

Université de Montréal

**Évaluation par IRM 3T, par échographie et par microscopie
du cartilage épiphysaire de poulains de 0-6 mois d'âge:
mieux comprendre et diagnostiquer l'ostéochondrose**

par Gabrielle Martel

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Philosophae Doctor* (Ph.D.)
en sciences vétérinaires

Mai 2018

© Gabrielle Martel, 2018

Résumé

L'ostéochondrose (OC) est une maladie articulaire développementale qui implique la chondronécrose ischémique du cartilage de croissance épiphysaire. Ceci résulte en une défaillance focale de l'ossification endochondrale et en ostéochondrite dissecans (OCD) à des sites spécifiques dans les épiphyses des humains et des animaux, dont les chevaux. Des lésions extensives au niveau de la trochlée fémorale latérale du cheval ont un mauvais pronostic avec une chirurgie de débridement et peuvent compromettre une carrière sportive. La pathophysiologie de la maladie est partiellement comprise, puisque les facteurs déclenchant l'ischémie focale ne sont pas encore connus. La matrice du cartilage de croissance épiphysaire subit des changements dynamiques en début de vie qui pourraient l'affaiblir biomécaniquement et augmenter sa susceptibilité à la défaillance vasculaire suite à un trauma focal. Des méthodes d'imagerie non-invasives pour le dépistage et le suivi de lésions sous-cliniques doivent être développées et validées, dans l'espoir qu'un diagnostic hâtif améliore le pronostic. Les épiphyses fémorales distales de poulains néonataux (n=10 prédisposés à l'OC; n=6 contrôle) ont été imagées par 3T Susceptibility-weighted imaging (3T SWI) et par échographie pour évaluer la vascularisation et par 3T IRM quantitatif (3T qIRM: cartographie T1rho et T2) pour évaluer le contenu et la structure des protéoglycanes et du collagène. Les images ont été validées par histologie, immunohistochimie et microscopie de génération de seconde harmonique. Aucune différence vasculaire et matricielle n'existe entre les poulains contrôle et prédisposés, mais des différences significatives dans le patron vasculaire et la composition matricielle au site de prédilection de l'OC sur la trochlée fémorale latérale ont été notées chez tous les spécimens. Ce site est moins ossifié et contient plus de vaisseaux périchondraux sans anastomoses avec l'os sous-chondral. La densité vasculaire et les temps de relaxation T1rho et T2, correspondant respectivement au contenu en protéoglycanes et au contenu et à la structure de collagène, y sont significativement augmentés ($p < 0,002$). L'évaluation microscopique de cette région a révélé une zone extensive avec un contenu réduit en protéoglycanes et une apparence hypertrophique. Nous spéculons que ces changements matriciels, quoique physiologiques, puissent affaiblir biomécaniquement le cartilage épiphysaire de façon focale et augmenter le risque de défaillance vasculaire menant à l'OC

suite à un trauma, quoique davantage d'investigations sont nécessaires pour le confirmer. Après avoir démontré que les mesures échographiques corrélaient fortement avec l'histologie et avec le 3T SWI, nous avons échographié la trochlée fémorale latérale d'une cohorte de poulains (n=46, 27-166 jours d'âge) et des radiographies ont été prises conjointement et à un an. Des lésions sous-cliniques d'OC, caractérisées par des indentations semi-circulaires dans le front d'ossification (évidence indirecte de défaillance focale de l'ossification endochondrale) ont été détectées chez 6 poulains (28-145 jours d'âge), à la fois à la radiographie et à l'échographie, bien que des validations post-mortems ne soient pas disponibles. Tandis que le 3T SWI et le qIRM rendent possible des études longitudinales non-invasives pour améliorer la compréhension de l'OC, l'échographie de la trochlée fémorale de poulains s'avère un outil prometteur pour le dépistage et le suivi de lésions sous-cliniques d'OC.

Mots-clés : Poulain, cartilage de croissance épiphysaire, vascularisation, protéoglycanes, collagène, imagerie de susceptibilité magnétique, IRM quantitatif, échographie, ostéochondrose

Abstract

Osteochondrosis (OC) is an ischemic chondronecrosis of epiphyseal growth cartilage that results in focal failure of endochondral ossification and in the development of osteochondritis dissecans (OCD) at specific sites in the epiphyses of humans and animals, including horses. Extensive OC lesions at the lateral ridge of the equine trochlea have a poor outcome with surgical debridement and can be career ending. The pathophysiology of the disease is partly understood, but the upstream events leading to the focal ischemia remain unknown. The epiphyseal growth cartilage matrix undergoes major dynamic changes in early life that could weaken it biomechanically and predispose it to focal trauma and vascular failure. There is a clinical need to develop and validate non-invasive imaging techniques for screening and monitoring of subclinical lesions, as their early detection holds the promise to improve outcome. Subregions in neonatal foal femoral epiphyses (n=10 osteochondrosis predisposed; n=6 control) were assessed for vascularity using 3T Susceptibility-weighted imaging (3T SWI) and ultrasonography and for proteoglycan and collagen structure/content employing 3T quantitative MRI (3T qMRI: T1r and T2 maps). Site-matched validations were made with histology, immunohistochemistry and second harmonic microscopy. There was no vascular and cartilage matrix difference between control and OC specimens, but a striking difference was seen in vascular pattern and cartilage matrix structure and composition at the OC-predilected site in the lateral ridge of the trochlea in all specimens compared with others sites in the trochlear ridge. This site was less ossified with more perichondrial vessels not yet bridging with the subchondral bone. Furthermore, the mean vascular density was significantly higher at this site, as well as T1r and T2 relaxation times ($p < 0,002$), suggesting matrix content and structure changes. Microscopic evaluation of this region revealed an expansive area with low proteoglycan content and a hypertrophic-like appearance on second-harmonic microscopy. We speculate that this matrix structure and composition, though physiological, may weaken the epiphyseal growth cartilage biomechanically in focal regions and could enhance the risk of vascular failure with trauma leading to OC. However, additional investigations are required to confirm this hypothesis. As ultrasonographic measurements strongly correlated with the histological measurements and with the site-matched SWI images,

and to translate our findings to the clinic, we undertook an ultrasonographic examination of the femoral trochleae of a cohort of foals in a field situation on a stud farm (n=46, 27-166 days old) was performed and radiographs were taken concurrently and at one year. Subclinical osteochondrosis lesions, characterised by semicircular indentations in the ossification front (indirect evidence of focal failure of ossification) were detected in six foals (28–145 days old), both with radiography and ultrasonography, but post-mortem validation of lesions was not possible. While 3T SWI MRI and 3T qMRI pave the way for non-destructive longitudinal studies to improve understanding of OC in all species, ultrasonographic examination of the femoral trochlea in young foals is a promising, practical tool for screening subclinical osteochondrosis and monitoring and managing lesions at important clinical sites.

Keywords: Foal, epiphyseal growth cartilage, vascularity, proteoglycan, collagen, susceptibility-weighted imaging, quantitative MRI, ultrasonography, osteochondrosis

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	xi
Liste des sigles et abréviations	xv
Introduction.....	1
1. Revue de littérature	3
1.1 Développement de l'épiphyse et de la surface articulaire	3
1.1.1 Développement des os longs et ossification endochondrale.....	3
1.1.1.1 Séquence développementale des os longs	3
1.1.2 Processus d'ossification endochondrale.....	6
1.1.2.1 Mécanismes moléculaires de l'ossification endochondrale.....	7
1.1.3 Rôle de la vascularisation	9
1.1.4 Structure de collagène.....	12
1.2 Ostéochondrose	15
1.2.1 Définition.....	15
1.2.2 Pathophysiologie	16
1.2.3 Étiologie	19
1.2.3.1 Défaillance vasculaire	19
1.2.3.2 Altérations du collagène	23
1.2.3.2.1 Zones de faiblesse au sein de la structure du collagène	24
1.2.3.2.2 Biomarqueurs associés au métabolisme du collagène.....	25
1.2.3.2.3 Changements dans le métabolisme du collagène type II.....	26

1.2.3.2.3.1 Synthèse du collagène type II	26
1.2.3.2.3.2 Dégradation du collagène type II	27
1.2.3.2.3.3 Contenu en collagène type II	28
1.2.3.2.4 Autres altérations de l'ossification endochondrale	29
1.2.3.3 Autres facteurs	29
1.2.3.3.1 Nutrition, facteurs hormonaux et taux de croissance	30
1.2.3.3.2 Exercice	31
1.2.3.3.3 Forces biomécaniques	32
1.2.3.3.4 Sexe	33
1.2.3.3.5 Héritéité et facteurs génétiques	33
1.3 Ostéochondrose équine.....	34
1.3.1 Articulations et sites prédisposés	34
1.3.2 Prévalence selon la race – études radiographiques.....	35
1.3.3 Héritabilité selon l'articulation.....	37
1.4 Problématique liée au grasset équin.....	39
1.4.1 Développement tardif de l'articulation	40
1.4.2 Traitements.....	42
1.4.3 Pronostic	46
1.5 Évaluation des lésions.....	47
1.5.1 Imagerie par résonance magnétique	48
1.5.1.1 Évaluation quantitative de la matrice cartilagineuse.....	49
1.5.1.2 IRM et vascularisation	50
1.5.1.3 IRM et développement épiphysaire	53
1.5.1.4 IRM et ostéochondrose.....	53
1.5.2 CT	55
1.5.2.1 CT et développement épiphysaire	55
1.5.2.2 CT et ostéochondrose.....	55
1.5.3 Échographie	57
1.5.3.1 Échographie et l'articulation juvénile	58
1.5.3.2 Échographie et ostéochondrose	60
2. Hypothèses et objectifs.....	62
3. Méthodologie	64

3.1 Survol du plan expérimental	64
3.2 Procédures expérimentales	66
3.2.1 Rappel du fonctionnement de base de l'IRM	66
3.2.2 Susceptibility-weighted imaging (SWI)	68
3.2.2.1 Algorithme Phase-difference enhanced (PADRE)	68
3.2.2.2 Artéfacts du SWI.....	69
3.2.3 T2 mapping	70
3.2.4 T1rho.....	71
4. Articles	72
4.1 Article 1	72
4.1.1 Informations supplémentaires sur l'article 1.....	104
4.1.1.1 Précisions méthodologiques sur la co-localisation histologique	104
4.1.1.2 Précisions méthodologiques sur l'analyse de l'orientation des vaisseaux	105
4.2 Article 2	107
4.2.1 Informations supplémentaires sur l'article 2.....	139
4.2.1.1 Précision sur l'anisotropie, le signal T2 et SHG.....	139
4.3 Article 3	147
4.3.1 Informations supplémentaires sur l'article 3.....	174
4.3.1.1 Spécifications sur l'indentation front d'ossification	174
4.3.1.2 Lien entre l'indentation du front d'ossification et l'OC.....	174
4.4 Article 4	176
4.4.1 Informations supplémentaires sur l'article 4.....	205
4.4.1.1 Précision sur la validation échographique.....	205
Discussion générale	209
Conclusion.....	224
Perspectives.....	225
Bibliographie	i

Liste des tableaux

Tableau I. Organisation du collagène du cartilage articulaire chez des fœtus à partir de 8 mois de gestation (Lecocq, Girard et al. 2008) et du poulain à la naissance (Cluzel, Blond et al. 2013).....	13
Tableau II. Organisation du collagène du cartilage de croissance de l'épiphyse chez des fœtus à partir de 8 mois de gestation	14
Tableau III. Études démontrant une augmentation de la synthèse du collagène type II lors d'OC.....	27
Tableau IV. Études démontrant une augmentation de la dégradation du collagène type II.	28
Tableau V. Sites prédisposés selon l'articulation	35
Tableau VI. Prévalence selon la race et l'articulation	36
Tableau VII. Héritabilité selon la race et l'articulation	38
Tableau VIII. Description des spécimens de l'étude 1, 2 et 3	65
Tableau IX. Table I: Comparison of vascular density (%) between pairs of regions of interest (ROIs) measured by 3T MRI SWI.....	86
Tableau X. Table S-I: Age, sex, breed, reason for euthanasia, history, osteochondrosis status of parents and limb sampled for each foal in the study	100
Tableau XI. Table S-II: Mean \pm SD of histologic vascular area (%) and SWI vascular density (%) at each ROI.....	101
Tableau XII. Table S-III: Mean \pm SD of the SWI proportion of vessels within interval [60, 120°] (%) at each ROI.	102
Tableau XIII. Table S-IV: Comparison of the proportion of vessels within interval [60, 120°] (%) between pairs of regions of interest (ROIs) measured by 3T MRI SWI.	103
Tableau XIV. Table S-I: Age, sex, breed, reason for euthanasia, history, osteochondrosis status of parents and limb sampled for each foal in the study	135
Tableau XV. Table S-II: Mean \pm SD of T1 ρ and T2 relaxation times (ms) at each ROI....	136
Tableau XVI. TABLE S-III: Significant differences in T1 ρ relaxation times between pairs of ROIs; estimates of the mean difference (MD) between the T1 ρ relaxation times (ms) of 2 ROIs; pairwise P value.....	137

Tableau XVII. TABLE S-IV: Significant differences in T2 relaxation times between pairs of ROIs; estimates of the mean difference (MD) between the T2 relaxation times (ms) of 2 ROIs; pairwise P value..... 138

Tableau XVIII. Table I: Ultrasonographic and histologic cartilage thickness and ossification front indentation measurements at each region of interest (ROI)..... 160

Tableau XIX. Table S-I: Age, sex, breed, reason for euthanasia, history, osteochondrosis status of parents and limbs sampled for each foal in the study..... 172

Tableau XX. TABLE S-II: Differences in histologic cartilage thickness measurements between pairs of ROIs..... 173

Tableau XXI. Table I: Foals included in the study..... 187

Tableau XXII. Table S-I: Cartilage thickness (cm) and ossification front indentation..... 203

Liste des figures

Figure 1.	Les étapes de développement des os longs du lapin..	3
Figure 2.	Coupe transversale du complexe de cartilage articulaire et de cartilage de croissance de l'épiphyse.....	4
Figure 3.	Vue d'ensemble des effets des facteurs sécrétés par les chondrocytes lors de l'ossification endochondrale.	9
Figure 4.	Les boucles de contrôle au niveau de la plaque de croissance.....	9
Figure 5.	L'expression des MMPs, de TRAP, des aggrecanes et de VEGF lors de la formation des canaux de cartilage, de la cavité médulaire et du SOC chez la souris..	11
Figure 6.	Représentation schématique de la structure du cartilage articulaire adulte..	12
Figure 7.	Illustration de la déformation par le poids subie par le cartilage articulaire.	14
Figure 8.	Démonstration schématique de la pathogenèse d'une lésion d'ostéochondrose. ..	17
Figure 9.	Modèle théorique de l'ischémie lors d'OC.).	21
Figure 10.	Schématisation de l'implication de facteurs étiologiques dans le développement d'une lésion d'ostéochondrose.	21
Figure 11.	Démonstration de la maturation plus avancée de la chèvre..	23
Figure 12.	Changement structurel entre la zone proliférative et hypertrophique.....	25
Figure 13.	Cartographies représentatives du temps de relaxation T2, de l'anisotropie et de l'angle des fibrilles du cartilage.	50
Figure 14.	Comparaison entre une image de SWI (gauche) et une image obtenue avec du matériel de contraste.....	52
Figure 15.	Image SWI ex vivo obtenue avec un IRM 9.4T de la trochlée humérale d'un porcelet de 6 semaines d'âge.....	52
Figure 16.	Cartographie T1 (a) et T2 (b) avec validation histologique démontrant une zone chondronécrotique avec des temps de relaxation plus élevés..	55
Figure 17.	L'apparence d'une lésion d'OC sous clinique au CT chez le porc.	56
Figure 18.	Image échographique du condyle fémoral médial d'un enfant de 3 ans.....	58

Figure 19. Définitions de l'apparence échographique des composantes de l'articulation juvénile.....	59
Figure 20. Lésion d'OCD de la LTR d'un à la radiographie, échographie et examen post-mortem.	60
Figure 21. Gradation échographique des lésions d'OC de la trochlée fémorale équine >6 mois d'âge.....	61
Figure 22. Schéma explicatif des temps de relaxation T1, T2 et T2*.....	67
Figure 23. Démonstration de l'artéfact dipolaire sur des images de phase à 9.4T.....	70
Figure 24. Figure 1. Study Design.....	91
Figure 25. Figure 2. Histological validation of 3T MRI SWI images.....	92
Figure 26. Figure 3. 3D EGC vascular architecture of the femoral trochlea.....	93
Figure 27. Figure 4. Comparison of vascular pattern and vascularity at OC predilected site (LRT) with a site where it is rarely observed (MRT).	94
Figure 28. Figure 5. SWI vessels orientation.	95
Figure 29. Supplementary figure 1. 3T MRI SWI orthogonal images illustrating the principal nutrient vessels entering the femoral trochlea.....	96
Figure 30. Supplementary figure 2. Validation of cartilage vessels within cartilage canals... ..	98
Figure 31. Supplementary figure 3. Comparison of histologic vascular area (%) and SWI vascular density (%).	99
Figure 32. Coupes de la trochlée fémorale. La trochlée fémorale (A) suite à la coupe avec la règle pour les mesures de la localisation des ROIs.....	105
Figure 33. Figure 1. Study design illustrating subregions investigated.....	124
Figure 34. Figure 2. T1 ρ maps of proteoglycan content of the epiphyseal growth cartilage in both ridges of the trochlea.....	125
Figure 35. Figure 3. T1 ρ and T2 relaxation times (ms) at ROIs in the femoral trochlea.....	127
Figure 36. Figure 4. Mapping of collagen structure of epiphyseal growth cartilage of the femoral trochlea.....	129
Figure 37. Figure 5. The osteochondral junction zone of the proximal, middle and distal femoral trochlea of the lateral ridge of the trochlea of the femur.	130
Figure 38. Figure 6: Epiphyseal growth cartilage matrix remodelling in the proximal and middle regions of the lateral ridge of the trochlea.	131

Figure 39. Supplementary figure 1. Validation of safranin O fast green stains.	132
Figure 40. Supplementary figure 2. Magnification of chondrocytes within matrix pallor areas.....	134
Figure 41. Méta-analyse de plusieurs méthodes multidisciplinaires pour l'évaluation de la structure du cartilage articulaire du chien.....	140
Figure 42. Schéma de l'anisotropie du cartilage articulaire selon l'orientation du collagène et l'angle magique.....	141
Figure 43. Image de microscopie SHG correspondant à la figure 35C, avec les flèches démontrant l'orientation et l'anisotropie.....	143
Figure 44. Contenu et structure du cartilage équin selon la maturation.....	145
Figure 45. Figure 1. Study design.	164
Figure 46. Figure 2. Ultrasonographic and histologic appearance of the articular and epiphyseal cartilage and the ossification front.	165
Figure 47. Figure 3. Representative ultrasonographic features of the femoral trochlea of neonatal foals.....	168
Figure 48. Figure 4. Ultrasonographic and histologic measurements of cartilage and ossification front.....	169
Figure 49. Figure 5. Validation of ultrasonographic detected cartilage canal vascular architecture.....	171
Figure 50. Figure 6. Field ultrasonography (pilot study).	171
Figure 51. Index de fibrillation du cartilage articulaire. Selon Pastourneau, 2003.	174
Figure 52. Figure 1. Normal radiographic and ultrasonographic appearance of the LRFT (< 6 months).....	193
Figure 53. Figure 2. Cartilage thickness and ossification front indentation values measured on ultrasonographic examination at 3 LRFT sites.....	194
Figure 54. Figure 3. Physiological morphologic ultrasonographic variations within the ossification front in younger foals (Group 1) compared with early subclinical osteochondrosis lesions.....	196
Figure 55. Figure 4. Subclinical osteochondrosis lesions: Group 1.....	197
Figure 56. Figure 5. Subclinical osteochondrosis lesions: Group 2.....	198
Figure 57. Figure 6. Subclinical osteochondrosis lesions in Group 3.....	199

Figure 58. Figure S1. Ultrasonographic evaluation.....	200
Figure 59. Figure S2. Example of different rates of maturation in foals the same age.	201
Figure 60. Figure S3. Foal #24 radiographs at 75 d. and 118 d. showing a healing lesion...	202
Figure 61. Méthode Delphes.	207
Figure 62. Scéma récapitulatif des zones présentant un signal T1rho et T2 augmenté au niveau de la LTRF.....	212
Figure 63. Images correspondantes de SWI, T1rho et T2 mettant en relation les résultats des 3 études.....	214
Figure 64. Représentation du poids de compression maximale au niveau de la LTRF	215

Liste des sigles et abréviations

OC : ostéochondrose

OCD : ostéochondrite dissecans

LTRF : lèvre latérale de la trochlée fémorale

IRM : imagerie par résonance magnétique

SWI : «susceptibility-weighted imaging»

qIRM : IRM quantitatif

POC : premier centre d'ossification

SOC : second centre d'ossification

MMP : matrice métalloprotéinase

GH : «Growth Hormone»

IGF-1 : « Insuline-like Growth Factor 1 »

VEGF : «vascular endothelial growth factor»

FGF : «fibroblast growth factors»,

Ihh : «Indian Hedgehog»

PTHrP : «Parathyroid hormone-related peptide»

TGFs β : «Transforming Growth Factors β »

BMPs : «Bone Morphogenetic proteins»

Runx2 : «Runt-related transcription factor 2»

HMGB1 : protéine «High-mobility group box 1»

RANKL : «Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand»,

TRAP : «tartrate-resistant acid phosphatase»

POFs : fragments osseux palmaires/plantaires

KWPN : « Royal Dutch Warmblood Studbook »

RF : radiofréquence

SAA: sérum amyloïde A

dGEMRIC: «delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging»

QSM: «quantitative susceptibility mapping»

PLM : microscopie de lumière polarisée

FITR-MS: microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Remerciements

Merci à Dre Laverty, qui m'a appris à quel point le monde était petit et accessible mais à la fois si grand qu'il était impossible d'en faire le tour. Dre Laverty m'aura transmis bien plus que des connaissances fondamentales en recherche; elle m'a non seulement appris à développer un esprit critique et une éthique de travail, mais elle m'a surtout transmis la passion de la recherche et le désir d'être aux premières loges du savoir, à l'affût des avancées scientifiques. Nous avons constamment eu et avons encore à ce jour des discussions fort intéressantes, avec différentes hypothèses et idées de projets, se terminant souvent par la phrase culte de Dre Laverty face à tout ce qui peut être fait : *'Well, I guess I'll never be able to die...'*. Dre Laverty est un mentor, un modèle et une personne que j'admire, bien au-delà de sa carrière scientifique et vétérinaire. Elle m'aura fait grandir comme chercheur, comme vétérinaire et comme être humain. Grâce à Dre Laverty, mon passage à la Faculté de médecine vétérinaire et mon parcours doctoral auront été uniques et privilégiés, remplis de défis, de découvertes, de voyages, de rencontres, de conférences, de projets et de réussites, et si le dépôt de la thèse en représente un point tournant, ce n'est définitivement pas la fin de cette collaboration.

Merci à Hélène Richard, le pilier sur lequel le laboratoire et ses activités reposent, celle qui fait en sorte qu'on soit tous capable de rendre à terme nos projets, celle sur qui on peut toujours compter, même à la dernière minute.

Merci à plusieurs autres avec qui j'ai eu la chance de collaborer tout au long de ses années pour enrichir ce projet. Un merci particulier à Julien Olive, Guillaume Gilbert et Guy Beauchamps, qui ont su m'éclairer en répondant maintes et maintes fois à mes questions.

Merci à Dr Moser, qui a accueilli l'idée de collaborer avec nous les vétérinaires, qui a accepté ensuite de devenir mon co-directeur et qui encore collabore dans nos idées d'imagerie.

Merci à Dr Forget, qui est la raison pourquoi tout ceci est arrivé, celui qui m'a mis sur le chemin de la recherche et qui m'a toujours encouragé à poursuivre davantage. Je suis privilégiée de si bien le connaître, Dr Forget est une personne d'esprit et d'exception.

Introduction

L'ostéochondrose est une maladie articulaire développementale qui affecte les humains et plusieurs espèces animales dont le cheval (Lavery and Girard 2013). Bien que la maladie soit de plus en plus diagnostiquée chez les enfants et les adolescents, les facteurs qui expliquent pourquoi et comment se développent les lésions d'OC demeurent encore incertains, surtout chez les humains puisque les signes cliniques apparaissent lorsque les lésions sont à leur stade final (McCoy, Toth et al. 2013). D'après les études réalisées chez les animaux, les lésions d'OC apparaissent très tôt dans la vie des sujets atteints (van Weeren and Jeffcott 2013). En raison de la quasi-impossibilité d'avoir accès à des échantillons provenant de jeunes enfants, les animaux, et en particulier le cheval en raison de la comparabilité de son cartilage avec celui de l'humain, sont donc des modèles de choix pour comprendre la pathogenèse de la maladie. D'après les études faites sur les animaux, l'OC implique initialement une atteinte aux vaisseaux nourriciers du cartilage de croissance, ce qui entraîne une chondronécrose ischémique (Ytrehus, Carlson et al. 2007). Avec la progression du processus d'ossification endochondrale, les lésions nécrotiques peuvent être résorbées ou persister (Dik, Enzerink et al. 1999). Dans le cas échéant, le cartilage nécrotique ne s'ossifie pas et forme une zone de faiblesse sous la surface articulaire qui devient alors sujette à rompre sous différentes contraintes biomécaniques. Ceci résulte en la formation d'une irrégularité sur la surface articulaire qui nécessite souvent une intervention chirurgicale et qui peut entraîner une dégénérescence articulaire menant à de l'ostéoarthrose juvénile (Lavery and Girard 2013). Au niveau de la lèvre latérale de la trochlée fémorale (LTRF) chez le cheval, les lésions sont souvent extensives et présentent un mauvais pronostic suite à un débridement chirurgical, pouvant grandement compromettre la carrière sportive du cheval (McIlwraith 2013).

Malgré le rôle évident d'une atteinte aux vaisseaux sanguins du cartilage de croissance épiphysaire dans la pathogenèse de la maladie, la raison pour laquelle il y a une interruption de la circulation sanguine à certains endroits demeure inconnue (van Weeren and Jeffcott 2013a). Il a été démontré que les lésions précoces d'OC surviennent au même moment où l'apport artériel des vaisseaux cartilagineux passe de péri-chondrial à sous-chondral suite à l'incorporation des canaux de cartilage dans le second centre d'ossification (Ytrehus, Ekman et al. 2004b). D'ailleurs, les vaisseaux cartilagineux longent parallèlement le front

d'ossification avant d'y être incorporés, et cette disposition particulière les rend plus susceptibles à subir des dommages (Olstad, Ytrehus et al. 2008c). De plus, des changements dans la structure du collagène ont aussi été identifiés au pourtour des vaisseaux cartilagineux, surtout à la jonction entre la zone proliférative et hypertrophique (Lecocq, Girard et al. 2008). D'autres études ont mis en évidence des altérations du métabolisme du collagène au sein des lésions précoces d'OC qui pourraient contribuer à l'apparition et au développement de la maladie (Lavery and Girard 2013).

En raison de l'étiologie multifactorielle de l'OC et de sa pathophysiologie partiellement comprise, la mise au point de méthodes d'imagerie non-invasives est primordiale pour faire des études longitudinales pour comprendre les événements initiant l'OC. De plus, ces méthodes pourraient éventuellement permettre le diagnostic précoce de la maladie pour amoindrir les conséquences reliées à la progression des lésions grâce à un repos préventif. Les études effectuées dans le cadre de ce travail valident et mettent à profit des techniques d'imagerie du cartilage épiphysaire non-invasives, utiles à la fois pour étudier la pathophysiologie de la maladie et pour le dépistage et le suivi de lésions sous-cliniques, et les conclusions qui en découlent sont transposables cliniquement à la fois en médecine équine et en médecine humaine.

1. Revue de littérature

1.1 Développement de l'épiphyse et de la surface articulaire

Chez tous les mammifères, les os longs et leurs épiphyses sont d'abord formés sous forme cartilagineuse avant de s'ossifier par ossification endochondrale. Ce processus débute durant la phase embryonnaire et se poursuit suite à la naissance. L'avantage principal de ce processus d'ossification est que les os peuvent croître et s'allonger tout en soutenant le poids de l'animal et ce, car le cartilage en ajout continu est simultanément transformé en os.

1.1.1 Développement des os longs et ossification endochondrale

1.1.1.1 Séquence développementale des os longs

La séquence développementale des os longs est similaire chez les mammifères, outre des variations temporelles. Une étude faite sur des lapins blancs de la Nouvelle-Zélande démontre la séquence histologique entière du développement osseux des membres et un schéma tiré de cette étude est ici mis en référence pour illustrer les différentes étapes du développement des os longs (Figure. 1) (Rivas and Shapiro 2002).

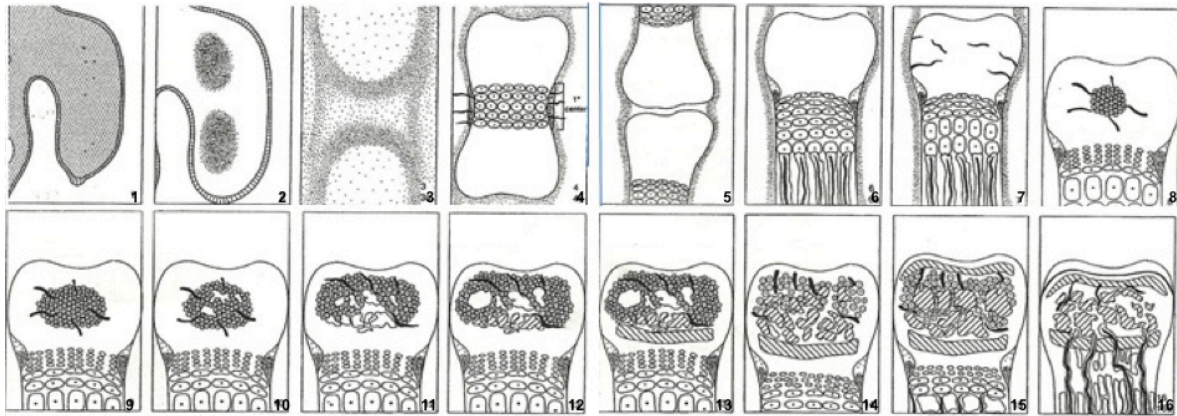


Figure 1. Les étapes de développement des os longs du lapin. Cette illustration schématise la séquence histologique du développement osseux des membres du lapin. Les étapes 1 à 8 ont lieu durant la période embryonnaire et les étapes de 9 à 16 ont lieu durant la période postnatale. Selon Rivas & Shapiro (2002).

Durant la phase embryonnaire, les membres se forment en bourgeons avec une répartition uniforme de cellules mésenchymateuses (Figure. 1, étape 1) qui éventuellement se

condensent (Figure. 1, étape 2), délimitant ainsi les futurs os, entre lesquels un espace aussi composé de cellules mésenchymateuses se forme : c'est ce qui est appelé l'interzone, soit la région où vont se développer les structures de l'articulation (Figure.1, étape 3). L'interzone au niveau du grasset du fœtus équin devient visible au 37^e jour de gestation (Jenner, A et al. 2014). La formation des épiphyses sous forme cartilagineuse a lieu suite à la différenciation en chondrocytes des cellules mésenchymateuses de l'os en développement (Figure.1, étape 4).

Simultanément à cette étape, le premier centre d'ossification (POC) se forme au milieu de la diaphyse (Figure.1, étape 4a), de même que le périoste au pourtour des chondrocytes hypertrophiés du premier centre d'ossification. Le périoste est formé d'une couche externe fibreuse et d'une couche interne de cellules ostéoprogénitrices. Ces dernières produisent des ostéoblastes qui synthétisent l'ostéoïde, la substance pré-osseuse, pour augmenter le diamètre de la diaphyse. Les plaques de croissance du POC au sein de la diaphyse, appelées physes, responsables de la croissance en longueur de l'os, comprennent histologiquement les zones suivantes: la zone de repos, où les chondrocytes se divisent très peu; la zone de prolifération, où le taux mitotique des chondrocytes est plus rapide; la zone hypertrophique et la zone de calcification, où il y a augmentation importante du volumes des chondrocytes et minéralisation de la matrice cartilagineuse (Figure. 2) (Poole, Kojima et al. 2001, Mackie, Ahmed et al. 2008, Changoor, Nelea et al. 2011).

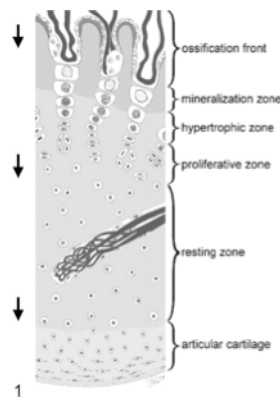


Figure 2. Coupe transversale du complexe de cartilage articulaire et de cartilage de croissance de l'épiphyse. Sur ce schéma sont illustrés la disposition et la forme des chondrocytes dans le cartilage articulaire et les zones de la plaque de croissance du second centre d'ossification (SOC). Le front d'ossification est aussi illustré. Les flèches indiquent le sens dans lequel croît le cartilage de croissance et dans lequel avance le front d'ossification. Selon Ytrehus et al. (2007)

Suite à la formation du POC a lieu la résorption de l'interzone et ainsi la formation du cartilage articulaire (Figure. 1, étape 5), puisque la couche de cartilage qui recouvre les

extrémités de l'os long persiste dans le temps. Cette étape a lieu autour du 65^e jour de gestation au niveau de l'articulation fémoro-tibiale du cheval (Jenner, A et al. 2014).

À la fin de la phase embryonnaire, les vaisseaux en provenance du périoste envahissent le cartilage de l'épiphyse dans les canaux de cartilage (Figure.1, étape 7), tel que discuté dans la section 1.1.3, ce qui initie l'hypertrophie des chondrocytes au centre de l'épiphyse (Figure.1, étape 8). Après la naissance, cette hypertrophie des chondrocytes se poursuit: le cartilage autour devient la plaque de croissance du second centre d'ossification (SOC) (Figure. 1, étape 9). La croissance s'effectue comme au niveau des physes, sauf que la plaque de croissance de l'épiphyse est sphérique (Rivas and Shapiro 2002). Les zones sont les mêmes que celles de la physe; la seule différence est que les chondrocytes de la zone hypertrophique du SOC sont regroupés en petites masses irrégulières plutôt qu'en colonnes (Byers and Brown 2006). Le SOC croît en taille, passant de la forme sphérique à hémisphérique, alors que le cartilage de l'épiphyse diminue (Figure.1, étape 11 et 12). La partie centrale du SOC, qui est initialement de la moelle hématopoïétique, devient graduellement du tissu adipeux, couramment appelé la moelle jaune (Figure.1, étape 13). La première région de l'épiphyse qui mature est celle adjacente à la plaque de croissance de la diaphyse : c'est la plaque osseuse de l'épiphyse (Figure.1, étape 13a). Durant la phase finale de l'ossification de l'épiphyse, la plaque de croissance de la diaphyse ainsi que celle entourant le SOC s'amincissent (Figure.1, étape 14). Sous le cartilage articulaire, il y a formation d'une plaque osseuse sous-chondrale (Figure.1, étape 15) et la partie inférieure du cartilage articulaire se calcifie (Figure.1, étape 16a). Finalement, vers la fin de la maturation des os longs, la vascularisation de la diaphyse et celle de l'épiphyse se relie (Figure.1, étape 16).

La séquence développementale des os longs décrite ci-haut est la même chez le lapin que chez l'humain et chez d'autres mammifères tels que le porc, la vache et l'agneau (Rivas and Shapiro 2002). Cette séquence est également similaire chez la souris et chez le rat, à l'exception du fait que, chez cette espèce, l'invasion vasculaire de l'épiphyse a lieu au même moment que l'apparition du SOC (Floyd, Zaleske et al. 1987), et que les plaques de croissance des physes restent ouvertes durant toute la vie, même lorsque la croissance est terminée. La séquence développementale des os longs diffère dans le temps selon l'espèce, l'os et même

l'épiphyse au sein d'un même os (Rivas and Shapiro 2002). Le taux de croissance et de différenciation des chondrocytes de la plaque de croissance, la progression tridimensionnelle du processus d'ossification ainsi que la complétion du processus sont modulés à la fois par des facteurs génétiques, nutritionnels, métaboliques, hormonaux et mécaniques (Ytrehus, Carlson et al. 2007).

Chez le cheval, l'ossification endochondrale se fait de façon plus primitive, car le poulain possède une capacité locomotrice complète dans les heures suivant sa naissance (Firth and Poulos 1982). Chez les équins, l'invasion vasculaire a lieu vers le 130^e jour de gestation et l'hypertrophie des chondrocytes au niveau de l'épiphyse qui initie la formation du SOC arrive vers le 250^e jour de gestation (la durée totale de gestation étant approximativement de 340 jours) (Shingleton, Mackie et al. 1997). Une étude sur des fœtus équins a mis en évidence l'apparition du second centre d'ossification au niveau de l'épiphyse distale du fémur dès le 7^e mois de gestation (Fontaine, Blond et al. 2013). Quoique l'âge exact auquel les épiphyses distales du fémur et du tibia sont complètement ossifiées ne soient pas déterminées chez le cheval contrairement à l'âne (Ahmed Abdelbaset-Ismail 2016), ces épiphyses du cheval ne contiennent plus de canaux vasculaires au sein du cartilage de croissance à 7 mois d'âge (Carlson, Cullins et al. 1995). Les dernières plaques de croissance des os longs à se fermer chez le cheval sont celles proximales du fémur et de l'humérus (24-36 mois d'âge) (Janet A. Butler 2017).

1.1.2 Processus d'ossification endochondrale

Plus précisément, le processus d'ossification endochondrale implique la prolifération par mitose des chondrocytes, leur sécrétion de matrice cartilagineuse, soit du collagène et des protéoglycanes, leur hypertrophie et leur apoptose qui crée des cavités dans la matrice cartilagineuse (Rivas and Shapiro 2002). Les chondrocytes en prolifération synthétisent du collagène type II avant de devenir pré-hypertrophiés, puis hypertrophiés. Les chondrocytes hypertrophiés sécrètent du collagène type X et commencent à sécréter la phosphatase alcaline, une enzyme responsable d'initier le dépôt minéral (Alini, Matsui et al. 1992, (Provot and Schipani 2005). Pour laisser place à la matrice osseuse, la matrice du cartilage de croissance doit être résorbée; il y a donc un clivage sélectif, une dénaturation puis une dégradation

complète des collagènes type II et X et des agrécanes par l'action d'enzymes produites par les chondrocytes hypertrophiques, dont la matrice métalloprotéinase 13 (MMP13) responsable de la dégradation du collagène type II (Mackie, Tatarczuch et al. 2011). D'autres enzymes de dégradation de la matrice cartilagineuse, comme MMP9, sont exprimées par les cellules du front d'ossification (Mackie, Tatarczuch et al. 2011). Lorsque les chondrocytes deviennent hypertrophiques, l'expression de protéines d'adhérence de l'ostéoïde, dont la chondrocalcine, l'ostéonectine et l'ostéopontine, est augmentée (Staines, Macrae et al. 2012). Les chondrocytes hypertrophiques sécrètent aussi un facteur, «vascular endothelial growth factor» (VEGF); ce facteur, responsable de l'angiogenèse dans tous les phénomènes biologiques, entraîne l'invasion endothéliale de vaisseaux sanguins à travers le périoste vers les lacunes (Provot and Schipani 2005). Cette invasion vasculaire initie le processus d'ossification endochondrale : elle amène des cellules hématopoïétiques qui formeront la moelle osseuse ainsi que des cellules ostéoprogénitrices qui, comme celles du périoste, se différencieront en ostéoblastes. Les chondrocytes hypertrophiques deviennent par la suite apoptotiques. Un autre type de cellules périvasculaires, les septoclastes, sécrètent la cathepsine B pour dégrader le collagène type II non lié et les protéoglycanes de la matrice cartilagineuse et ainsi permettre l'entrée des capillaires (Mackie, Tatarczuch et al. 2011). Il a récemment été démontré qu'au niveau du SOC, contrairement au POC, l'ossification endochondrale implique également la transdifférenciation directe de chondrocytes hypertrophiques en ostéoblastes sous l'influence de l'hormone thyroïdienne, plutôt que leur apoptose (Ono, Ono et al. 2014, Yang, Tsang et al. 2014, Zhou, von der Mark et al. 2014, Park, Gebhardt et al. 2015, Tsang, Chan et al. 2015, Aghajanian, Xing et al. 2017, Hinton, Jing et al. 2017). Au fur et à mesure que la matrice osseuse est formée par les ostéoblastes, elle est remodelée par les ostéoclastes, si bien que le premier centre d'ossification se sépare en deux plaques de croissance opposées avec, au centre, un espace grandissant qui se remplit de moelle osseuse (Mackie, Tatarczuch et al. 2011).

