/kg de Finadyne® (FM), solution injectable IM de flunixin méglumine à 5 %, soit 2 mg/kg de Tolfine® (AT), solution injectable IM d'acide tolfénamique à 4 %.

Avant et à partir de l'injection de carragénine, l'exsudat des cages tissulaires a été récolté par ponction aux temps suivants : 0,5 h - 1,5 h - 4 h - 8 h - 12 h - 24 h - 48 h. Le liquide était recueilli sur anticoagulant en solution saline (héparine 10 UI/ml) et sur une solution tampon d'indocid destinée à bloquer la production in vitro de PGE2. Pour

chaque étape toutes les cages tissulaires de chaque animal étaient ponctionnées et les exsudats récoltés mélangés à parties égales avant congélation immédiate à -196°C et stockage à -80°C.

ANALYSE DES PRELEVEMENTS

Après décongélation à la température ambiante, centrifugation à 2000 g à +4°C, extraction et purification par chromatographie : SEP PACK C18 cartriges (Waters) selon la méthode de POWELL ⁶, les dosages de PGE2 ont été réalisés en aveugle par radioimmunologie ⁷⁻⁸. La variabilité inter-essai était de 10 % et intra-essai de 6 %. Les réactions croisées pour l'immunosérum utilisé sont inférieures à 15 % avec les autres prostaglandines.

ANALYSE DES DONNEES

Une analyse préliminaire ayant montré que la transformation log 10 des taux de PGE2 homogénéisait la variance des mesures, tous les calculs ont été effectués sur les log 10 des valeurs mesurées.

La comparaison des effets de chaque traitement par rapport au témoin et la comparaison des traitements entre eux a été réalisée par le test des séries appariées car chaque bovin est son propre témoin en faisant l'hypothèse qu'aucune interaction existe entre les périodes.

Pour atténuer cette éventuelle interaction, pour chaque bovin, a été calculé l'accroissement des taux de PGE2 par rapport au temps 0 (t0) soit (taux de PGE2 d'un traitement au temps t - taux de PGE2 de ce traitement à t0) - (taux de PGE2 du témoin à t - taux de PGE2 du témoin à t0). Cette valeur est appelée delta taux (ΔT) de PGE2 FM pour la comparaison entre FM et T, ΔT de PGE2 AT pour la comparaison entre AT et T. Pour la comparaison entre FM et AT, on remplace témoin par AT dans la formule ci-dessus pour obtenir le ΔT de PGE2 FM-AT.

Les pourcentages d'inhibition de la synthèse de PGE2 sont obtenus de la façon suivante : % d'inhibition = 1 - 10 ΔT .

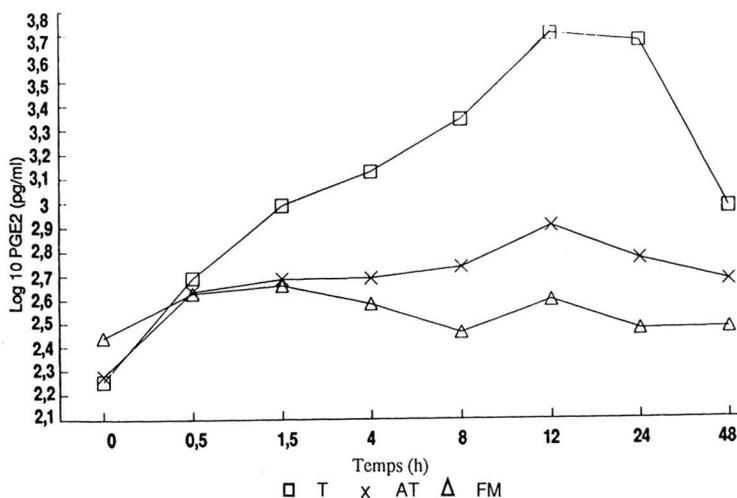
RESULTATS

Dans l'ensemble les balles de golf ont été bien tolérées, 2 rejets ont été relevés sur 36 balles mises en place (5,5 %), ceci sur une période de 10 semaines environ.

Le volume de l'exsudat prélevé à chaque ponction varie de 0,5 à 2,5 ml.

La figure 1 montre l'évolution des concentrations moyennes de PGE2 (log 10) dans l'exsudat pour chaque lot de traitement pour les trois phases de l'essai.

Figure 1 : Evolution des concentrations moyennes de PGE2 dans l'exsudat des cages tissulaires des différents lots de traitement pour les trois phases de l'essai.