1.1.2.1 Mécanismes moléculaires de l'ossification endochondrale

Le taux de prolifération et le taux d'hypertrophie des chondrocytes ainsi que le front d'ossification sont régulés par certaines hormones et par un ensemble de facteurs sécrétés par les chondrocytes (Figure 3). Tout d'abord, l'hypophyse sécrète l'hormone de croissance,

«Growth Hormone» (GH), qui agit sur le foie et les chondrocytes en stimulant la sécrétion d'une autre hormone, «Insuline-like Growth Factor 1» (IGF-1) (Mackie, Tatarczuch et al. 2011). L'IGF-1 stimule la prolifération des chondrocytes et a aussi un effet anti-apoptotique sur les chondrocytes (Mackie, Tatarczuch et al. 2011). Les protéines WNTs influencent aussi la chondrogenèse, entre autres par la voie WNT/ β -catenin; les protéines WNTs peuvent stimuler ou inhiber la prolifération et l'hypertrophie des chondrocytes, tout dépendant de la forme des protéines impliquées et du moment où elles agissent (pour une revue des voies des protéines WNTs et de leurs implications dans la chondrogenèse, voir Staines et al. 2012) (Staines, Macrae et al. 2012). La FGF 3, une protéine membre de la famille des «fibroblast growth factors», inhibe la croissance et la prolifération des chondrocytes et inhibe la synthèse d'Ihh (Provot and Schipani 2005, (Mackie, Tatarczuch et al. 2011). Ihh, soit la protéine «Indian Hedgehog» exprimée par les chondrocytes pré-hypertrophiques, favorise la prolifération des chondrocytes en inhibant la différenciation des chondrocytes hypertrophiques (Provot and Schipani 2005). Les hormones thyroïdiennes sont des régulateurs systémiques de l'hypertrophie des chondrocytes via la sur-régulation de certaines protéines WNTs et l'expression des récepteurs de FGF3 (Mackie, Tatarczuch et al. 2011). Le taux de chondrocytes quittant la zone de prolifération dépend de boucles de contrôle locales (Figure 4). Ces boucles comprennent notamment le «Parathyroid hormone-related peptide» (PTHrP), qui inhibe l'hypertrophie des chondrocytes et l'Ihh qui stimule la prolifération des chondrocytes et la synthèse du PTHrP (Kronenberg and Chung 2001). Également impliqué dans les boucles de contrôle, un groupe de protéines membres de la superfamille des «Transforming Growth Factors β » (TGFs β), les «Bone Morphogenetic proteins» (BMPs), régulent positivement la prolifération des chondrocytes et négativement leur différenciation terminale et augmente l'expression d'Ihh (Provot and Schipani 2005). Le «Runt-related transcription factor 2» (Runx2), régule positivement la différenciation des chondrocytes hypertrophiques de même que l'expression de l'Ihh (Provot and Schipani 2005). Le Runx2 coordonne donc le taux de prolifération et le taux de maturation des chondrocytes (Provot and Schipani 2005).

Pour ce qui est du front d'ossification, les facteurs d'importance sécrétés par les chondrocytes hypertrophiques sont : VEGF, responsable de l'invasion vasculaire des lacunes qui résultent de l'apoptose des chondrocytes; HMGB1, la protéine «High-mobility group box

1» qui est chimioattractive des cellules endothéliales, des ostéoblastes et des ostéoclastes et RANKL, «Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand», essentiel à la différenciation des ostéoclastes (Mackie, Tatarczuch et al. 2011).

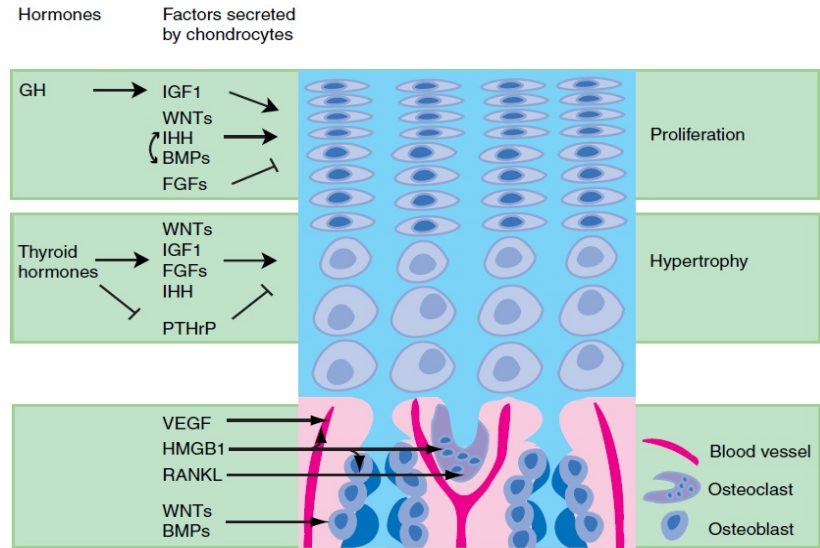


Figure 3. Vue d'ensemble des effets des facteurs sécrétés par les chondrocytes lors de l'ossification endochondrale. Sur ce schéma sont représentés les hormones et les facteurs sécrétés par les chondrocytes qui régulent le taux de prolifération et d'hypertrophie ainsi que les interactions entre ces hormones et ces facteurs. Les flèches indiquent une stimulation et les lignes croisées indiquent une inhibition. Selon Mackie et al. (2011)

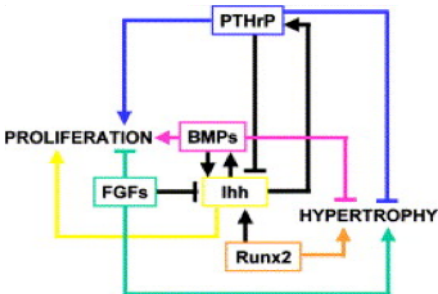


Figure 4. Les boucles de contrôle au niveau de la plaque de croissance. Ihh induit l'expression de PTHrP alors que PTHrP inhibe l'expression de Ihh. Ihh induit l'expression de BMPs qui font un rétrocontrôle positif sur l'expression de Ihh, contrairement au rétrocontrôle négatif de FGFs sur Ihh. PTHrP, Ihh et BMPs modulent positivement la prolifération des chondrocytes et négativement leur maturation alors que FGFs et Runx2 font l'inverse. Runx2 régule aussi l'expression de Ihh. Selon Provot et al. (2005).

1.1.3 Rôle de la vascularisation

L'ossification des épiphyses implique la vascularisation du cartilage de croissance avant l'initiation de la minéralisation. La formation du POC et celle du SOC sont similaires, sauf que, pour le SOC, l'invasion vasculaire a lieu avant l'hypertrophie des chondrocytes,

contrairement au POC où les chondrocytes s'hypertrophient avant l'invasion vasculaire (Blumer, Longato et al. 2008). Le rôle de la vascularisation de l'épiphyse est triple (Ytrehus, Carlson et al. 2007). Le premier est la nutrition des chondrocytes du cartilage de croissance au-delà des limites de diffusion des nutriments à partir du liquide synovial (Wilsman and Van Sickle 1972, Yamaguchi, Hayashi et al. 1990, Hayashi 1992). Le deuxième est d'initier la formation du SOC et d'assurer son maintien (Visco, Hill et al. 1990, Yamaguchi, Hayashi et al. 1990). Le troisième est de fournir au cartilage de croissance et à l'os en devenir un apport en cellules mésenchymateuses (Wilsman and Van Sickle 1970, Haines 1974, Kugler, Tomlinson et al. 1979). En somme, des études visant l'interruption de l'angiogénèse au niveau de l'épiphyse, soit de façon génétique, biochimique ou mécanique, démontraient un épaissement subséquent de la plaque de croissance épiphysaire lié à l'expansion de la zone hypertrophique (pour une revue de ces études, voir Colnot, 2005 et Hall et al., 2006).

Les vaisseaux sanguins épiphysaires se trouvent dans des canaux de cartilage au sein de l'épiphyse (Stockwell 1971). Il a été noté, lors d'une étude des changements vasculaires de l'épiphyse par imagerie par résonance magnétique chez les porcelets, que les canaux de cartilage ne contenaient pas un mais plusieurs vaisseaux sanguins à travers du tissu conjonctif péri-vasculaire, patron qui a similairement été démontré chez l'humain (Jaramillo, Villegas-Medina et al. 2004). La structure du réseau vasculaire est comme suit : une artériole en provenance du périchondre donne naissance à un réseau de capillaires s'enroulant autour de celle-ci et rejoint une veinule qui retourne au plexus périchondral par le même chemin que l'artériole (Blumer, Longato et al. 2008). De plus, les canaux de cartilage ne comportent pas d'anastomoses au niveau du cartilage de croissance de l'épiphyse, mais, avec la progression du SOC, ils peuvent former des anastomoses avec les vaisseaux de la moelle osseuse, à travers du front d'ossification (Visco, Van Sickle et al. 1989, Hayashi 1992, Ytrehus, Ekman et al. 2004b). Ceci a également été mis en évidence chez le cheval lors d'études décrivant en détails la structure vasculaire de l'épiphyse distale du fémur (Olstad, Ytrehus et al.), du tibia (Olstad, Ytrehus et al. 2008b) et du 3^e os métatarsien (Olstad, Ytrehus et al. 2009).

Chez les mammifères, la formation de canaux de cartilage vascularisés se fait selon deux processus distincts: l'angiogénèse passive («quiescent angiogenesis») et l'angiogénèse réactive («reactive angiogenesis») (Figure 5) (Blumer, Longato et al. 2008). Le premier processus implique la formation d'un réseau de canaux de cartilage en même temps que celle

de la cavité médullaire, ce qui nécessite la dégradation de la matrice du cartilage de croissance de l'épiphyse par différentes MMPs dont MMP-9, MMP-13 et MMP-14 et par l'enzyme «tartrate-resistant acid phosphatase» (TRAP) (Figure. 5, étape A). Le second processus, qui lui dépend de VEGF, est responsable de la vascularisation du cartilage hypertrophique et mène à l'expansion de la cavité de la moelle osseuse. Les chondrocytes sont, à ce moment, hypertrophiques et sécrètent VEGF. Sous l'effet des MMPs, de TRAP et d'une faible quantité d'aggrécases, les canaux de cartilage progressent et se fusionnent, agrandissant ainsi la cavité médullaire (Figure. 5, étape B). Des noyaux d'ossification et leur fusion forment le SOC (Figure. 5, étape C).

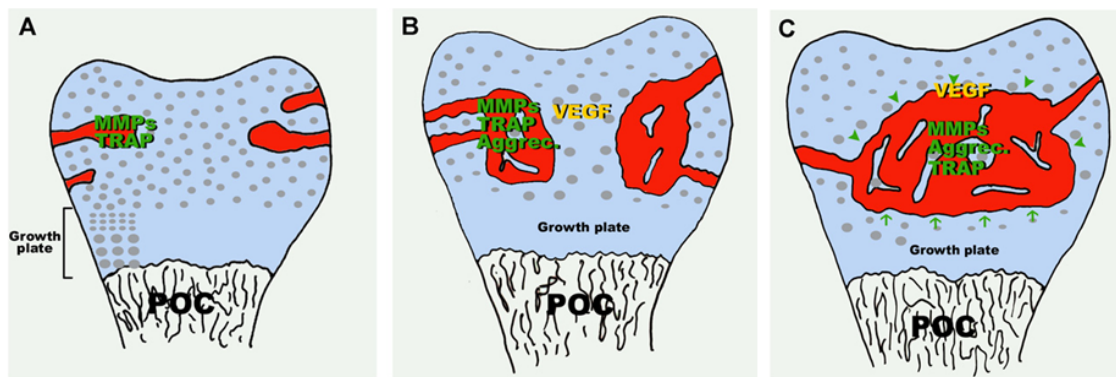


Figure 5. L'expression des MMPs, de TRAP, des aggrécases et de VEGF lors de la formation des canaux de cartilage, de la cavité médullaire et du SOC chez la souris. La Figure A représente le processus d'angiogenèse passive avec l'expression de MMPs et de TRAP par les chondrocytes. La Figure B représente le commencement du processus d'angiogenèse réactive qui mène à l'expansion de la cavité médullaire. Les chondrocytes s'hypertrophient et sécrètent VEGF. Des noyaux d'ossification apparaissent. La Figure C démontre la fusion des noyaux d'ossification, ce qui entraîne la formation du SOC. Selon Blumer et al. (2008).

Le processus de régression physiologique des canaux de cartilage se nomme chondrification et implique la conversion des cellules mésenchymateuses en chondrocytes qui sécrètent de la matrice cartilagineuse pour emplir la lumière des canaux de cartilage préexistants (Haines 1974, Carlson, Meuten et al. 1991, Olstad, Ytrehus et al. 2007, Blumer, Longato et al. 2008). La vitesse de régression des canaux de cartilage dépend de l'articulation (Lecocq, Girard et al. 2008). Au niveau du fémur distal des poulains, les canaux vasculaires demeurent présents à 5 mois d'âge, mais sont absents à 7 mois d'âge (Carlson, Cullins et al. 1995). Le patron de chondrification est séquentiel, tel que démontré par une étude sur des

poulains de 0 à 7 semaines d'âge: à partir de 5 semaines d'âge des régions spécifiques du fémur distal deviennent progressivement avasculaires (Olstad, Ytrehus et al. 2008c).

1.1.4 Structure de collagène

Durant le développement embryonnaire, l'épiphyse est constituée de cartilage hyalin et d'un réseau de vaisseaux sanguins, comme mentionné précédemment. L'arrangement spatial des fibres de collagène du cartilage est important pour que l'articulation puisse remplir son rôle biomécanique suite à la naissance, soit résister à la pression due à l'expansion des protéoglycanes de la matrice cartilagineuse et à la pression lors du mouvement de l'articulation (Rieppo, Hyttinen et al. 2009).

Un modèle de la structure du cartilage articulaire adulte a été proposé en 1925 : le modèle de Benninghoff. Maintes études ont été réalisées à partir de ce modèle, ce qui a permis d'arriver à un constat final relatif à la structure du cartilage articulaire adulte en quatre zones : la zone tangentielle (superficielle), la zone transitionnelle (médiane), la zone radiale (profonde) qui est séparée de la dernière zone, la zone de cartilage calcifié, par le «tidemark» (Figure 6) (Newman 1998). Plus précisément, les chondrocytes de la zone tangentielle sont aplatis et les fibres de collagène sont isotropes et parallèles à la surface articulaire. Les chondrocytes de la zone transitionnelle sont arrondis et disposés en colonnes obliques à la surface articulaire et les fibres de collagène sont plus grosses et sont arrangées aléatoirement. Au niveau de la zone profonde, les colonnes de chondrocytes sont perpendiculaires à la surface articulaire, de même que les fibres de collagène. Les fibres de collagène de la zone profonde traversent le «tidemark» et se continuent dans la zone calcifiée.

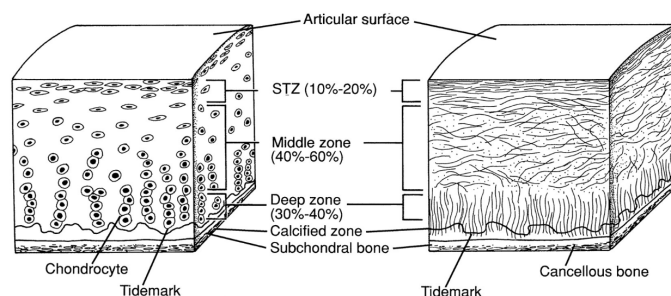
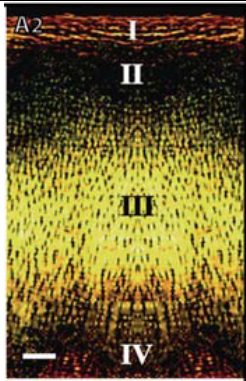
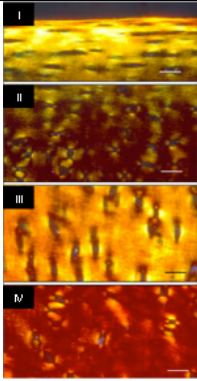


Figure 6. Représentation schématique de la structure du cartilage articulaire adulte. L'organisation des chondrocytes, à gauche, et celle des fibres de collagène, à droite. Les différentes zones sont : la zone tangentielle (STZ), la zone transitionnelle (Middle zone), la zone profonde et la zone calcifiée, au-dessus de l'os sous-chondral. Le «tidemark» sépare la zone profonde et la zone calcifiée. Selon Newman (1998).

Bien que les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire équin semblent homogènes à la naissance et se modulent par la suite selon les forces mécaniques auxquelles l'articulation est soumise (Brommer, Brama et al. 2005), il a été démontré que le cartilage de fœtus équin comprend une organisation structurale du collagène bien avant la naissance et la mise en charge post-natale (Lecocq, Girard et al. 2008, Cluzel, Blond et al. 2013). En effet, dès le 4^e mois de gestation, la présence d'une couche correspondant au cartilage articulaire a été identifiée chez le fœtus équin (Cluzel, Blond et al. 2013). Lecocq et al. (2008) ont identifié quatre zones différentes dans le cartilage articulaire des fœtus équins (8 mois de gestation): zone I, superficielle et tangentielle; zone II, intermédiaire de transition; zone III, radiale profonde et zone IV, profonde de transition (Tableau I).

Tableau I. Organisation du collagène du cartilage articulaire chez des fœtus à partir de 8 mois de gestation (Lecocq, Girard et al. 2008) et du poulain à la naissance (Cluzel, Blond et al. 2013)				
	≥8 mois de gestation		≥ 11 mois de gestation – 52 jours d'âge	
Zone I	Fibres orientées parallèles à la surface articulaire		Fibres orientées tangentiellement	
Zone II (zone de transition)	Fibres orientées aléatoirement		Fibres orientées aléatoirement	
Zone III	Fibres orientées perpendiculairement à la surface articulaire		Fibres orientées radialement	
Zone IV (zone de transition)	Fibres orientées aléatoirement		Fibres orientées aléatoirement	

La matrice de la zone IV du cartilage articulaire est séparée en matrice territoriale et interterritoriale. La matrice territoriale entoure les chondrocytes, jouant un rôle de protection lors de la déformation du tissu (Figure 7). Au niveau de la zone profonde, les fibres de collagène, alignées perpendiculairement, y forment des feuillets sur la surface desquels il y a des fibres qui émergent et y replongent plus loin, peut-être pour relier les feuillets entre eux. La matrice interterritoriale est perpendiculaire à la surface articulaire, et ses fibres de collagène sont isotropes (Hughes, Archer et al. 2005).

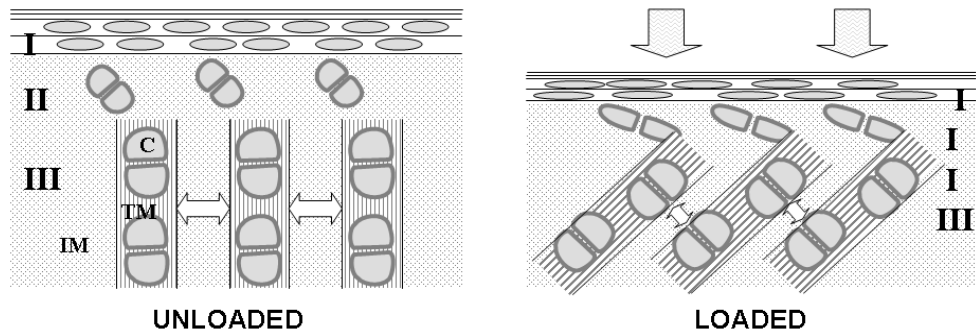

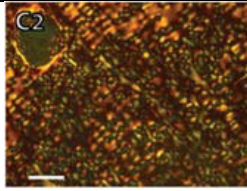
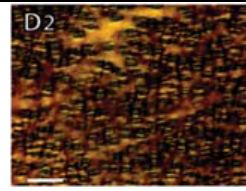
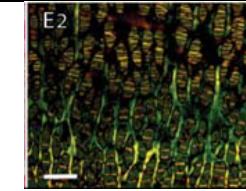


Figure 7. Illustration de la déformation par le poids subie par le cartilage articulaire. Les seuls chondrocytes (C) qui ne sont pas déformés sont ceux de la zone profonde, protégés par la matrice territoriale (TM). La matrice interterritoriale (IM) se déforme pour que les colonnes de chondrocytes puissent s'incliner. Selon Hughes et al. (2005).

Pour ce qui est du cartilage de croissance de l'épiphyse chez le fœtus équin de 10 mois, il comporte lui aussi quatre zones (zone de repos, zone intermédiaire, zone de prolifération et zone hypertrophique) (Tableau II).

Tableau II. Organisation du collagène du cartilage de croissance de l'épiphyse chez des fœtus à partir de 8 mois de gestation			
Zone de repos	Zone intermédiaire	Zone de prolifération	Zone hypertrophique
			
Réseau dense, fibres orientées parallèlement à la surface articulaire	Fibres orientées aléatoirement	Fibres orientées parallèlement à la surface articulaire	Réseau moins dense, fibres entrelacées et orientées perpendiculairement à la surface articulaire

La structure du collagène varie durant la maturation du cartilage de sa forme fœtale à sa forme adulte (Brama, Tekoppele et al. 2000, Hyttinen, Arokoski et al. 2001, Brama, Tekoppele et al. 2002, Hunziker, Kapfinger et al. 2007, Lecocq, Girard et al. 2008, Hyttinen, Holopainen et al. 2009, Julkunen, Harjula et al. 2009, Julkunen, Iivarinen et al. 2010, van Turnhout, Schipper et al. 2010, van Turnhout, Kranenbarg et al. 2011), (Hughes, Archer et al. 2005). Lecocq et al. (2008) ont remarqué qu'à partir de 10 mois, le cartilage articulaire des poulains est identique à celui des adultes : les fibres de collagène de la zone I sont parallèles à la surface articulaire, celles de la zone II sont isotropes, celles de la zone III, la plus large, sont

perpendiculaires à la surface articulaire. La zone IV est la dernière à se former. Durant les premiers mois de vie, la composition et la structure du cartilage articulaires changent, de même que ses propriétés fonctionnelle jusqu'à l'âge de 5 – 11 mois (Oinas, Ronkainen et al. 2018). Les propriétés biomécaniques du cartilage équin seraient définitives vers l'âge de 18 mois (Brommer, Brama et al. 2005). La maturation de la matrice du cartilage articulaire se termine entre 11 et 14 ans chez l'humain (Grunder 2006) et au 25^e jour chez la souris (Hughes, Archer et al. 2005).

1.2 Ostéochondrose

1.2.1 Définition

C'est un chirurgien nommé König qui fut le premier à introduire le terme ostéochondrite pour parler d'une pathologie du cartilage et de l'os (Konig 1888). Le terme a plus tard été remplacé par ostéochondrose (OC), parce qu'il n'y a pas présence d'inflammation lors de lésions primaires au cartilage (Howald 1942).

Dans la littérature vétérinaire, l'OC est définie, tant au niveau de la plaque de croissance qu'au niveau de l'épiphyse, comme une défaillance focale du processus d'ossification endochondrale, soit une zone de cartilage de croissance qui n'est pas transformée en os, et ce chez les 6 espèces animales chez lesquelles la maladie a été étudiée : le porc (Reiland 1978), le cheval (Rejnö 1978), le boeuf (Reiland, Stromberg et al. 1978), le chien (Olsson 1973), la dinde (Poulos 1978) et le poulet (Poulos, Reiland et al. 1978). La maladie apparaît d'abord sous des formes sous-cliniques qui évoluent vers la forme clinique. On a classé les lésions selon trois types, *osteochondrosis latens*, *manifesta* ou *dissecans* : *latens* regroupe les lésions primaires focales de nécrose des chondrocytes dans la zone de repos du cartilage de croissance de l'épiphyse ; *manifesta* implique les lésions visibles de nécrose des chondrocytes qui ne se sont pas résorbées et qui n'ont donc pas été ossifiées ; *dissecans* indique une lésion qui résulte en une fente du cartilage puis en la formation d'un fragment qui se détache d'un cartilage articulaire (Ytrehus, Carlson et al. 2007).

En médecine humaine, le terme *osteochondritis dissecans* est utilisé et ce pour décrire à la fois la forme juvénile et adulte de la maladie (Hendrickson, Olstad et al. 2015) et la

manifestation d'OC à divers sites anatomiques comporte des noms différents propres à chacun (tel que révisé par McCoy et al. (McCoy, Toth et al. 2013)).

1.2.2 Pathophysiologie

L'OC est une maladie dynamique dont l'évolution clinique varie selon le temps et l'âge de l'espèce atteinte ainsi que selon une multitude de facteurs, qui seront expliqués dans la section 1.2.3. La distinction entre la physiologie normale du cartilage lors du développement des os longs et la pathologie qui peut en résulter suite à un dérèglement n'est pas évidente (Ekman, Carlson et al. 2009).

Des études ont mis en évidence chez le porc des zones de cartilage de croissance nécrotiques aux sites de prédilection de l'OC (Kincaid, Allhands et al. 1985, Woodard, Becker et al. 1987, Carlson, Hilley et al. 1989), et ces zones nécrotiques étaient associées avec des vaisseaux sanguins nécrotiques. Un groupe de chercheurs a démontré qu'en interrompant focalement de manière chirurgicale la vascularisation des canaux de cartilage de porc, des lésions similaires aux lésions sous-cliniques d'OC apparaissaient, soit une zone de chondronécrose (Carlson, Meuten et al. 1991). Cette étude et une étude subséquente de Ytrehus et al., (Ytrehus, Ekman et al. 2004b) ont clairement permis de démontrer le rôle d'une ischémie dans le développement d'OC. De telles études d'induction chirurgicale via ischémie de lésions d'OC ont été reproduites chez le cheval (Olstad, Hendrickson et al. 2013) et la chèvre (Toth, Nissi et al. 2015).

La pathogenèse d'une lésion d'OC, tel que démontré à la Figure 8, implique une interruption focale de la vascularisation lors de l'ossification endochondrale au niveau des anastomoses qui se créent entre les vaisseaux dans les canaux de cartilage du cartilage de croissance de l'épiphyse et ceux du front d'ossification (Figure 8 A et B). Les lésions initiales correspondent à des zones focales où il y a eu nécrose des chondrocytes du cartilage épiphysaire (*OC latens*, Figure 8 C et D). Si la zone de nécrose est petite, elle peut être réparée et ossifiée normalement (Figure 8 E et G). Si la zone de nécrose est trop importante, elle ne sera pas ossifiée (Figure 8 F) et deviendra du tissu fibreux entouré par du tissu osseux (*OC manifesta*, Figure H). En effet, lorsque le front d'ossification progresse au cours du développement, les zones nécrotiques altèrent le processus normal d'ossification et ne sont donc pas ossifiées (Ytrehus, Carlson et al. 2007). Si les zones nécrotiques se retrouvent en

profondeur dans l'épiphyse, elles forment des kystes alors que lorsqu'elles se situent en bordure du cartilage articulaire, elles deviennent des zones de faiblesse sujettes à la rupture sous un impact ou une charge, ce qui entraîne le détachement d'un fragment de cartilage articulaire (*OC dissecans*, Figure 8 I).

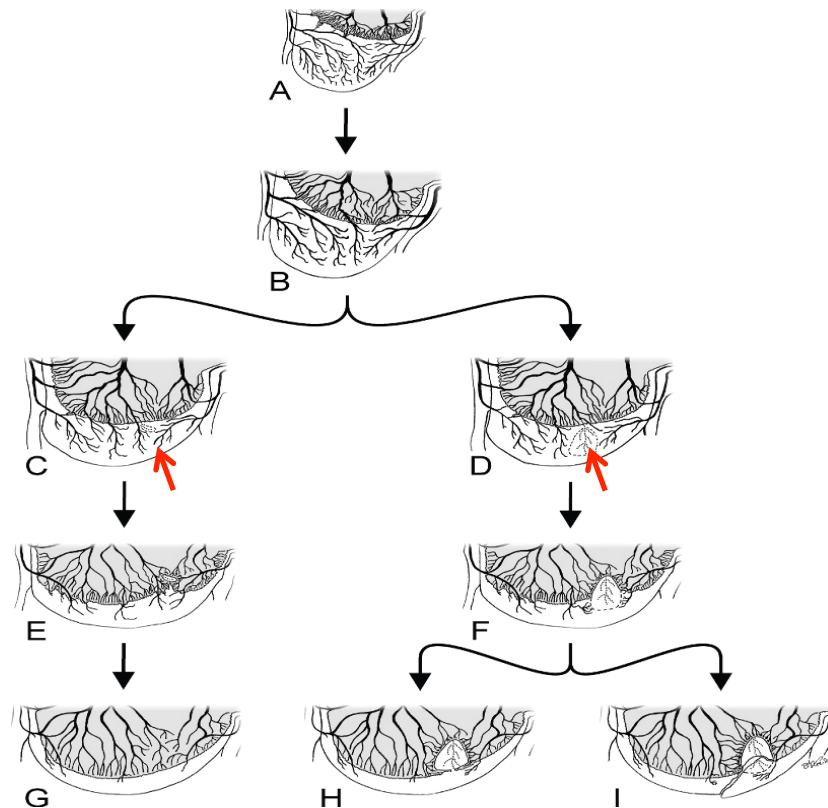


Figure 8. Démonstration schématique de la pathogenèse d'une lésion d'ostéochondrose. Les étapes A et B représentent l'évolution de la vascularisation au-fur-et-à-mesure qu'avance le front d'ossification. Les étapes C et D illustrent une zone de nécrose ischémique (flèche) suite à une interruption de la vascularisation. Les étapes E et G démontrent la réparation de la zone nécrotique vu sa petite taille et la continuation normale du processus d'ossification endochondrale. Les étapes F, H et I démontrent l'évolution de la lésion d'ostéochondrose qui résulte d'une zone nécrotique trop grande pour être initialement réparée. La zone nécrotique devient entourée d'os (étape H) et le cartilage recouvrant cette zone est sujet à rompre, résultant ainsi en une lésion d'OCD (étape I). Selon Ytrehus et al. (2007).

La chondronécrose ischémique est associée avec un processus de réparation secondaire, étudié à la fois lors de lésions ischémiques et de lésions induites chirurgicalement, qui implique la prolifération des chondrocytes adjacents la zone nécrotique ainsi que la prolifération des canaux de cartilage vers la zone de nécrose (Ytrehus, Andreas Haga et al. 2004a, Ytrehus, Ekman et al. 2004b, Olstad, Ytrehus et al. 2007, Olstad, Ytrehus et al. 2008b,

Olstad, Hendrickson et al. 2013). Les lésions d'OC peuvent être réparées à la fois par un centre séparé d'ossification en surface de la lésion ou par ossification intramembranaire du tissu de granulation à la base de la lésion (Olstad, Cnudde et al. 2008a).

À ce jour, il existe de nombreuses études et hypothèses quant à la cause de la défaillance vasculaire qui entraîne l'apparition de sites de chondrocytes nécrosés dans le cartilage de croissance de l'épiphyse. Ces hypothèses seront expliquées plus en détails dans la section 1.2.3.1.

Des études faites sur des sujets équins en très bas âge, voire même des fœtus, mettent à la lumière un nouvel élément : non seulement des lésions d'OC ont une forte prévalence en bas âge, elles peuvent être réparées jusqu'à un certain moment grâce à la capacité de remodelage du cartilage juvénile. Une étude radiographique sur les jarrets et grassetts de poulains entre l'âge de 1 mois et 11 mois a permis de démontrer qu'un pourcentage plus élevé de poulains démontraient des lésions à un mois d'âge qu'à 11 mois, ce qui indique que certaines lésions d'OC apparaissant en bas âge se résorbent, n'ayant donc aucune incidence clinique (Dik, Enzerink et al. 1999). Cette étude a aussi établi un « âge de non-retour », âge à partir duquel les lésions présentes ne peuvent plus se résorber (5 mois pour le jarret et 8 mois pour le grasset). Au moment où une lésion se forme dans le cartilage juvénile de l'épiphyse, un processus est enclenché pour la réparer, ce processus s'expliquant par l'activité métabolique élevé du cartilage juvénile. Or, le cartilage, contrairement à l'os, vient à perdre sa capacité de remodelage, probablement, en partie, reliée à un manque de vascularisation avec la maturité; la réparation des lésions dans le cartilage diminue donc avec l'âge. Si les lésions sont trop grandes ou si elles arrivent trop tard, elles ne peuvent pas être complètement réparées lors du remodelage du cartilage et deviennent donc permanentes. Les lésions qui persistent dans le cartilage peuvent avoir ou non une incidence clinique dans la vie future de l'animal. La capacité de remodelage du cartilage juvénile est ce qu'on appelle le renouvellement («turnover») de la matrice cartilagineuse (McILwraith 1996).

Des études réalisées au CT chez le porc ont aussi établi des périodes de susceptibilité pour le développement des lésions et un intervalle durant lequel les lésions pouvaient se résorber (Olstad, Kongsro et al. 2014b).

La capacité de réparation du cartilage juvénile influence donc également l'évolution de la condition. D'après des études récentes chez la chèvre, une espèce non atteinte cliniquement par l'OC, la capacité de réparation des lésions chondronécrotiques induites chirurgicalement par interruption de la vascularisation était considérable en comparaison au porc et au poulain (Toth, Nissi et al. 2015).

Chez les autres espèces, comme le chien et l'agneau, les lésions microscopiques observées correspondent à celles rapportées chez le porc et le cheval, ce qui suggère une étiopathogénie similaire à travers de certaines espèces (Jensen, Park et al. 1981, Carlson, Meuten et al. 1991, Wegener and Heje 1992, Scott, Gibbs et al. 1996, Hill, Sutton et al. 1998). En ce qui a trait à l'homme, de nombreuses similarités portent à croire que la pathophysiologie soit la même que celle mise en évidence chez les espèces animales, quoique les études réalisées sont faites à partir de spécimens présentant des stades plus avancés de la maladie et non les stades sous-cliniques, vu la difficulté à avoir accès à des spécimens en bas âge (McCoy, Toth et al. 2013).

1.2.3 Étiologie

1.2.3.1 Défaillance vasculaire

Tel que mentionné précédemment, une ischémie du cartilage de croissance de l'épiphyse entraîne une nécrose des chondrocytes: c'est le premier changement histologique observé témoignant l'apparition de lésions d'OC (Hill, Ruth et al. 1985, Kincaid, Allhands et al. 1985, Carlson, Hilley et al. 1986, Woodard, Becker et al. 1987, Carlson, Hilley et al. 1989, Carlson, Meuten et al. 1991, Carlson, Cullins et al. 1995, Shingleton, Mackie et al. 1997, Ytrehus, Carlson et al. 2004, Olstad, Ytrehus et al. , Olstad, Cnudde et al. 2008a, Olstad, Ytrehus et al. 2008b, Olstad, Ytrehus et al. 2008c, Olstad, Ytrehus et al. 2009, Olstad, Ytrehus et al. 2011). Pour confirmer davantage ces trouvailles, l'interruption expérimentale de la vascularisation en sectionnant des canaux de cartilage à certains endroits dans le cartilage de croissance de l'épiphyse résulte en l'apparition de lésions semblables à celles d'OC chez le porc (Carlson, Meuten et al. 1991, Ytrehus, Andreas Haga et al. 2004a), chez le cheval (Olstad, Hendrickson et al. 2013) et chez la chèvre (Toth, Nissi et al. 2015).

Mais pourquoi survient l'ischémie du cartilage? Les changements qui surviennent au niveau des canaux de cartilage lors de l'apparition de lésions d'OC ne correspondent pas à ceux de la chondrification (Carlson, Hilley et al. 1989, Carlson, Meuten et al. 1991) et aucune association n'a pu être faite entre un défaut de la chondrification des canaux de cartilage et la formation de lésions d'OC (Ytrehus, Carlson et al. 2004). Comme aucune évidence n'a pu être démontrée entre le patron global de régression des canaux de cartilage et la localisation de lésions d'OC, ceci porte à conclure que l'OC n'est pas le résultat d'une défaillance du processus général d'ossification endochondrale ou d'un facteur systémique, mais bien de facteurs locaux comme les influences biomécaniques qui altèrent les canaux de cartilage. Par contre, cette étude a démontré, indépendamment des autres facteurs étudiés, la présence d'un patron commun de régression des canaux de cartilage. En effet, l'apport vasculaire du cartilage de croissance épiphysaire est spécifique à chaque articulation et à chaque site, est bilatéralement symétrique et est relativement constant entre les espèces (Carlson, Cullins et al. 1995) (Ytrehus, Carlson et al. 2007). Ceci pourrait expliquer la manifestation de lésions d'OC à des sites de prédilection (Carlson, Meuten et al. 1991).

Le changement de l'apport vasculaire du cartilage de croissance induit par le front d'ossification rend les canaux de cartilage correspondants plus susceptibles à la rupture (Ytrehus, Ekman et al. 2004b, Olstad, Ytrehus et al. 2008c). En effet, les anastomoses qui se créent entre les vaisseaux du cartilage de croissance qui proviennent initialement du périoste et ceux de l'os sous-chondral sont fragiles, d'autant plus que la matrice adjacente est plus faible étant donné que le front d'ossification est une zone métaboliquement active (Ytrehus, Ekman et al. 2004b) (Figure 9). De plus, Ytrehus et al. (2004) ajoute à l'hypothèse de la compression locale de canaux de cartilage par des influences biomécaniques le fait que les chondrocytes peuvent réagir directement à la compression. Ceci pourrait modifier leur sécrétion de facteurs nécessaires à la vascularisation endothéliale et ainsi entraîner la chondrification.

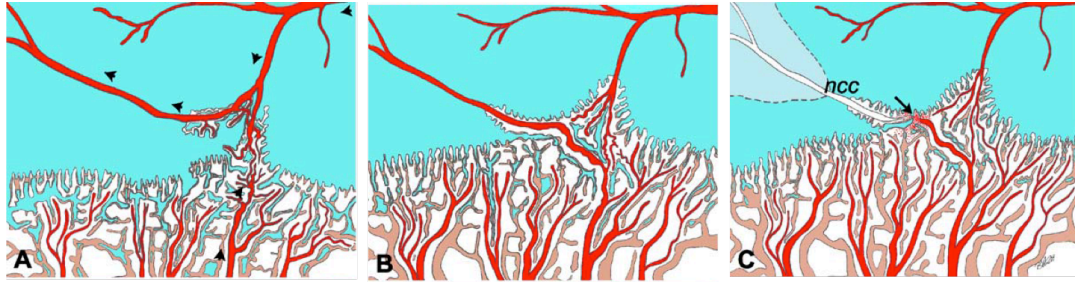


Figure 9. Modèle théorique de l'ischémie lors d'OC. Ces dessins démontrent des vaisseaux cartilagineux (rouge) dans le cartilage épiphysaire (bleu). À l'approche du front d'ossification (brun), des anastomoses entre les vaisseaux du cartilage et les vaisseaux de l'os se créent (A). Les têtes de flèche représentent la direction du flot artériel. Les vaisseaux du cartilage traversent donc la jonction ostéochondrale (B), un site avec une activité métabolique élevée et une structure changeante. Cette jonction est donc considérée plus fragile et sujette à une rupture avec les forces biomécaniques (C), engendrant ainsi une ischémie focale et la chondronecrose associée. Selon Ytrehus et al. (2004).

La figure 10 explique les facteurs étiologiques qui entraînent une défaillance vasculaire, la manière dont ils sont interreliés et aussi les raisons pour lesquels une lésion d'*OC dissecans* sera observée ou non. L'atteinte aux canaux de cartilage est causée principalement par des microtraumas qui résultent d'une prédisposition anatomique, d'un comportement ou de l'environnement. Les autres facteurs étiologiques mentionnés dans la figure 10 sont expliqués en détails dans le texte qui suit.

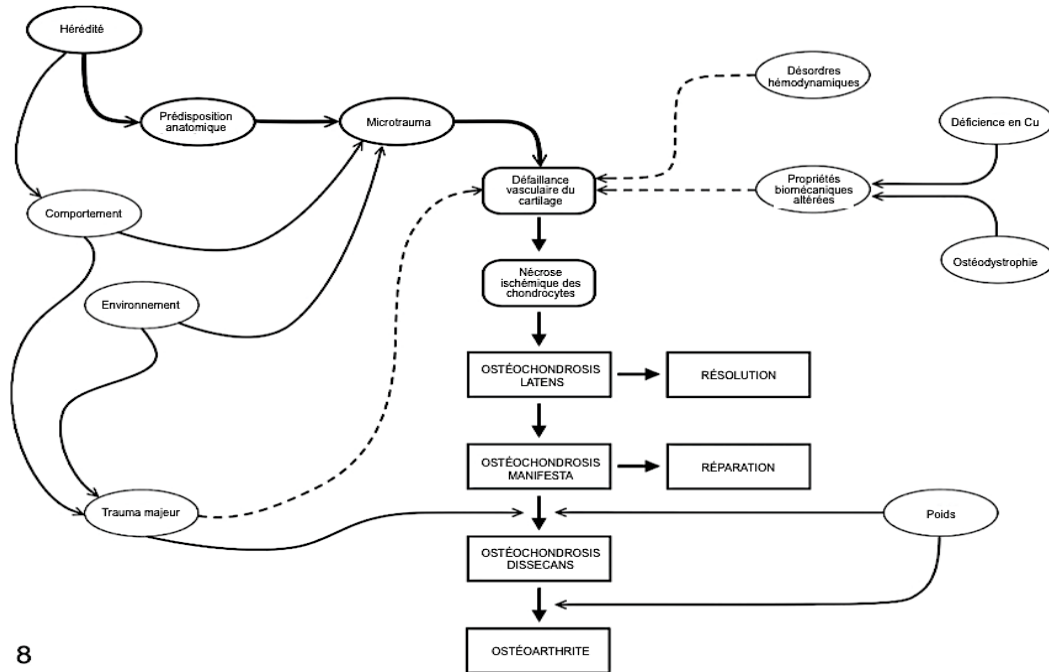


Figure 10. Schématisation de l'implication de facteurs étiologiques dans le développement d'une lésion d'ostéochondrose (Adaptée de Ytrehus et al. 2007).

Des études morphologiques et des études de perfusion sur des spécimens équins (fémur distal; tibia distal et talus; métatarse distal et première phalange proximale) en bas âge (0-7 semaines) ont démontré que la présence de structures vasculaires similaires au porc, et ce de façon constante entre les articulations et les sites de prédilection (Olstad, Ytrehus et al. 2008b, Olstad, Ytrehus et al. 2008c, Olstad, Ytrehus et al. 2009), de même qu'une apparence histologique similaire des lésions (zone de chondronécrose centrée sur un vaisseau cartilagineux nécrotique) (Olstad, Ytrehus et al. 2007, Olstad, Ytrehus et al. 2008b, Olstad, Ytrehus et al. 2011).

La configuration vasculaire de l'épiphyse, soit les vaisseaux sanguins respectivement parallèles au front d'ossification ou perpendiculaires, suite à leur anastomose avec l'os, reflète le degré de maturation du cartilage de même que la fenêtre de susceptibilité du développement de l'ischémie (Figure 11). Il existe des différences de la structure vasculaire selon la maturité chez les espèces, et même chez les races. Une étude comparative entre des poneys Norvégiens et des poulains Standardbred de même âge a souligné une différence significative entre l'épaisseur du cartilage et le nombre de vaisseaux au niveau de la trochlée latérale distale du talus, démontrant que plus de vaisseaux devaient être incorporés dans le front d'ossification chez les poulains Standardbred que les poneys Norvégiens suite à la naissance, expliquant ainsi la plus faible prévalence chez cette dernière race (Hendrickson, Olstad et al. 2015). Une prédominance des vaisseaux perpendiculaires au front d'ossification a également été démontrée chez la chèvre suite à la naissance, indiquant une morphologie plus mature suite à la naissance et expliquant peut-être ainsi la prévalence quasi nulle d'OC chez cette espèce (Toth, Nissi et al. 2015).

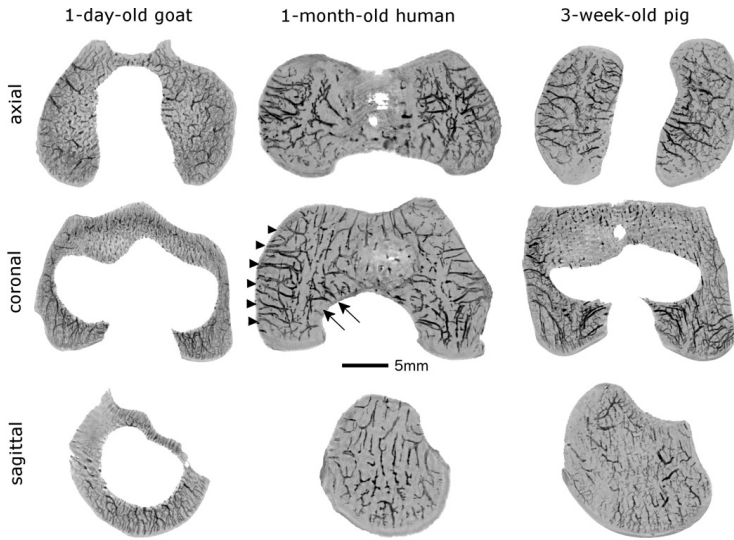


Figure 11.

Démonstration de la maturation plus avancée de la chèvre. Images comparatives de SWI démontrant la maturation plus avancée de la chèvre à la naissance par rapport à l'humain et au porc (SOC plus visible chez la chèvre). Selon Toth et al. (2005).

Une autre hypothèse soutenue par un groupe de chercheurs pour expliquer l'ischémie du cartilage de croissance implique l'occlusion bactérienne des canaux vasculaires lors de septicémie. C'est une cause de défaillance vasculaire expérimentale chez d'autres espèces dont le poulet (au niveau des vaisseaux métaphysaires et de la plaque de croissance) (Emslie and Nade 1983, Speers and Nade 1985) et le porc (déposition bactérienne dans les canaux vasculaires épiphysaires) (Denecke and Trautwein 1986, Denecke, Trautwein et al. 1986). Chez le cheval, des études ont démontré des cas sporadiques présentant des zones extensives de nécrose de l'os et du cartilage, probablement d'origine ischémique, au niveau des condyles fémoraux à la suite de septicémie (Hance, Schneider et al. 1993, Haggett, Foote et al. 2012). D'ailleurs, une étude morphologique des canaux de cartilage du cheval a démontré des discontinuités dans l'endothélium vasculaire au sein des canaux de cartilage, ce qui est reconnu comme un facteur facilitant l'adhésion de bactéries à la matrice cartilagineuse chez le porc et le poulet (Hellings, Ekman et al. 2016). Par contre, davantage d'études sont nécessaires pour pouvoir démontrer clairement un lien entre la présence de bactéries et les lésions de chondronécrose ischémique caractéristiques de l'OC.

1.2.3.2 Altérations du collagène

Des études sur l'implication potentielle du collagène dans la pathogenèse de l'OC ont été faites suite à l'hypothèse émise d'une corrélation entre l'OC et l'inhibition de l'enzyme lysyl oxydase, une enzyme dépendante du cuivre responsable de la formation des cross-links du collagène (Bridges, Womack et al. 1984). Cette inhibition de la lysyl oxydase était expliquée

par une déficience en cuivre, ce qui fut par la suite infirmé (voir section 1.3.3.3.1.1.1). Des zones de faiblesse au sein la structure du réseau de collagène (Hughes, Archer et al. 2005) (Lecocq, Girard et al. 2008) et des changements dans le métabolisme du collagène (Mubarak and Carroll 1981, Carlson, Hilley et al. 1986, Ekman, Rodriguez-Martinez et al. 1990) modifient la composition de la matrice cartilagineuse, ce qui pourrait être associé à la formation de lésions similaires à l'OC.

1.2.3.2.1 Zones de faiblesse au sein de la structure du collagène

La maturation du cartilage de sa forme fœtale à adulte implique des changements structurels et biochimiques majeurs durant lesquels le cartilage immature est moins résistant (Brama, Tekoppele et al. 2000, Hyttinen, Arokoski et al. 2001, Hughes, Archer et al. 2005, Lecocq, Girard et al. 2008, Julkunen, Iivarinen et al. 2010, van Turnhout, Kranenbarg et al. 2011). Lecocq et al. ont démontré une démarcation claire entre le cartilage articulaire et le cartilage de croissance de l'épiphyse qui apparaît entre 6 et 8 mois de gestation chez le cheval, chacun démontrant une zone isotrope de réorganisation des fibres de collagène (Lecocq, Girard et al. 2008). De plus, une organisation particulière des fibres de collagène au pourtour du front d'ossification a été identifiée : il y a un changement drastique entre l'orientation tangentielle des fibres de collagène de la zone de prolifération et entre l'orientation radiale des fibres de collagène de la zone hypertrophique du cartilage de croissance de l'épiphyse (Figure 12). Ce remodelage du collagène entre ces deux zones résulte de la sécrétion accrue de l'enzyme MMP13 par les chondrocytes hypertrophiques, ce qui crée la protéolyse du collagène, tel que discuté à la section 1.1.2. Une autre zone de faiblesse du cartilage de croissance pourrait résulter du changement d'orientation des fibres de collagène aux alentours des canaux de cartilage : les fibres deviennent rectilignes et suivent le cours des canaux de cartilage (Lecocq, Girard et al. 2008). De plus, une étude microscopique plus récente au niveau du cartilage de croissance de fémurs distaux de porcs (Finnoy, Olstad et al. 2017) semble démontrer des variations structurelles au sein de la matrice adjacente aux canaux de cartilage, soit relativement à la présence variable de collagène type I et au taux de calcification, ce qui pourrait influencer la susceptibilité de différents canaux à subir un dommage. Au niveau du tibia distal chez des fœtus et des poulains, la présence de collagène type I autour des vaisseaux semble également variable, quoique présente de façon plus

constante surtout au niveau des canaux en profondeur versus ceux superficiels (Hellings, Dolvik et al. 2017). Chacun de ses changements majeurs dans la matrice cartilagineuse au cours du développement pourrait représenter des «fenêtres de susceptibilité» à l'OC (Lecocq, Girard et al. 2008). En effet, il est connu que la jonction ostéochondral des personnes fracture avec une charge inférieure à celle des tissus adultes lorsque soumis à un impact traumatique (Flachsmann, Broom et al. 2000, Klein, Chaudhry et al. 2007).

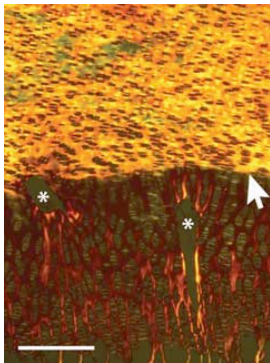


Figure 12. Changement structurel entre la zone proliférative et hypertrophique. Section du cartilage distal du tibia d'un fœtus équin de 11 mois coloré par rouge picosirius et examiné par microscopie par lumière polarisée. La flèche indique la présence d'une transition brusque entre l'orientation tangentielle (parallèles à la surface articulaire) des fibres de collagène de la zone de prolifération (haut de l'image) et celle radiale (perpendiculaires à la surface articulaire) des fibres de collagène de la zone hypertrophique (bas de l'image). (Asthérisques : canaux de cartilage). Barre = 300µm. Selon Lecocq et al. (2008)

1.2.3.2.2 Biomarqueurs associés au métabolisme du collagène

Le métabolisme du collagène peut aussi être évalué à partir de biomarqueurs dans le liquide synovial et dans le sérum, c'est-à-dire des marqueurs moléculaires d'un renouvellement anormal d'un tissu (excès de synthèse ou de dégradation) (van Weeren and Firth 2008).

Le CPII (carboxy propeptide du collagène de type II) est un marqueur anabolique du métabolisme du collagène (Nelson, Dahlberg et al. 1998, Frisbie, Ray et al. 1999, Laverty, Ionescu et al. 2000). La dégradation du collagène type II, quant à elle, est accomplie par le biais des MMPs 1, 8 et 13 (Bramono, Richmond et al. 2004). On peut aussi identifier la dégradation du collagène type II par MMP 13 grâce à un marqueur, C2C (Collagen Type II Cleavage), qui agit comme anticorps envers un des brins issus de la fragmentation du collagène type II (Poole, Ionescu et al. 2004). C1,2C, anciennement appelé *COL2-3/4C_{short}*, est un marqueur moins spécifique pour la dégradation du collagène type I et type II (Billinghurst, Dahlberg et al. 1997). 234CEQ-epitope est aussi un marqueur spécifique de la dégradation du collagène type II (Billinghurst, Buxton et al. 2001). Coll2-1, un peptide dérivé de la dégradation du collagène type II, est utilisé comme nouveau biomarqueur, de même que sa

forme nitraté, Coll2-1NO₂ (Henrotin, Deberg et al. 2004). Les changements dans le métabolisme du collagène type II dans les lésions d'OC, monitorés via la mesure des biomarqueurs, sont résumés à la section 1.3.3.2.3.

1.2.3.2.3 Changements dans le métabolisme du collagène type II

Différents changements dans le métabolisme du collagène type II ont été observés de façon récurrente lors de plusieurs études sur des spécimens atteints d'OC.

1.2.3.2.3.1 Synthèse du collagène type II

Il semble y avoir une augmentation de la synthèse du collagène type II dans les lésions d'OC, qui a d'abord été identifiée sous forme d'une augmentation du contenu en fibres de collagène de petite taille observée dans la matrice extracellulaire de cartilage porcine provenant de lésions d'OC (Carlson, Hilley et al. 1986, Ekman, Rodriguez-Martinez et al. 1990). Par la suite, différentes études à partir de biomarqueurs (Tableau III) ont mis en évidence chez le cheval une élévation de la synthèse du collagène type II chez de jeunes chevaux avec des lésions actives, mais pas chez des chevaux matures (Laverty, Ionescu et al. 2000). D'ailleurs, chez le porc de 5 à 6 mois, le niveau de CPII est considéré comme un bon indicateur de la présence d'OCD (Frantz, Friesen et al. 2010). Garvican et al., 2008 ont observé une augmentation de l'expression du gène Coll-II, gène du collagène type II au niveau de chondrocytes provenant de lésions d'OCD, quoiqu'une telle surrégulation n'a pas été observée par d'autres chez des spécimens d'OC (Semevolos, Nixon et al. 2001, Semevolos, Nixon et al. 2004, Semevolos, Strassheim et al. 2005, Mirams, Tatarczuch et al. 2009) ou d'OCD (Semevolos, Nixon et al. 2001, Semevolos, Nixon et al. 2004, Semevolos, Strassheim et al. 2005).

Tableau III. Études démontrant une augmentation de la synthèse du collagène type II lors d'OC				
Biomarqueurs	Résultats	Échantillons/tissus	Spécimens	Références
CPII	Augmentation chez les jeunes avec OC	Liquide synovial articulation tarsocrurale	Poulains Jeunes: 9-23 mois Matures: 24-48 mois	Lavery et al. 2000
CPII	Corrélation avec sévérité OC à 11 mois	Sérum	Poulains 1 semaine à 5 mois et à 11 mois	Billinghurst et al. 2004
CPII	Corrélation à 20 semaines avec sévérité OC à 22 semaines	Sérum	Poulains 2-52 semaines	Donabedian, 2008
Ratio CPII/C2C	Corrélation à 20 semaines avec OC à 22 semaines et corrélation à 52 semaines avec OC à 44 semaines Très forte corrélation à 20 semaines avec nécropsie	Sérum	Poulains 2-52 semaines	Donabedian, 2008
Ratio CPII/C2C	Ratio augmenté lorsque OC vs contrôle, significatif à 22 semaines	Liquide synovial Articulation tarsocrurale	Poulains 18-52 semaines	De Graw, 2011

L'augmentation de la synthèse de collagène dans les lésions précoces d'OCD pourrait refléter le processus de réparation, bien qu'il soit surprenant de ne pas observer d'augmentation de la synthèse des protéoglycanes, autre molécule principale dans la matrice cartilagineuse. Le marqueur de la synthèse des protéoglycanes, CS846, était diminué dans le liquide synovial (Lavery, Okouneff et al. 2002, de Grauw, Donabedian et al. 2011) et dans le sérum (Billinghurst, Brama et al. 2004) de poulains atteints d'OCD. D'autres études ont mis en évidence une diminution du contenu en protéoglycanes au sein de lésions d'OCD autant chez le cheval que chez le porc, tel que révisé par Lavery & Girard (Lavery and Girard 2013), qui concluent que à la fois la synthèse et la dégradation de protéoglycanes semblent réduites chez les jeunes animaux atteints d'OC.

1.2.3.2.3.2 Dégradation du collagène type II

Outre l'altération de la synthèse du collagène type II, certaines études ont mis en évidence une augmentation de la dégradation du collagène type II dans les stades les plus précoces de l'OC, alors qu'une autre étude n'a pas observée de différence entre le liquide synovial de poulains atteints d'OCD et celui d'articulation normale (Tableau IV). Une augmentation de

l'expression du gène MMP-13 a été identifiée dans des lésions précoces d'OC chez le cheval (Garvican, Vaughan-Thomas et al. 2008, Mirams, Tatarczuch et al. 2009) et chez le chien (Kuroki, Cook et al. 2005).

Tableau IV. Études démontrant une augmentation de la dégradation du collagène type II				
COL2-3/4C _{short} (C1,2C)	Augmentation chez les explants provenant de lésions d'OCD	Explants de cartilage	Poulains 7-12 mois avec OCD	Lavery et al., 2002
COL2-3/4C _{short}	Corrélation positive avec sévérité OCD	Sérum	Poulains 5 mois	Billinghurst, 2004
COL2-3/4C _{short}	Corrélation négative avec sévérité OCD	Sérum	Poulains 11 mois	Billinghurst, 2004
C2C	pas différence entre poulains atteints d'OCD et contrôles	Liquide synovial	Poulains 18-52 semaines	De Grauw, 2011

1.2.3.2.3.3 Contenu en collagène type II

Le contenu en collagène du cartilage lors d'OC semble également modifié. Une réduction du contenu en collagène du cartilage atteint d'OCD a été observée chez le porc et le cheval, respectivement (Wardale and Duance 1994, van de Lest, Brama et al. 2004). En effet, van de Lest et al. (van de Lest, Brama et al. 2004) ont conclu dans le cadre d'une étude faite sur des poulains entre 5 et 11 mois que le cartilage articulaire acquiert graduellement une topographie typiquement hétérogène selon un processus influencé par le poids que porte l'articulation. Des variations quant à l'augmentation du contenu total de collagène selon l'âge ont été observées entre les articulations. Il a aussi été noté que les caractéristiques du collagène diffèrent selon la gravité de la lésion d'OC. Dans les lésions précoces, une importante diminution du contenu total de collagène a été remarquée autant dans le cartilage que dans l'os sous-chondral. Quant au degré de liaison du collagène, une diminution a été notée dans le cartilage mais pas dans l'os sous-chondral. Les chercheurs de cette étude proposent des hypothèses relatives à la diminution du contenu de collagène, soit l'altération du taux de synthèse de collagène, une mauvaise incorporation du collagène nouvellement synthétisé dans la matrice ou une augmentation de la dégradation du collagène par une augmentation de l'activité protéique (van

de Lest, Brama et al. 2004). Par contre, Laverty et al. (2002) n'ont pas identifié de perte de collagène au total dans les lésions précoces d'OC puisque, malgré la dégradation accentuée, il y a une augmentation de la synthèse de collagène type II associée à la croissance.

À la lumière de ces études, il semble donc y avoir des altérations dans le métabolisme du collagène type II lors d'OC. Par contre, l'implication de ces changements dans la pathogenèse de la maladie est inconnue. Bien que plusieurs études démontrent des changements dans le métabolisme du collagène dans les lésions primaires d'OC, il n'y a aucune preuve qui démontre que ces changements soient responsables de la formation initiale des lésions (van de Lest, Brama et al. 2004). Les changements métaboliques du collagène pourraient modifier les propriétés biomécaniques du cartilage et contribuer au développement de l'atteinte vasculaire au cartilage (Laverty and Girard 2013). Les changements métaboliques pourraient aussi résulter de la chondronécrose ischémique ou encore refléter un processus de réparation. Davantage de travail en recherche doit être fait pour mieux comprendre les causes de la chondronécrose ischémique, l'implication du collagène dans la formation des lésions, tant du point de vue de sa structure et de son métabolisme, et aussi les propriétés biomécaniques du cartilage épiphysaire sain et atteint d'OC.

1.2.3.2.4 Autres altérations de l'ossification endochondrale

Des changements au niveau moléculaires au sein de la matrice cartilagineuse et/ou au niveau des mécanismes moléculaires de l'ossification endochondrale pourrait jouer un rôle dans le développement de l'OC. En plus des changements mentionnés précédemment relatifs au contenu matriciel du cartilage, des changements au niveau de l'expression de gènes de certains facteurs de croissance et de facteur paracrines au niveau des chondrocytes au pourtour des canaux de cartilage ou au niveau de la jonction ostéochondrale pourraient également contribuer dans la pathogenèse de l'OC (tel que révisé par Semevelos (Semevolos 2017)).

1.2.3.3 Autres facteurs

Il existe à l'heure actuelle un consensus dans la littérature quant à l'implication de défauts de vascularisation dans la pathophysiologie de l'ostéochondrose (van Weeren and Jeffcott 2013a). Or, les études actuelles sur les défauts de vascularisation n'expliquent pas les facteurs étiologiques qui déclenchent le développement des lésions d'OC ni la susceptibilité de

certains chevaux à savoir s'ils vont développer ou non de lésions d'OC (van Weeren and Denoix 2013b). Il existe diverses études et hypothèses relatives aux facteurs étiologiques suspectés de l'OC. Parmi ces facteurs figurent la nutrition, les facteurs hormonaux, le taux de croissance, l'exercice et les facteurs biomécaniques. Malgré les nombreuses études sur ces diverses étiologies, aucun facteur ne semble à lui seul pouvoir expliquer le développement de la maladie, qui est sans équivoque d'origine multifactorielle.

1.2.3.3.1 Nutrition, facteurs hormonaux et taux de croissance

Initialement, l'emphase de la recherche sur l'OC a été mise sur l'influence des facteurs nutritifs. Les études sont orientées d'une part sur certains minéraux et oligo-éléments, principalement le cuivre, le zinc, le calcium et le phosphore et d'autre part sur le niveau énergétique des diètes, tel que révisé par Vervuet et D. Ellis, chapitre 32 - Developmental orthopedic disease (Geor, Coenen et al. 2013).

Brièvement, c'est d'abord le lien entre le cuivre et l'OC qui a été largement étudié, et il a été conclu que le cuivre a un effet positif dans la réparation de lésions d'OC mais pas dans leur pathogenèse (AUER 2012). En ce qui a trait au niveau énergétique des diètes, son implication potentielle dans la pathogenèse de l'OC est liée au taux de croissance. En effet, bien que la hauteur finale du squelette soit un facteur génétique, la vitesse de croissance peut être influencée par la nutrition. Un apport énergétique trop élevé chez le poulain altère le taux de croissance, la prise de poids et l'apport en nutriments, tel que révisé par Harris et al. (Harris, Staniar et al. 2004). Par contre, la croissance rapide peut également résulter de prédispositions génétiques et un apport excessif en énergie ne mène pas toujours à une croissance rapide (Savage, McCarthy et al. 1993a). Malgré la controverse relative aux différents résultats des études, il existe des évidences expliquant pourquoi un apport énergétique élevé peut affecter le processus d'ossification endochondrale: un excès énergétique, surtout s'il provient d'une diète riche en carbohydrates facilement digestibles (Glade 1986a, Glade 1987) occasionne une hyperinsulémie postprandiale, qui peut affecter directement les mécanismes moléculaires de l'ossification endochondral (Ralston 1996, HENSON, Davenport et al. 1997, Williams, Kronfeld et al. 2001, Pagan, Geor et al. 2005, Treiber, Boston et al. 2005). Des études plus récentes évaluent même l'influence de la nutrition de la jument durant la gestation sur la programmation métabolique du fœtus et le

potentiel lien avec l'OC (Vander Heyden, Lejeune et al. 2013)((George, Staniar et al. 2009, Peugnet, Robles et al. 2015, Robles, Gautier et al. 2017, Robles, Nouveau et al. 2018).

1.2.3.3.2 Exercice

L'exercice est un facteur reconnu qui influence l'adaptation fonctionnelle des composantes biochimiques de la matrice cartilagineuse (Brama, TeKoppele et al. 2002), ((Brama, Tekoppele et al. 1999), (Brama, Tekoppele et al. 2000). Le cartilage articulaire se modèle de façon hétérogène durant la première année de vie, surtout les premiers mois, d'où l'hypothèse de l'influence possible de l'exercice dans le développement des lésions d'OC. Une étude préliminaire sur des poulains de 3 à 24 mois a démontré qu'un niveau élevé d'exercice est associé à une incidence d'OC de 6% alors qu'un faible niveau est associé à une incidence de 20% (Bruin, Creemers et al. 1992). Les résultats de cette étude, bien que révélateurs, ont été remis en question suite à la publication d'une étude relative à l'influence de la nutrition sur l'OC, paramètre qui n'avait pas été pris en considération (Jeffcott 1991). Des études démontrent une diminution de la sévérité des lésions d'OC chez de jeunes poulains à l'exercice (van Weeren and Barneveld 1999b, Wilke 2003). Il a aussi été observé que des poulains avec un accès restreint au pâturage, donc un faible niveau d'exercice, étaient plus à risque d'avoir des lésions d'OC, de même que des poulains ayant un niveau d'exercice irrégulier, quoiqu'un accès à un pâturage trop grand pouvait également augmenter le risque d'avoir des lésions d'OC (Lepeule, Bareille et al. 2009). Lepeule et al. (2013) ont démontré qu'un exercice restreint affecte négativement le statut ostéochondral des poulains alors qu'un accès à un pâturage trop grand augmente le risque d'être atteint de conditions ostéochondrales juvéniles. Vander Heyden et al. (2013) ont également rapporté que les poulains gardés au pâturage jusqu'à 1 an d'âge étaient significativement moins affectés d'OC que des poulains gardés exclusivement au boxe ou arlternativement au box et au pâturage (Vander Heyden, Lejeune et al. 2013). L'exercice semble donc être un facteur qui influence l'aspect final des lésions, mais ne semble pas être le facteur premier qui déclenche le développement de lésions d'OC.

1.2.3.3 Forces biomécaniques

Les forces biomécaniques jouent un rôle dans la pathogenèse de l'OC, ce qui est supporté par le fait que les lésions occurrentes à des sites spécifiques dit de prédilection, là où les forces de compression ou de cisaillement sont plus importantes (Denoix, Jeffcott et al. 2013a). Comme mentionné plus haut pour l'exercice, le poids appliqué post-partum transforme la matrice du cartilage articulaire en une matrice dont le contenu biochimique est hétérogène selon la région articulaire et le poids porté (Brama, Tekoppele et al. 2000). Ceci soutient le fait que l'application soudaine de poids sur les articulations à la naissance puisse déclencher le développement de lésions (AUER 2012). Une étude a démontré que, sur 9 fœtus équins et 10 poulains âgés entre 0 et 35 jours, seulement un poulain âgé de 3 jours avait des lésions, alors qu'aucune lésion n'était observable chez tous les fœtus (Rejnö 1978). Dans le cadre d'une autre étude, aucune lésion histologique d'OC n'a été observée chez les 21 fœtus de l'échantillonnage (Lecocq, Girard et al. 2008), ni sur les 4 fœtus d'une autre étude sur le fémur distal équin (Olstad, 2011). Les influences biomécaniques peuvent affecter la vascularisation et provoquer une ischémie, et ce probablement lors de différents stades de maturation où la susceptibilité vasculaire est accrue, comme il a été vu précédemment. Les influences biomécaniques peuvent également, sous forme de trauma, entraîner le détachement d'un fragment de cartilage suite à un défaut de l'ossification endochondrale. Les forces biomécaniques pourraient également endommager l'apport vasculaire péri-chondriale comme dans le cas d'arrachement de fibres du tendon extenseur digital long au niveau de l'aspect distal de la trochlée latérale, là où se trouve un apport vasculaire périochondrial (Rejno and Stromberg 1978, Stromberg 1979). Une étude chez le porc a également démontré des vaisseaux nécrotiques au sein du cartilage de croissance du condyle fémoral au site d'attachement du ligament croisé caudal, indépendamment de la jonction ostéochondrale (Finnoy, Olstad et al. 2017).

Une récente étude a évalué la locomotion des poulains et a démontré des changements dans les paramètres cinétiques indiquant un processus de maturation de la démarche dans les 6 premiers mois de vie. De façon intéressante également, quoiqu'aucune boiterie n'ait été visible, des variations dans les paramètres locomoteurs des poulains avec OC indiquent la présence d'une boiterie sous-clinique (Gorissen, Wolschrijn et al. 2017). Cette adaptation de la

locomotion, de même que l'adaptation posturale et de la coordination des poulains dans les premiers mois de vie (Nauwelaerts, Malone et al. 2013), pourraient également s'avérer être un cofacteur au développement des lésions d'OC, quoique davantage de recherche soit nécessaire dans ce domaine.

Une autre étude intéressante d'un point de vue biomécanique a évalué la façon dont des poulains de 6-9 mois se lèvent (en glissant ou non) dans différentes fermes et a la prévalence d'OC de ces mêmes poulains Warmblood entre 6-12 mois. Une tendance de corrélation entre le fait de glisser en se levant et la prévalence d'OC aux jarrets semblait évidente à 6 mois d'âge, mais pas à 12 mois d'âge, où même il semblait y avoir une corrélation négative entre le glissement et l'OC, peut-être parce que les poulains atteints d'OC modifient leur façon de se lever en raison de la douleur (van Grevenhof, Meerburg et al. 2017).

1.2.3.3.4 Sexe

Bien que ce soit de moins grande importance dans l'étiologie de l'OC, plus de lésions ont été observé chez les mâles que les femelles en raison probable du taux de croissance plus rapide (Ekman and Carlson 1998) (Stromberg), ce qui, par contre, n'est pas soutenu par d'autres études (B. SANDGREN), (Valentino L.W. 1999, van Weeren, Sloet van et al.).

1.2.3.3.5 Hérité et facteurs génétiques

Les connaissances actuelles concernant l'hérité relatifs à l'OC seront détaillées dans la section 4. En ce qui a trait aux études génétiques, plus de 25 loci de traits quantitatifs, soit des régions du génome pouvant contribuer à l'OC, ont été découverts, tel que révisé par Distl (Distl 2013) et par Naccache et al. (Naccache, Metzger et al. 2018). Par contre, ces loci ne sont pas constants entre les races et chaque articulation semble avoir différents loci. Une méta-analyse des études génétiques sur l'OC révèlent des regroupements caractéristiques des gènes atteints (collagène, laminine, signalement moléculaire, « turnover » matriciel, modification posttranslationnelle) (Bates, Jacobs et al. 2014). Tout de même, malgré l'immense progrès fait du côté de la génétique, il reste impensable qu'un test génétique puisse être disponible pour l'OC.

1.3 Ostéochondrose équine

Comme il a été mentionné précédemment, les lésions d'OC se forment en bas âge chez les chevaux. Or, le moment auquel les lésions se manifestent cliniquement varie selon chaque individu tout dépendamment de la présence ou non de boiterie, de la présence d'effusion articulaire, de la prise de radiographie et du moment auquel est débuté l'entraînement (AUER 2012). Dans le nord-ouest de l'Europe, on estime que 20 000 à 25 000 poulains à chaque année présenteront à divers degrés des lésions d'ostéochondrose (van Weeren and Barneveld 1999c). Une étude radiographique de 811 poulains Warmblood néerlandais entre 9 mois et 24 mois d'âge a démontré que seulement 30,5% des poulains ne présentaient aucune lésion d'OC dans les grassetts, les jarrets et les boulets (Van Grevenhof, Ducro et al. 2009). La prévalence et l'hérédité selon les races et les articulations sont résumées à la section 1.3.2 et 1.3.3.

1.3.1 Articulations et sites prédisposés

Chez le cheval, l'OC est plus souvent diagnostiqué au niveau du grasset, du tarse et des boulets, bien que des lésions aient déjà été notées dans toutes les autres articulations diarthrodiales. La distribution des lésions varie selon la race (voir section 1.3.2). Les lésions se retrouvent à des sites spécifiques dans chaque articulation, des sites prédisposés (Tableau V), et sont souvent bilatérales et symétriques. Au niveau du tarse et du grasset, il y a présence de lésions bilatéralement mais avec seulement des signes cliniques unilatéraux dans plus de 50% des cas (McIlwraith 1982). Par contre, la concomitance entre articulations est moins fréquente : à moins de signes cliniques existants, il est seulement nécessaire d'imager l'articulation controlatérale pour un bon diagnostic (AUER 2012).

Il est à noter que les fragments osseux palmaires/plantaires (POFs) dans l'articulation métacarpo/métatarsophalangienne, d'abord considérés comme étant de nature ostéochondritique (Sonnichsen, Kristoffersen et al. 1982), sont maintenant reconnus comme étant des fragments d'origine traumatique (Dalin 1993, (Nixon and Pool 1995, Barr, Pinchbeck et al. 2009, Theiss, Hilbe et al. 2010). Des lésions d'OC s'observent aussi au niveau des processus articulaires des vertèbres cervicales (Stewart, Reed et al. 1991).

Tableau V. Sites prédisposés selon l'articulation		
Articulation	Sites prédisposés	
Fémoropatellaire	lèvre latérale trochlée fémorale; lèvre médiale trochlée fémorale; sillon trochléaire du fémur; extrémité distale de la patella	(AUER 2012) (McIlwraith, Foerner et al. 1991, Dik, Enzerink et al. 1999, Bourzac, Alexander et al. 2009)
Tarsocrurale	extrémité crâniale crête intermédiaire distale tibia; extrémité distale crête latérale trochlée talus; malléole médiale du tibia	(McIlwraith, Foerner et al. 1991)
Métacarpo/métatarsophalangienne	Extrémité dorsale de la crête sagittale du métacarpien/métatarsien	(AUER 2012)
Scapulo-humérale	Face caudale de la tête humérale Cavité glénoïde (lésions kystiques)	(McILwraith 1996)

1.3.2 Prévalence selon la race – études radiographiques

Chez les équins, la susceptibilité au développement de lésions d'OC varie d'une race à l'autre et d'une population à l'autre: non seulement certaines races sont plus à risques, mais il y a aussi des variances quant aux articulations affectées. Par exemple, les Warmbloods seraient significativement plus à risque de développer des lésions d'OC que les Thoroughbreds (Lepeule, Bareille et al. 2009). De même, la prévalence globale de conditions ostéocondrales juvéniles (incluant des lésions d'OC, mais aussi d'autres lésions orthopédiques développementales dont la pathophysiologie diffère de l'OC) était plus élevée chez les Warmbloods que chez les Standardbreds et les Thoroughbreds de la population à l'étude (Jacquet, Robert et al. 2013). La distribution des lésions d'OC variait selon la race; les Standardbreds étant plus affectés au niveau de l'articulation tarsocrurale et les Thoroughbreds étant plus affectés au niveau de l'articulation fémoropatellaire, ce qui est en accord avec les conclusions de précédents rapports (McIntosh and McIlwraith 1993, Sandgren B 1993).

Il faut par contre savoir que les résultats des études radiographiques suivantes doivent être interprétés avec précaution, car l'OC est une pathologie très dynamique et, tout dépendamment de l'âge des spécimens étudiés, certaines lésions peuvent se réparer ou encore se manifester cliniquement. De plus, les résultats des études varient selon les vues prises, selon le moment choisi pour réaliser les études, de même que des critères d'inclusion des lésions et des politiques de reproduction des différentes races qui interdisent ou limitent les étalons

atteints d'OC. Il faut également considérer en regardant ces résultats que la prévalence extrapolée des populations de chevaux présentés aux ventes peut être biaisée, car probablement les poulains présentant des lésions sévères sont exclus et les poulains traités chirurgicalement avant les ventes sont inclus. Le tableau VI résume les différentes études sur la prévalence selon la race et l'articulation.

Tableau VI. Prévalence selon la race et l'articulation				
	Grasset	Jarret	Boulet	
Population	Prévalence	Prévalence	Prévalence	Référence
STANDARDBRED				
Standardbred canadien n=74, 17 mois d'âge	31,5% grasset et boulet combinés			Alvarado et al. 1990
Standardbred norvégien n=1217		19,3%	3,6%	Lykkjen et al. 2014
Trotteur français n=1337-2104, 6-24 mois d'âge	6%	15%	Avant: 6% Arrière: 23%	Ricard et al. 2013
Trotteur norvégien n= 644, 6-21 mois d'âge		14,3%	11,8%	Grondahl & Dolvik 1993
Danish trotters n=325, 18-24 mois		12%		Shougaard et al. 1990
Standardbred suédois n=793, 1,5 an		10,5%	Avant: 4,4%	Sangren 1993
THOROUGHBRED				
Thoroughbred 1 an d'âge Radiographies prises avant ou après vente	41,3% n=660	6,5% n=1101	Avant: 31% n=1127 Arrière: 27% n=1102	Kane et al. 2003
Thoroughbred 1989, n=96, 10-17mois d'âge 1990, n=120, 6-13 mois d'âge 1991, n=125, 4-8 mois d'âge	24% 10,8% 12,8%			McIntosh & McIlwraith 1993
Thoroughbred australien n=2401 Radiographies de vente	10,9%	8,7%	Avant: 6,9% Arrière: 3,4%	Jackson et al. 2003
Thoroughbred australien n=1962, >1 an	10%	6%	8%	Russel et al. 2016
Thoroughbred australien et norvégien n =1004, 1 an n=299, <1 an	8,7% 14%	7,2% 9%	7,3% 10,3%	Castle, 2015
WARMBLOOD				
Warmblood norvégien n=43, 5 mois d'âge n=19, 11 mois d'âge	LTRF 20% 3%	DIRT/talus latéral 37/8% 18/5%		Dik, Enzerink et al.1999
Warmblood allemand	7,2%	11,1%	19,5%	Arnan & Hertsch. 2004
Warmblood néerlandais n=811, 1an	28% OCD: 12%	18% OCD: 14%	23% OCD: 12%	Van Grevenhof et al. 2009
Warmblood néerlandais n= 1965	11,5%	16%		Der Kinderen 2005)

Warmblood français n=733	1-7%	11-13%	8-11%	Ricard 2002
Warmblood suédois n=3199	8.9%	6.1%	DOF : 9.5% POF : 9.9%	Jonsson et al. 2011
Italian Warmblood (Maremmano) n=350, 2-3 ans	5.1%	9.2%	0.8% DOF : 2%	Pieramati et al. 2003
Warmblood hanovrien n= 7396	4.4% OCD: 2.4%	9.7% OCD: 6.8%	7.2% OCD: 5.4%	Hilla et al. 2014
Warmblood hanovrien n=10000	2,6%	6,9%	5,4%	Hill & Distl 2013
Warmblood hanovrien n=3725, 3.5 ans Radiographies d'encan		9.6%	20.8%	Stock et al. 2005
Warmblood hanovrien n=5231, 3.5 ans Radiographies d'encan		9.2%	23.5%	Stock et Distl 2006
Warmblood hanovrien n=624		10.5%	18.3%	Schober, Coenen et al. 2003
Coldblood Allemagne Sud n=167, moyenne 14 mois d'âge		40,1% OCD 0,6%	53,9% OCD:26,4%	Wittwer et al. 2006
Selle français et Anglo-arabes, France n=1180		13,3%		Denoix & Valette 2001
Pur-sang espagnol n=309, >1 an	1,3%	33,3%	25%	Boado & Lopez- Sanroman 2016

Il est intéressant de noter que, chez les poneys, les lésions sont très rares (L.C., Henson et al. 1997). De plus, une incidence de seulement 2,5% a été trouvée pour l'articulation tarsocrurale et aucune incidence pour l'articulation fémoropatellaire lors d'une étude sur 80 chevaux de trait (Valentino L.W. 1999).

1.3.3 Héritabilité selon l'articulation

L'héritabilité et les influences génétiques de l'OC sont sujets à beaucoup d'études, mais les résultats diffèrent beaucoup d'une étude à l'autre, encore une fois en raison du caractère dynamique de la pathogenèse des lésions et de la méthodologie des études. Tout comme la prévalence, l'héritabilité varie d'une race à l'autre. L'OC une pathologie à caractère polygénique, et probablement une portion de son expression dépend de l'épigénétique (van Weeren and Jeffcott 2013). Plusieurs gènes ont été identifiés et varient d'une articulation à

l'autre. Les influences génétiques sont révisées par Distl et al. (Distl 2013), mais dépassent le sujet de la présente recension de la littérature. Le tableau V résume les différentes études sur l'héritabilité selon la race et l'articulation.