Le tableau I rassemble les résultats de l'analyse statistique avec mention des pourcentages d'inhibition. Pour la comparaison FM-T et AT-T tous les ΔT PGE2 sont hautement significatifs. Pour la comparaison FM-AT les ΔT PGE2 sont significatifs dès la quatrième heure.

Tableau I : Résultats de la comparaison des différents traitements par le test des séries appariées avec leur pourcentage d'inhibition de la synthèse des PGE2.

TEMPS (h)	0,5	1,5	4	8	12	24	48
comparaison FM-T :							
moyenne ΔT PGE2 FM	-0,25	-0,52	-0,73	-1,07	-1,29	-1,38	-0,69
erreur standart	0,09	0,13	0,17	0,13	0,21	0,21	0,2
test t	2,8	4,1	4,2	8,2	6,1	6,5	3,5
pourcentage d'inhibition	44	70	81	91	95	96	79
comparaison AT-T :							
moyenne ΔT PGE2 AT	-0,08	-0,33	-0,46	-0,63	-0,82	-0,92	-0,32
erreur standart	0,17	0,11	0,16	0,15	0,19	0,16	0,21
test t	0,5	3	2,9	4,1	4,3	5,8	1,5
pourcentage d'inhibition	17	53	65	76	85	88	52
comparaison FM-AT :							
moyenne ΔT PGE2 FM-AT	-0,17	-0,19	-0,27	-0,44	-0,47	-0,46	-0,36
erreur standart	0,16	0,1	0,11	0,12	0,17	0,15	0,14
test t	1,1	1,9	2,5	3,7	2,8	3,2	2,5
pourcentage d'inhibition	33	36	46	64	66	65	57

Le degré de liberté (ddl) du test t du Student des séries appariées est égal à 11 pour chaque temps

DISCUSSION

Les cages tissulaires représentent un modèle pour l'étude de l'espace interstitiel. Les contrôles cytologiques et biochimiques montrent qu'en période de stabilisation le liquide collecté est comparable au véritable liquide interstitiel⁹. Les travaux de HIGGINS et al¹⁰ chez le cheval ont montré l'intérêt des balles de golf insérées dans les régions latérales de l'encolure pour l'étude de la réaction inflammatoire aiguë aseptique et non immuno provoquée par une solution de carragénine. En effet dans ce modèle, l'inflammation est circonscrite dans l'espace et dans le temps ce qui perturbe au minimum le bien-être de l'animal. Il permet aussi de suivre la cinétique du phénomène inflammatoire et l'utilisation du cross over. Enfin le prélèvement de l'exsudat est facile et compatible avec des prélèvements en série.

Pour ces raisons, les cages tissulaires sont à la base d'études sur la distribution et l'efficacité des antimicrobiens, sur la physiopathologie de certaines infections microbiennes, sur les mécanismes et la pharmacologie du phénomène inflammatoire.

Au cours de la réaction inflammatoire les AINS agissent comme des inhibiteurs de la cyclo-oxygénase et entravent la production des eicosanoïdes en particulier des PGE2 11-12, leur concentration dans l'exsudat représente un indicateur de l'efficacité de l'AINS évalué¹³. Toutefois, dans un modèle utilisant des fragments d'éponges de polyester stériles imbibées de carragénine à 2 %, placées en région sous-cutanée de l'encolure, la réduction de l'oedème inflammatoire par un AINS n'est pas parfaitement liée aux concentrations de PGE2¹³.

Dans cet essai, le délai entre la mise en place des balles de golf et la première injection de carragénine est de 3 semaines. Il correspond au minimum fixé par HIGGINS et al.¹⁰, mais il est plus court que celui recommandé par CLARKE et al.⁹ : 40 jours. Etant donné la durée de l'essai il s'agissait d'opérer avant l'envahissement des cages par du tissu fibreux¹⁵.

Pour chaque temps de prélèvement, nous avons préféré ponctionner toutes les cages et effectuer un pool d'exsudats plutôt que de prélever une seule cage à chaque intervention. En effet, malgré le risque de provoquer un déséquilibre entre le compartiment vasculaire et la cage tissulaire lié aux ponctions trop rapprochées, il nous a semblé plus important de ne pas introduire un facteur supplémentaire de biais.