Population	Grasset		Jarret		Boulet		Référence
	Prévalence	Héritabilité	Prévalence	Héritabilité	Prévalence	Héritabilité	
Meta-analyse plusieurs races		0.10 ±0.04		0.17±0.06		0.15±0.03	Russel et al. 2016
Australian Thoroughbred n=1962	10% LTR : 6%	0.16±0.12 LTR : 0.21±0.17	6%	0.10±0.19	8%	0.05±0.23	Russel et al. 2016
Newzeland & Australian Thoroughbred n =1004	8.7%	0.010	7.2%	0.10	7.3%	0.15	Castle, 2015
French Trotters n=1337-2104	6%	0.02	15%	0.19	Avant: 6% Arrière: 23%	Avant: 0.01 Arrière: 0.29	Ricard et al. 2013
Dutch Warmblood n=811	28% OCD: 12%	0.06±0.07 OCD:0.09±0.11	18% OCD: 14%	0.36±0.11 OCD:0.26±0.09	23% OCD: 12%	0.14±0.08 OCD:0.06±0.07	Van Grevenhof et al. 2009
Dutch Warmblood n= 1965	11.5%	0.09	16%	0.11			Der Kinderen 2005
Dutch Warmblood n=590				0.14±0.17			KWPN 1994
French Warmblood n=733	1-7%	0.00-0.17	11-13%	0.00-0.02	8-11%	0.04-0.21	Ricard 2002
Swedish warmblood n=3199	8.9%	0.09±0.11	6.1%	0.32±0.16	DOF : 9.5% POF : 9.9%	DOF:0.32±0.16 POF:0.38±0.12	Jonsson et al. 2011
Italian Warmblood (Maremano) n=350	5.1%	OCD: 0.09±0.24	9.2%		0.8% DOF : 2%	DOF :0.13±0.23	Pieramati et al. 2003
Hanoverian Warmblood n=7396	4.4% OCD: 2.4%	0.21±0.04 OCD: 0.23±0.07	9.7% OCD: 6.8%	0.35±0.04 OCD:0.46±0.06	7.2% OCD: 5.4%	0.16±0.03 OCD:0.16±0.04	Hilla et al. 2014
Hanoverian Warmblood n=3725			9.6%	OCD:0.27±0.06	20.8%	OCD: 0.19±0.03	Stock et al. 2005
Hanoverian Warmblood n=5231			9.2%	OCD:0.28±0.04	23.5%	OCD:0.17±0.03	Stock et Distl 2006
Hanoverian Warmblood n=624			10.5%	0.08±0.05	18.3%	0.12	Schober 2003
Holsteiner mares n=356				0.34±0.06			Willms et al. 1999
Holsteiner foals n= 624				0.19±0.02			Willms et al. 1999
French trotters n= 525				0.45±0.11		0.27±0.13	Teyssède et al. 2012

Norwegian trotter n= 644			14.3%	0.52	11.8%	OCD: 0.21	Grondahl & Dolvik 1993
Swedish trotters n=793			10.5%	0.27±0.08	21.5%	OCD:0.17±0.06	Philipsson et al. 1993
Danish trotters n=325			12%	0.26±0.14			Schougaard et al. 1990
Standardbred trotters n=1217				0.29±0.15			Lykkjen et al. 2014
South German Coldblood n=167			40.1%	0.04±0.07	53.9% OCD:26.4%	0.16±0.16 OCD:0.08±0.09	Wittwer et al. 2007
German riding horses n= 2407				0.07±0.03			Winter et al. 1996

Une méta-analyse a été réalisée en 2016 à partir des données d'héritabilité de plusieurs races issues de différentes études et les données estimées d'héritabilité étaient de 0.10 ± 0.04 pour l'OC au niveau du grasset, de 0.17 ± 0.06 pour le jarret et 0.15 ± 0.03 au niveau du boulet (Russell, Matika et al. 2016). Ces données semblent démontrer une héritabilité suffisante pour justifier un programme de sélection des reproducteurs. Une simulation réalisée en 2003 basée sur l'héritabilité Maremmanos (Warmbloods italiens) d'un programme de reproduction sélectif (à la fois les étalons et les juments) a démontré sur 5 générations la diminution de l'incidence d'OCD de 16% à 2%, en plus d'avoir testé des modèles de sélection se basant sur le statut des étalons seulement et des étalons et de leur mère (réduction de l'incidence à 5.8% et 5.6% respectivement) (Pieramati, Pepe et al. 2003). En contraste, des pratiques de sélection des étalons existent depuis 1984 par le « Royal Dutch Warmblood Studbook (KWPN), soit la rejection d'étalons présentant des signes d'OC au jarret et également depuis 1992 au grasset, sans pourtant que l'incidence d'OC ne soit diminuée de façon substantielle en 2010 (AUER 2012).

1.4 Problématique reliée au grasset équin

L'OC au niveau du grasset équin présente des particularités importantes qui en complique la gestion clinique (développement plus tardif de l'articulation) et présente des conséquences plus importantes sur la carrière des chevaux atteints (pronostic suite au traitement moins favorable), tel qu'il sera discuté dans la présente section. La pathogenèse des lésions pourrait différer également puisque l'héritabilité est faible pour cette articulation

comparée aux autres (selon une récente méta-analyse, 0.10 comparativement à 0.17 pour le jarret et 0.15 pour le boulet (Russell, Matika et al. 2016)), ce qui veut dire qu'une plus grande proportion de son expression dépend de facteurs environnementaux ayant un impact à un autre niveau que la génétique.

La majorité des lésions d'OC au tarse et au boulet sont diagnostiquées soit au moment où de l'effusion articulaire est remarquée, soit lorsqu'une boiterie devient visible (souvent au début de l'entraînement) ou soit au moment de la prise de radiographies au sevrage ou pour les ventes. En ce qui a trait au grasset, l'OC entraîne des signes cliniques plus sévères plus tôt, avant 1 an (entre 4 et 9 mois) (DABAREINER, SULLINS et al. 1993), soit de l'effusion articulaire, de la difficulté à se lever, une boiterie sévère ou une allure qualifiée de « bunny hop » (foulées raccourcies aux membres postérieurs). Il faut tout de même que les éleveurs soient attentifs pour déceler ces signes, notamment car l'effusion articulaire est moins facilement assimilable que pour les autres articulations. L'identification précoce des signes cliniques et des lésions est primordiale pour limiter leur progression et idéalement favoriser leur guérison.

1.4.1 Développement tardif de l'articulation

Différentes études sur le développement articulaire du poulain ont mis en évidence une maturation plus tardive de l'épiphyse du fémur distal (Firth and Greydanus 1987, Lecocq, Girard et al. 2008, Olstad, Ytrehus et al. 2008c). Ceci veut donc dire que le fémur distal présente certaines caractéristiques structurelles plus longtemps après la naissance, le rendant plus vulnérable à l'apparition d'OC.

Selon une étude au CT et à l'IRM 1.5T de fœtus équins, le second centre d'ossification du fémur distal apparaît à 7 mois de gestation, alors que celui du tibia distal apparaît à 8 mois de gestation (Fontaine, Blond et al. 2013). L'ossification commence au niveau du sillon intertrochléaire de la trochlée fémorale et s'étend de façon radiale. L'aspect cranio-proximal de la trochlée fémorale médiale et latérale est le dernier site à s'ossifier et conserve une portion cartilagineuse après la naissance. Le cartilage de la trochlée latérale est significativement plus épais que celui de la trochlée médiale à 8-9 mois de gestation, mais cette différence n'est plus significative après la naissance, selon Fontaine et al., 2013

(Fontaine, Blond et al. 2013). Par contre, selon Firth, 1987, le cartilage de la trochlée médiale est plus épais que celui de la trochlée latérale à 150 jours post-partum (Firth and Greydanus 1987). Le pourcentage de cartilage mesuré à différents sites était plus élevé au niveau des sites de prédilection d'OC du tibia distal et de la trochlée fémorale médiale et latérale à la naissance.

Seulement le fémur distal présentait des irrégularités du front d'ossification, selon Fontaine et al., 2013, ce qui supporte les trouvailles d'une étude histologique de fœtus équins qui a démontré que les irrégularités du front d'ossification étaient plus présentes au niveau de l'articulation scapohumérale et fémoropatellaire/fémorotibiale (Lecocq, Girard et al. 2008). Ces irrégularités perdurent jusqu'à 11 semaines d'âge (Adams, 1985) et rendent l'interprétation radiographique plus complexe en bas âge (Gorissen, Wolschrijn et al. 2017). Lecocq et al., 2008 ont également démontré des zones avec des changements matriciels, notamment une perte de protéoglycanes, présentes chez 38% des fœtus de 6-9 mois, et chez 6% des poulains à la naissance. Ces zones étaient présentes après la naissance seulement au niveau du grasset et pas au niveau du boulet ou du tarse. Lecocq et al., 2008 ont aussi démontré que le cartilage épiphysaire du grasset est plus vascularisé à la naissance, comparé aux autres articulations. Le fémur distal conserve également son apport vasculaire au cartilage épiphysaire plus longtemps qu'au niveau du tarse. Selon une étude ex vivo de la vascularisation de l'épiphyse du fémur distal, la portion distale de la trochlée fémorale médiale ainsi que le sillon intertrochléaire deviennent avasculaires en premier, vers l'âge de 6 semaines, suivis par la portion distale de la trochlée latérale vers 7 semaines. La portion proximale de la trochlée fémorale médiale et latérale contient encore des vaisseaux cartilagineux à 7 semaines d'âge (Olstad, Ytrehus et al. 2008c). La trochlée fémorale devient complètement avasculaire entre l'âge de 5 et 7 mois (Carlson, Cullins et al. 1995), contrairement au tarse qui est en partie avasculaire à 7 semaines d'âge, sauf au niveau de la malléole médiale du tibia (Olstad, Ytrehus et al. 2007) et complètement avasculaire vers 10 semaines (Carlson, Cullins et al. 1995).

Le cartilage articulaire du fémur distal est métaboliquement plus actif que celui du tibia distal chez des poulains de 1 an (Bertone, Bramlage et al. 2005). En effet, la synthèse de protéoglycanes était significativement plus élevée au niveau des chondrocytes de la trochlée

fémorale latérale comparativement à des chondrocytes du tibia distal, quoique le contenu total en glycosaminoglycanes du cartilage ne différait pas entre ces deux sites chez des chevaux cliniquement normaux. Le contenu en glycosaminoglycanes provenant de fragments de cartilage de la trochlée fémorale était significativement plus élevé que celui des fragments du tibia distal.

La fenêtre de susceptibilité durant laquelle les lésions d'OC se modulent, associée à une période de turnover plus élevé du cartilage épiphysaire, survient plus tard au niveau du fémur distal (4 à 8 mois) que du tibia distal (1 à 5 mois) (Dik, Enzerink et al. 1999, Donabédian 2006, Jacquet, Robert et al. 2013). Les lésions de chondronécrose ischémique sont observées entre 12 et 153 jours au niveau du tarse et entre 31 à 336 jours (Olstad, Ytrehus et al. 2008b), en moyenne 148 jours, au niveau de la trochlée fémorale (Olstad, Ytrehus et al. 2011).

1.4.2 Traitements

Le choix du traitement des lésions d'OC au grasset dépend de la présentation clinique, soit la sévérité de la lésion radiographique et l'âge de l'animal. En général, les chevaux atteints d'OC au niveau du grasset présentent des signes cliniques autour de l'âge de 1 an ou plus jeunes si les lésions sont plus sévères (Foland, McIlwraith et al. 1992). Chez les jeunes animaux, la capacité de guérison est supérieure, tel qu'expliqué précédemment. Des lésions focales d'OC au niveau du grasset peuvent guérir jusqu'à 11 mois d'âge (Dik, Enzerink et al. 1999), et il est donc conseillé d'attendre après cette période pour les opérer.

McIntosh et al. ont suivi les cohortes de poulains 3 années consécutives sur une ferme de Thoroughbreds et en ont noté l'évolution selon les signes cliniques, l'âge de diagnostic et les traitements (McIntosh and McIlwraith 1993). La première cohorte de chevaux étudiée en 1989 a rapporté que 50% des poulains traités de façon conservative avaient par la suite pris part à des courses (l'âge de diagnostic moyen était de 12.6 mois). En 1990, 6 des 13 poulains traités de façon conservative (l'âge moyen de diagnostic était de 9 mois) ne présentaient plus de signes cliniques (3 ont coursé), 3 avaient des signes cliniques persistants, 3 n'ont pas eu de suivi et 1 était atteint d'OC au niveau des boulets, mais a guéri au grasset. En 1991, les lésions d'OC fémoropatellaire ont été diagnostiquées avant 8 mois d'âge (âge moyen 6 mois)

et le taux de succès du traitement conservateur était grandement supérieur (10 chevaux sur 16 ont été entraîné ou coursé, dont 3 avaient initialement des lésions de haut grade (3, 4)). Cette étude réalisée en 1993 a soulevé 3 points qui sont encore aujourd'hui d'intérêt dans la décision adéquate de la gestion d'une lésion d'OC : d'abord, l'importance du diagnostic précoce pour un succès accru du traitement conservateur, ensuite l'identification adéquate des lésions pour savoir lesquelles doivent être traitées chirurgicalement ou de façon conservatrice et, finalement, la limite des radiographies pour détecter les lésions précoces (chevaux avec signes cliniques sans changements radiographiques initialement). En comparaison, le suivi de 9 cas d'OC du grasset de poulains entre 5 et 12 mois rapporte une absence d'amélioration de la boiterie et de l'effusion articulaire (3 chevaux) et même la progression des lésions (4 chevaux) avec un traitement conservateur (repos au boxe ou en petite paddock) initialement (DABAREINER, SULLINS et al. 1993).

À l'heure actuelle, un traitement conservateur peut donc être recommandé lorsque la taille des lésions radiographiques sur la lèvre latérale de la trochlée fémorale est moindre que 2cm de long, 5 mm de profond et sans présence de fragmentation (McIlwraith 2013). On entend par traitement conservateur un repos et un exercice contrôlé avec plus ou moins l'administration d'anti-inflammatoire non-stéroïdiens, quoique pas d'études ne se soient penchées sur la question. Une étude sur l'effet de l'administration d'un supplément oral d'acide hyaluronique chez des poulains de 8 à 36 mois avec de l'OCD au niveau de l'articulation tarsocrurale n'a pas démontré de différences significatives par rapport au traitement placebo (Carmona, Arguelles et al. 2009). Le traitement conservateur implanté lors de l'étude de McIntosh et al. en 1993 comprenait un repos dans un petit paddock de sable (30 x 50 pieds) pour une période de 60 à 90 jours avec quelquefois préalablement un repos au boxe de 30 jours (McIntosh and McIlwraith 1993).

Chez les jeunes poulains, il y a maintenant une chirurgie orthopédique qu'on peut proposer pour essayer de fixer le fragment de cartilage en place. Si cette première chirurgie n'est pas efficace, il est possible par après de retourner en chirurgie pour débrider. Les fragments plus larges peuvent être fixés avec des tiges de polydioxanone résorbables, tel que décrit par Nixon et al. (Nixon, Fortier et al. 2004). Cette technique ne s'applique qu'à un nombre restreint de cas présentant des fragments (« flaps ») de cartilage non calcifié dont la surface présente peu d'irrégularités (sur 87 chevaux opérés, la technique ne s'appliquait qu'à 9

chevaux, soit 10.3%). Les résultats de cette intervention sont intéressants, soit une résolution rapide des signes cliniques en 6 à 8 semaines (diminution de l'effusion articulaire et de la boiterie), la résolution radiographique complète en 6 à 12 mois et la disparition complète des tiges entre 3 et 6 mois. Bien qu'initialement le succès de cette intervention semblait supérieur chez les chevaux plus jeunes (< 8 mois), en raison de la persistance de l'attachement du fragment cartilagineux et l'absence de calcification (critères d'inclusion surface articulaire régulière, >50% de la bordure du fragment attachée et absence de minéralisation), une nouvelle étude avec un suivi à long terme semble rapporter un taux de succès de 95% chez 26 chevaux, et ce en élargissant les critères d'inclusion (présence modérée de fibrillation de la surface, une petite partie du fragment attachée et présence de minéralisation (chez 6 des chevaux)), ce qui a donc permis de réaliser le succès de cette technique même chez des chevaux de plus d'un an (Sparks, Nixon et al. 2011). Bien qu'on ne sache pas le pourcentage de chevaux qui auraient pu guérir naturellement sans cette intervention, une telle chirurgie est recommandée si une lésion large est identifiée chez des poulains de 7 à 10 mois d'âge dans le but de préserver la surface articulaire et d'empêcher le déplacement du fragment cartilagineux.

Le traitement de débridement chirurgical est recommandé chez les chevaux de plus de 11 mois qui présentent de l'effusion articulaire et/ou une boiterie. En chirurgie, les fragments et débris intra-articulaires sont retirés et la lésion cartilagineuse est débridée jusqu'au tissu sain, quoiqu'il faille faire attention dans le cas des jeunes chevaux puisque leur os sous-chondral est mou et qu'il est difficile de faire la distinction entre du tissu normal et lésionnel (McIlwraith 2013). Il a été démontré *in vitro*, à partir de chondrocytes provenant de fragments ostéochondraux de la LRTF retirés chirurgicalement chez des chevaux avec un âge moyen de 5,9 ans, que bien que le phénotype des chondrocytes soit perturbé, ils conservent tout de même la capacité de synthétiser de la matrice cartilagineuse, quoique de façon moindre comparé à des chondrocytes normaux (Garvican, Vaughan-Thomas et al. 2008).

D'autres méthodes de traitement expérimental ont été rapportées, mais ne sont pas encore utilisées de routine en clinique, de par leur manque de validation scientifique ou de leur nouveauté. D'abord, des injections concentrées de moelle osseuse dans des lésions cartilagineuses extensives créées expérimentalement sur la LRTF chez des chevaux âgés de 2 à 5 ans ont permis la guérison en comparaison avec la réalisation de micro-fractures dans l'os

sous-chondrale de lésions expérimentales similaires (Fortier, Potter et al. 2010). 8 mois après les interventions, la réparation tissulaire était supérieure, avec plus de collagène type II et de glycosaminoclycanes, chez les chevaux ayant subi une injection de moelle osseuse concentrée versus ceux ayant subi l'induction chirurgicale de micro-fractures. Des injections de moelle osseuse concentrée sous le fragment ostéochondral fixé avec des tiges résorbables ont d'ailleurs été faites dans 21 des 44 articulations traitées de l'étude de Sparks et al (2011), et, bien qu'une tendance d'amélioration de la guérison ait été noté par les auteurs, cette différence n'était pas significative (Sparks, Nixon et al. 2011). Un rapport de cas datant de 2016 d'une pouliche Thoroughbred de 15 mois présente avec d'importantes lésions d'OCD affectant bilatéralement les LRTF (longueur, profondeur et largeur de 46, 22 et 20 mm respectivement à gauche et de 49, 23 et 19 mm à droite) rapporte un guérison quasi complète du défaut ostéochondral suite à un traitement avec greffe d'une matrice multicouches à base de collagène, avec la formation d'une couche de cartilage à la surface et sans changements ostéoarthritiques, de même que la disparition de la boiterie de la pouliche après un suivi de 22 mois (Stack, Levingstone et al. 2017). Cette technique s'avèrera peut-être, avec plus d'évidence scientifique, être une technique palliative pour les lésions sévères d'OC.

En ce qui concerne brièvement les autres articulations, on recommande également un traitement conservateur pour les lésions au niveau de la crête sagittale du métacarpe et métatarse lorsque seule la présence d'un aplatissement de la crête sans fragmentation est présente (McIlwraith 2013). Si un fragment est présent, le retrait chirurgical est indiqué.

En contrepartie, au niveau du tarse, malgré qu'une étude ait démontré un résultat favorable avec un traitement conservateur en présence d'une lésion unique d'OC au niveau du tarse, sans présence d'effusion articulaire, chez des Standardbreds de course (Brendov 1997), les lésions sont souvent quand même traitées chirurgicalement lorsque le cheval est destiné à une carrière sportive. Il est noté que l'effusion articulaire revient à la reprise de l'exercice suite à traitement conservateur au niveau du tarse (McIlwraith 2013). Pour diminuer la distension permanente de la capsule articulaire, il faut procéder à la chirurgie le plus tôt possible, quoiqu'il faille attendre après 5 mois d'âge, âge jusqu'à laquelle les lésions d'OC au niveau du tarse peuvent naturellement régresser (Dik, Enzerink et al. 1999). Le traitement conservateur pour les lésions d'OC au niveau de l'épaule présente un pronostic plus sombre (Bertone,

Bramlage et al. 2005), quoique c'est également le cas avec le traitement chirurgical (environ 45%, Howard and McIlwraith, data non publié).

En médecine humaine, un traitement conservateur (anti-inflammatoires, physiothérapie, réduction de l'activité et immobilisation articulaire) est implanté initialement pour les lésions d'OC lorsque la surface articulaire est intacte et en l'absence de fragments visibles à l'IRM (McCoy, Toth et al. 2013).

1.4.3 Pronostic

Le pronostic des lésions d'OC au niveau du grasset dépend grandement de l'étendue de la lésion, de l'âge de diagnostic et du traitement choisi.

Pour le traitement conservateur, malgré le peu d'études, tel que mentionné précédemment, on rapporte un taux de succès de plus de 50% (McIntosh and McIlwraith 1993), et ce surtout si les lésions sont diagnostiquées en bas âge et que leur grade est de 2 ou moins (définition des grades radiographiques: grade 1= perte de contour de la trochlée; grade 2 = zone irrégulière ou concave <2cm long et <5mm profond; grade 3= zone irrégulière ou concave 2-4 cm long +/- fragmentation; grade 4 = zone irrégulière ou concave > 4cm long), quoique certaines lésions de grade supérieur aient guéri sans traitement chirurgical.

Le traitement chirurgical via arthroscopie présente un pronostic modéré. Le pronostic de retour à la performance suite à un débridement arthroscopique est de 54 à 78% chez les chevaux de course selon le grade de la lésion (78 % pour les lésions de grade I de <2cm; 63% pour les lésions de grade II de 2-4cm; 54% pour celles de grade III de >4cm) (Foland, McIlwraith et al. 1992) et de 66% chez les chevaux de selle (UpRichard, Elce et al. 2013). UpRichard et al. ont aussi démontré que le pronostic était 10 fois pire lorsqu'une autre structure en plus de la trochlée fémorale latérale, soit la patella ou la trochlée fémorale médiale, était atteinte. Il faut aussi prendre en considération que ces pourcentages peuvent même être trop optimistes, car la majorité des chevaux présentant des lésions fémoropatellaires d'OC ne sont pas opérés (van Weeren and Jeffcott 2013). Les performances sportives des chevaux de course et de sport sont diminuées chez les chevaux de course (moins de départs, moins bon classement et moins de gains en argent en comparaison avec des contrôles de même âge) (Clarke, Reardon et al. 2015).

La technique chirurgicale visant à la fixation avec des tiges résorbables de fragments ostéochondraux, telle que décrite précédemment, semble avoir un pronostic plus favorable, soit de 95% et ce même en présence de changements plus chroniques (minéralisation du fragment) ou des lésions plus extensives (> 2cm de long), et ce chez les chevaux de plus d'un an. Il faut par contre considérer que seulement 6 chevaux avec des fragments minéralisés au niveau de la trochlée fémorale ont été opérés. Cette technique serait 8 fois plus efficace que le débridement chirurgical pour améliorer le score radiographique du contour de l'os sous-chondral et 20 fois plus efficace en ce qui concerne le remplissage de l'os sous-chondral 6 mois après la chirurgie (Sparks, Nixon et al. 2011). Par contre, il n'y avait pas différence 12 mois post chirurgie pour les deux techniques. Tout dépendant de la sévérité de la lésion, cette technique demeure intéressante, surtout lorsque le but visé est d'améliorer rapidement l'apparence radiographique en vue de ventes.

1.5 Évaluation des lésions

Malgré des décennies de recherche relative, l'étiologie exacte de l'OC demeure incomprise. Chose certaine, l'OC est une condition multifactorielle qui ne semble pas être possible d'éradiquer ou de contrôler à l'aide d'un simple ajustement environnemental. D'où l'intérêt grandissant pour des moyens d'imagerie pour identifier les lésions d'OC sous-cliniques à leur stade le plus précoce, en bas âge, pour favoriser leur gestion dans le but de favoriser leur guérison.

L'identification précoce des lésions d'OC au grasset demande une attention particulière des propriétaires pour remarquer les signes cliniques subtils. Tel que mentionné à la section précédente, le grasset est une articulation complexe et les propriétaires, de même que les vétérinaires, peuvent manquer des signes cliniques subtils, tels que de l'effusion articulaire, sauf si l'animal présente une boiterie, ce qui est le cas à un stade plus avancé.

Il serait même d'une grande utilité d'avoir des moyens de dépistage non-invasifs à grande échelle pour identifier les lésions précoces à leur stade sous-clinique pour limiter idéalement leur progression et pour faciliter leur guérison.

Des méthodes de diagnostic précoce et de suivi des lésions sont nécessaires pour déterminer le meilleur traitement et pour faire le suivi de son efficacité. Puisque l'OC a un

caractère dynamique en bas âge, un suivi régulier est utile pour voir la régression naturelle des lésions avec un traitement conservateur, mais aussi pour s'assurer qu'il n'y ait pas plutôt une progression des lésions.

La radiographie est utilisée à l'heure actuelle pour le diagnostic de lésions d'OC. Par contre, il a été démontré que la radiographie ne corrèle pas avec les trouvailles arthroscopiques chez les adultes (Steinheimer, McIlwraith et al. 1995) et est moins sensible que l'échographie pour les lésions au niveau de la trochlée fémorale médiale (Bourzac, Alexander et al. 2009). De plus, au niveau de la trochlée fémorale, en raison des irrégularités du front d'ossification en bas âge, l'interprétation radiographique est ardue (Dik, Enzerink et al. 1999, Gorissen, Wolschrijn et al. 2017).

En considérant la pathogénèse de l'OC, l'ischémie ou la chondronécrose seraient les indicateurs les plus précoces d'OC à identifier par imagerie suivi d'un délai focal ou multifocal de l'ossification endochondral. Diverses méthodologies d'imagerie, dont l'IRM, le CT et l'échographie, permettent la visualisation et caractérisation du cartilage et de l'os, avec des avantages et limitations propres à chacune. Un travail scientifique extensif a été récemment fait pour développer et valider de nouvelles techniques d'imagerie articulaire non-invasives, à la fois en médecine vétérinaire et en médecine humaine.

1.5.1 Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique est une modalité d'imagerie utilisée massivement en médecine humaine pour l'évaluation clinique et expérimentale du système myoarthrosquelettique. La littérature rapporte de nombreuses études relatives au développement épiphysaire, à la dégénérescence et à la réparation du cartilage articulaire en lien avec des pathologies comme l'ostéoarthrose et l'OC.

Des séquences d'IRM spécifiques ont été mises au point pour visualiser la morphologie du cartilage et aussi pour évaluer quantitativement la composition du cartilage. Les séquences conventionnelles d'IRM servant à évaluer le cartilage créent un contraste entre les structures grâce à la variation de l'intensité du signal des pixels de l'image selon le temps de relaxation longitudinal (T1) ou celui transversal (T2) (Binks, Hodgson et al. 2013). Un rappel du fonctionnement de base de l'IRM est fourni à la section 3.2.

1.5.1.1 Évaluation quantitative de la matrice cartilagineuse

Les séquences d'IRM quantitatives rendent possibles l'évaluation de l'ultrastructure et du contenu du cartilage, offrant davantage d'information que les séquences morphologiques de base. Les séquences quantitatives comprennent notamment les séquences de mesure de relaxométrie (T1rho, T2 et T2* mapping et T1), lesquelles sont d'intérêt dans l'évaluation du cartilage. À ce jour elles sont largement utilisées et validées en médecine humaine, notamment pour des études sur l'ostéoartrite du genou (MacKay, Low et al. 2018).

Le temps de relaxation T1rho, qui correspond à la relaxation spin-réseau dans le référentiel tournant, diffère des temps de relaxation T1 et T2, tel qu'expliqué dans la section 3.2.3. Le T1rho mapping a été utilisé pour le diagnostic précoce de la dégénérescence du cartilage et est reconnu comme étant sensible aux changements dans le contenu en protéoglycanes du cartilage, le signal variant de façon inversement proportionnelle au contenu (tel que révisé par Li & Majumdar (Li, Pai et al. 2009).

Le temps de relaxation T2 du cartilage articulaire reflète le contenu en eau, en collagène ainsi que l'orientation des fibres de collagène dans la matrice cartilagineuse (tel que révisé par Li & Majumdar (Li, Pai et al. 2009). T2 varie selon les zones du cartilage articulaire : le signal augmente de la zone profonde à la zone superficielle, démontrant ainsi la structure trilaminaire du cartilage mature (Xia, Moody et al. 2001, (Lehner, Rechl et al. 1989, Nieminen, Rieppo et al. 2001, Loeuille, Olivier et al. 2002, Kurkijarvi, Nissi et al. 2008, Li, Pai et al. 2009). Chez les animaux en bas âge, jusqu'à 7 couches sont visibles dans le cartilage (Figure 15) (Nissi, Rieppo et al. 2006). Davantage d'informations sur les facteurs influençant le temps de relaxation T2 sont fournies à la section 4.2.1

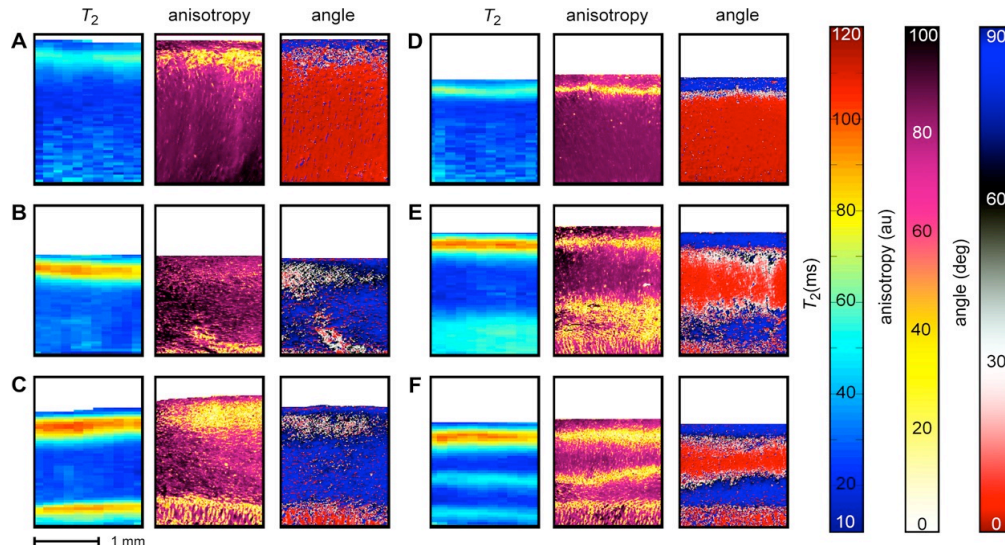


Figure 13. Cartographies représentatives du temps de relaxation T2, de l'anisotropie et de l'angle des fibrilles du cartilage humain qui démontrent 3 couches (A), du cartilage porcine qui démontre 3 couches (B) ou 5 couches (C) et du cartilage bovin qui démontre 3 (D), 5 (E) ou 7 (F) couches. Selon Nissi et al. (2006).

L'IRM quantitatif a très peu été étudié chez le cheval, et jamais dans un contexte développemental. Quelques études ont utilisé la séquence d'IRM quantitatif «delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging» (dGEMRIC) pour évaluer le contenu cartilagineux en protéoglycanes à l'aide de matériel de contraste (Menendez, Clark et al. 2011, Carstens, Kirberger et al. 2013, Carstens, Kirberger et al. 2013b). Une étude a également validé le T2 mapping pour l'évaluation de l'épaisseur du cartilage articulaire du métacarpe/métatarsale distal (Carstens, Kirberger et al. 2013b). Une étude in vitro (White, Sussman et al. 2006) et une autre in vivo (Menendez, Clark et al. 2011) ont utilisé le T2 mapping pour démontrer des différences entre les temps de relaxation du cartilage normal et en réparation. Le T1rho n'a jamais été utilisé chez le cheval (Nelson, Kawcak et al. 2018). L'IRM quantitatif a été utilisé chez la chèvre pour analyser des lésions ischémiques induites chirurgicalement et pour identifier des lésions chondronécrotiques (ex vivo, T1rho adiabatique avec IRM 9.4T (Toth, Nissi et al. 2015); ex vivo, T1, T2, T1rho, T1rho adiabatique et TRAFF avec IRM 9.4T (Wang, Nissi et al. 2015); in vivo, T2 avec IRM 3T (Toth, David et al. 2017).

1.5.1.2 IRM et vascularisation

L'administration de matériel de contraste par voie intraveineuse crée un contraste entre les vaisseaux et les tissus adjacents, ce qui permet la visualisation des canaux de

vascularisation du cartilage de croissance épiphysaire. Le gadolinium administré est un matériel de contraste utilisé et l'acquisition des images suite à son administration se fait à l'aide de séquences T1 (Khanna and Thapa 2009). Cette procédure a été utilisée pour une étude morphologique de l'humérus proximal et du fémur proximal chez des enfants (Barnewolt, Shapiro et al. 1997) et a été validée histologiquement au niveau du fémur distal de porcs (Jaramillo, Villegas-Medina et al. 2004, Li, Wang et al. 2005). L'administration de gadolinium permet de différencier le cartilage physaire du cartilage épiphysaire et démontre les canaux de vascularisation du cartilage de croissance, bien que le degré de contraste soit moindre entre le cartilage épiphysaire et les canaux vasculaires (Li, Wang et al. 2005). Cette technique a été utilisée pour évaluer les anomalies de la vascularisation de la tête fémorale lors de pathologies liées à l'ischémie (Lang, Mauz et al. 1993, Jaramillo, Villegas-Medina et al. 1996, Jaramillo, Villegas-Medina et al. 1998, Lamer, Dorgeret et al. 2002).

Une autre séquence d'IRM permet l'étude de la vascularisation du cartilage : «Diffusion weighted». Cette séquence se base sur le mouvement des molécules d'eau : la perte d'intensité de signal suite à la magnétisation des molécules d'eau par l'application de plusieurs ondes magnétiques dépend du taux de diffusion des molécules d'eau (Crema, Roemer et al. 2011). Il a été démontré que cette technique est sensible à l'ischémie cérébrale (Chien, Kwong et al. 1992, Warach, Chien et al. 1992). Cette séquence démontre aussi expérimentalement la présence et la durée d'une ischémie épiphysaire de courte durée (Jaramillo, Connolly et al. 2003). Lors d'une étude sur l'ischémie de la tête fémorale du porcelet, Menezes et al. (2007) ont mis en évidence que le signal de diffusion était très sensible à l'ischémie aiguë et qu'il restait anormalement élevé même après la reperfusion sanguine, contrairement à l'imagerie par contraste de gadolinium. Cette technique d'IRM est également jugée complémentaire pour l'évaluation du dommage ischémique tissulaire chez les patients avec la maladie de Legg-Calvé-Perthes (Yoo, Kim et al. 2011).

Une nouvelle technique d'IRM, soit la Susceptibility-Weighted Imaging (SWI) permet d'accroître le contraste entre un tissu cible et le tissu environnant en se basant sur la différence de susceptibilité magnétique des tissus, tel que discuté dans la section 3.2.2. Cette séquence permet d'obtenir un meilleur contraste, sans l'utilisation de matériel de contraste, et permet l'évaluation tridimensionnelle de structures microscopiques (Kakeda, Korogi et al. 2011). La SWI est actuellement utilisée pour des études du cerveau et des désordres qui y sont associés,

notamment la maladie de Parkinson (Ide, Kakeda et al. 2012). Cette technique s'avère utile pour l'étude de la vascularisation du cartilage de croissance épiphysaire ex vivo, puisqu'il ne faut pas administrer de matériel de contraste, et offre des images de meilleure qualité (Figure 14).

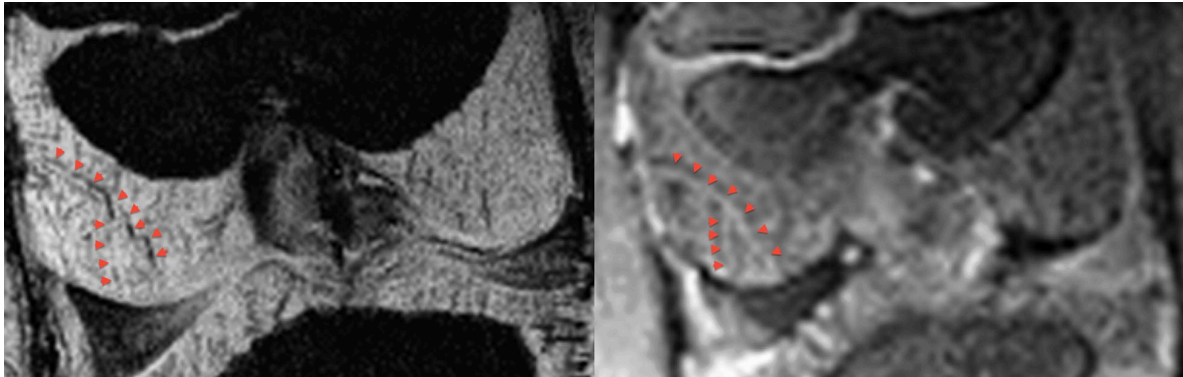


Figure 14. Comparaison entre une image de SWI (gauche) et une image obtenue avec du matériel de contraste. L'image est une coupe coronale du fémur distal d'un porc de 25 jours d'âge. Les images sont obtenues avec un IRM 7T. Selon Toth et al. (2013).

Toth et al. (2013) furent les premiers à utiliser cette technique d'IRM pour démontrer les canaux vasculaires de l'épiphyse du fémur distal de porc ex vivo à l'aide d'IRM 9.4T, 7T et 3T et in vivo avec un IRM 7T (Figure 15) (Toth, Nissi et al. 2013, Nissi, Toth et al. 2014).

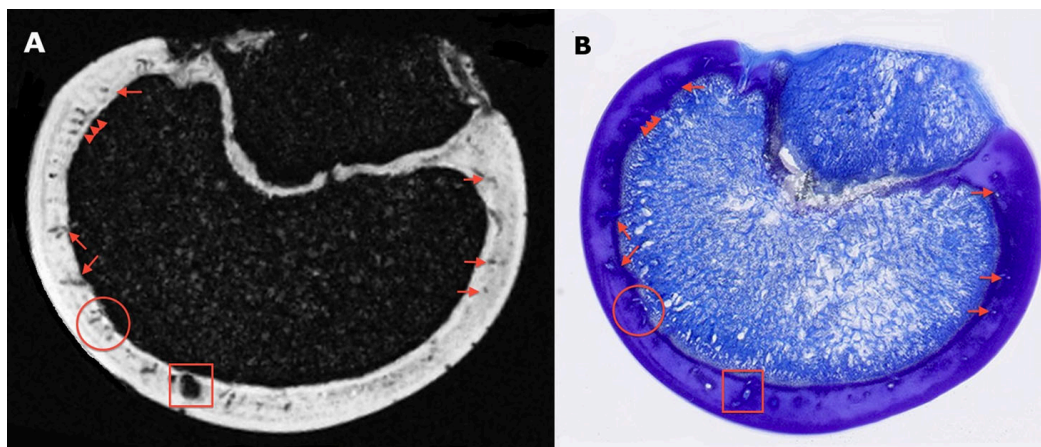


Figure 15. Image SWI ex vivo obtenue avec un IRM 9.4T de la trochlée humérale d'un porcelet de 6 semaines d'âge. Les marques rouges identifient les vaisseaux du cartilage. Selon Toth et al., 2013.

Le même groupe a par la suite utilisé la même technique pour imager à l'aide d'un IRM 9.4T des spécimens ex vivo d'enfants, de porcs et de chèvres pour en comparer la

structure vasculaire (Toth, Nissi et al. 2015). Il a également démontré l'application du «quantitative susceptibility mapping» (QSM), soit une technique quantitative de traitement des images de SWI qui permet une meilleure visualisation des vaisseaux du cartilage et également la réduction d'artéfacts (Nissi, Toth et al. 2015). Par la suite, le même groupe a utilisé cette technique de QSM pour évaluer des lésions ischémiques induites expérimentalement chez la chèvre (Wang, Nissi et al. 2017) et pour l'étude d'un modèle préclinique d'ischémie de la tête fémorale (Johnson, Wang et al. 2018). Une étude descriptive in vivo de la vascularisation du fémur distal d'enfants à l'aide de SWI avec un IRM 7T a récemment été publiée (Kolb, Robinson et al. 2018).

1.5.1.3 IRM et développement épiphysaire

Le développement épiphysaire a été étudié chez différentes espèces incluant le porc (Babyn, Kim et al. 1996, Dwek, Shapiro et al. 1997, Jaramillo, Connolly et al. 2003, Connolly, Jaramillo et al. 2004, Jaramillo, Villegas-Medina et al. 2004, Menezes, Gray et al. 2004, Menezes, Olear et al. 2006, Menezes, Connolly et al. 2007), l'agneau (Jaramillo, Connolly et al. 1998), et, récemment, le cheval (Fontaine, Blond et al. 2013) (Cluzel, Blond et al. 2013). L'apparence normale à l'IRM de la maturation du cartilage chez l'humain est bien décrite dans la littérature, tel que révisé par Khanna & Thapa (Khanna and Thapa 2009). Ces études sur l'imagerie du développement épiphysaire normal sont primordiales afin de différencier les variations des paramètres d'IRM propres au développement en fonction de l'âge et de l'espèce de ceux liés à la progression de différentes pathologies des os longs. Jaimes et al. (2012) ont établi l'apparence à l'IRM du second centre d'ossification selon l'âge et les risques de confondre ce patron de développement avec des processus pathologiques (Jaimes, Jimenez et al. 2012, Jaimes, Chauvin et al. 2014).

1.5.1.4 IRM et ostéochondrose

En médecine humaine, l'IRM est la modalité d'imagerie idéale pour le diagnostic de l'OC, car c'est une méthode non invasive qui permet de visualiser le cartilage et l'os sous-chondral (Moktassi, Popkin et al. 2012). Jans et al. (2011) ont mis en évidence l'utilité de l'IRM dans la différenciation des variations d'ossification et les lésions réelles d'OC : les

variations d'ossification, observées en bas âge à une localisation différente des lésions d'OCD, sont cunéiformes et ne s'accompagnent pas d'œdème au niveau de la moelle osseuse (Jans, Jaremko et al. 2011a). Chez l'humain, l'imagerie par résonance magnétique est utilisée fréquemment pour diagnostiquer les lésions d'OC et évaluer la stabilité des lésions, ce qui détermine le pronostic (Twyman, Desai et al. 1991, Cahill 1995, Robertson, Kelly et al. 2003, Flynn, Kocher et al. 2004, Kocher, Tucker et al. 2006). Plusieurs études réalisées décrivent les caractéristiques d'IRM propres aux lésions d'OC stables et instables (Mesgarzadeh, Sapega et al. 1987, De Smet, Fisher et al. 1990, Nelson, DiPaola et al. 1990, De Smet, Ilahi et al. 1996, Yoshida, Ikata et al. 1998, O'Connor, Palaniappan et al. 2002). De Smet et al. (1990,1996) ont établi quatre critères pour caractériser l'instabilité d'une lésion d'OCD à l'IRM : (1) une zone autour de la lésion avec un signal T2 de haute intensité, (2) des kystes entourant la lésion, (3) une ligne de fracture avec un signal T2 de haute intensité à travers du cartilage articulaire et (4) un défaut ostéochondral rempli de fluides. Ces critères ont été révisés par Kijowski et al. (2008) qui rapportent que la présence d'une zone avec un signal T2 de haute intensité ou de kystes autour de la lésion est indicatrice d'instabilité seulement chez l'adulte. Chez les patients juvéniles, les lésions sont instables si la zone de haute intensité autour de la lésion a le même signal T2 que le fluide synovial adjacent, si la zone de haute intensité autour de la lésion est entourée par une zone de faible intensité ou si la lésion est accompagnée par plusieurs bris au niveau de la plaque osseuse sous-chondrale (Kijowski, Blankenbaker et al. 2008). Les kystes entourant la lésion juvénile indiquent l'instabilité seulement si ils sont multiples ou larges (>5mm) (Kijowski, Blankenbaker et al. 2008). L'imagerie par résonance magnétique s'avère aussi être un outil essentiel pour suivre la guérison d'une lésion d'OCD suite à une intervention chirurgicale (Moktassi, Popkin et al. 2012).

De récentes études lors desquelles des lésions de chondronécrose ischémique ont été induites chirurgicalement chez la chèvre ont démontré l'utilité de l'IRM quantitatif (Figure 16) (Toth, Nissi et al. 2015, Wang, Nissi et al. 2015, Toth, David et al. 2017) et de l'IRM SWI (Wang, Nissi et al. 2017) pour l'évaluation de lésions sous-cliniques d'OC, tel que discuté aux sections 1.5.1.1 et 1.5.1.2. Ces études soutiennent la valeur clinique et le potentiel diagnostique de telles séquences dans le dépistage de l'OC sous-clinique. D'ailleurs, une étude avec la

cartographie T2* a été réalisée pour évaluer le cartilage épiphysaire d'enfants à la recherche de changements suggestifs d'OC (Ellermann, Johnson et al. 2017).

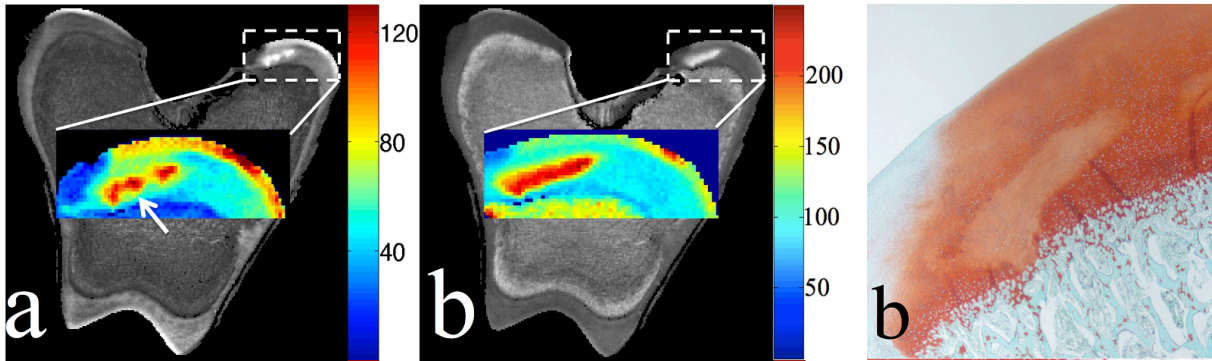


Figure 16. Cartographie T1 (a) et T2 (b) avec validation histologique démontrant une zone chondronécrotique avec des temps de relaxation plus élevés. Selon Toth et al. (2015).

Malgré les avantages de l'IRM comme modalité d'imagerie, la taille de certaines articulations, comme le grasset du cheval, limite son utilisation routinière en clinique.

1.5.2 CT

1.5.2.1 CT et développement épiphysaire

Le CT a été utilisé chez le cheval par Fontaine et al., 2013, pour démontrer l'ossification du grasset et du tarse chez des fœtus jusqu'à la naissance (Fontaine, Blond et al. 2013). En permettant une évaluation multiplanaire et la reconstruction d'images en 3D, l'apparition du SOC vers 7-8 mois de gestation et la séquence d'ossification de ces articulations ont été brillamment illustrées. Une étude similaire au micro-CT avait également démontré la séquence d'ossification du grasset du lapin (Doschak, Cooper et al. 2003): le SOC au niveau du fémur distal apparaît à 29 jours de gestation (durée gestation: 30 jours). Le fémur distal est donc moins ossifié à la naissance chez le lapin que chez le cheval. En médecine humaine, il y a eu au cours des dernières années une remise en question sur l'utilité du CT chez les enfants en raison du risque accru de cancer, puisque les doses de radiation sont considérablement plus élevées que lors de radiographie (Baysson, Journy et al. 2016).

1.5.2.2 CT et ostéochondrose

Une étude ex vivo utilisant le micro-CT avec du matériel artériel de contraste au niveau

de la crête intermédiaire distale du tibia et de l'aspect distal de la trochlée latérale du talus de poulains Standardbred prédisposés à l'OC a indirectement mis en évidence des zones chondronécrotiques via l'absence focale de vaisseaux sanguins (Olstad, Cnudde et al. 2008a). Des lésions de chondronécrose induites chirurgicalement au fémur distal de poulains ont été étudiées avec des radiographies, du micro-CT et du CT avec du matériel de contraste et l'histologie, et il semble que les changements vus au micro-CT étaient également visibles au CT (Olstad, Hendrickson et al. 2010)

Chez le porc, le CT est utilisé pour la sélection des mâles reproducteurs, notamment pour évaluer le pourcentage de viande maigre et de gras. Des défauts radiolucent dans le front d'ossification notés au CT correspondaient histologiquement dans 90% des cas à une ou plusieurs zones de chondronécrose (Figure 17) (Olstad, Kongsro et al. 2014). Une étude longitudinale au CT chez le porc a démontré des pics d'apparition de lésions à différents moments dans les articulations, de même qu'un pourcentage élevé de régression, soit 51% des lésions au grasset jusqu'à 69% au coude (Olstad, Kongsro et al. 2014b). Le CT a aussi été utilisé par le même groupe pour évaluer la prévalence d'OC au niveau du tarse dans les porcs sauvages (Etterlin, Ekman et al. 2017).

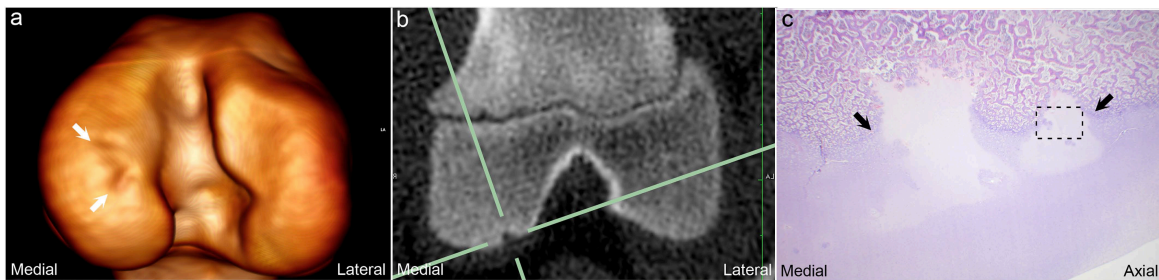


Figure 17. L'apparence d'une lésion d'OC sous clinique au CT chez le porc. Reconstruction 3D (a) et coupe transverse (b) du condyle fémoral médial d'un porcelet de 145 jours d'âge présentant un défaut d'ossification (flèches). À l'histologie ce défaut correspond à une zone chondronecrotique indicative d'OC. Selon Olstad et al. (2014b).

Il faut noter que Aasmundstad et al., 2013 avaient déjà démontré l'utilité du CT pour la sélection génétique contre l'OC en créant une méthode de score des lésions d'OC au niveau des condyles fémoraux chez 1449 porcs mâles et en faisant des corrélations génétiques et héréditaires (Aasmundstad, Kongsro et al. 2013). Le CT avait aussi été utilisé en comparaison

avec les radiographies et l'arthroscopie chez des chiens avec des fragments ostéochondraux à l'articulation tibiotarsienne, et il avait été noté que, bien que le diagnostic soit faisable aux radiographies, le CT permettait de déterminer la localisation exacte et le nombre et la taille des fragments présents (Gielen, Bree et al. 2002). Une récente étude au CT de genoux d'enfants de 1 à 11 mois a mis en valeur des variations au niveau du front d'ossification, similaires à celles considérées comme des lésions sous-cliniques d'OC en médecine vétérinaire, mais comme des variantes normales en médecine humaine (Jans, Jaremko et al. 2012). Cette étude post-mortem a enfin pu faire des corrélations histologiques pour démontrer que ces zones étaient bel et bien des lésions d'OC sous-clinique (Finnoy, Olstad et al. 2018).

À la lueur de ces informations, le CT permet donc d'évaluer bien entendu le stade d'OCD de la maladie, mais également un stade sous-clinique auquel les zones chondronécrotiques causent des irrégularités semi-circulaires dans le front d'ossification. Le CT avec matériel de contraste permet aussi de mettre indirectement en évidence des zones de chondronécrose via l'absence de vaisseaux sanguins. Par contre, malgré ces indications prometteuses du CT, ce n'est pas une modalité de choix chez les enfants vu la radiation, mais également chez les chevaux puisque les mêmes limitations que l'IRM s'appliquent dans un contexte clinique.

1.5.3 Échographie

L'échographie est une modalité d'imagerie aux avantages multiples, surtout dans un contexte de dépistage, puisqu'elle est non-invasive, facilement accessible, portable et non dispendieuse et démontre des images de bonne résolution spatiale en temps réel. Cette modalité permet d'évaluer l'intégrité articulaire, en révélant des informations à la fois sur les tissus mous et les tissus osseux. Il a d'ailleurs été démontré que l'échographie avait des performances diagnostiques similaires aux séquences de routine d'IRM 1.5T pour l'évaluation de défauts du cartilage du genou humain en référence à l'arthroscopie (Cao, Zheng et al. 2018).

1.5.3.1 Échographie et l'articulation juvénile

En médecine humaine, l'échographie est devenue une modalité de choix pour évaluer l'intégrité articulaire chez les enfants, pour toutes les raisons énumérées ci-haut, mais aussi vu l'absence de radiation et puisqu'aucune sédation n'est requise. Des études descriptives de l'anatomie normale des articulations en développement sont rendues accessibles pour faciliter l'évaluation échographique, tel que mentionné ci-bas. L'échographie démontre le cartilage articulaire hypoéchogène qui peut ou non présenter une zone hyperéchogène à sa surface; le cartilage épiphysaire hypoéchogène avec des sections hyperéchogènes correspondant aux vaisseaux cartilagineux (Figure 18); le front d'ossification hyperéchogène, lisse ou irrégulier; et la plaque de croissance métaphysaire hypoéchogène (Roth, Jousse-Joulin et al. 2015).

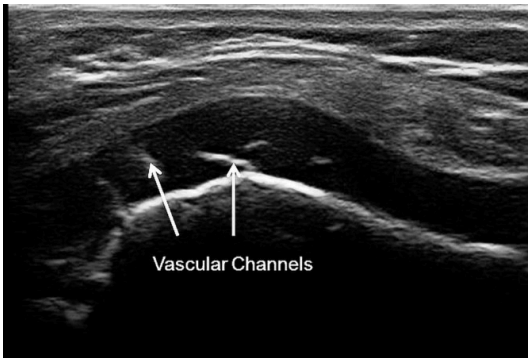


Figure 18. Image échographique du condyle fémoral médial d'un enfant de 3 ans. Les sections hyperéchogènes au sein du cartilage hypoéchogène correspondent aux vaisseaux cartilagineux. Selon Roth et al. (2015).

Des définitions échographiques de l'articulation juvénile normale ont été émises et validées (Figure 19).

Definition 1

The hyaline cartilage will present as a well-defined anechoic structure (with/without bright echoes/dots) that is non-compressible. The cartilage surface can (but does not have to) be detected as a hyperechoic line.

Definition 2

With advancing maturity, the epiphyseal secondary ossification center will appear as a hyperechoic structure, with a smooth or irregular surface within the cartilage.

Definition 3

Normal Joint Capsule - A hyperechoic structure which can (but does not have to) be seen over bone, cartilage and other intraarticular tissue of the joint.

Definition 4

Normal synovial membrane - Under normal circumstances, the thin synovial membrane is undetectable.

Definition 5

The ossified portion of articular bone is detected as a hyperechoic line. Interruptions of this hyperechoic line may be detected at the growth plate and at the junction of two or more ossification centers.

Figure 19. Définitions de l'apparence échographique des composantes de l'articulation juvénile. Selon Roth et al. (2015).

Le doppler semble même pouvoir démontrer le flux sanguin dans le cartilage épiphysaire et dans les autres structures articulaires (Chauvin, Ho-Fung et al. 2015, Collado, Vojinovic et al. 2016). D'ailleurs, une étude utilisant le power doppler avec du matériel de contraste a révélé l'ischémie cartilagineuse au niveau de la tête fémorale de porc lors d'hyperabduction expérimentale de la hanche chez des porcelets (Barnewolt, Jaramillo et al. 2003).

Des études ont été faites pour valider la mesure échographique de l'épaisseur du cartilage juvénile normal (Spannow, Stenboeg et al. 2007, Spannow, Pfeiffer-Jensen et al. 2009, Spannow, Pfeiffer-Jensen et al. 2010, Spannow, Stenboeg et al. 2011) et pathologique lorsque présence d'arthrite juvénile idiopathique (Pradsgaard, Spannow et al. 2013, Pradsgaard, Fiirgaard et al. 2015). L'épaisseur, l'apparence ainsi que la vascularisation du

cartilage normal d'enfants ont été décrits sous forme d'acquisition systématique au niveau de plusieurs articulations (Spannow, Pfeiffer-Jensen et al. 2010, Chauvin, Ho-Fung et al. 2015, Collado, Vojinovic et al. 2016), dont la fiabilité a été validée par une étude pilote internationale (Windschall, Collado et al. 2017). Le développement postnatal de l'épiphyse proximale et distale du fémur et de l'épiphyse proximale du tibia de 178 nouveau-nés prématures ou matures a été étudié à l'échographie afin de déterminer l'âge d'apparition du SOC, soit respectivement 43, 30 et 31 semaines d'âge (Windschall, Pommerenke et al. 2016).

1.5.3.2 Échographie et ostéochondrose

Vandeveldt et al., 2006, ont démontré chez le chien que l'échographie permet une meilleure visualisation des défauts de l'os sous-chondral lors d'OCD que la radiographie et permet aussi la visualisation d'un épaissement focal du cartilage qui n'est pas visible avec un arthrogramme ou en arthroscopie lorsque la surface articulaire est intacte. L'utilité de l'échographie pour le diagnostic de lésions d'OC au niveau de la trochlée fémorale latérale et médiale de poulains de plus de 6 mois a été démontrée par Bourzac et al., en 2009 (Figure 20) (Bourzac, Alexander et al. 2009).



Figure 20. Lésion d'OCD de la LTR d'un à la radiographie, échographie et examen post-mortem. Selon Bourzac et al. (2009).

En effet, l'échographie a permis de diagnostiquer 5 lésions au niveau de la trochlée fémorale non vues à la radiographie, dont 3 petites lésions et deux fragments. L'échographie était plus sensible que la radiographie pour détecter les lésions au niveau du tiers moyen de la trochlée médiale alors que la spécificité était similaire que la radiographie lorsque comparées aux trouvailles arthroscopiques. De plus, l'échographie apporte de l'information notable dans plusieurs plans sur l'étendue d'une lésion, surtout dans l'axe latéromédial. Une gradation des

lésions a été établie (Figure 21). Les constats de Bourzac et al., 2009 ont été confirmés par Beccati et al., en 2013, qui ont rapporté que la sensibilité échographique (100%) pour les lésions d'OC au niveau de la trochlée fémorale était supérieure à celle de la radiographie (84-88%), quoique la radiographie était plus spécifique. Hinz et al., en 2011 ont également rapporté que l'échographie était beaucoup plus sensible que la radiographie pour la détection de lésions articulaires dans 10 articulations différentes (n=254) en comparaison avec les trousses arthroscopiques, notamment pour les lésions d'OCD au niveau de la crête intermédiaire distale du tibia et de la trochlée fémorale (sensibilité échographie de 87% versus 69% pour la radiographie). Relave et al., 2009 ont aussi démontré que l'échographie était significativement plus sensible que la radiographie pour les lésions d'OCD de la malléole médiale et de la crête intermédiaire du tibia distal.

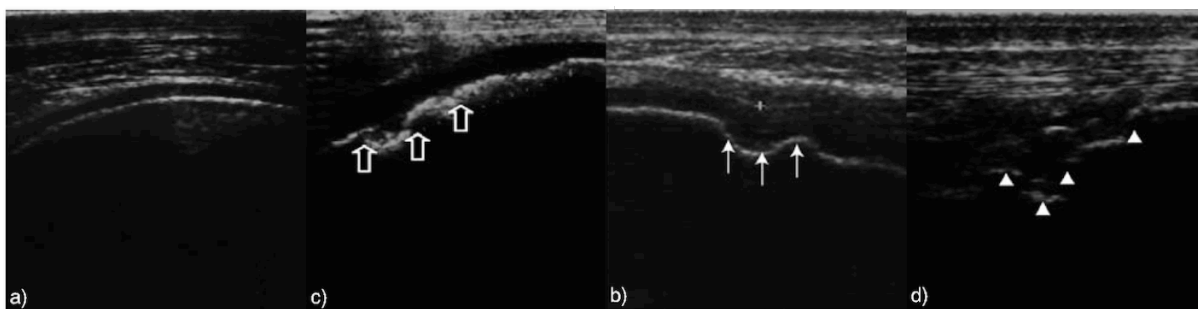


Figure 21. Gradation échographique des lésions d'OC de la trochlée fémorale équine >6 mois d'âge. 0= pas de lésion (a); 1=irrégularité du cartilage dont la surface est échogénique, présentant une déviation concave mais continue (b); 2=surface de l'os hyperéchoïque discontinue avec irrégularité modérée (c) et 3=surface articulaire échoïque complètement discontinue avec une irrégularité sévère de la surface de l'os et une discontinuité en escalier sous du matériel échoïque hétérogène (d). Selon Bourzac et al. (2009).

En médecine humaine, il est soutenu, dans une récente révision de l'utilité de l'échographie pour les pathologies musculosquelettiques juvéniles (Suzue, Matsuura et al. 2015), que l'échographie peut démontrer la fragmentation et la discontinuité de l'os sous-chondral des condyles fémoraux en cas d'OCD, mais qu'il faut davantage d'études comme celle de Olstad et al. (2018) pour pouvoir faire la distinction entre les différents degrés d'OCD et les variations d'ossification considérées à l'heure actuelle normales en médecine humaine. Une récente étude a démontré en comparant avec l'IRM que l'échographie était utile pour évaluer la stabilité d'une lésion d'OCD (Yoshizuka, Sunagawa et al. 2018).

2. Hypothèses et objectifs

Tel que démontré par la revue de littérature, la pathophysiologie de l'OC n'est pas encore entièrement comprise. Bien qu'il semble évident qu'une atteinte vasculaire entraîne initialement de la chondronécrose qui, par la suite, évolue vers les formes cliniques de la maladie, les causes entraînant une telle chondronécrose ischémique ne sont pas élucidées. Puisqu'aucune lésion d'OC n'ait été démontrée in utero (Lecocq, Girard et al. 2008, Cluzel, Blond et al. 2013, Fontaine, Blond et al. 2013) et puisque des lésions sont rapportées dès 2 jours d'âge chez le poulain (Rejnö 1978), nous avons émis les hypothèses suivantes:

1. Dès la naissance, il existe des variations au sein du cartilage de croissance de poulains prédisposés à l'OC qui expliquent leur susceptibilité à l'apparition de la maladie.
2. Il serait possible, à l'aide de la méthodologie d'imagerie adéquate, de visualiser ces zones à risque et d'en faire le suivi.

Plus précisément, nous pensons qu'il existe des différences dans la structure vasculaire et dans la composition matricielle (contenu en protéoglycanes et structure du collagène) du cartilage de croissance aux sites de prédilection de l'ostéochondrose qui pourraient les rendre sujets à subir une atteinte vasculaire menant à la chondronécrose ischémique. Nous pensons qu'il soit possible d'évaluer la structure vasculaire ainsi que la composition matricielle du cartilage à l'aide d'un IRM 3T, avec des séquences SWI et quantitatives (T1rho, T2 mapping).

Le présent travail comprend 4 études.

Les objectifs de la première étude sont :

- Comparer la vascularisation au niveau de la trochlée fémorale distale entre des poulains prédisposés à l'OC et des poulains contrôle, dès la naissance.
- Évaluer la séquence SWI à l'IRM 3T pour la visualisation des vaisseaux dans le cartilage épiphysaire de la trochlée fémorale distale et la valider à l'aide d'histologie.

Les objectifs de la deuxième étude sont :

- Comparer la composition matricielle (contenu en protéoglycanes et structure du collagène) au niveau du cartilage épiphysaire de la trochlée fémorale distale entre des

poulains prédisposés à l'OC et des poulains contrôle, dès la naissance.

- Évaluer la séquence quantitative T1rho à l'aide d'IRM 3T pour la cartographie du contenu en protéoglycanes dans le cartilage épiphysaire de la trochlée fémorale distale et la valider à l'aide d'histologie.
- Évaluer la séquence quantitative T2 à l'aide d'IRM 3T pour la cartographie du contenu et de la structure en collagène dans le cartilage épiphysaire de la trochlée fémorale distale et la valider à l'aide d'immunohistochimie et de microscopie de génération de seconde harmonique.

Après avoir complété les deux études ci-haut, dans l'optique d'adapter au contexte clinique de la médecine équine, nous avons émis les hypothèses additionnelles suivantes :

3. L'échographie est une méthode valide pour évaluer le cartilage de croissance et le front d'ossification, ainsi que pour visualiser les canaux vasculaires du cartilage.
4. Il est possible d'utiliser l'échographie comme moyen de dépistage dans une plus grande population, dans un contexte pratique, afin d'identifier des changements dans la structure épiphysaire indicatifs de lésions sous-cliniques d'OC.

Les objectifs de la troisième étude sont :

- Décrire l'apparence sonographique de la trochlée fémorale de poulains prédisposés à l'OC et de poulains contrôle à la naissance.
- Valider la capacité de l'échographie d'évaluer l'épaisseur du cartilage, le front d'ossification et les vaisseaux du cartilage épiphysaire de la trochlée fémorale à l'aide d'histologie et d'IRM SWI.
- Évaluer la faisabilité d'un protocole d'acquisition d'images échographiques de la trochlée fémorale in vivo à titre d'étude pilote préliminaire.

Les objectifs de la quatrième étude sont :

- Décrire l'apparence sonographique de la trochlée fémorale latérale de poulains de <6 mois d'âge.
- Faire le dépistage de lésions d'OC sous-cliniques au niveau de la trochlée fémorale latérale dans une population de poulains de <6mois d'âge.

3. Méthodologie

3.1 Survol du plan expérimental

La première, deuxième et troisième étude permettent de comparer un groupe de poulains prédisposés à l'OC (n= 5) aux poulains contrôle (n=4). Les poulains prédisposés à l'OC ont été spécialement conçus pour le présent travail par transfert d'embryon en provenance de 3 juments donneuses et d'un étalon, tous de race Standardbred avec une histoire d'OCD. Ces poulains ont été euthanasiés dans les 24 premières heures suite à la naissance. Les poulains contrôle sont des poulains décédés à l'hôpital vétérinaire à moins d'une semaine d'âge. Le tableau VI est joint en matériel supplémentaire pour les articles 1 et 2, et sera ici inclus en référence. Les fémurs distaux de ces poulains ont été imagés in situ à l'IRM puis à l'échographie, tel que décrit dans la méthodologie des études 1, 2 et 3, et ont ensuite été disséqués. Des sections correspondant aux régions d'intérêt déterminées ont par la suite été prélevées pour l'histologie, l'immunohistochimie et la microscopie de génération de seconde harmonique (SHG).

La quatrième étude est une étude prospective réalisée sur une cohorte de 46 poulains de race Thoroughbred (26 poulains et 20 pouliches), classés en 3 groupes d'âge (0-62 jours (n=15); 66-121 jours (n=15); 122-166 jours (n=16)), tel que décrit dans la méthodologie. Les LTRF des poulains ont été échographiées, conjointement à la prise de radiographies. Des radiographies de suivi ont été prises quand les poulains avaient > 1 an.

Tableau VIII. Description des spécimens de l'étude 1, 2 et 3

Foal number	Age	Sex	Breed	Reason for euthanasia	Osteochondrosis status of parents	Hindlimb sampled
Osteochondrosis 1	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 2	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 3	< 24h	M	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ³ +	Both
Osteochondrosis 4	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 5	< 24h	M	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ⁴ +	Both
Control 1	0h	M	Paint	Dystocia	* sire - & dam -	Left ⁵
Control 2	< 24h	F	Standardbred	Died suddenly few hours after birth	* sire - & dam -	Both
Control 3	4 d	M	Warmblood	Traumatic patellar luxation right hindlimb	* sire - & dam -	Left ⁶
Control 4	4 d	F	Hanovarian	Ventricular septal defect	* sire - & dam -	Both

¹ Sire from Osteochondrosis foals 1 – 5 had OCD in hocks, bilateral

² Dam from Osteochondrosis foals 1, 2 & 4 had OCD in stifle, unilateral

³ Dam from Osteochondrosis foal 3 had OCD in stifle, unilateral

⁴ Dam from Osteochondrosis foal 5 had OCD in hocks, bilateral

⁵ Right hindlimb of control 1 was not imaged because of a schedule error with MRI scanner

⁶ Right hindlimb of control 3 was excluded because of traumatic patellar luxation

N/A = non applicable

* based on information from clients

3.2 Procédures expérimentales

Les procédures expérimentales sont décrites dans les articles 1, 2, 3 et 4. Puisque seuls les paramètres techniques des séquences d'IRM sont inclus dans les articles, une brève explication du fonctionnement de ces techniques sera donc détaillée dans cette section, en complément à la méthodologie publiée.

3.2.1 Rappel du fonctionnement de base de l'IRM

L'IRM utilise un champ magnétique, qui peut être à bas champ ($\approx 0.3\text{T}$) ou à haut champ (normalement en clinique $1.5\text{-}3\text{T}$, jusqu'à 9.4T en recherche) et des impulsions de radiofréquences afin de faire basculer les protons au sein des tissus. Brièvement, les protons, qui effectuent déjà une rotation sur eux-mêmes, s'orientent parallèlement au champ magnétique induit par l'IRM (B_0). Une onde électromagnétique appelée onde radiofréquence (B_1 ou RF) est ensuite appliquée pour faire basculer les protons dans une direction autre que parallèle, ce qui correspond à la phase d'excitation. En interrompant la RF, les spins des protons se déphasent et ces derniers se réalignent dans la direction parallèle à B_0 en perdant l'énergie acquise, ce qu'on appelle relaxation. C'est la mesure de cette perte d'énergie qui compose le signal à partir duquel les images d'IRM sont générées. Le temps de relaxation spin-réseau (T_1) correspond à la relaxation longitudinale alors que le temps de relaxation spin-spin (T_2) correspond à celle transverse (Figure 22). Plus précisément, le temps de relaxation T_1 est le temps qu'il faut à l'aimantation longitudinale pour retrouver 63% de son état initial après une impulsion de 90° et le temps de relaxation T_2 correspond au temps nécessaire à l'aimantation transversale pour retrouver 37% de son aimantation initiale (McRobbie, Moore et al. 2007). Les relaxations T_1 et T_2 surviennent en même temps, mais T_2 est beaucoup plus rapide que T_1 .

Le temps de relaxation T_2 décroît de façon exponentielle à cause du déphasage des protons, qui est fait est le résultat de l'interaction du spin d'un proton avec le spin d'un proton voisin. Pour obtenir un réel temps T_2 , il faut utiliser une séquence d'écho de spin qui applique une impulsion radiofréquence de 180° au milieu du temps d'écho pour refocaliser les déphasages des spins, s'affranchissant ainsi des inhomogénéités de champs. Des séquences multi-écho, spin-écho et fast-écho sont les plus souvent utilisées pour calculer le temps de

relaxation T2. En comparaison, pour pondérer une séquence en T2*, il faut utiliser une séquence d'écho de gradient, qui ne comporte pas de rephasage des spins par une impulsion de 180°. Le signal T2* est donc plus rapide que le T2, puisque le déphasage des protons y est accéléré à cause de des hétérogénéités de champs non compensées (Hontoir, Clegg et al. 2015). Un des avantages du T2* par rapport au T2 est d'ailleurs le temps d'acquisition plus court. Il faut noter que le temps T2* est l'inverse du T2 et que l'information obtenue par le T2* peut différer de celle des images T2 puisque l'inhomogénéité du signal est mesurée (Hontoir, Clegg et al. 2015).

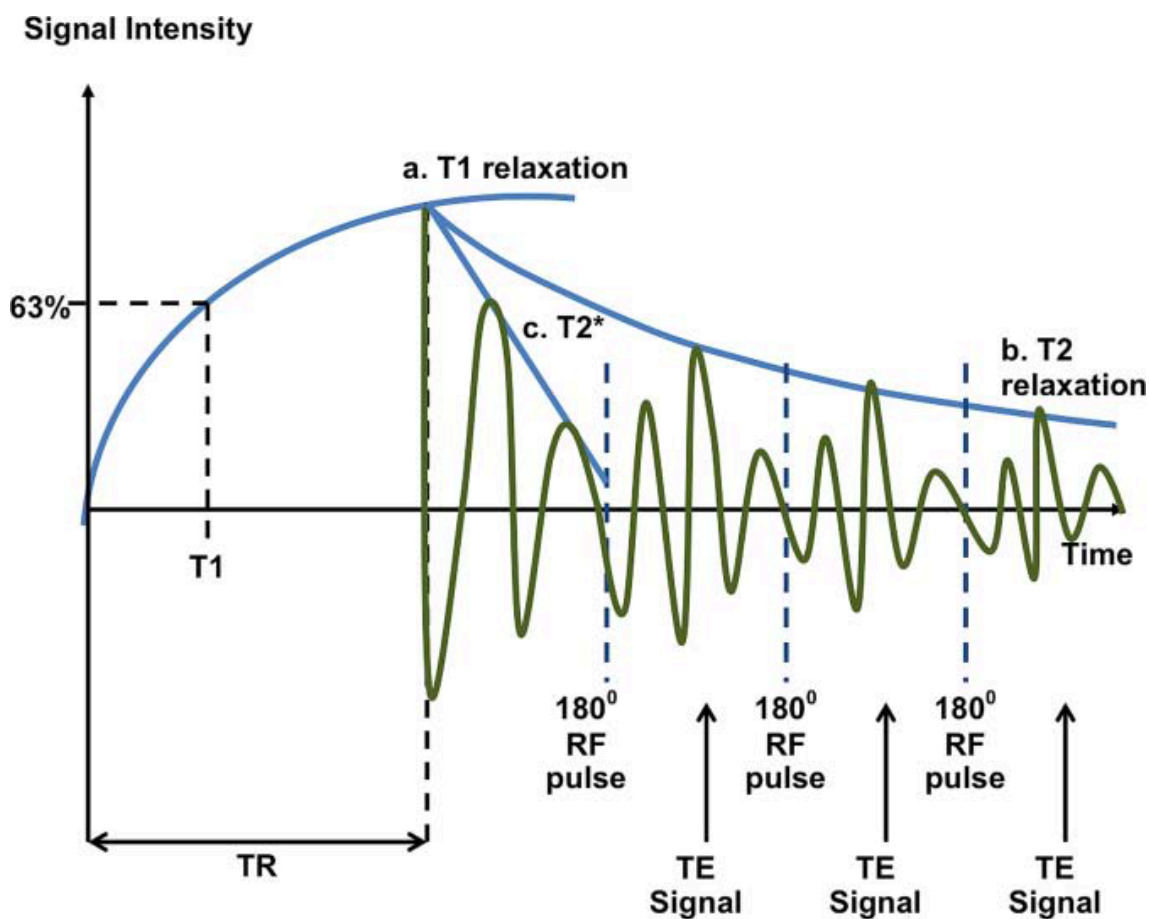


Figure 22. Schéma explicatif des temps de relaxation T1, T2 et T2*. La courbe de relaxation T1 (a) correspond à la magnétisation longitudinale dans le temps suite à l'arrêt de la RF. La courbe de relaxation T2 (b) correspond à la magnétisation transversale. Au milieu du TE, une onde RF de 180° est appliquée pour contrer les inhomogénéités du champ qui modifient la fréquence de précession. Au TE, les protons se trouvent rephaser à nouveau, avec un signal plus fort, ce qu'on appelle spin-écho. S'ensuit un enchaînement de spi-écho, chacun de signal plus en plus faible. La courbe de relaxation T2* (c), où aucune onde RF de 180° n'est appliquée pour rephaser les protons, démontre la diminution rapide du signal. Selon Currie, 2012.

3.2.2 Susceptibility-weighted imaging (SWI)

Le SWI diffère des autres méthodes d'imagerie standard, parce que les images de phase obtenues ne dépendent pas des temps de relaxation T1 et T2. En effet, le contraste est généré d'après les différences de susceptibilité magnétique des tissus, surtout le sang désoxygéné, qui font varier la force du champ magnétique locale et entraînent de légères différences dans la fréquence de résonance des spins excités. Ceci se traduit par des différences de phase au niveau des images d'écho de gradient. Pour augmenter le contraste des images de susceptibilité, les images de phase et d'intensité sont combinées (Haacke, Xu et al. 2004). Le contraste obtenu ne dépend pas de l'orientation ni de la composition des structures voisines, mais la susceptibilité magnétique est inversement proportionnelle à la température.

Dans le cadre de l'étude 1, une séquence 3D d'écho de gradient, simple écho avec compensation de flux a été utilisée pour obtenir les images SWI, dont les paramètres sont mentionnés dans la section méthodologie de l'étude.

3.2.2.1 Algorithme Phase-difference enhanced (PADRE)

Les images obtenues par SWI doivent être traitées. Les images d'IRM conventionnelles sont générées seulement à partir de l'information de magnitude du signal. La reconstruction des images de SWI utilise l'image de phase. Par contre, une image de phase contient à la fois de l'information microscopique et macroscopique sur les variations de susceptibilité magnétique d'un objet. L'information macroscopique correspond aux inhomogénéités de fond et doit être filtrée par ce qu'on appelle la filtration «high-pass». À partir de l'image de phase filtrée, un masque de phase est créé. Le SWI sélectionne uniquement la différence de phase négative reliée aux veines alors que, avec le PADRE, il est possible de sélectionner diverses différences de phases dans le but d'augmenter le contraste de différents tissus sur l'image de magnitude (Kakeda, Korogi et al. 2011). L'image finale est obtenue en multipliant plusieurs fois le masque de phase avec l'image de magnitude pour fournir un bon contraste, sans toutefois ajouter de bruit excessif à l'image.

Dans le cadre de l'étude 1, qui a utilisé l'algorithme PADRE, un masque de phase négatif a été sélectionné pour augmenter le contraste des veines, comme l'aurait fait un algorithme SWI. Les paramètres de la séquence et du traitement des images sont rapportés dans la méthodologie de l'étude 1.

3.2.2.2 Artéfacts du SWI

Le SWI demeure tout de même une méthode d'imagerie qualitative sujette à certains artéfacts ici décrits.

L'artéfact «blooming» est principalement causé par le fait que le SWI utilise la phase du signal afin d'augmenter le contraste entre les tissus ayant des valeurs de susceptibilité magnétique différentes et que cette phase est non-locale. Autrement dit, si on considère un objet ayant une certaine susceptibilité magnétique (disons dans notre cas, une veine) placé dans un milieu homogène ayant une susceptibilité magnétique différente (disons le cartilage), la présence de cet objet va modifier la phase du signal sur une région plus grande que la taille de l'objet. Cet effet rend donc difficile la mesure des dimensions exactes de cet objet à partir d'une image de phase ou d'une image combinant phase et magnitude (Salomir, de Senneville et al. 2003).

L'artéfact dipolaire ou «doubling» visibles tel un dédoublement des vaisseaux est noté lorsque les vaisseaux sont perpendiculaires au champ magnétique B_0 . Dans le plan transverse, lorsque les vaisseaux sont perpendiculaires à B_0 , leur apparence dipolaire est coupée de façon transverse, donc les vaisseaux sont vus dans leur configuration actuelle sur plusieurs coupes consécutives, alors qu'ils seraient visibles sur la même coupe dans les autres plans (Figure 17) (Nissi, Toth et al. 2013). L'apparence de cet artéfact est dépendant de la résolution de l'image et la taille de voxels (Xu and Haacke 2006). Pour réduire cet artéfact, une filtration de phase moins agressive pourrait être indiquée, augmentant ainsi le blooming des vaisseaux et masquant le doubling, le retrait plus spécifique de la phase de fond plutôt que seulement la filtration High-pass pourrait également réduire l'artéfact et finalement l'utilisation du quantitative mapping of the susceptibility (QSM) (Nissi, Toth et al. 2015).

Dans le cadre de l'étude 1, puisqu'un plus grand ratio de vaisseaux perpendiculaires

que parallèles au front d'ossification est rapporté au niveau de la trochlée fémorale chez le poulain (Olstad, Ytrehus et al. 2008c), la décision a été prise d'acquérir les images SWI dans le plan transverse pour minimiser la présence de l'artéfact dipolaire.

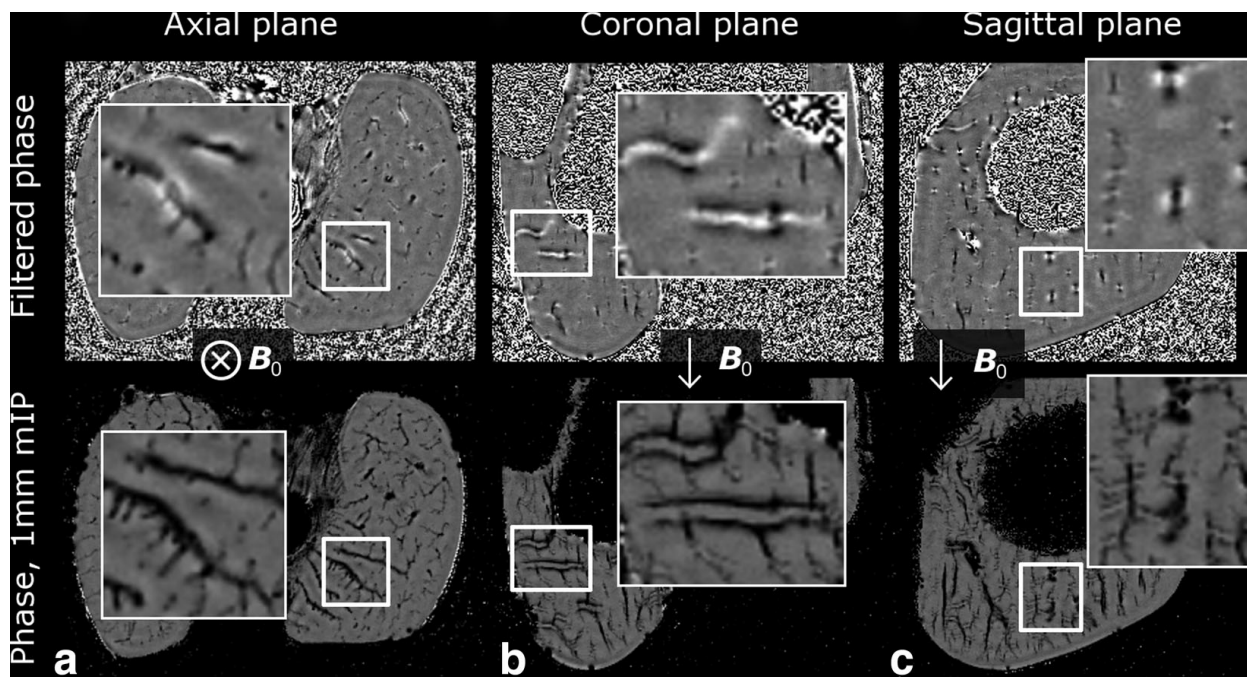


Figure 23. Démonstration de l'artéfact dipolaire sur des images de phase à 9.4T. Les images proviennent d'un porc de 3 semaines d'âge. La première rangée démontre les images de phase filtrée et la deuxième rangée des images «maximum intensity projections» (mIPs) de 1mm. a: plan axial, perpendiculaire à B_0 . b et c: plan coronal et sagittal, parallèle à B_0 . L'artéfact dipolaire est vu pour les vaisseaux perpendiculaires à B_0 dans les plans coronal et sagittal (tel que vu dans la section agrandie du mIP de b). Dans le plan axial, pas d'artéfact dipolaire n'est vu. Selon Nissi et al. (2013).