La validation du modèle repose sur l'existence d'une différence significative entre la concentration moyenne de PGE2 (log 10) dans l'exsudat des cages tissulaires des témoins et celle des animaux traités (quel que soit l'AINS) à tous les temps de prélèvements (Tableau I). Dans leurs essais chez le cheval HIGGINS et al. ¹⁰ ont observé la même durée du phénomène inflammatoire après injection de la solution de carragénine dans les balles de golf : installation progressive entre 1,5 et 4 h, maximum à 12 h, résolution entre 24 et 48 h (Figure 1). A souligner cependant chez ces auteurs des concentrations de PGE2 à 12 h 7 à 12 fois plus élevées selon les essais et la technique de dosage mise en oeuvre.

La méthode du cross over, utilisée chez des animaux dont les caractéristiques zootechniques, sanitaires et les conditions d'élevage sont identiques autorise une comparaison sans biais de l'efficacité des deux AINS. Il apparaît clairement que pendant la phase de développement maximum de la réaction inflammatoire, la flunixinine méglumine inhibe davantage la production de prostaglandines que l'acide tolfénamique (Tableau I).

L'examen des pourcentages d'inhibition, en bonne cohérence, à posologie comparable, avec ceux rapportés par LEES et al. ¹⁴ pour la FM avec la méthode des éponges, confirme cette tendance (Tableau I). Dans ce modèle la flunixinine méglumine paraît donc plus efficace que l'acide tolfénamique.

SUMMARY

A comparison of the effects of two antiinflammatory drugs, flunixin meglumine (FM) and tolfenamic acid (TA, has been conducted in cattle using a tissue cage model . "Practice" polypropylene golf balls have been implanted subcutaneously in the neck of 12 young males calves. After a 3 weeks stabilisation period, an acute inflammatory reaction has been induced with an injection in the tissue cage of a 2% carragenine sterile solution. After randomisation of the animals in 3 groups : one received an intramuscular injection of distilled water (placebo), another group was treated with 2 mg/Kg FM intramuscularly, the third group received TA at the same posology and through the same route. Starting half an hour after the carragénine injection the tissue cage exudate were collected seven times during the first 48 hours to measure the prostaglandine E2 level using a radioimmunologic method. To decrease the variability between animals the study has been conducted in a cross-over way, each series starting three weeks after the other. A statistical analysis of all datas has been done using a paired series test after a log10 transformation of the prostaglandine E2 concentrations. The comparisons between placebo and FM groups and between placebo and TA groups are in accordance with the validity of the model. The inhibition of the production of prostaglandine E2 for both antiinflammatory drugs confirm their action on the cyclo-oxygenase. The statistical comparisons demonstrate as well the superiority of FM on TA.

RESUME :

Une comparaison des effets de deux anti-inflammatoires non stéroïdiens, flunixinine méglumine (FM) et acide tolfénamique (AT), a été menée chez des bovins en utilisant un modèle de cages tissulaires. Des balles de golf practice en polypropylène ont été implantées par voie sous-cutanée dans l'encolure de 12 jeunes taurillons. Après une période de stabilisation de 3 semaines une réaction inflammatoire aiguë a été provoquée par l'injection dans la cage tissulaire d'une solution stérile à 2 % de carragénine. Les animaux ont alors été randomisés en 3 groupes : 1 recevait de l'eau distillée par voie intramusculaire (témoin), un groupe était traité avec 2 mg/kg de flunixinine méglumine par voie intramusculaire, le troisième recevait de l'acide tolfénamique à la même posologie et par la même voie. A partir de la première 1/2 heure après l'injection de carragénine et à 7 reprises pendant 48 h l'exsudat de la cage tissulaire a été prélevé pour mesurer le taux de prostaglandines E2 par une méthode radioimmunologique. Pour réduire la variabilité entre animaux l'étude a été menée en cross-over chaque série séparée par un intervalle de 3 semaines; Toutes les données disponibles ont été soumises à une analyse statistique après transformation en log 10 des concentrations en prostaglandines E2 utilisant le test des séries appariées. Les résultats de la comparaison flunixinine méglumine-témoin et acide tolfénamique-témoin valident le modèle. Ils confirment ainsi l'action des deux anti-inflammatoires sur la cyclooxygénase par leur pouvoir inhibiteur de la production de prostaglandines E2. La comparaison flunixinine méglumine-acide tolfénamique fait apparaître par ailleurs la supériorité de la première sur la seconde.