3.2.3 T2 mapping

Tel que mentionné plus haut, le temps de relaxation T2 est le taux constant de déphasage des protons dans le plan transverse suite à l'application d'une onde RF.

L'eau a un temps de relaxation T2 long, de l'ordre de 3000 ms; les tissus fortement hydratés et les fluides apparaîtront par le fait même en hyper-signal. Le temps de relaxation T2 est toujours soit égal ou plus court que le temps T1. L'utilisation du T2 pour l'évaluation du cartilage reflète l'interaction entre la matrice et l'eau, surtout par rapport au contenu en collagène. La perte de collagène augmente le volume d'eau libre et allonge le temps de relaxation T2 (Ho-Fung and Jaramillo 2013). Le T2 mapping est susceptible à l'artéfact de

l'angle magique, soit un allongement du temps T2 lorsque l'orientation des fibres de collagène est à 55° par rapport au champs magnétique appliqué (B_0) (Jaramillo, Connolly et al. 1998). Une discussion plus extensive sur le temps de relaxation T2 est faite à la section 4.2.1.

Dans le cadre de l'étude 2, une séquence écho de spin multi-échos 2D multi-coupes a été utilisée dans le plan sagittal. Les paramètres de la séquence sont détaillés dans la méthodologie de l'étude 2.

3.2.4 T1rho

La relaxation T1rho ($T1\rho$) correspond à la relaxation spin-réseau dans le référentiel tournant, soit la décroissance de l'aimantation transverse lorsqu'une impulsion radiofréquence de «spin-locking» (SL) est appliquée dans la même direction que B_1 . Le SL est une radiofréquence de longue durée et de faible intensité, qui a la fonction de garder les protons immobiles dans le référentiel tournant, alignés avec B_1 , sans déphasage. Les protons vont relaxer dans le plan transverse, ce qui correspond au T1rho. Le T1rho est plus long que le temps T2. La perte de protéoglycanes est associée avec un allongement du temps de relaxation T1rho (Ho-Fung and Jaramillo 2013).

Les paramètres utilisés pour la séquence T1rho sont détaillés dans la méthodologie de l'étude 2.

4. Articles

4.1 Article 1

Differences in the vascular tree of the femoral trochlear growth cartilage at osteochondrosis-susceptible sites in foals revealed by SWI 3T MRI

Article publié :

Journal of Orthopaedic Research 2016 Sep; 34(9):1539-46.

doi: 10.1002/jor.23149. Epub 2016 Jan 21.

Martel Gabrielle¹, Kiss Sabrina², Gilbert Guillaume³, Anne-Archard Nicolas¹, Richard Hélène¹, Moser Thomas², & Laverty Sheila¹

¹Comparative Orthopaedic Research Laboratory, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Qc, Canada

²Department of Radiology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Qc, Canada

³MR Clinical Science, Philips Healthcare, Markham, Ontario, Canada.

Corresponding author: Dr Sheila Laverty, Comparative Orthopaedic Research Laboratory, Département des Sciences Cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 1500 Avenue des Vétérinaires, St-Hyacinthe, Quebec, J2S 7C6. Canada
sheila.laverty@umontreal.ca

Running title: 3T MRI cartilage vessels foals

Author contributions statement: GM collected the specimens, performed the descriptive and quantitative MRI and histologic analyses and wrote the manuscript. SK evaluated the MRI images. GG conceived the imaging acquisition and processing protocol and revised the manuscript. HR prepared the histologic specimens. NAA designed and performed the 3D reconstruction of the MRI data. TM participated in the study design, evaluated the MRI images and revised the manuscript. SL conceived and designed the study, evaluated the histological specimens and revised the manuscript.

Abstract

Focal ischemic chondronecrosis of epiphyseal growth cartilage (EGC) during endochondral ossification is believed to be a key early event on the pathway to osteochondrosis (OC) in both animals and humans. The lateral ridge of the equine trochlea is a site where severe osteochondritis dissecans lesions frequently arise and is a model for the study of naturally-occurring disease. Non-invasive imaging to investigate EGC vascularity may help elucidate why focal ischemia occurs. 3T MRI susceptibility-weighted imaging (SWI) of femoral trochlea of OC predisposed (n=10) and control (n=6) day-old foals, with minimal joint loading after birth, was performed. SWI and 3D images revealed the EGC vascular architecture without a contrast agent, and matched histologic observations. No vascular lesions were identified. There was no difference in the vascular density and architecture between control and OC specimens, but a striking difference in vascular pattern was seen at the OC predilected site in the lateral ridge of the trochlea in all specimens, when compared to the medial ridge of the trochlea, where OC lesions are rarely observed. This site was less ossified with more perichondrial vessels not yet bridging with the subchondral bone. Furthermore, the mean vascular density of all specimens was significantly higher at this site. We speculate that joint morphology and focal internal trauma on this site with a unique vascular architecture may trigger ischemic events at this site. SWI permitted visualization of EGC in young foals with a clinical 3T MRI and paves the way for non-destructive longitudinal studies to improve understanding of OC in all species.

Keywords: Epiphyseal growth cartilage; vascularity; susceptibility-weighted imaging; MRI; osteochondrosis

Introduction

Osteochondrosis (OC), and subsequent osteochondritis dissecans (OCD), is a developmental joint disorder that affects human and several animal species (reviewed by Laverty et al., 2013)(Laverty and Girard 2013). Investigations of the early events of OC are hampered in children because of limited access to material for study for ethical reasons. Numerous animal studies of naturally occurring and artificially induced OC lesions now

provide valuable insight into the pathogenesis of OC relevant to all species (reviewed by McCoy et al., 2013) (McCoy AM 2013). The earliest histological evidence of OC is a well characterized focal area of chondronecrosis with necrotic, ischemic cartilage and a pale staining matrix (Ytrehus, Carlson et al. 2007) and has been observed in many species including young horses (Olstad, Ytrehus et al. 2011), pigs (Carlson, Hilley et al. 1989, Ytrehus, Ekman et al. 2004b) and dogs (Weiss and Loeffler 1996). Clinical OC lesions causing pain and necessitating surgical intervention occur in the distal femur in horses and humans (McCoy, Toth et al. 2013).

The blood supply to the femoral epiphysis issues from the perichondrium and the subchondral bone. The vessels course in cartilage canals and provide nutrients to the EGC until a physiological timepoint where they regress by a process of chondrification (Olstad, Ytrehus et al. 2008c). A focal disturbance of vascularization and ischemia of the EGC during endochondral ossification is now well recognized as one of the earliest events on the pathway to OC and is hypothesized to occur very early in life (Ytrehus, Carlson et al. 2007, Laverty and Girard 2013). It is also speculated that the earliest upstream events of OC may even arise in utero (Lecocq, Girard et al. 2008, Ekman, Carlson et al. 2009, Cluzel, Blond et al. 2013, Fontaine, Blond et al. 2013). This pathological interruption of vascular supply is believed to induce cartilage hypoxia as collateral anastomotic vessel development is limited, leading to the focal chondronecrosis (Ytrehus, Carlson et al. 2007). The necrotic cartilage is retained and not converted to bone with the advance of the ossification front and biomechanical forces on this compromised tissue may lead to the formation of cartilage flaps or osteochondral fragments at the joint surface, termed osteochondritis dissecans (OCD) at this advanced stage (Ytrehus, Carlson et al. 2007).

However, it remains unknown why some animals develop OC and others don't, and why clinical OCD lesions often arise bilaterally and at predilection sites within certain joints (van Weeren and Jeffcott 2013). It has been shown that early OC lesions are consistently located where the cartilage canal vessels traverse the ossification front, and that they arise in the equine femoral trochlea at a timepoint when there is a transition in the source of EGC vessels from perichondral to subchondral arteries (Ytrehus, Ekman et al. 2004b, Olstad, Ytrehus et al. 2008c, Olstad, Ytrehus et al. 2011). As studies evaluating epiphyseal development in equine fetuses have so far failed to identify classical OC histological lesions

(Lecocq, Girard et al. 2008, Cluzel, Blond et al. 2013, Fontaine, Blond et al. 2013), this provides some evidence that the early events of OC most likely arise post-partum and biomechanical factors such as external trauma or internal trauma due to joint geometry could play a role in the onset of vascular failure leading to ischemic chondronecrosis. Based on the knowledge that the youngest foal with an OC lesion reported in the literature was a 2-day-old foal (Rejnö 1978), investigations of the EGC in foals within the first hours after birth may help identify the earliest events leading to OC.

There is a need for practical, accessible non-invasive and contrast-free methods for monitoring the vascularity of the EGC in very young animals and humans longitudinally to better understand when and why EGC ischemia arises and, ideally, to follow the evolution of the lesions non-destructively. OC is usually recognized in humans only in its final stages when obvious clinical signs are manifested. It is possible that early diagnostic imaging methods would permit the identification of early lesions in children and permit prevention of progression with conservative treatment and obviate the need for surgical stabilization of the fragments, as some OC lesions are known to heal with rest (McCoy, Toth et al. 2013).

In the past, non-destructive MRI imaging techniques to visualize cartilage canals required the administration of intravenous contrast agents (Laor and Jaramillo 2009). Recently, susceptibility-weighted imaging (SWI) revealed vessels in cartilage canals of the EGC at OC predilection sites in a porcine model employing 9.4T, 7T and 3T MRI *ex vivo*, and 7T *in vivo* (Toth, Nissi et al. 2013, Nissi, Toth et al. 2014). This novel MRI technique, primarily employed to image brain vascularity, generates contrast from differences in magnetic susceptibility values between deoxygenated blood and surrounding tissues (Haacke and Ye 2012).

The aims of this study were to evaluate 3T MRI susceptibility-weighted imaging (SWI) sequences for mapping the equine distal femur epiphyseal growth cartilage vessels and to identify differences in the vascular tree of the distal femoral trochlea in animals predisposed to OC and controls that could be related to the onset of the disease.

Methods

Animal and Collection Procedures

The experimental protocol was approved by the institutional animal care and use

committee. Furthermore, guidelines established by the Canadian Council on Animal Care were strictly followed. Foals (n=5) were conceived by embryo transfer from three Standardbred donor mares and a Standardbred stallion, all with a history of OCD lesions to maximize the prevalence of OC in this group (Table S-I). The experimental animals were humanely euthanized within 24 hours of birth. The dams and foals were sedated with xylazine (0.6mg/kg IV) and the foals were then humanely euthanized with embutramide (75mg/kg IV). Control animals were foals (n=4; <1 week) that died at the veterinary teaching hospital (Table S-I). The OC status of parents in this group was clinically OC negative according to foals' owners. The OC group was all Standardbred foals and judged to be of normal size at birth. Foals in the control group were of a similar size: smaller foals such as miniatures or large draft species were excluded from the study. Hind limbs were disarticulated at the coxo-femoral joint and kept in a refrigerator and then frozen at -20°C until imaging.

MRI

Sixteen hindlimbs (n=6 control and 10 OC) were thawed at room temperature for 15 hours and cleaned to avoid blood trace artifacts prior to MRI imaging. Limbs were then oriented parallel to the main magnetic field and the stifles were imaged with a 3T MRI (Achieva X, Philips Healthcare, Best, The Netherlands) with a maximum gradient strength of 40 mT/m, a maximum slew rate of 200 T/m/s and an 8-channel receive only knee coil.

Susceptibility-weighted imaging (SWI) was performed using a fully flow-compensated 3D single-echo gradient-echo sequence employing the following parameters: TR = 25 ms, TE = 20 ms, flip angle = 20 degrees, resolution at acquisition = 0.65 mm x 0.65 mm x 2 mm, resolution at reconstruction = 0.35 mm x 0.35 mm x 1 mm, field-of-view = 140 mm x 100 mm x 100 mm, number of averages = 2 and acquisition time = 6min30sec.

Phase images of the distal femoral epiphysis were processed using a homodyne filter with a size 30% of the image dimensions. These filtered phase images were then employed to calculate a negative phase mask using the phase difference enhanced imaging (PADRE) algorithm (Kakeda, Korogi et al. 2011). This negative phase mask was finally multiplied with the magnitude images to generate the susceptibility-weighted images. The SWI images were studied under 3D MPR stack using Osirix software (Osirix v.5.0.2 32-bit, <http://www.osirix-viewer.com>)(Rosset, Spadola et al. 2004) by two blinded observers, including a

musculoskeletal radiologist. DRISHTI software (Australian National University)(Limaye 2012) was used to provide a three-dimensional (3D) reconstruction of the whole femoral trochlea.

SWI Vascular Density

Paramagnetic cartilage canals were automatically segmented in the homodyne filtered phase images by using a constant negative phase threshold of -0.1 rad. This threshold was visually optimized based on phase images from several subjects. This automatic segmentation process was implemented in Matlab R2012a (The Mathworks, Natick, MA, USA). Six sites were selected as regions of interest (ROIs; LRT (lateral ridge of the trochlea) & MRT (medial ridge of the trochlea); P (proximal), M (middle) and D (distal) sites) to capture equine femoral trochlear OC predilection (LRTP and LRTM where clinical OCD lesions most commonly arise (Lavery and Girard 2013)) and control sites (Fig. 1A). The proximal ROIs were adjacent to the metaphyseal ossification front, the middle ROIs to the cranio-proximal aspect of the secondary ossification center (SOC) and those distal to the distal third of the SOC. ROIs were manually drawn on the magnitude susceptibility-weighted images using ITK-SNAP software (<http://www.itksnap.org>) (Yushkevich, Piven et al. 2006). Vascular density was evaluated for each ROI by calculating the ratio between the number of voxels belonging to cartilage canals over the total number of voxels (Fig. 1C).

SWI vessels orientation

Cartilage vessel orientation was assessed with “OrientationJ” (Rezakhaniha et al., Biomech Model Mechanobiol, 2012) a Fiji plug-in based on structure tensors. It was applied to the thresholded images generated at each ROI for the assessment of SWI vascular density. The output data of the plugin is the directional amount of oriented structures. In order to compare the ROIs to each other, the probability density function of each site was determined from the corresponding angular distribution. The generated data was represented on polar graphs (from 0 to 180°) with the proportion of vessels at different angles (the ossification front is horizontal in all the graphs). Furthermore, for statistical analyses, the proportion of vessels within determined interval [$60, 120^\circ$] was calculated at each ROI.

Histology

Following MRI, femurs were dissected free of soft tissues. Each femoral trochlear ridge was sectioned in the sagittal plane and then sawed in a transverse plane to obtain 0.5cm to 1cm thick slabs that matched the SWI ROIs. The slabs were immediately fixed in 10% formalin for 24 hours and then decalcified in EDTA for 6-7 days. The sections were then fixed in 70% alcohol for 24 hours and embedded in paraffin as described previously (Lecocq, Girard et al. 2008). Two 4- μ m thick sections were cut from each of the 6 slabs corresponding to the ROIs. One was stained with Safranin O fast green (SOFG) and the other was immunostained with Von Willebrand factor (see supplementary information online for protocol) for validation of endothelial cells lining within cartilage canals. The SOFG sections were co-localized with the corresponding SWI image for vessel matching and used for histologic vascular area assessment. All other sections were banked. Images were digitalized using a Leica DM4000B microscope attached to a Leica DFC320 video camera. Screening for early OC lesions (according to description by Olstad et al., 2007 (Olstad, Ytrehus et al. 2007)) was performed at each ROI.

Histologic Vascular Area

A region was manually drawn using Image J software (<http://imagej.nih.gov/ij/>) (Schneider, Rasband et al. 2012) on the digitalized histologic sections of each ROI, within 3 mm margins of the perimeter, excluding the articular cartilage (defined as the avascular zone at the surface) and the region close to the ossification front. A threshold of the pixels corresponding to stained EGC was created. The total cartilage canal area corresponded to the area without pixel. Vascular area was calculated by the ratio of the cartilage canal area over the total selected area (Fig.1E).

Statistical analysis

A mixed model with repeated measurements was employed, with the individual as a random effect, the ROI as intra-subject factor and the group as factor between specimens to detect a difference in SWI vascular density, SWI vessels orientation or histologic vascular area between ROIs in both control and OC groups and to evaluate if there was a difference in SWI vascular density, SWI vessels orientation or histologic vascular area between groups at each

ROI. The alpha value was adjusted for each analysis with a Bonferroni correction. A linear regression and a Bland-Altman bias plotting were used to assess the agreement and limits of agreement of histologic vascular area (%) and SWI vascular density (%). As the goal was to validate the SWI sequence, the values from the different ROIs of same specimens were considered as independent. A value of $P < 0.05$ was considered significant. All analyses were performed with a commercial statistical software (SAS, version 9.1, SAS Institute Inc, Cary, NC).

Results

Cartilage canal vessels within the EGC were consistently seen in all specimens on the SWI transverse plane slices, and on the dorsal and sagittal plane reconstructed images. The principal nutrient vessels supplying the femoral EGC were visible, in agreement with that previously described by Olstad et al., 2008 employing contrast microangiographic techniques (Olstad, Ytrehus et al. 2008c) (Fig. S-1).

A good match for vascular architecture between SWI slices and histologic sections of the femoral trochlea (all ROIs) of both control and OC specimens was observed (Fig. 2). Von Willebrand factor immunostained sections revealed positive immunostaining (brown reaction product) in endothelial cells lining cartilage vessels within the cartilage canals seen of the corresponding SOFG sections (Fig. S-2).

No obvious differences in the vascular architecture were detected between the control and OC specimens. However, regional variations in the vascular patterns were clearly identified within the femoral epiphysis, as illustrated with the 3D reconstructed model (Fig. 3A & video S-1). First, large vessels running parallel to the ossification front of the metaphysis were seen in the proximal part of the medial and lateral trochlea (Fig. 3B). Interestingly, the cranio-proximal aspect of the ossification front of the SOC was highly indented (Fig. 3C). Many cartilage vessels, with a principal orientation perpendicular to the osteochondral junction, were observed coursing into the subchondral bone there (Fig. 3C). Distally, vessels kept the same perpendicular orientation, but there appeared to be fewer and associated with a less indented SOC ossification front compared with proximally (Fig. 3D). The SOC was more prominent proximally and cranially in the MRT than the LRT (Fig. 4A & B). The abaxial cartilage of the LRT at the cranio-proximal aspect of the SOC appeared

thicker than that of the MRT and more vascularized, while the vessel orientation changed from mainly perpendicular to the ossification front to parallel (Fig. 4C). The proportion of vessels at different angles from the ossification front at each ROI is represented in polar graphs (Fig. 5).

There was no significant difference in the vascular density and in the vascular area (Table S-II) and in the SWI vessels orientation (Table S-III) between control and OC groups at each ROI. Consequently, for joint subregional ROI comparisons, data from both groups were pooled. The mean vascular density of all specimens at the ROI LRTM was significantly higher than that of LRTP ($p=0.002$), MRTP ($p<0.0001$), MRTM ($p=0.0001$) and MRTD ($p=0.0008$) (Table I). The mean proportion of vessels within interval $[60, 120^\circ]$ of all specimens at the ROI LRTM was significantly lower than that of MRTP ($p=0.002$), MRTM ($p<0.0001$) and MRTD ($p=0.0002$), while the mean of all specimens at the ROI LRTP and LRTD were also significantly lower than and MRTD ($p=0.001$ and $p=0.0006$, respectively) (Table S-IV). The mean proportion of vessels within interval $[60, 120^\circ]$ of all specimens at the ROI LRTM was lower than that of LRTP and LRTD (mean difference of 12.03% and 12.22%, respectively), but the differences did not reach statistical significance ($p=0.11$ and $p=0.15$, respectively). There was no difference in mean of the calculated vascular area of all specimens between each ROI. There was a significant linear positive correlation ($r = 0.26$, $p = 0.01$) between histologic vascular area (%) and SWI vascular density (%). The slope of the regression (1.64) was statistically different from 0 ($p = 0.01$), and the intercept (11.97) was significantly different from 0 ($p<0.0001$), indicating that the SWI values were larger than the histologic values. The regression slope of the Bland-Altman analysis was significantly different from 0 ($p<0.0001$) and the intercept was not significantly different from 0 ($p<0.0001$), indicating that vascular density values were larger with MRI than histology and that this difference increased with larger values (mean difference between 2 measurements, 13.89% and 95% confidence interval, 0.52% to 27.27%) (Fig. S-3).

Discussion

This study highlights the capacity of clinical 3T MRI SWI to display the vascular tree of equine neonatal distal femoral epiphyseal growth cartilage accurately. The vascular pattern and density at the OC susceptible sites (LRTP&M) was different to the sites where lesions are

rarely observed (Bourzac, Alexander et al. 2009). The SWI images were acquired *in situ*, employing parameters that are currently used for brain imaging *in vivo* in a hospital setting in humans and validate the use of this noncontrast-enhanced MRI technique to visualize EGC vessels in foals. The findings in our study confirm and extend those of others who recently reported the vascular pattern of porcine EGC at OC predilected sites, but with 9.4T (*ex vivo*) and 7T MRIs (*in vivo*) and with longer acquisition times (Toth, Nissi et al. 2013, Nissi, Toth et al. 2014). In the study herein, the use of a multi-channel coil and adapted processing, as previously suggested by Nissi et al. (Nissi, Toth et al. 2014), resulted in the acquisition of 3T SWI images providing sufficient resolution to optimize an accurate 3D reconstruction.

The results of this study, combined with the recent work by Toth et al. (Toth, Nissi et al. 2013), now provide compelling evidence that it is possible to image the vascular tree of growth cartilages in different species with MRI and also potentially assess the traumatic interruption of the blood supply or ischemic events, currently postulated to be a cause of OCD (Lavery and Girard 2013, McCoy, Toth et al. 2013). These investigations now pave the way for longitudinal *in vivo* studies that hold the promise to shed light on the upstream events in this complex disease in both humans and animals.

By examining the vascular supply at this early stage, we attempted to reduce the influence of trauma or shear forces on the vascular pattern as foals stand and walk immediately after birth. The description of the femoral vascular architecture of the neonatal foal herein reported confirms and extends that of Olstad et al. with contrast microangiographic techniques (Olstad, Ytrehus et al. 2008c).

Advancement of the epiphyseal ossification front engulfing the mid portion of the vessels that run parallel to the ossification front has been postulated to render the distal end of these vessels susceptible to failure precipitating cartilage ischemic events, based on observations at OC predilected site pigs (Ytrehus, Ekman et al. 2004b) and in the distal tibia in foals, (Olstad, Ytrehus et al. 2007). However, from our results and those of Olstad et al., in the distal femur (Olstad, Ytrehus et al. 2008c), vessels parallel to the ossification front were not only observed at the cranio-proximal aspect of the SOC in the LRT, where characteristic OCD macroscopic lesions are typically observed in juvenile foals, but also in the proximal aspect of both trochlear ridges where OCD does not arise. Nonetheless, based on our quantitative assessment of SWI vessels orientation, their proportion is statistically greater in the mid LRT

when compared to the MRT. Furthermore, the vascular density calculated from the transverse SWI images confirmed an enhanced vascularity at this site in the LRT, when compared to all other ROIs examined. This quantitative assessment of vascularity at this timepoint extends the findings of Olstad et al. (Olstad, Ytrehus et al. 2008c) reporting a disproportionately prolonged vascular supply dependence of the abaxial LRT relative to its thickness during development. Furthermore, we identified that, at the time of birth, the middle LRT is less ossified than the MRT, as seen by the increased thickness of the abaxial cartilage in the LRT. This could explain the later presence of perichondrial vessels not yet incorporated into the SOC. The increase of cartilage thickness at this site compared to the MRT, however, is not reported in older foals (Firth and Greydanus 1987, Fontaine, Blond et al. 2013).

The cranio-proximal aspect of the SOC presented an increased ossification front irregularity and indentation compared to the distal aspect. Although our results confirm those of others that the latter indentations are physiological (Lecocq, Girard et al. 2008, Fontaine, Blond et al. 2013), the dependence of this area of EGC on blood supply crossing an irregular osteochondral junction early in development is still considered as a risk factor for vascular failure, as the vessels may be subjected to greater biomechanical stresses from internal (joint morphology) or external trauma at these irregular sites (Hurtig 1996, Lecocq, Girard et al. 2008, Olstad, Ytrehus et al. 2008c, Olstad, Ytrehus et al. 2011).

No significant difference of vascular density on either imaging or histology at any ROI was seen between OC predisposed and control foals. Also, in the animals studied, despite the measures taken to increase the prevalence of OC, no evident vascular lesions or areas of vascular ischemia were observed on histology or imaging in any of the animals. Our data indicates that vascular ischemic events may not be present in newborn foals and arise, for as yet unelucidated reasons, soon after birth.

Similar distinct age-dependent patterns of vascular canal orientation and distribution have been reported previously in children employing gadolinium-enhanced MRI: parallel vessels were observed running radially in the epiphysis before the development of the SOC, after which the orientation changed to perpendicular to the ossification front (Barnewolt, Shapiro et al. 1997) as described here on SWI images. Spiculated ossification front variants were also reported in the femoral condyles of children (Laor and Jaramillo 2009, Jans, Jaremko et al. 2012), similar to the indentation fronts we and others have observed previously

in foals (van Weeren and Barneveld 1999, Lecocq, Girard et al. 2008, Fontaine, Blond et al. 2013). From a translational perspective and similarities in development, it is highly likely that SWI techniques will prove to be very useful to image vascularity of the developing epiphysis in children. A major advantage of MRI SWI is that contrast material is not required thereby simplifying the process and reducing image acquisition time. SWI is feasible both *in vivo* and *ex vivo* as the acquired vessel images are based on the phase differences generated from the deoxygenated blood present in cartilage canals (Nissi, Toth et al. 2014). It also permits a higher contrast than gadolinium enhanced MRI imaging (Haacke, Mittal et al. 2009) and allows visualization of cartilage vessels with artery supply not only from perichondrium, but also within the subchondral bone (Toth, Nissi et al. 2013). SWI could also allow detection of early ischemic OC lesions and conservative management of potential traumatic incidents in affected patients to allow healing of lesions, as the final outcome of OC is believed to be influenced by biomechanical forces (Nakano and Aherne 1988, Takahara, Shundo et al. 1998, Olstad, Hendrickson et al. 2013).

There was a good association between vascular area and density data calculated on histology and SWI, but the bias revealed by the Bland-Altman analysis could be explained, in part, by a vessel intensification on SWI due to a “blooming” effect created by the non-local phase information employed to enhance contrast between tissues, as the presence of a susceptibility source modifies the phase signal in a larger region than the actual size of this source (Marques 2005). Furthermore, some additional disparity could be explained by our choice of methodology. The histologic vascular area was acquired by making 2D thresholds of the area corresponding to the empty cartilage canal area while the site-matched SWI vascular density corresponded directly to the 3D presence of deoxygenated blood products inside vessels, theoretically providing a superior assessment of the 3D anatomy. Also, as there was a substantial difference in average slice thickness between histology (4 μ m) and the MRI (2mm), a longitudinal vessel undulating within an MRI slice may be cut on a histologic slide and appear as multiple transverse round vessels. This limitation could perhaps have been overcome by the assessment of a greater number of consecutive sections within the ROIs to obtain similar thickness to MRI slicing (Toth, Nissi et al. 2013).

Our study has additional limitations that merit mention. First, although a major improvement of image quality was achieved with clinical 3T MRI compared to previous

studies (Toth, Nissi et al. 2013, Nissi, Toth et al. 2014), multi-echo sequences are now used to perform SWI with a signal-to-noise efficiency better than that of a single echo SWI sequence, allowing for higher spatial resolution for comparable acquisition time (Denk and Rauscher 2010, Gilbert, Savard et al. 2012). A shortcoming of this study is that the imaging was not performed *in vivo*. At the outset of the study, in 2010, there were few, if any, 3T MRIs available in veterinary research institutions. However, since then, the landscape is changing fast and longitudinal studies *in vivo* are currently possible. We believe that it will be feasible to perform this sequence *in vivo* as it is currently used in diagnostic brain imaging (CHUM, Montréal). Furthermore, recent publications have reported a similar sequence *in vivo* to image porcine epiphyses with 7T MRI (Toth, Nissi et al. 2013, Nissi, Toth et al. 2014), but after we had completed the experimental arm of our investigation, providing evidence that it should be also be feasible in clinical 3T MRIs. An additional limitation of our study is the small sample size. As this was a terminal and exploratory study we tried to reduce the number of animals sacrificed for ethical reasons. The fact that several joints from each animal could be analyzed increased the power of our study.

It should be noted that every effort was made employing parents with OC and state of the art techniques of embryo transfer to increase the prevalence of an OC phenotype in the OC study population. The absence of evident focal growth cartilage ischemia lesions could be due either to the small number of animals studied or the very early timepoint of investigation and provides additional weight for the hypothesis that the ischemic events may be related to focal trauma to susceptible cartilage in the early days or months after birth (Hurtig 1996, Lecocq, Girard et al. 2008, Olstad, Ytrehus et al. 2008c, Olstad, Ytrehus et al. 2011, van Weeren and Jeffcott 2013). However, additional studies are required to determine this.

In conclusion, the data presented here provides additional lines of evidence that MRI SWI is a very promising, non-invasive and non tissue-destructive technique for *in vivo* studies to better understand the pathogenesis of OC in a variety of species. Although this method has great potential for future longitudinal studies of OC in horses and humans, additional investigations will be required to clearly establish the reproducibility and precision of the sequence, for accurate assessment of the growth cartilage vascular network and lesion assessment, similar to that performed in human medicine to validate SWI imaging for brain vascularity (Shmueli, de Zwart et al. 2009).

Acknowledgement

We would like to thank the following people for their contributions: Danielle Blain for her technical assistance with MRI SWI, Dr Claude Forget DVM for procuring OCD affected animals, Dr Réjean Lefebvre DVM PhD DACVR for embryo transfer, Dr Christiane Girard DVM DACVP for valuable insight on the histological assessment of the tissues and Dr Alan Boyde PhD, Queen Mary University of London for introducing us to DRISHTI.

This project was funded in part by Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), Quebec. Sheila Laverty's laboratory is currently funded by the National Science and Engineering Council of Canada (NSERC) the Réseau ThéCell, Fonds de Recherche en Santé Québec (FRSQ) and also by a generous gift from Mr and Mrs J Magnier, Coolmore Stud, Fethard, Ireland.

Tableau IX. Table I: Comparison of vascular density (%) between pairs of regions of interest (ROIs) measured by 3T MRI SWI.

ROIs	MD (%)	P value
LRTM > LRTP ⁽¹⁾	4.51	0.002
LRTM > MRTP	6.62	<0.0001
LRTM > MRTM	5.70	0.0001
LRTM > MRTD	4.86	0.0008

Only sites where significant differences in density were observed between pairs are included in the table. Significant differences in SWI vascular density between pairs of ROI. MD is the estimate of the mean difference between the vascular densities of 2 ROIs. ⁽¹⁾ **LRTM > LRTP** indicates that the vascular density mid section of the lateral trochlear ridge is higher than that in the proximal section of the lateral trochlear ridge by 4.51% on average (p = 0.002).

References

1. Lavery S, Girard C. 2013. Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis. *Vet J* 197:3-12.
2. McCoy AM TF, Dolvik NI, Ekman S, Ellermann J, Olstad K, Ytrehus B, Carlson CS. 2013. Articular osteochondrosis: A comparison of naturally-occurring human and animal disease. *Osteoarthritis Cartilage* 21:1638-1647.
3. Ytrehus B, Carlson CS, Ekman S. 2007. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Vet Pathol* 44:429-448.
4. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, et al. 2011. Early lesions of articular osteochondrosis in the distal femur of foals. *Vet Pathol* 48:1165-1175.
5. Carlson CS, Hilley HD, Meuten DJ. 1989. Degeneration of cartilage canal vessels associated with lesions of osteochondrosis in swine. *Vet Pathol* 26:47-54.
6. Ytrehus B, Ekman S, Carlson CS, et al. 2004. Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. *Bone* 35:1294-1306.
7. Weiss S, Loeffler K. 1996. [histological study of cartilage channels in the epiphyseal cartilage of young dogs and their relationship to that of osteochondrosis dissecans in the most frequently affected locations]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 103:164-169.
8. McCoy AM, Toth F, Dolvik NI, et al. 2013. Articular osteochondrosis: A comparison of naturally-occurring human and animal disease. *Osteoarthritis Cartilage* 21:1638-1647.
9. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, et al. 2008. Epiphyseal cartilage canal blood supply to the distal femur of foals. *Equine Vet J* 40:433-439.
10. Lecocq M, Girard CA, Fogarty U, et al. 2008. Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: Early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine Vet J* 40:442-454.
11. Fontaine P, Blond L, Alexander K, et al. 2013. Computed tomography and magnetic resonance imaging in the study of joint development in the equine pelvic limb. *Vet J* 197:103-111.
12. Cluzel C, Blond L, Fontaine P, et al. 2013. Foetal and postnatal equine articular cartilage development: Magnetic resonance imaging and polarised light microscopy. *Eur Cell Mater* 26:33-47; discussion 47-38.

13. Ekman S, Carlson CS, van Weeren PR. 2009. Workshop report. Third international workshop on equine osteochondrosis, stockholm, 29-30th may 2008. *Equine Vet J* 41:504-507.
14. van Weeren PR, Jeffcott LB. 2013. Problems and pointers in osteochondrosis: Twenty years on. *Vet J* 197:96-102.
15. Rejnö S, Strömberg, B. 1978. Osteochondrosis in the horse ii. Pathology. *Acta Radiologica Suppl* 358:153-178.
16. Laor T, Jaramillo D. 2009. Mr imaging insights into skeletal maturation: What is normal? *Radiology* 250:28-38.
17. Nissi MJ, Toth F, Zhang J, et al. 2014. Susceptibility weighted imaging of cartilage canals in porcine epiphyseal growth cartilage ex vivo and in vivo. *Magn Reson Med* 71:2197-2205.
18. Toth F, Nissi MJ, Zhang J, et al. 2013. Histological confirmation and biological significance of cartilage canals demonstrated using high field mri in swine at predilection sites of osteochondrosis. *J Orthop Res* 31:2006-2012.
19. Haacke EM, Ye Y. 2012. The role of susceptibility weighted imaging in functional mri. *Neuroimage* 62:923-929.
20. Kakeda S, Korogi Y, Yoneda T, et al. 2011. A novel tract imaging technique of the brainstem using phase difference enhanced imaging: Normal anatomy and initial experience in multiple system atrophy. *Eur Radiol* 21:2202-2210.
21. Rosset A, Spadola L, Ratib O. 2004. Osirix: An open-source software for navigating in multidimensional dicom images. *J Digit Imaging* 17:205-216.
22. Limaye A. 2012. Drishti: A volume exploration and presentation tool. pp. 85060X-85060X-85069.
23. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, et al. 2006. User-guided 3d active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* 31:1116-1128.
24. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, et al. 2007. Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. *J Orthop Res* 25:1094-1105.
25. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-675.

26. Bourzac C, Alexander K, Rossier Y, Laverty S. 2009. Comparison of radiography and ultrasonography for the diagnosis of osteochondritis dissecans in the equine femoropatellar joint. *Equine Vet J* 41:685-692.
27. Firth EC, Greydanus Y. 1987. Cartilage thickness measurement in foals. *Res Vet Sci* 42:35-46.
28. Hurtig MB, Pool, R.R. 1996. Pathogenesis of equine osteochondrosis In: Saunders editor. *Joint disease in the horse*. Philadelphia; pp. 335-358.
29. Barnewolt CE, Shapiro F, Jaramillo D. 1997. Normal gadolinium-enhanced mr images of the developing appendicular skeleton: Part i. Cartilaginous epiphysis and physis. *AJR Am J Roentgenol* 169:183-189.
30. Jans L, Jaremko J, Ditchfield M, et al. 2012. Ossification variants of the femoral condyles are not associated with osteochondritis dissecans. *Eur J Radiol* 81:3384-3389.
31. van Weeren PR, Barneveld A. 1999. The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the warmblood foal. *Equine Vet J Suppl*:16-25.
32. Haacke EM, Mittal S, Wu Z, et al. 2009. Susceptibility-weighted imaging: Technical aspects and clinical applications, part 1. *AJNR Am J Neuroradiol* 30:19-30.
33. Olstad K, Hendrickson EH, Carlson CS, et al. 2013. Transection of vessels in epiphyseal cartilage canals leads to osteochondrosis and osteochondrosis dissecans in the femoro-patellar joint of foals; a potential model of juvenile osteochondritis dissecans. *Osteoarthritis Cartilage* 21:730-738.
34. Nakano T, Aherne FX. 1988. Involvement of trauma in the pathogenesis of osteochondritis dissecans in swine. *Can J Vet Res* 52:154-155.
35. Takahara M, Shundo M, Kondo M, et al. 1998. Early detection of osteochondritis dissecans of the capitellum in young baseball players. Report of three cases. *J Bone Joint Surg Am* 80:892-897.
36. Marques JP, Bowtell, R. . 2005. Application of a fourier-based method for rapid calculation of field inhomogeneity due to spatial variation of magnetic susceptibility. *Concepts in Magnetic Resonance Part B (Magnetic Resonance Engineering)* 25B:65-78.
37. Denk C, Rauscher A. 2010. Susceptibility weighted imaging with multiple echoes. *J Magn Reson Imaging* 31:185-191.

38. Gilbert G, Savard G, Bard C, Beaudoin G. 2012. Quantitative comparison between a multiecho sequence and a single-echo sequence for susceptibility-weighted phase imaging. *Magn Reson Imaging* 30:722-730.
39. Shmueli K, de Zwart JA, van Gelderen P, et al. 2009. Magnetic susceptibility mapping of brain tissue in vivo using mri phase data. *Magn Reson Med* 62:1510-1522.

Figure legends

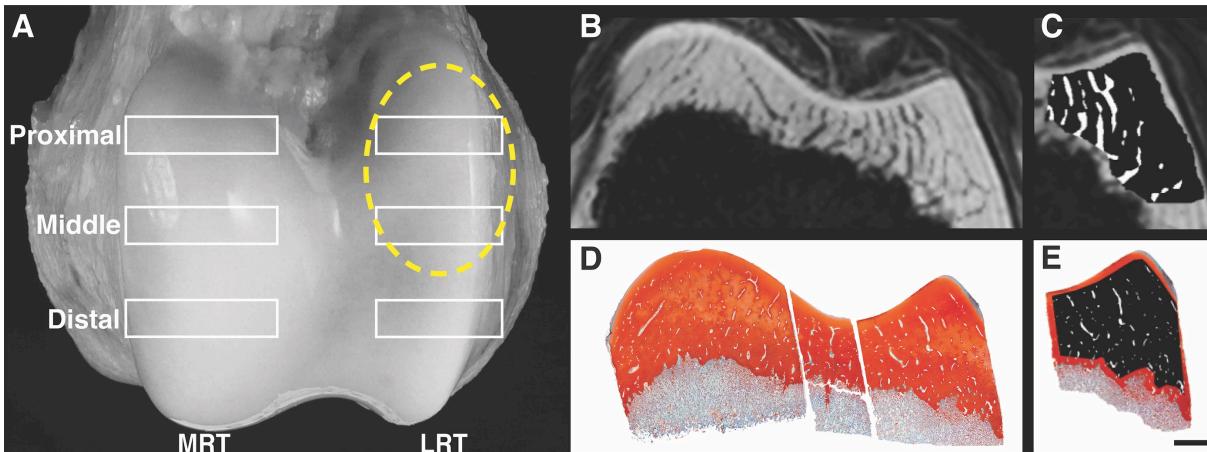


Figure 24. Figure 1. a) Distal femoral trochlea illustrating regions of interest (ROIs: proximal, middle and distal rectangles) in the lateral and medial ridges. Broken lines indicate the position of the probe for sagittal assessment. Yellow broken oval illustrates the region where osteochondritis dissecans lesions most frequently occur. b) Transverse ultrasonographic image of the lateral and medial trochlear ridge. c) Quantitative assessments at ROIs to validate ultrasonographic imaging of structures. The combined thickness (mm) of the articular and epiphyseal cartilage was measured by tracing a straight line from the articular surface to the osteochondral junction. The assessment of the degree of ossification front indentation was performed by calculating the ratio of the length of the osteochondral junction and width of the subchondral bone within the margins of each ROI. Scale bar = 5 mm. d) Transverse 3T SWI MRI [16].