RESUMEN

Una comparacion de los efectos de dos anti-inflamatorios no esteroideos flunixinina meglumina (FM) y acido tolfenamico (AT) ha sido realizada sobre bovidos utilizando como modelo las cajas tisulares. Pelotas de golf en polipropileno fueron implantadas por via subcutanea en las tablas del cuello de 12 terneros. Despues de un periodo de estabilizacion de 3 semanas, fue provocado una reaccion inflamatoria aguda por inyeccion en la caja tisular de una solucion esteril a 2 % de carragenina. Los animales fueron separados por randomizacion en 3 grupos : uno recibe agua destilada por via intramuscular (testigo), otro recibe 2 mg/Kg de FM por via intramuscular y el tercero recibe el AT por

la misma vía y dosis que el precedente. 30 minutos después de la inyección de carragenina y 7 veces durante 48 horas el exudado de la caja tisular fue recogido para medir el nivel de prostaglandinas E2 por una técnica radioinmunitaria. Para reducir la variabilidad entre animales el estudio fue realizado por "cross over" de cada serie a 3 semanas de intervalo. Los resultados así obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico, después de transformar en log decimales las concentraciones de prostaglandinas E2, utilizando un test de series emparejadas. Los resultados de la comparación FM, AT y testigo validan el modelo, que confirma así la acción de los antiinflamatorios sobre la ciclooxigenasa por su acción inhibitoria sobre la producción de prostaglandinas E2. De la comparación FM y AT, resulta la superioridad del primero sobre el segundo.

REMERCIEMENTS à C. STELLMANN pour son aide à l'interprétation statistique des résultats.

REFERENCES

1. ESPINASSE J., SCHELCHER, F., LAVALADE, I., VALARCHER, J.F., Antiinflammatoires non stéroïdiens : bases de stratégies thérapeutiques chez les bovins, in *Le grand livre des antiinflammatoires*, Scherring-Plough Santé Animale Ed., Paris : 91-100. 1991.2. LEKEUX, P., GUSTIN, P., DESMECHT, D., LINDEN, A., Thérapeutique des pathologies respiratoires aiguës des bovins. *Ann. Méd. Vét.* 135 : 175-184. 1991.3. SWAN, G.E., Non-steroidal antiinflammatory drugs in domestic animals : I. Their classification, mechanism of action and pharmacological effects. *S. Afr. Vet. Ver.*, 62 (1) : 35-38. 1991.4. ESPINASSE, J., DEWAELE, A., VINDEVOGEL, H., L'intervention thérapeutique en productions animales. *Pratiques actuelles et perspectives d'avenir. Rev. Méd. Vét.*, 139 (2) : 227-243. 1988.5. CLARKE, C.R., Tissue-chamber modeling systems - applications in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 12 : 349-368. 1989.6. POWELL, W.S., Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecylsilyl silica. *Methodes Enzymol.*, 86 : 467-477. 1982.7. DRAY, F., Dosage radio-immunologique des prostaglandines. *Nouveaux développements, in Les prostaglandines et la reproduction humaine*, Flammarion Ed., Paris : 47-64. 1979.8. DRAY, F., CHARBONNEL, B., MACLOUF, J., Radio-immuno-assay of prostaglandin F2, E1 and E2 in human plasma. *European J. Clin. Investigations*, 5 : 311-318. 1975.9. CLARKE, C.R., SHORT, C.R., USENIK, E.A., Subcutaneously implanted tissue-chamber : a pathophysiological study. *Res. Vet. Sci.*, 47 : 195-202. 1989.10. HIGGINS, A.J., LEES, P., SEDGWICK, A.D., Development of equine models of inflammation. *Vet. Rec.*, 120 : 517-522. 1987.11. LEES, P., HIGGINS, A.J., Flunixin inhibits prostaglandins E2 production in equine inflammation. *Res. Vet. Sci.*, 37 : 347-349. 1984.12. LEES, P., HIGGINS, A.J., Clinical pharmacology and therapeutic uses of non steroidal antiinflammatory drugs in the horse. *Equine Vet. J.*, 17 : 83-96. 1985.13. LEES, P., MAY, S.A., WHITE, D., Pharmacokinetics and dosage regimens of antiinflammatory drugs. *Ann. Recherche Vét.*, 21, suppl., 1 : 735-788. 1990.14. LEES, P., WHITE, D., MAY, S.A., Dose-response relationships for flunixin in a bovine model of acute non immune inflammation. *Acta Vet. Scand. Proceedings 5th Congress European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology* : 261-263. 1991.15. CALNAN, T.S., FORD, P.M., HOLT, J.L., PFUG, J.J., Implanted tissue cages a study in rabbits. *British J. Plastic Surgery*, 25 : 164-174. 1972.16. ZIV, G., WANNER, M., NICOLET, J., Distribution of penicillin G, dihydro-streptomycine, oxytetracycline and chloramphenicol in serum and subcutaneous chamber fluid. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 5 : 59-69. 1982.