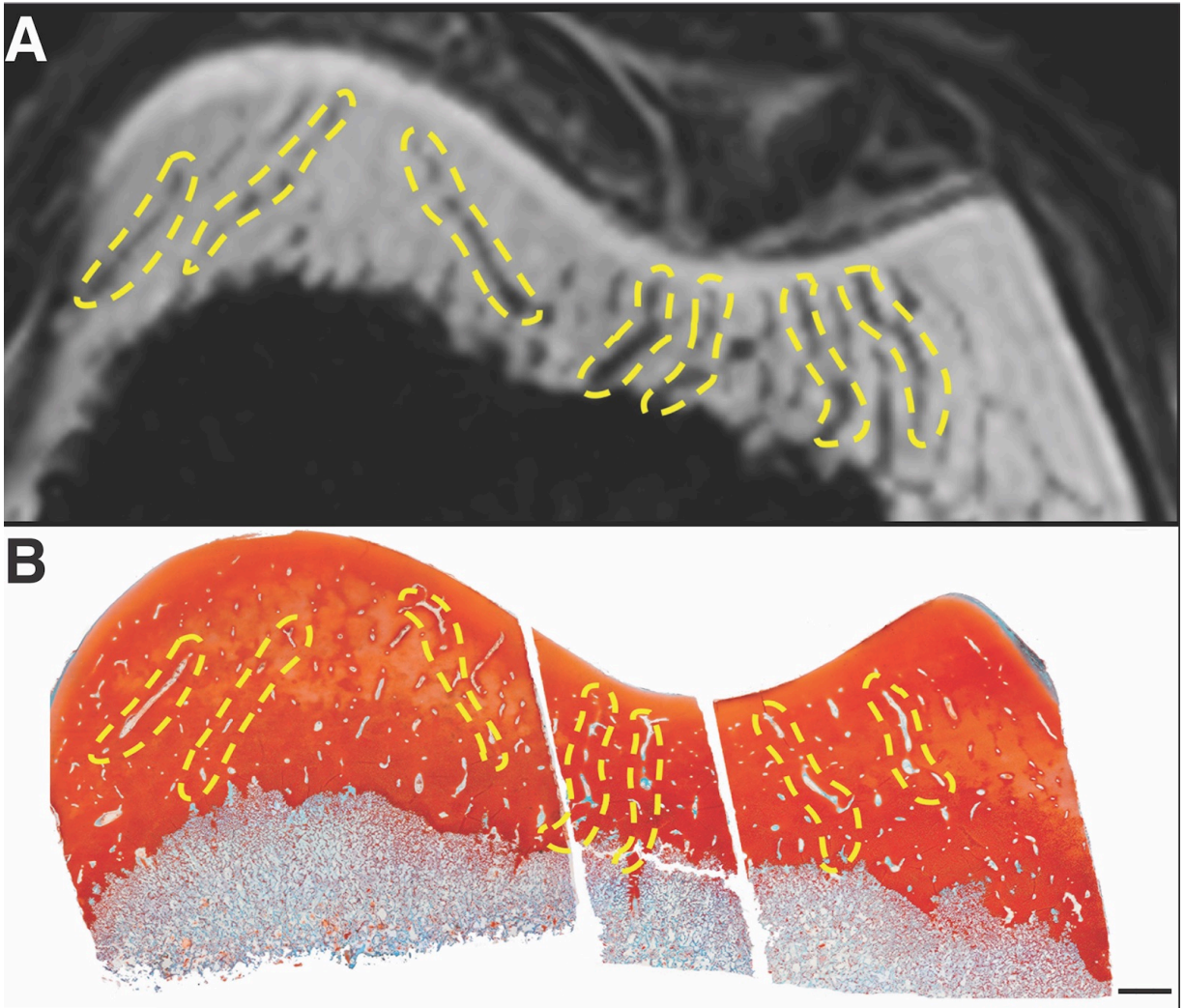


Figure 25. Figure 2. Histological validation of 3T MRI SWI images.

A. 3T MRI SWI transverse plane image of the middle femoral trochlea. B. Histologic site-matched slides stained with SOFG. The EGC is red and the SOC is blue. The yellow broken lines delineate matching vessels in the EGC.

Key: 3TMRI SWI = 3 Tesla MRI susceptibility-weighted imaging. SOFG = safranin O fast green. EGC = epiphyseal growth cartilage. SOC = secondary ossification center. Scale bar = 3mm.

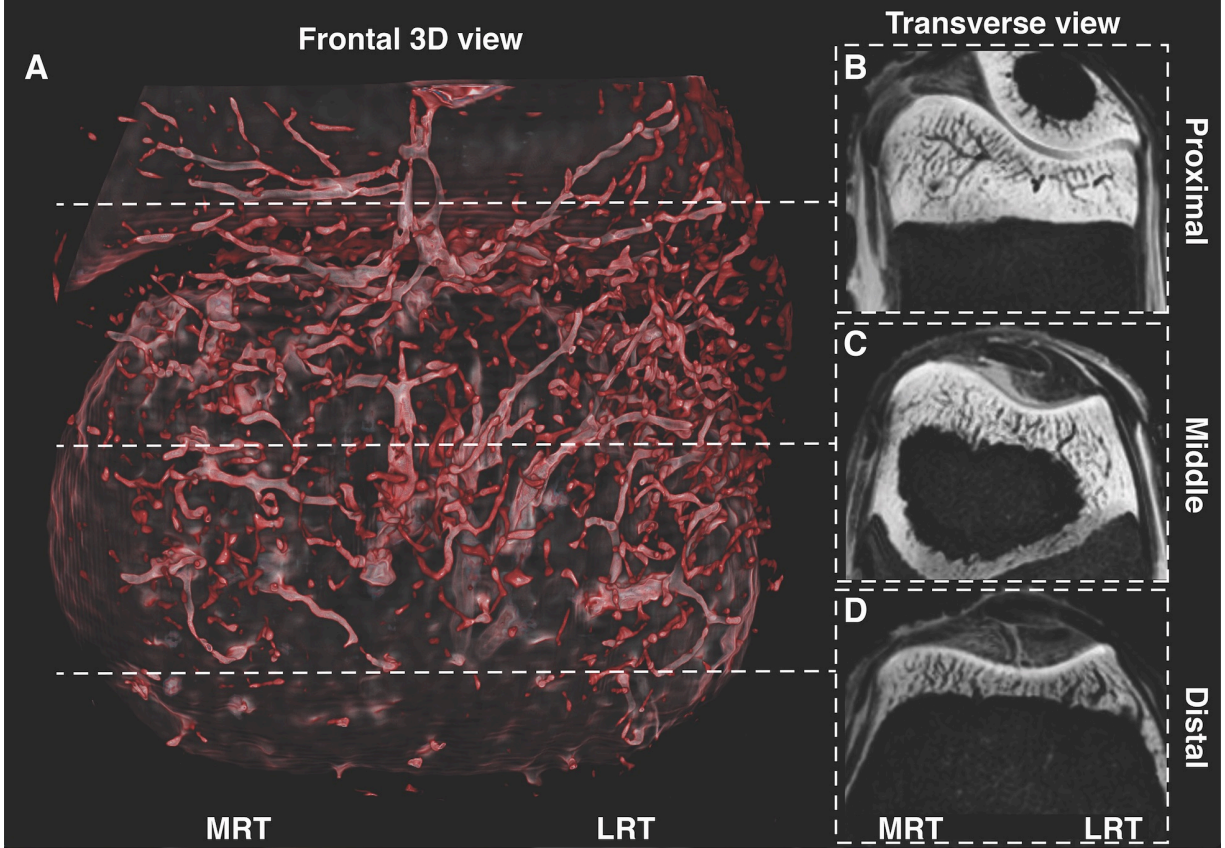


Figure 26. Figure 3. 3D EGC vascular architecture of the femoral trochlea.

A. Cranial 3D reconstruction of the 3T MRI SWI of the femoral trochlea illustrating its vascular architecture. The broken white lines correspond to the plane of the SWI images in panel on right. B. 3T transverse SWI image of the proximal femoral trochlea revealing that the vessels are branching from an axial nutrient perichondrial vessel and coursing abaxially parallel to the straight metaphyseal ossification front. C. 3T transverse SWI image of the middle trochlea showing the perpendicular vessels traversing the highly indented SOC and the perichondrial vessels seen within the abaxial LRT cartilage. D. 3T transverse SWI image of the distal trochlea showing a less indented ossification front with mainly perpendicular vessels bridging into the subchondral bone.

Key: 3T MRI SWI = 3 Tesla MRI susceptibility-weighted imaging. SOC = secondary ossification center.

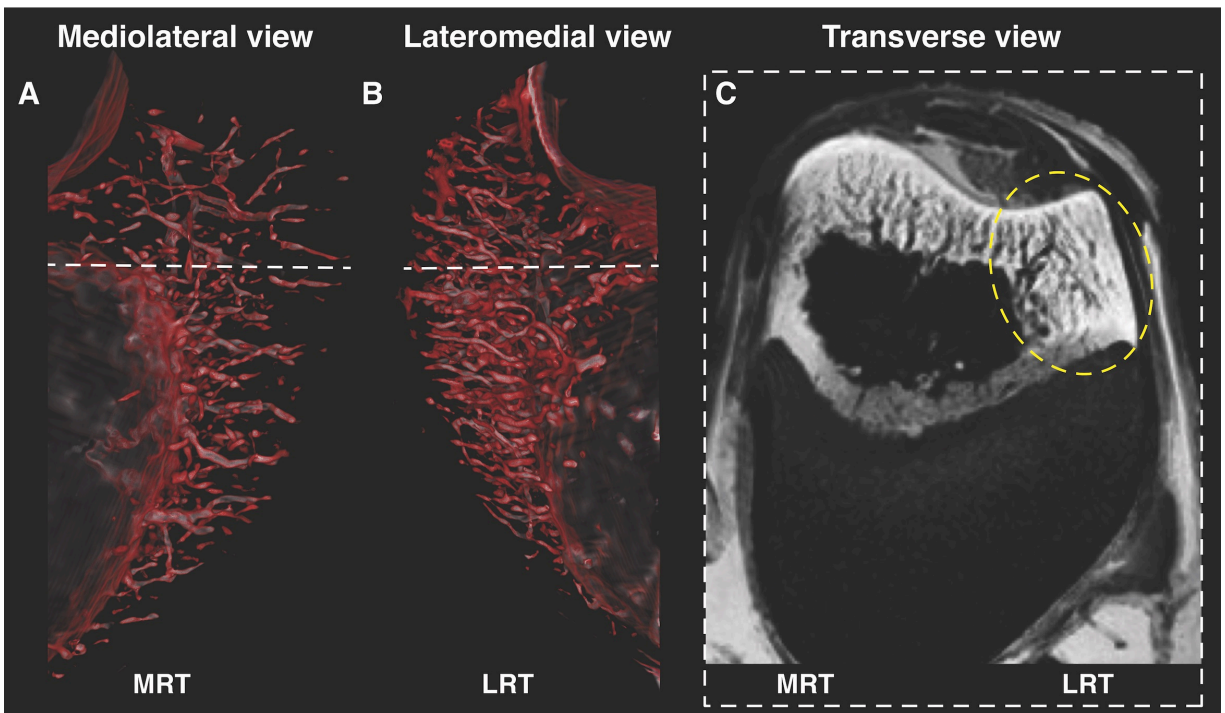


Figure 27. Figure 4. Comparison of vascular pattern and vascularity at OC predilected site (LRT) with a site where it is rarely observed (MRT).

Sagittal 3D reconstruction of the 3T MRI SWI images of the medial ridge of the trochlea (MRT) (A) and lateral ridge of the trochlea (LRT) (B) revealing that the abaxial aspect of the LRT is more vascularized than that of the MRT. The broken white lines represent the plane of the image on the right. C. Transverse 3T SWI image at the cranio-proximal aspect of the SOC showing that the LRT is less ossified than the MRT. The vessels within the thick abaxial LRT EGC (yellow broken line) are changing from perpendicular to parallel.

Key: LRT = lateral ridge of the trochlea and MRT = medial ridge of the trochlea. 3TMRI SWI = 3 Tesla MRI susceptibility-weighted imaging. SOC = secondary ossification center. EGC = epiphyseal growth cartilage.

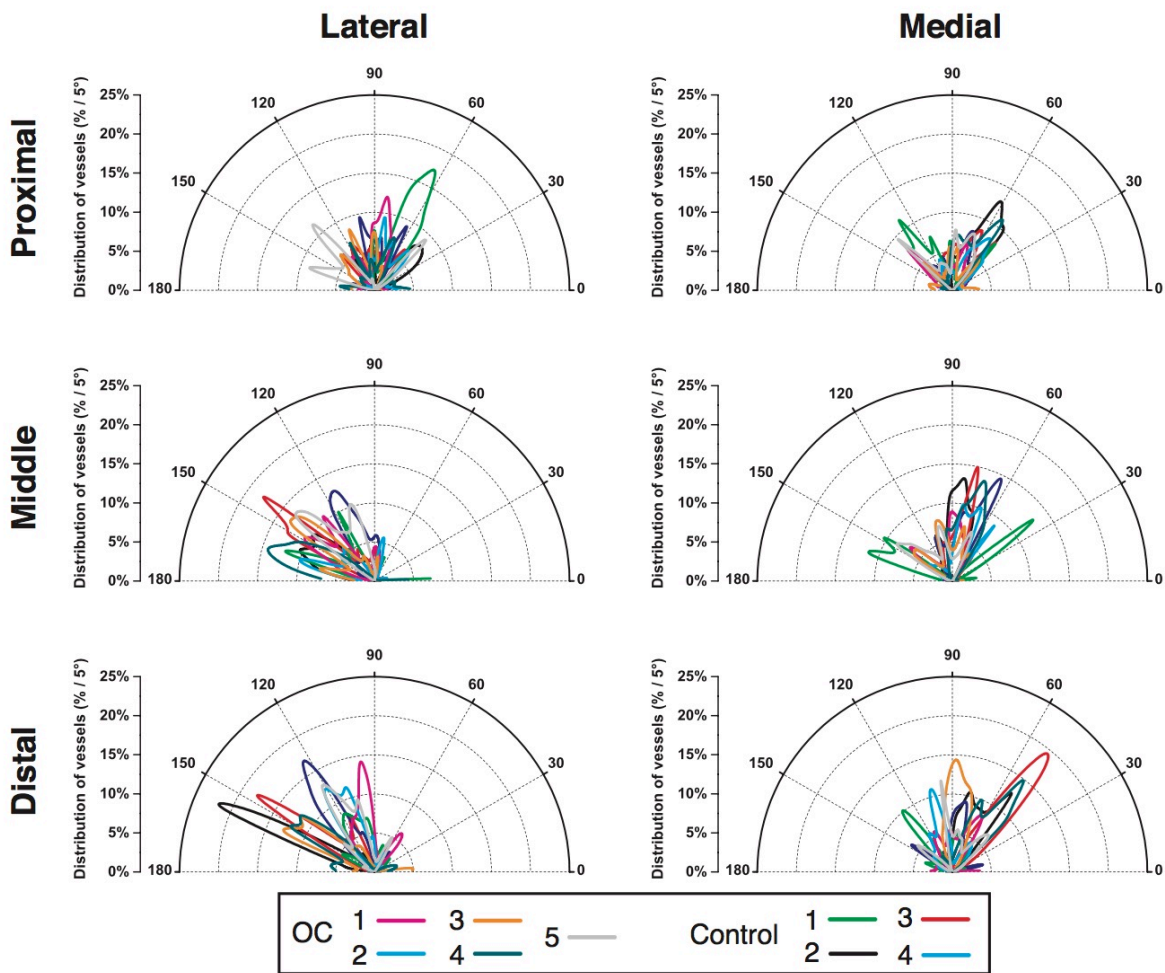


Figure 28. Figure 5. SWI vessels orientation. Polar graphs at each ROI of the distribution of vessels (% / 5°) at different angles from the ossification front. Only the left hindlimb of each specimen were included and represented in different colors. The ossification front is horizontal (0°).

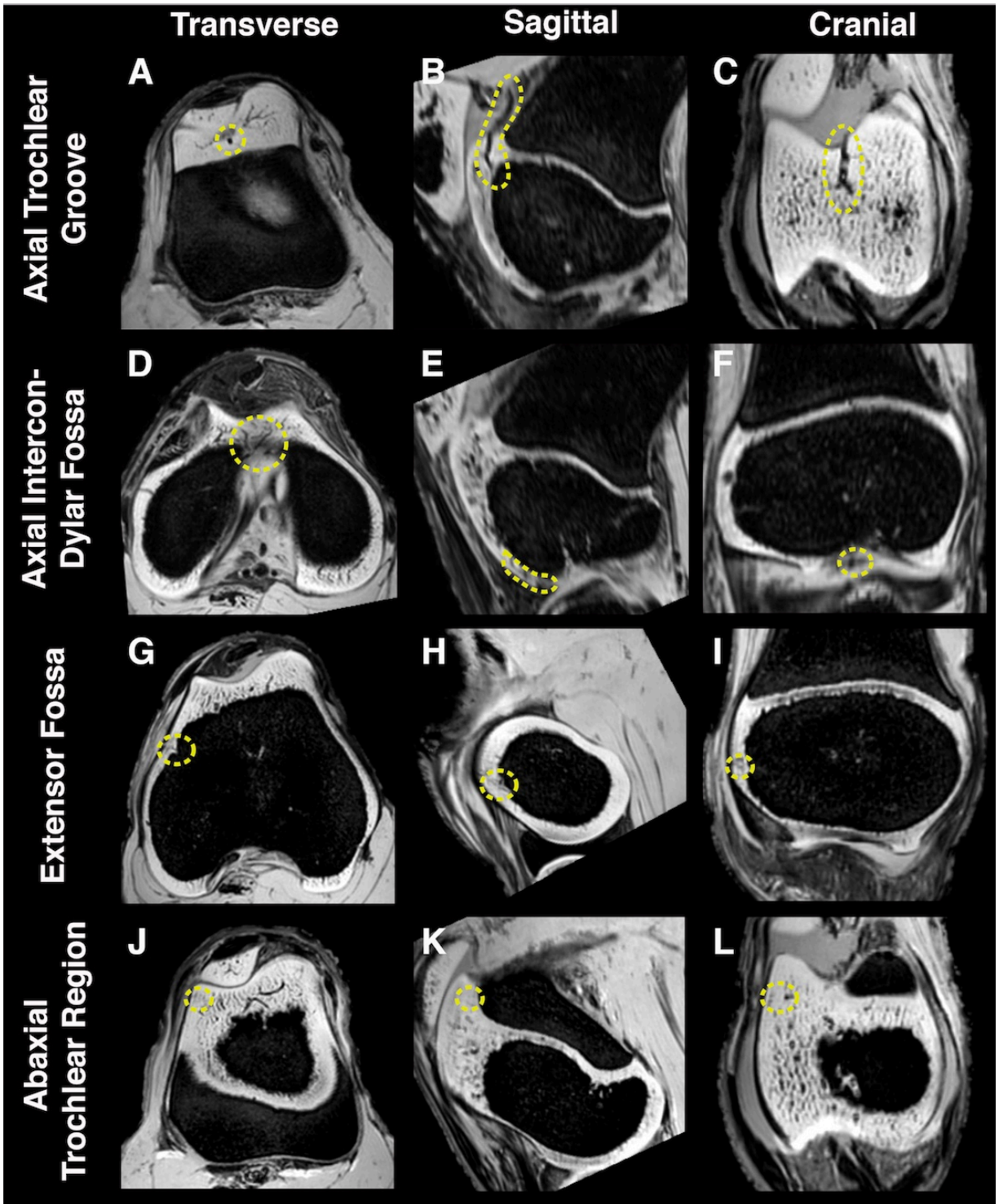


Figure 29. Supplementary figure 1. 3T MRI SWI orthogonal images illustrating the principal nutrient vessels entering the femoral trochlea.

A, B & C. The nutrient vessels entering the trochlear groove proximally. D, E & F. The axial nutrient vessels entering distally from the intercondylar fossa. G, H & I. The abaxial nutrient vessels coming from the extensor fossa. J, K & L. The abaxial nutrient vessels of the perichondrium entering the LRT proximally.

Key: 3T MRI SWI: = 3 Tesla MRI susceptibility-weighted imaging. LRT = lateral ridge of the trochlea.

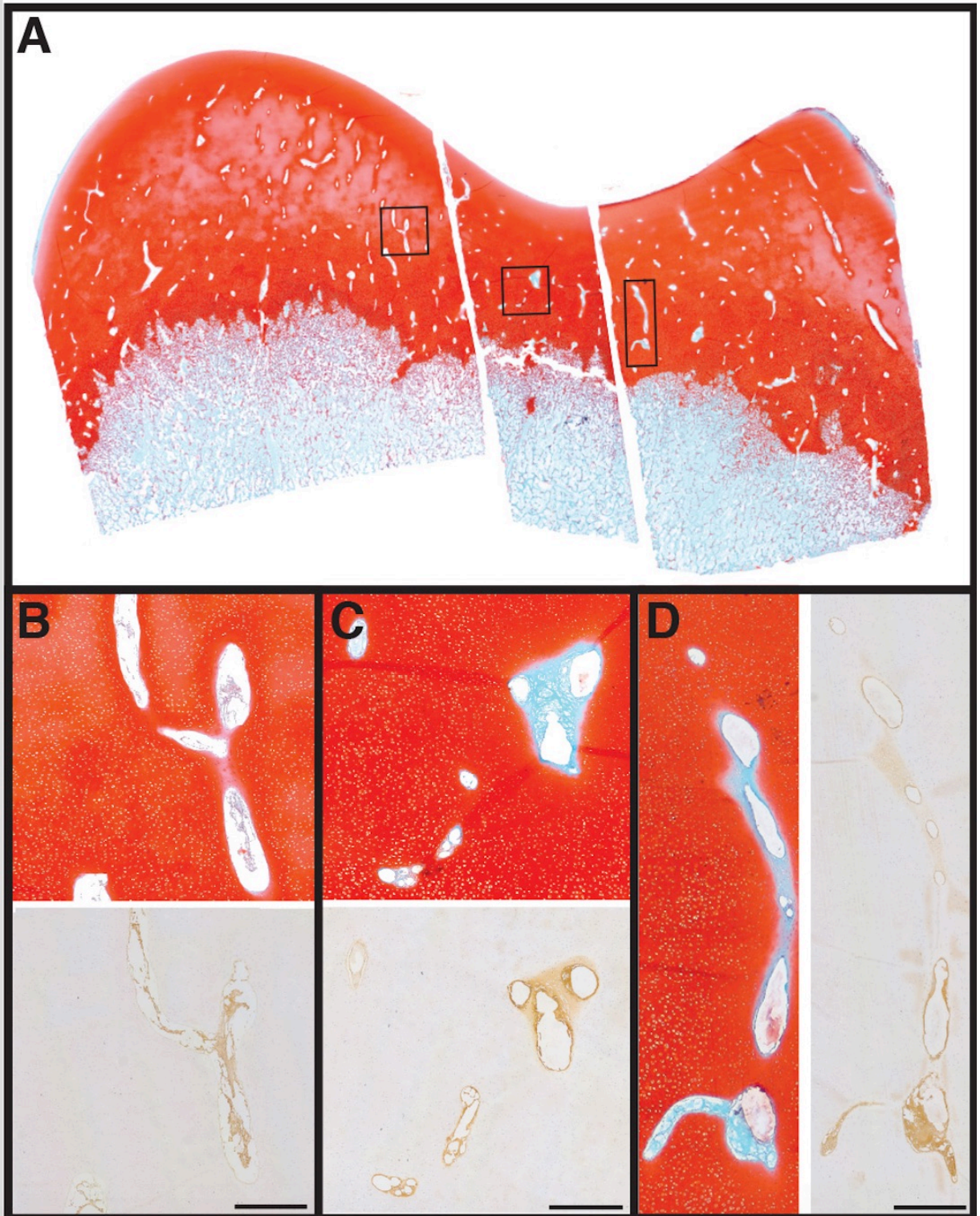


Figure 30. Supplementary figure 2. Validation of cartilage vessels within cartilage canals.

A. Safranin O fast green stained sections of the femoral trochlea. Rectangles show location of

magnification in B, C & D.

B, C & D. Magnification sections of Safranin O fast green and adjacent Von Willebrand factor immunostained sections revealing positive immunostaining (brown reaction product) in endothelial cells lining cartilage vessels. Scale bar = 100 μ m.

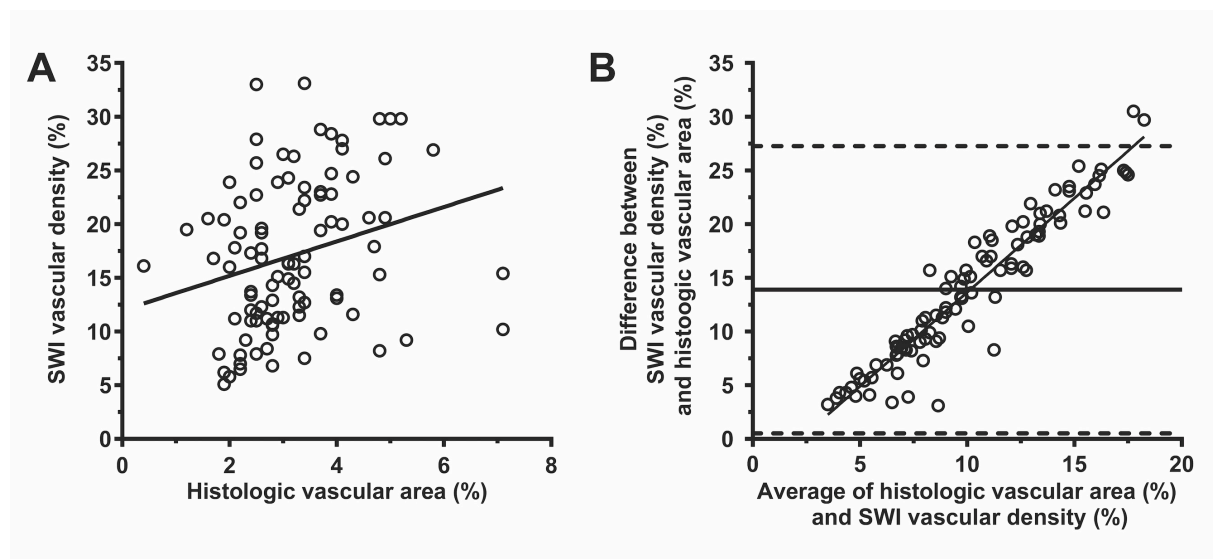


Figure 31. **Supplementary figure 3. Comparison of histologic vascular area (%) and SWI vascular density (%).** A. Scatterplot of the relation between histologic vascular area (%) and SWI vascular density (%). B. Bland-Altman difference plot of histologic vascular area (%) and MRI vascular density (%). Black line indicates level of bias, and dashed lines indicate 95% limits of agreement.

Tableau X. Table S-I: Age, sex, breed, reason for euthanasia, history, osteochondrosis status of parents and limb sampled for each foal in the study

Foal number	Age	Sex	Breed	Reason for euthanasia	Osteochondrosis status of parents	Hindlimb sampled
Osteochondrosis 1	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 2	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 3	< 24h	M	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ³ +	Both
Osteochondrosis 4	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 5	< 24h	M	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ⁴ +	Both
Control 1	0h	M	Paint	Dystocia	* sire - & dam -	Left ⁵
Control 2	< 24h	F	Standardbred	Died suddenly few hours after birth	* sire - & dam -	Both
Control 3	4 d	M	Warmblood	Traumatic patellar luxation right hindlimb	* sire - & dam -	Left ⁶
Control 4	4 d	F	Hanovarian	Ventricular septal defect	* sire - & dam -	Both

¹ Sire from Osteochondrosis foals 1 – 5 had OCD in hocks, bilateral

² Dam from Osteochondrosis foals 1, 2 & 4 had OCD in stifle, unilateral

³ Dam from Osteochondrosis foal 3 had OCD in stifle, unilateral

⁴ Dam from Osteochondrosis foal 5 had OCD in hocks, bilateral

⁵ Right hindlimb of control 1 was not imaged because of a schedule error with MRI scanner

⁶ Right hindlimb of control 3 was excluded because of traumatic patellar luxation

N/A = non applicable

* based on information from clients

Tableau XI. Table S-II: Mean \pm SD of histologic vascular area (%) and SWI vascular density (%) at each ROI.

ROI	Group	Histologic vascular area ⁽¹⁾ (%)	SWI vascular density ⁽²⁾ (%)
L RTP	OC :	3.1 \pm 1.0	19.4 \pm 6.1
	Control :	3.4 \pm 2.0	12.6 \pm 7.0
	Pooled* :	3.2 \pm 1.4	16.9 \pm 7.1
L RTM	OC :	3.3 \pm 0.8	20.8 \pm 6.1
	Control :	3.3 \pm 0.8	20.1 \pm 7.7
	Pooled* :	3.3 \pm 0.8	20.5 \pm 6.5
L RTD	OC :	2.6 \pm 0.9	15.4 \pm 8.1
	Control :	3.7 \pm 0.9	21.0 \pm 7.0
	Pooled* :	3.0 \pm 1.0	17.5 \pm 8.0
M RTP	OC :	2.8 \pm 1.0	14.2 \pm 5.9
	Control :	3.6 \pm 1.2	15.9 \pm 6.6
	Pooled* :	3.1 \pm 1.1	14.8 \pm 6.0
M RTM	OC :	2.8 \pm 0.7	14.7 \pm 6.2
	Control :	3.0 \pm 0.9	17.6 \pm 9.2
	Pooled* :	2.9 \pm 0.7	15.8 \pm 7.3
M RTD	OC :	3.0 \pm 1.3	15.3 \pm 5.7
	Control :	4.7 \pm 1.5	19.8 \pm 8.1
	Pooled* :	3.6 \pm 1.6	17.0 \pm 6.8

⁽¹⁾ The histologic vascular area represents the area in 2D of the cartilage canals containing the cartilage vessels.

⁽²⁾ The MRI vascular density represents the volume (3D) of desoxygenated blood and blood products contained in the cartilage vessels.

* A linear mixed model was used to evaluate if there was a difference in the histologic vascular area (%) or the SWI vascular density (%) between the groups at each ROI. There were no significant differences between the osteochondrosis predilected and control group. The ROI data of all the specimens were subsequently pooled for further comparisons between ROIs.

Tableau XII. Table S-III: Mean \pm SD of the SWI proportion of vessels within interval [60, 120°] (%) at each ROI.

ROI	Group	SWI proportion of vessels within interval [60, 120°] (%)
L RTP	OC :	34.6 \pm 15.7
	Control :	37.7 \pm 14.2
	Pooled * :	36.9 \pm 14.7
L RTM	OC :	22.7 \pm 10.5
	Control :	28.5 \pm 21.0
	Pooled * :	24.9 \pm 14.5
L RTD	OC :	40.9 \pm 22.6
	Control :	30.8 \pm 16.8
	Pooled * :	37.1 \pm 20.6
M RTP	OC :	48.4 \pm 12.8
	Control :	48.4 \pm 10.8
	Pooled * :	48.4 \pm 11.7
M RTM	OC :	58.7 \pm 17.5
	Control :	64.0 \pm 32.6
	Pooled * :	60.7 \pm 23.3
M RTD	OC :	54.2 \pm 22.5
	Control :	53.5 \pm 23.9
	Pooled * :	54.0 \pm 22.2

* A linear mixed model was used to evaluate if there was a difference in the SWI proportion of vessels within interval [60, 120°] (%) between the groups at each ROI. There were no significant differences between the osteochondrosis predilected and control group. The ROI data of all the specimens were subsequently pooled for further comparisons between ROIs.

Tableau XIII. Table S-IV: Comparison of the proportion of vessels within interval [60, 120°] (%) between pairs of regions of interest (ROIs) measured by 3T MRI SWI.

ROIs	MD (%)	P value
L RTP < MRTM ⁽¹⁾	23.8	0.0001
L RTM < MRTP	23.5	0.002
L RTM < MRTM	35.8	<0.0001
L RTM < MRTD	29.1	0.0002
L RTD < MRTM	23.6	0.0006

Only sites where significant differences in density were observed between pairs are included in the table. Significant differences in SWI proportion of vessels within interval [60, 120°] between pairs of ROI. MD is the estimate of the mean difference between the proportion of vessels within interval [60, 120°] of 2 ROIs. ⁽¹⁾ **L RTM > L RTP** indicates that the proportion of vessels within interval [60, 120°] of the proximal section of the lateral ridge of the ochlea is lower than that in the mid section of the medial ridge of the trochlea by 23.8% on average (p = 0.0001).

4.1.1 Informations supplémentaires sur l'article 1

4.1.1.1 Précisions méthodologiques sur la co-localisation histologique

Les précisions méthodologiques fournies ci-bas sur la co-localisation histologique s'appliquent aux articles 1 à 3, puisque ce sont les mêmes spécimens à l'étude. Les ROIs de chacun des spécimens ont été déterminés selon la morphologie du front d'ossification et du cartilage. Les ROIs proximaux se situent au niveau de l'extrémité distale de la diaphyse, le front d'ossification, qui est celui métaphysaire, est droit. Les ROIs du milieu se situent au niveau du tiers proximal du SOC. Les ROIs distaux se situent entre le ROI du milieu et l'extrémité distale de la trochlée. Suite à l'imagerie, les trochlées ont été disséquées et coupées d'abord en trois sections longitudinales séparant ainsi la lèvre latérale et médiale de la trochlée, puis transversalement pour faire des blocs d'environ 1 cm d'épaisseur. Pour localiser les ROIs, un ruban à mesurer a été placé sur la crête de la LTRF, de l'extrémité proximale à l'extrémité distale du cartilage articulaire (Figure 31). La coupe d'IRM correspondant au ROI a pu être localisée selon les distances mesurées sur les échantillons post-mortem, en traçant une ligne longeant la surface articulaire, à partir de l'extrémité proximale du cartilage, tel que la règle mise sur les échantillons post-mortem. La coupe d'IRM correspondant le plus visuellement à la lame histologique a été retenue pour des fins illustratives et, dans le cas de l'article 1, pour l'analyse quantitative de la densité vasculaire et de l'orientation des vaisseaux. Pour l'article 2, une segmentation circulaire de même volume a été appliquée à chacun des ROIs et à un ROI supplémentaire tel que démontré à la figure 33.

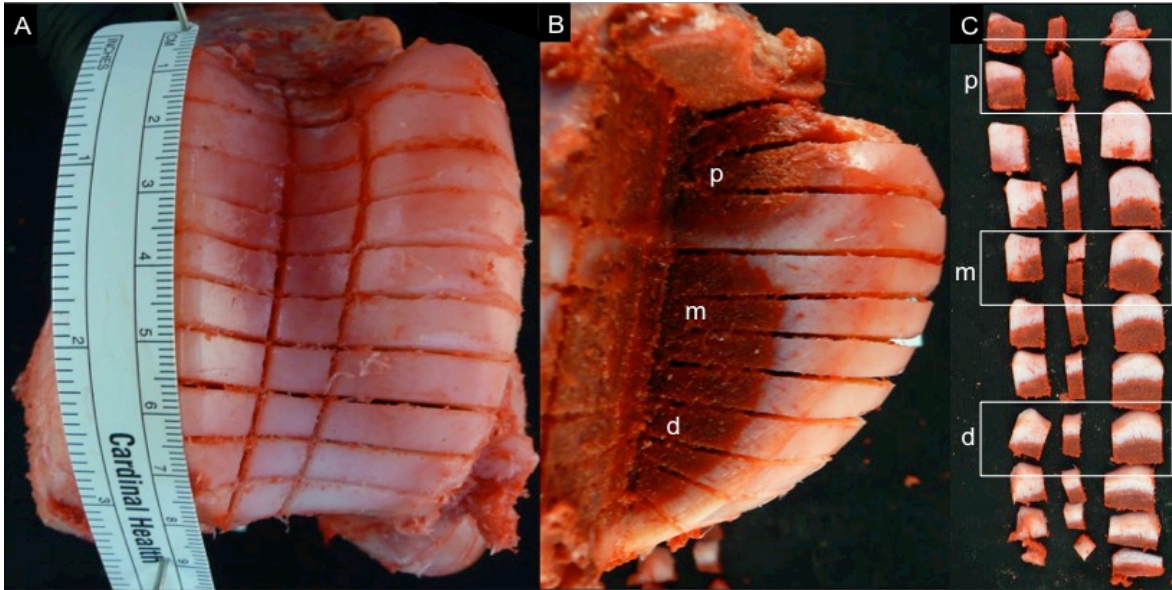


Figure 32. Coupes de la trochlée fémorale. La trochlée fémorale (A) suite à la coupe avec la règle pour les mesures de la localisation des ROIs. La segmentation de la MTR (B). Les blocs de cartilage/os en coupe transverse, avec les ROIs encadrés (C). p=proximal; m=moyen et d=distal.

4.1.1.2 Précisions méthodologiques sur l'analyse de l'orientation des vaisseaux

Les résultats de cette étude présentent à la fois de façon qualitative et descriptive la structure vasculaire de la trochlée fémorale de poulains à la naissance. La structure était similaire pour tous les poulains à l'étude, autant ceux contrôle que ceux prédisposés à l'OC. En plus des images 2D de SWI, une reconstruction 3D a été faite avec le logiciel Dristhi à des fins illustratives. Une vidéo de la reconstruction 3D d'une des trochlées fémorales est disponible comme matériel supplémentaire de cet article qui est publié dans le Journal of Orthopaedic Research. Bien qu'aucune différence vasculaire n'ait été démontré entre les poulains contrôle et ceux prédisposés, des variations vasculaires significatives étaient visibles entre les ROIs, notamment au ROI correspondant au site de prédilection de l'OC. Les résultats présentés dans cet article expliquent de façon descriptive et quantitative les variabilités vasculaires visibles au sein de la trochlée, en regard non seulement de la densité vasculaire mais également de l'orientation des vaisseaux par rapport au front d'ossification. Ce paramètre, soit l'orientation parallèle ou perpendiculaire au front d'ossification, est important

dans la pathogénèse de l'OC, tel que discuté dans l'article et plus en profondeur à la section 1.2.3.1. La figure 3 illustre l'apparence vasculaire à chacun des ROIs. La figure 4 démontre une variation vasculaire importante à l'aspect cranio-proximal du SOC, situé tout juste crânialement à la coupe de la figure 3C. On peut clairement voir que, au niveau de la LTRF, il y a une proportion plus importante de cartilage non ossifié, et qu'une proportion importante des vaisseaux ne traversent pas le front d'ossification et ont une orientation plutôt parallèle à ce dernier.

La densité vasculaire à chacun des ROIs a été calculé à l'aide des images SWI de même que l'aire vasculaire avec les lames histologiques correspondantes à des fins de validation. Afin de quantifier l'orientation des vaisseaux, l'angulation de ceux-ci par rapport au front d'ossification a été calculé en adaptant la méthodologie utilisée pour évaluer l'orientation trabéculaire de l'os (Rezakhaniha, Aghianniotis et al. 2012). Pour se faire, l'image de phase filtrée par homodyne de la coupe de SWI de chacun des ROIs a été utilisée. L'image a été orienté de manière à ce que le front d'ossification soit horizontal et correspond d'ailleurs à l'axe des X sur les graphes présentés à la figure 5. À l'aide de la fonction "OrientationJ" du logiciel Fiji, l'angle des vaisseaux par rapport à l'horizontal a été calculé. Les graphes de la figure 5 illustre la proportion angulaire par tranche de 5° du membre gauche de chaque spécimen à chaque ROI. Il faut noter que la densité vasculaire (nombre de vaisseaux) n'est pas évaluée ici, seulement la proportion angulaire des vaisseaux.

4.2 Article 2

Femoral epiphyseal cartilage matrix changes at predilection sites of equine osteochondrosis: quantitative MRI, second-harmonic microscopy and histological findings

Article publié:

Journal of Orthopaedic Research 2016 Oct;34(10):1743-1752

doi: 10.1002/jor.23176. Epub 2016 Feb 8.

Martel Gabrielle¹, Couture Charles-André³, Gilbert Guillaume⁴, Bancelin Stéphane³, Richard Hélène¹, Moser Thomas², Kiss S², Légaré F³ & Laverty S¹

¹Comparative Orthopaedic Research Laboratory, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Qc, Canada

²Department of Radiology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame, Montréal, Qc, Canada

³INRS-EMT, Université du Québec, Qc, Canada

⁴MR Clinical Science, Philips Healthcare, Markham, Ontario, Canada.

Corresponding author: Dr Sheila Laverty, Comparative Orthopaedic Research Laboratory, Département des Sciences Cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 1500 Avenue des Vétérinaires, St-Hyacinthe, Quebec, J2S 7C6. Canada
sheila.laverty@umontreal.ca

Running title: Quantitative MRI foals femoral epiphysis

Author contributions statement: GM collected the specimens, performed the descriptive and quantitative MRI analyses and microscopic validation and wrote the manuscript. CAC performed the second harmonic generation microscopy analyses. GG conceived the imaging acquisition and processing protocol and revised the manuscript. SB assisted in the the second

harmonic generation microscopy analyses. HR prepared the histologic and immunohistochemic specimens. TM participated in the study design and evaluated the MRI images. SK evaluated the MRI images. FL participated in the study design. SL conceived and designed the study, evaluated the histological specimens and revised the manuscript. All authors have read and approved the final submitted manuscript.

Abstract

Osteochondrosis is an ischemic chondronecrosis of epiphyseal growth cartilage that results in focal failure of endochondral ossification and osteochondritis dissecans at specific sites in the epiphyses of humans and animals, including horses. The upstream events leading to the focal ischemia remain unknown. The epiphyseal growth cartilage matrix is composed of proteoglycan and collagen macromolecules and encases its vascular tree in canals. The matrix undergoes major dynamic changes in early life that could weaken it biomechanically and predispose it to focal trauma and vascular failure. Subregions in neonatal foal femoral epiphyses (n=10 osteochondrosis predisposed; n=6 control) were assessed for proteoglycan and collagen structure/content employing 3T quantitative MRI (3T qMRI: T1 ρ & T2 maps). Site-matched validations were made with histology, immunohistochemistry and second-harmonic microscopy. Growth cartilage T1 ρ and T2 relaxation times were significantly increased (p<0.002) within the proximal third of the trochlea, a site predisposed to osteochondrosis, when compared with other regions. However this was observed in both control and osteochondrosis predisposed specimens. Microscopic evaluation of this region revealed an expansive area with low proteoglycan content and a hypertrophic-like appearance on second-harmonic microscopy. We speculate that this matrix structure and composition, though physiological, may weaken the epiphyseal growth cartilage biomechanically in focal regions and could enhance the risk of vascular failure with trauma leading to osteochondrosis. However additional investigations are now required to confirm this. 3T qMRI will be useful for future non-invasive longitudinal studies to track the osteochondrosis disease trajectory in animals and humans.

Key words: Epiphyseal growth cartilage; proteoglycan; collagen; quantitative MRI; osteochondrosis

Introduction

Osteochondrosis is a disorder that affects both human and animal joint development and lesions arise very early in life (Lavery and Girard 2013). As access to osteochondrosis lesion specimens is hampered because of ethical constraints, investigation of the very early stages of the disease in children is limited (McCoy, Toth et al.). However, major advances in knowledge of the pathophysiology of osteochondrosis have been made from animal studies of naturally occurring disease in recent years and the earliest subclinical lesion is now well recognized to be a focal ischemic chondronecrosis of the epiphyseal growth cartilage (Carlson, Hilley et al. 1989, Weiss and Loeffler 1996, Ytrehus, Ekman et al. 2004b, Olstad, Ytrehus et al. 2011). Normal neonatal epiphyses are composed of an avascular articular cartilage overlying a vascularized growth cartilage (Lecocq, Girard et al. 2008, Cluzel, Blond et al. 2013). With osteochondrosis, the focally ischemic chondronecrotic cartilage fails to undergo endochondral ossification and may form a cartilage flap or osteochondral fragment at the joint surface (Ytrehus, Carlson et al. 2007). At this advanced stage it is termed osteochondritis dissecans.

The upstream events leading to the focal growth cartilage ischemia remain to be elucidated (van Weeren and Jeffcott 2013). As cartilage's biomechanical properties are highly dependant on the major structural constituents of its matrix, it is speculated that changes in the epiphyseal growth cartilage matrix macromolecules at specific subregional sites in joints predisposed to osteochondrosis may render the cartilage canals and blood vessels susceptible to trauma and subsequent vascular failure (Bertone, Bramlage et al. 2005, Lecocq, Girard et al. 2008). Collagen has been proposed to play a role in the pathogenesis of osteochondrosis (reviewed by Lavery et al., (Lavery and Girard 2013)): collagen structural changes may predispose to cartilage canal collapse and ischemia or, altered collagen metabolism may translate to a biomechanically susceptible matrix. Proteoglycan depletion has also been identified at osteochondrosis predilection sites in fœtuses and young foals (Lecocq, Girard et al. 2008) and, although considered to be a normal developmental feature, may be linked to the onset of the disease.

The horse has a high prevalence of osteochondrosis leading to osteochondral fragments and joint pain in juvenile animals, similar to humans, and is a suitable model for investigations

of the naturally occurring disease (McCoy, Toth et al. 2013). Furthermore, osteochondrosis occurs in the distal femoral epiphyses of both humans and horses and usually arises at specific sites and may often be bilateral (McCoy, Toth et al. 2013).

Osteochondrosis lesions have not been identified in the few studies of equine fetuses to date and the youngest foal reported with an osteochondrosis lesion was 2-days-old (Rejnö 1978). Investigations of the causes of osteochondrosis very early after birth may help elucidate if there is a link between physiological maturation events in the epiphyseal growth cartilage matrix and the onset of osteochondrosis lesions.

Magnetic resonance imaging (MRI) is currently the most suitable imaging modality to evaluate cartilage non-invasively *in vivo*. MRI studies of epiphyseal development have been performed in children (Khanna and Thapa 2009) and juvenile animals including pigs (Dwek, Shapiro et al. 1997, Oeppen and Jaramillo 2003, Connolly, Jaramillo et al. 2004, Menezes, Olear et al. , Menezes, Connolly et al. 2007), lambs (Jaramillo, Connolly et al. 1998), rabbits (Rivas and Shapiro 2002) and horses (Cluzel, Blond et al. 2013, Fontaine, Blond et al. 2013). A variety of sequences have been identified to better distinguish the articular, epiphyseal and physeal cartilage (Khanna and Thapa 2009).

Quantitative MRI (qMRI) reveals site variations of proteoglycan content (T1 ρ maps) and collagen structure (T2 maps). Quantitative T1 ρ has been employed for the early diagnosis of cartilage degeneration and was shown to be sensitive to changes in cartilage proteoglycan content (reviewed by Li & Majumdar (Li and Majumdar 2013)). Recently, 9.4T T1 ρ , adiabatic T1 ρ and T2 relaxation time mapping permitted the identification of cartilage necrosis following surgical interruption of the vascular supply of the distal femoral epiphyseal growth cartilage of juvenile goats for the first time (Toth, Nissi et al. 2015). T2 mapping has been employed for the assessment of cartilage development in humans and other species and has revealed that juvenile articular cartilage has a multi-laminar appearance of up to 7 layers due to incomplete maturation and structural variations (Dardzinski, Laor et al. 2002, Nissi, Rieppo et al. 2006). However, qMRI with both T1 ρ and T2 mapping sequences has never been employed to study naturally occurring osteochondrosis in any species or in equine epiphyseal cartilage to date.

We hypothesize that osteochondrosis predilection regions in the epiphyseal cartilage of neonatal foals have physiological variations in proteoglycan and collagen structure or content

that could be implicated in the early pathogenesis of the disease.

The specific objectives of this study were twofold: to investigate the proteoglycan content and collagen content and structure of the epiphyseal cartilage of the femoral trochlea in control foals and neonatal foals predisposed to osteochondrosis employing q3T MRI (T1 ρ and T2 maps) and to validate the imaging findings with site-matched second-harmonic microscopy for collagen ultrastructure, immunohistochemistry for type II collagen and histology for proteoglycan content.

Materials and methods

Animal and Collection Procedures

The experimental protocol was approved by the institutional animal care and use committee. Furthermore, guidelines established by the Canadian Council on Animal Care were strictly followed. Foals (n=5; osteochondrosis predisposed group) were conceived by embryo transfer from three Standardbred donor mares and a Standardbred stallion, all with a history of osteochondritis dissecans lesions (Table S-I). The foals were humanely euthanized with an IV injection of embutramide (75mg/kg) within 24 hours of birth, following deep sedation of both the dams and the foals with xylazine (0.6mg/kg IV). Control animals were foals (n=4) that died at the veterinary teaching hospital from other causes. The osteochondrosis status of parents in this group was negative according to foals' owners. The mean age of the control foals was 2 days. Breed and the cause of death are provided in Table S-I (supplementary information online). Hindlimbs were disarticulated at the coxofemoral joint and kept in a refrigerator and then frozen at -20°C until imaging and thawed prior to MRI.

MRI

Sixteen hindlimbs (n = 6 control and 10 osteochondrosis predisposed) were oriented parallel to the main magnetic field and the stifles were imaged with a 3T MRI (Achieva X, Philips Healthcare, Best, The Netherlands) with a maximum gradient strength of 40 mT/m, a maximum slew rate of 200 T/m/s and an 8-channel receive only knee coil.

T1 ρ mapping was performed using a 2D multi-slice magnetization-prepared steady-state free precession sequence with 7 different spin-locking times (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ms). Spin-locking was performed at a frequency of 500 Hz by using a rotary echo locking scheme. Local shimming was performed specifically on the region of interest (ROI) to improve B0 homogeneity. Other imaging parameters were: TR = 5.0 ms, TE = 2.5 ms, flip angle = 40 degrees, field-of-view = 140 mm x 140 mm, resolution = 0.55 mm x 0.55 mm, slice thickness = 3 mm, number of slices = 27, acquisition time = 1min57sec per spin-locking time.

T2 mapping was performed using a 2D multi-slice multi-echo spin-echo sequence with 6 different echo times (13, 26, 39, 52, 65, 78 ms). Other imaging parameters were: TR = 2000 ms, flip angle = 90 degrees, field-of-view = 140 mm x 140 mm, resolution = 0.55 mm x 0.55 mm, slice thickness = 3 mm, number of slices = 27, acquisition time = 19min52sec.

Cylindrical regions of interest (ROIs) were manually drawn on both the T1 ρ and T2 relaxation time maps with ITK-SNAP (<http://www.itksnap.org>) at proximal, middle and distal sites in the growth cartilage, just below the articular surface, in both the lateral (L_{proximal} , L_{middle} and L_{distal}) and medial (M_{proximal} , M_{middle} and M_{distal}) ridge of the trochlea. An additional ROI was also assessed deeper to the proximal and middle trochlea sites, close to the junction of the physis and epiphyseal growth cartilage, as the cartilage was very thick in this site (L_{deep} , M_{deep}) (Fig. 1A & B). Clinical osteochondritis dissecans lesions usually occur at the L_{proximal} and L_{middle} ROIs (Bourzac, Alexander et al. 2009) that overly the L_{deep} region.

The ROIs were 243 voxels or 139.535 mm³. T1 ρ and T2 relaxation time maps (Fig. 1C & D) were calculated by means of mono-exponential two-parameter fitting (MatLab 6.5.1, MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

Histology: Safranin O fast green

Following MR imaging, femurs were dissected free of soft tissues. The femoral trochlea was sectioned in the transverse plane to obtain 0.5 - 1cm thick slabs that matched the ROIs. The slabs were fixed in 10% formalin (24 hours), decalcified in EDTA (6-7 days), fixed in 70% alcohol (24 hours) and embedded in paraffin as described previously (Lecocq, Girard et al. 2008). 4- μ m thick sections were cut from each slab and stained with safranin O fast green. A validation of safranin O staining of proteoglycan was also performed with toluidine blue on selected sections with matrix pallor (see later) (Fig. S-1). Staining with hematoxylin

and eosin at each ROI was also performed to evaluate the presence of chondronecrosis within the growth cartilage. All the sections were digitalised using a Leica DM4000B microscope attached to a Leica DFC320 video camera.

Immunohistochemistry: Collagen type II

Selected sections from ROIs that had the greatest T2 mapping variations (L_{proximal} , M_{proximal} , L_{middle} and M_{middle}) were immunostained with collagen type II rabbit primary antibody (Abcam inc, Cambridge, MA, USA) (see supplementary information online for protocol).

Second-harmonic microscopy

Second-harmonic microscopy (see Brown et al. (Brown, Houle et al. 2013)) was employed to image 10 μm thick tissue slices corresponding to the ROIs. The signal intensity provides information (resolution of 500 nm) on collagen density and alignment over regions of 300 x 300 μm . The polar plots of this intensity as a function of incident laser polarization provide the general axis of alignment of the fibrils and their anisotropy in the field of view considered. These properties were calculated over each region of 100 x 50 μm in the images and represented as an arrow whose direction corresponded to the main fibrillar direction, and length indicated the degree of anisotropy of the fibrils within a region. A longer arrow indicates greater anisotropy of the signal, representing a high level of collagen alignment.

Statistical analysis

A linear mixed model was used to detect differences in T1 ρ relaxation time or T2 relaxation time between ROIs in both control and osteochondrosis predisposed groups and to evaluate if there was a difference in T1 ρ or T2 relaxation time between the groups at each ROI. To take into account the dependent nature of the samples, the individual was used as a random effect and the ROI as intra-subject factor and the group as factor between specimens. A priori contrasts were used to examine differences between pairs of means adjusting the alpha value for each contrast with the sequential Bonferroni adjustment procedure. A value of $p < 0.05$ was considered significant. All analyses were performed with commercial statistical software (SAS, version 9.3, SAS Institute Inc, Cary, NC.)

Results

T1ρ mapping

T1ρ maps varied between and within articular, epiphyseal and physeal cartilage revealing very evident differences in proteoglycan content in these zones (Fig. 2). An inverse relationship exists between T1ρ relaxation times and proteoglycan content (Li and Majumdar 2013). The growth cartilage of the proximal and middle ROIs, in both the lateral and medial ridges, had distinct areas with high T1ρ relaxation times (Fig. 2 A & B). Transverse projections of the proximal trochlea ROIs confirmed and extended these findings. A central expansive area with increased T1ρ relaxation times was most evident at the ROI L_{proximal} (Fig. 2 C) and the area of the zone decreased further distally in the ROI L_{middle} (Fig. 2 E). In addition, the T1ρ relaxation times were also elevated in a thin layer close to the metaphyseal ossification front (Fig. 2 C). The distal trochlea had overall lower T1ρ relaxation times, except for focal sites in the M_{distal} region (Fig. 2 G).

There were no significant differences between the ROI T1ρ relaxation times of the osteochondrosis predisposed and control group. The ROI data of all the specimens were subsequently pooled for further comparisons between sites and within joints (Table S-II). There were significant differences in T1ρ relaxation times between the ROIs (Table S-III and Fig. 3B). The highest T1ρ relaxation times were recorded in the ROIs L_{deep} and M_{deep} . The greatest variation in T1ρ relaxation times was observed within the lateral ridge of the trochlea: L_{proximal} values were significantly higher than those of L_{distal} , where the lowest mean values were measured. This pattern was not observed in the medial ridge of the trochlea. The ROI M_{distal} had significantly higher T1ρ relaxation times when compared with L_{distal} .

Histologic validation of proteoglycan content

Safranin O fast green stained slides revealed focal areas with low stain uptake in the growth cartilage indicative of a low proteoglycan content that corresponded to the high relaxation times observed on T1ρ matched maps (Fig. 2 C - H).

L_{proximal} sections had a laminar loss of staining in the early proliferative cartilage next to the metaphyseal physis but the matrix staining in areas with hypertrophic chondrocytes was

not decreased (Fig. 2 D and Fig. S-2). A central matrix pallor was also seen within the L_{proximal} and the L_{middle} regions in all of the specimens and occasionally also in the M_{middle} (Fig. 2 D, F). Sections from the distal sites of both ridges of the trochlea had good stain uptake in the majority of the specimens, but a few M_{distal} sections had focal areas of matrix pallor (Fig. 2 H). The loss of proteoglycan within the areas of low safranin O staining uptake was also confirmed on selected site-matched sections stained with toluidine blue (Fig.S-1). Chondronecrosis assessed on hematoxylin and eosin sections was not found within any of the areas of matrix pallor (Fig. S-2).

T2 mapping

T2 mapping revealed a variation of T2 relaxation times between and within articular, epiphyseal and physeal cartilage (Fig. 4). An increase of the T2 relaxation times is associated with a decrease of collagen anisotropy and/or content (Hontoir, Clegg et al. 2015). The articular cartilage had higher T2 values than those of the underlying growth cartilage, permitting easy differentiation of the two, and had a bilaminar appearance (Fig. 4A, site 1). The growth cartilage had homogeneous lower T2 values (Fig. 4B, site 2). The ROI M_{deep} had small focal areas with higher T2 relaxation times and ROI L_{deep} presented overall high T2 relaxation times (Fig. 4A, site 3 & B, site 4).

There were no significant differences between the ROI T2 relaxation times of the osteochondrosis predisposed and control group. The information from all the ROIs was then pooled for further statistical analyses (Table S-II). There were significant differences in T1 ρ relaxation times between the ROIs (Table S-IV and Fig. 3B). ROIs L_{deep} and M_{deep} had the highest T2 relaxation times. The greatest variation in T2 relaxation times was also observed within the ROIs in the lateral ridge of the trochlea: L_{proximal} values were significantly higher than those of the L_{distal} where the lowest mean values were measured, but this pattern was not observed in the medial ridge of the trochlea.

Second-harmonic microscopic validation of collagen structure

The second-harmonic signal variations corroborated those observed on T2 maps. The bilaminar pattern of the articular cartilage on T2 maps corresponded to the increased signal from the superficial, transitional and radial layers (Fig. 4A, site 1 and 4C, zones i-iii) and to

the loss of signal within the deeper transitional layer (Fig. 4A, site 1 and Fig. 4C, zone iv). The growth cartilage had a homogenous second-harmonic signal (Fig. 4B, site 2 and Fig 4D). Epiphyseal cartilage at the ROI M_{deep} had small focal areas with an increase of T2 values corresponding to the decreased second-harmonic signal and hypertrophic chondrocyte lacunae (Fig. 4A, site 3 and Fig. 4E). The higher T2 values at the ROI L_{deep} corresponded to a zone with low second-harmonic signal and large chondrocyte lacunae shape with an organization similar to that of the hypertrophic zone (Fig 4B, site 4 and Fig. 4F). This hypertrophic-like region extended more cranially at the ROI L_{deep} , compared to elsewhere along the secondary ossification front (Fig. 5A, sites 2-4 and Fig. 5C-E). The metaphyseal ossification front cartilage at the ROI L_{proximal} presented distinct very large and aligned hypertrophic chondrocyte lacunae (Fig. 5A, site1 and Fig. 5B) compared to those of the secondary ossification centre that are randomly distributed (Fig 5A, site5 and Fig. 5F).

Immunohistochemistry for type II collagen

Selected site-matched type II collagen immunostained sections from the ROIs L_{proximal} and L_{middle} revealed type II collagen staining centrally where the T2 relaxation times were low (Fig. 6 A, B, D, E). Second-harmonic microscopy scans within these areas revealed an enhanced signal and increased collagen anisotropy (Fig. 6 C) compared to the extended hypertrophic cartilage near the ossification front (Fig. 6 F).

Discussion

The findings of this study provide a number of novel insights into equine epiphyseal development pertinent to the understanding of osteochondrosis in all species. qMRI revealed that the epiphyseal growth cartilage matrix composition and structure varies substantially between the proximal, middle and distal aspects of the trochlea of the femur. The lateral ridge had the greatest variation. Classical lesions of osteochondritis dissecans occur most frequently in the lateral ridge of the equine femoral trochlea compared to the medial ridge (Dik, Enzerink et al. 1999, van Weeren, Sloet van et al. 1999a, Bourzac, Alexander et al. 2009, UpRichard, Elce et al. 2013). This investigation is, to the best of our knowledge, the first to examine, in parallel, growth cartilage proteoglycan content, collagen content and collagen structure employing qMRI with validation by histology, immunohistochemistry and second-harmonic

microscopy in any species. Second-harmonic microscopy provided evidence of a strong link between the T2 mapping variations and collagen structural variation within and between articular, epiphyseal and physeal cartilage.

Despite efforts to create an osteochondrosis phenotype, no classical early histological lesions of osteochondrosis were detected in either group. This may have been due to the small number of animals studied because of ethical constraints or to the very early timepoint of the investigation. As this was a terminal and exploratory study, we tried to reduce the number of animals sacrificed for ethical reasons. However, it is recognized that a larger number of animals may have yielded different results. On the other hand, the fact that several joints from each animal could be analyzed increased the power of our study.

Our study design to increase the number of osteochondrosis predisposed foals was an extension of those reported previously (Barneveld and van Weeren 1999, Olstad, Ytrehus et al. 2008b) where sires and dams with OCD were bred. The reported prevalence of microscopic osteochondrosis in the femoropatellar joint of young foals with affected parents is 28% and 0% in foals from non-affected parents (van Weeren, Sloet van et al. 1999a). As osteochondrosis lesions have been observed in a 2 day old foal (Rejnö 1978), we believed at the outset that we might identify early lesions in these foals. Although we did not detect early lesions with our methods, it remains possible that the specimens may contain early, but as yet un-characterized, molecular or cellular upstream events that lead to classical early osteochondrosis histological lesions. Despite these limitations, our findings illustrate the development of the osteochondrosis predilection sites and provide a foundation for future studies to investigate the link between the growth cartilage matrix changes, its biomechanical properties and the early vascular ischemic events of osteochondrosis.

A large zone of low proteoglycan content, but with homogeneous type II collagen immunostaining and increased anisotropy, was identified in the epiphyseal cartilage at the proximal trochlea sites, where clinical osteochondritis dissecans lesions arise (Bourzac, Alexander et al. 2009), and was observed with multiple modalities. However, it was observed in both osteochondrosis predisposed and control specimens, suggesting that these matrix variations may be part of physiologic maturation of the trochlea (Lecocq, Girard et al. 2008). These findings confirm and extend those of a previous histological study of equine epiphyseal maturation in foetuses and foals (Lecocq, Girard et al. 2008). Focal areas of low proteoglycan

content were observed within osteochondrosis predilection sites in different joints, but were more prevalent in the femoropatellar joint (Lecocq, Girard et al. 2008, Cluzel, Blond et al. 2013). The growth cartilage matrix changes were associated with age: their prevalence decreased with the time of gestation, but they remained present at birth in the distal femur reflecting the late maturation of this joint (Lecocq, Girard et al. 2008). However, unlike the expansive regions of growth cartilage pallor we observed in the study herein, the focal areas observed by Lecocq et al. (Lecocq, Girard et al. 2008) were localized close to chondrifying canals, similar to other investigations of the normal appearance of epiphyseal cartilage in osteochondrosis affected species (Ekman and Heinegard 1992, Olstad, Ytrehus et al. 2007).

It remains to be elucidated whether the large zones with low proteoglycan are a result of increased proteoglycan turnover or reduced synthesis. Growth plate matrix remodelling and the interrelationships between its extracellular matrix synthesis, proteinases and their inhibitors, has been studied in many species (Orth, Peters et al. 2000, Haeusler, Walter et al. 2005, Malesud 2006, Tchetina, Mwale et al. 2014). However, no age-related studies of proteoglycan distribution in equine growth cartilage have been reported. Gene expression studies at different zones of the growth plate of bovine fetuses (Tchetina, Mwale et al. 2014) recently revealed that aggrecan synthesis occurred in the resting zone and was initially decreased, and later absent, in the proliferative zone. The synthesis was upregulated again at the onset of chondrocyte hypertrophy. *In situ* hybridization studies of aggrecan expression in the human growth plate during different stages of human skeletal development also showed that the resting zone had the lowest expression and a higher expression occurred in the lower proliferative and upper hypertrophic zone (Mundlos, Meyer et al. 1991). The focal zones of growth cartilage pallor (less proteoglycan) we observed herein contained resting and proliferative chondrocytes. Although they are potentially related to normal physiological developmental changes in epiphyseal growth cartilage, their patchy distribution suggests otherwise.

An alternative explanation for the focal zones of matrix pallor observed with both qMRI and Safranin O staining is a focal extracellular matrix resorption, similar to that observed in rodent epiphyseal growth cartilage (Lee, Lamplugh et al. 2001). Two forms of resorption were observed: « free », not associated with ossification events, and « ossification-coupled resorption » occurring at the secondary ossification centre front and the primary

growth plate. The latter proteolytic resorption is due to aggrecanase and MMP activity (Lee, Lamplugh et al. 2001). The subregional proteoglycan depletion observed in the study herein resembles “free” resorption and may allow expansion of the secondary ossification centre, but this remains to be confirmed.

We also identified an expansive hypertrophic-like zone on T2 maps and second harmonic microscopy extending abaxially in the lateral ridge of the trochlea at the cranio-proximal aspect of the secondary ossification centre that has not been described before. It is known that the hypertrophic zone of the physal cartilage is the least rigid region of the growth plate (Villemure and Stokes 2009) and that the physal osteochondral junction is less resistant to shear forces and more likely to fracture than adult tissue (Flachsmann, Broom et al. 2000, Klein, Chaudhry et al. 2007). This biomechanical weakness is due to a physiological zonal loss of cartilage matrix because of a concurrent dramatic increase in chondrocyte volume (chondrocyte hypertrophy) with accompanying proteolysis and resorption of collagen in the process of endochondral ossification (Lavery and Girard 2013). It is of interest that, in a parallel study employing susceptibility-weighted imaging of the same specimens (Martel et al. submitted to JOR) to map 3D vascularity of the growth cartilage, this hypertrophic-like zone contains many perichondral vessels that are known to be vulnerable to vascular failure as they get incorporated into the ossification front with ongoing ossification (Ytrehus, Ekman et al. 2004b).

This study underpins the clinical potential of T1 ρ and T2 mapping for identifying and monitoring abnormal cartilage growth and ossification in children. Subregional matrix variations similar to the changes we describe here have also been identified on T2 maps of the femoral condyle of children, a site of predilection for osteochondritis dissecans, but no further histological validation of the MRI findings could be performed for ethical reasons (McCoy, Toth et al. 2013). The study herein confirms and extends these findings by adding *ex vivo* comparisons of imaging with histology, immunohistochemistry and second-harmonic microscopy in an animal model.

Taken together, the results of our investigations suggest that the growth cartilage at the cranio-proximal aspect of the secondary ossification centre in the lateral ridge of the equine femoral trochlea has a distinct matrix composition at birth. These subregional matrix variations may be associated with growth spurts and decrease the epiphyseal cartilage

mechanical properties subregionally as recently illustrated in the ulnar physis of growing pigs (Wosu, Sergerie et al. 2012). We speculate that a temporary focal weakening of the epiphyseal cartilage could predispose the vessels, housed within, to injury precipitating the early ischemic events of osteochondrosis. As both the control and osteochondrosis predisposed foals had these cartilage matrix characteristics at birth, vascular failure and osteochondrosis onset could be triggered by an additional cofactor such as biomechanical stresses from internal (joint geometry) or external trauma later in the foal's life (van Weeren and Jeffcott 2013). An example of internal trauma due to abnormal anatomy leading to joint pathology is provided by femoracetabular impingement in adolescents which is now believed to be due to variations in hip anatomy resulting in mechanical aberrations of joint function (Sankar, Matheney et al. 2013). Similar events could be at play in joints with osteochondrosis. Additional investigations are now needed to understand the changes in the cartilage matrix composition during maturation and, importantly, the associated variations in its biomechanical properties over time.

In conclusion, we have identified focal epiphyseal growth cartilage matrix changes, including regions with low proteoglycan and also, previously undescribed, large hypertrophic cartilage zones with less collagen, in the equine femoral trochlea at osteochondritis dissecans predilection sites. These focal changes could potentially weaken the growth cartilage and predispose the vessels, housed within, to injury precipitating the early ischemic events of osteochondrosis. Additional biomechanical studies are now planned to investigate this further. qMRI and complementary MRI SWI for mapping of the vascular tree of growth cartilage (Martel et al. submitted to JOR) are both clinically feasible and non-invasive and may be employed for future longitudinal studies to investigate the link between the matrix changes of growing cartilage we have identified and the later development of osteochondrosis and expand the understanding of underlying etiology of osteochondrosis in humans.

Acknowledgement

We would like to thank the following people for their contributions: Danielle Blain for her technical assistance with MRI SWI, Dr Claude Forget DVM for procuring osteochondrosis affected animals, Dr Rejean Lefebvre DVM PhD DACVR for embryo transfer, Dr Christiane Girard DVM DACVP for valuable insight on the histological assessment of the tissues and Dr Guy Beauchamps for statistical analyses.

This project was funded in part by Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ), Quebec. Sheila Laverty's laboratory is currently funded by the National Science and Engineering Council of Canada (NSERC), the Réseau ThéCell, Fonds de Recherche en Santé Québec (FRSQ) and also by a generous gift from Mr and Mrs J Magnier, Coolmore Stud, Fethard, Ireland. The authors acknowledge supports from Canada Foundation for Innovation for the nonlinear optical microscope available at INRS-ÉMT, financial supports from NSERC and FRQNT. Furthermore, CAC acknowledges supports from NSERC and FRQNT for M.Sc. student awards.

References

1. Laverty S, Girard C. 2013. Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis. *Vet J* 197:3-12.
2. McCoy AM, Toth F, Dolvik NI, et al. 2013. Articular osteochondrosis: A comparison of naturally-occurring human and animal disease. *Osteoarthritis Cartilage* 21:1638-1647.
3. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, et al. 2011. Early lesions of articular osteochondrosis in the distal femur of foals. *Vet Pathol* 48:1165-1175.
4. Carlson CS, Hilley HD, Meuten DJ. 1989. Degeneration of cartilage canal vessels associated with lesions of osteochondrosis in swine. *Vet Pathol* 26:47-54.
5. Ytrehus B, Ekman S, Carlson CS, et al. 2004. Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. *Bone* 35:1294-1306.
6. Weiss S, Loeffler K. 1996. histological study of cartilage channels in the epiphyseal cartilage of young dogs and their relationship to that of osteochondrosis dissecans in the most frequently affected locations. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 103:164-169.
7. Lecocq M, Girard CA, Fogarty U, et al. 2008. Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: Early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine Vet J* 40:442-454.
8. Cluzel C, Blond L, Fontaine P, et al. 2013. Foetal and postnatal equine articular cartilage development: Magnetic resonance imaging and polarised light microscopy. *Eur Cell Mater* 26:33-47; discussion 47-38.
9. Ytrehus B, Carlson CS, Ekman S. 2007. Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Vet Pathol* 44:429-448.
10. van Weeren PR, Jeffcott LB. 2013. Problems and pointers in osteochondrosis: Twenty years on. *Vet J* 197:96-102.
11. Bertone AL, Bramlage LR, McIlwraith CW, Malesud CJ. 2005. Comparison of proteoglycan and collagen in articular cartilage of horses with naturally developing osteochondrosis and healing osteochondral fragments of experimentally induced fractures. *Am J Vet Res* 66:1881-1890.
12. Rejnö S, Strömberg, B. 1978. Osteochondrosis in the horse ii. Pathology. *Acta Radiologica Suppl* 358:153-178.
13. Khanna PC, Thapa MM. 2009. The growing skeleton: Mr imaging appearances of developing cartilage. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 17:411-421, v.

14. Dwek JR, Shapiro F, Laor T, et al. 1997. Normal gadolinium-enhanced mr images of the developing appendicular skeleton: Part 2. Epiphyseal and metaphyseal marrow. *AJR Am J Roentgenol* 169:191-196.
15. Oeppen RS, Jaramillo D. 2003. Sports injuries in the young athlete. *Top Magn Reson Imaging* 14:199-208.
16. Connolly SA, Jaramillo D, Hong JK, Shapiro F. 2004. Skeletal development in fetal pig specimens: Mr imaging of femur with histologic comparison. *Radiology* 233:505-514.
17. Menezes NM, Olear EA, Li X, et al. 2006. Gadolinium-enhanced mr images of the growing piglet skeleton: Ionic versus nonionic contrast agent. *Radiology* 239:406-414.
18. Menezes NM, Connolly SA, Shapiro F, et al. 2007. Early ischemia in growing piglet skeleton: Mr diffusion and perfusion imaging. *Radiology* 242:129-136.
19. Jaramillo D, Connolly SA, Mulkern RV, Shapiro F. 1998. Developing epiphysis: Mr imaging characteristics and histologic correlation in the newborn lamb. *Radiology* 207:637-645.
20. Rivas R, Shapiro F. 2002. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: A study in the new zealand white rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 84-A:85-100.
21. Fontaine P, Blond L, Alexander K, et al. 2013. Computed tomography and magnetic resonance imaging in the study of joint development in the equine pelvic limb. *Vet J* 197:103-111.
22. Li X, Majumdar S. 2013. Quantitative mri of articular cartilage and its clinical applications. *J Magn Reson Imaging* 38:991-1008.
23. Toth F, Nissi MJ, Wang L, et al. 2015. Surgical induction, histological evaluation, and mri identification of cartilage necrosis in the distal femur in goats to model early lesions of osteochondrosis. *Osteoarthritis Cartilage* 23:300-307.
24. Nissi MJ, Rieppo J, Toyras J, et al. 2006. T(2) relaxation time mapping reveals age- and species-related diversity of collagen network architecture in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 14:1265-1271.
25. Dardzinski BJ, Laor T, Schmithorst VJ, et al. 2002. Mapping t2 relaxation time in the pediatric knee: Feasibility with a clinical 1.5-t mr imaging system. *Radiology* 225:233-239.
26. Bourzac C, Alexander K, Rossier Y, Laverty S. 2009. Comparison of radiography and ultrasonography for the diagnosis of osteochondritis dissecans in the equine femoropatellar joint. *Equine Vet J* 41:685-692.
27. Brown CP, Houle MA, Popov K, et al. 2013. Imaging and modeling collagen architecture from the nano to micro scale. *Biomed Opt Express* 5:233-243.
28. Hontoir F, Clegg P, Nisolle JF, et al. 2015. Magnetic resonance compositional imaging of articular cartilage: What can we expect in veterinary medicine? *Vet J* 205:11-20.
29. Dik KJ, Enzerink E, van Weeren PR. 1999. Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of dutch warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine Vet J Suppl*:9-15.
30. van Weeren PR, Sloet van O-O, Barneveld A. 1999. The influence of birth weight, rate of weight gain and final achieved height and sex on the development of osteochondrotic lesions in a population of genetically predisposed warmblood foals. *Equine Vet J Suppl*:26-30.
31. UpRichard K, Elce YA, Piat P, et al. 2013. Outcome after arthroscopic treatment of lateral femoral trochlear ridge osteochondrosis in sport horses. A retrospective study of 37 horses. *Vet Comp Orthop Traumatol* 26:105-109.
32. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, et al. 2008. Epiphyseal cartilage canal blood supply to the

- tarsus of foals and relationship to osteochondrosis. *Equine Vet J* 40:30-39.
33. Barneveld A, van Weeren PR. 1999. Conclusions regarding the influence of exercise on the development of the equine musculoskeletal system with special reference to osteochondrosis. *Equine Vet J Suppl*:112-119.
 34. Ekman S, Heinegard D. 1992. Immunohistochemical localization of matrix proteins in the femoral joint cartilage of growing commercial pigs. *Vet Pathol* 29:514-520.
 35. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, et al. 2007. Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. *J Orthop Res* 25:1094-1105.
 36. Tchétina EV, Mwale F, Poole AR. 2014. Changes in gene expression associated with matrix turnover, chondrocyte proliferation and hypertrophy in the bovine growth plate. *Acta Naturae* 6:89-97.
 37. Orth MW, Peters TL, Chlebek-Brown KA. 2000. Cartilage turnover in embryonic chick tibial explant cultures. *Poult Sci* 79:990-993.
 38. Malesud CJ. 2006. Matrix metalloproteinases: Role in skeletal development and growth plate disorders. *Front Biosci* 11:1702-1715.
 39. Haeusler G, Walter I, Helmreich M, Egerbacher M. 2005. Localization of matrix metalloproteinases, (mmps) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (vegf) in growth plates of children and adolescents indicates a role for mmps in human postnatal growth and skeletal maturation. *Calcif Tissue Int* 76:326-335.
 40. Mundlos S, Meyer R, Yamada Y, Zabel B. 1991. Distribution of cartilage proteoglycan (aggrecan) core protein and link protein gene expression during human skeletal development. *Matrix* 11:339-346.
 41. Lee ER, Lamplugh L, Davoli MA, et al. 2001. Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats ages 0-21 days: I. Two groups of proteinases cleave the core protein of aggrecan. *Dev Dyn* 222:52-70.
 42. Villemure I, Stokes IA. 2009. Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding. *J Biomech* 42:1793-1803.
 43. Flachsman R, Broom ND, Hardy AE, Moltschanivskyj G. 2000. Why is the adolescent joint particularly susceptible to osteochondral shear fracture? *Clin Orthop Relat Res*: 212-221.
 44. Klein TJ, Chaudhry M, Bae WC, Sah RL. 2007. Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage. *J Biomech* 40:182-190.
 45. Wosu R, Sergerie K, Levesque M, Villemure I. 2012. Mechanical properties of the porcine growth plate vary with developmental stage. *Biomech Model Mechanobiol* 11:303-312.
 46. Sankar WN, Matheney TH, Zaltz I. 2013. Femoroacetabular impingement: Current concepts and controversies. *Orthop Clin North Am* 44:575-589.
 47. Koff MF, Shah P, Pownder S, et al. 2013. Correlation of meniscal t2* with multiphoton microscopy, and change of articular cartilage t2 in an ovine model of meniscal repair. *Osteoarthritis Cartilage* 21:1083-1091.

Figure legends

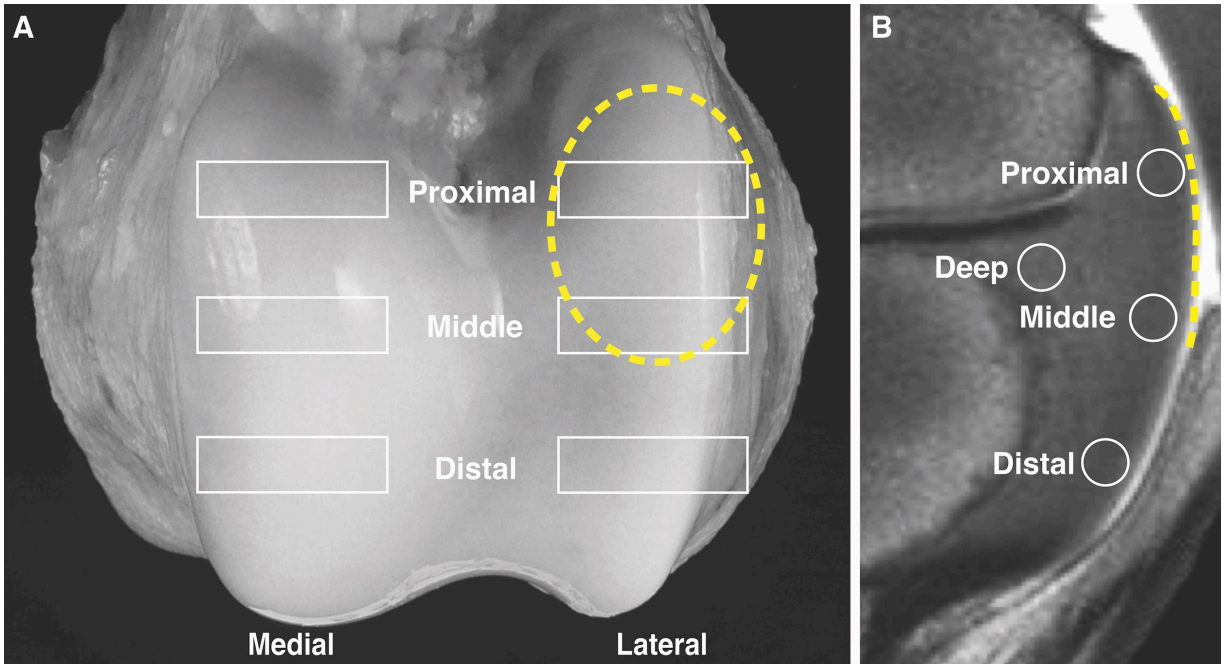


Figure 33. Figure 1. Study design illustrating subregions investigated.

A. Distal femoral trochlea illustrating rectangular regions of interest (ROIs: proximal, middle, and distal) selected for MRI and histologic investigations in the lateral and medial ridges. Yellow broken oval illustrates the region where osteochondritis dissecans lesions most frequently occur.

B. Sagittal MRI map of a trochlea ridge with ROIs that were assessed by 3T quantitative MRI. It includes the proximal, middle and distal ROIs described in A. An additional ROI (deep) was assessed because of the thickness of the epiphyseal growth cartilage in this area. The yellow broken line illustrates the region where osteochondritis dissecans lesions most frequently occur.

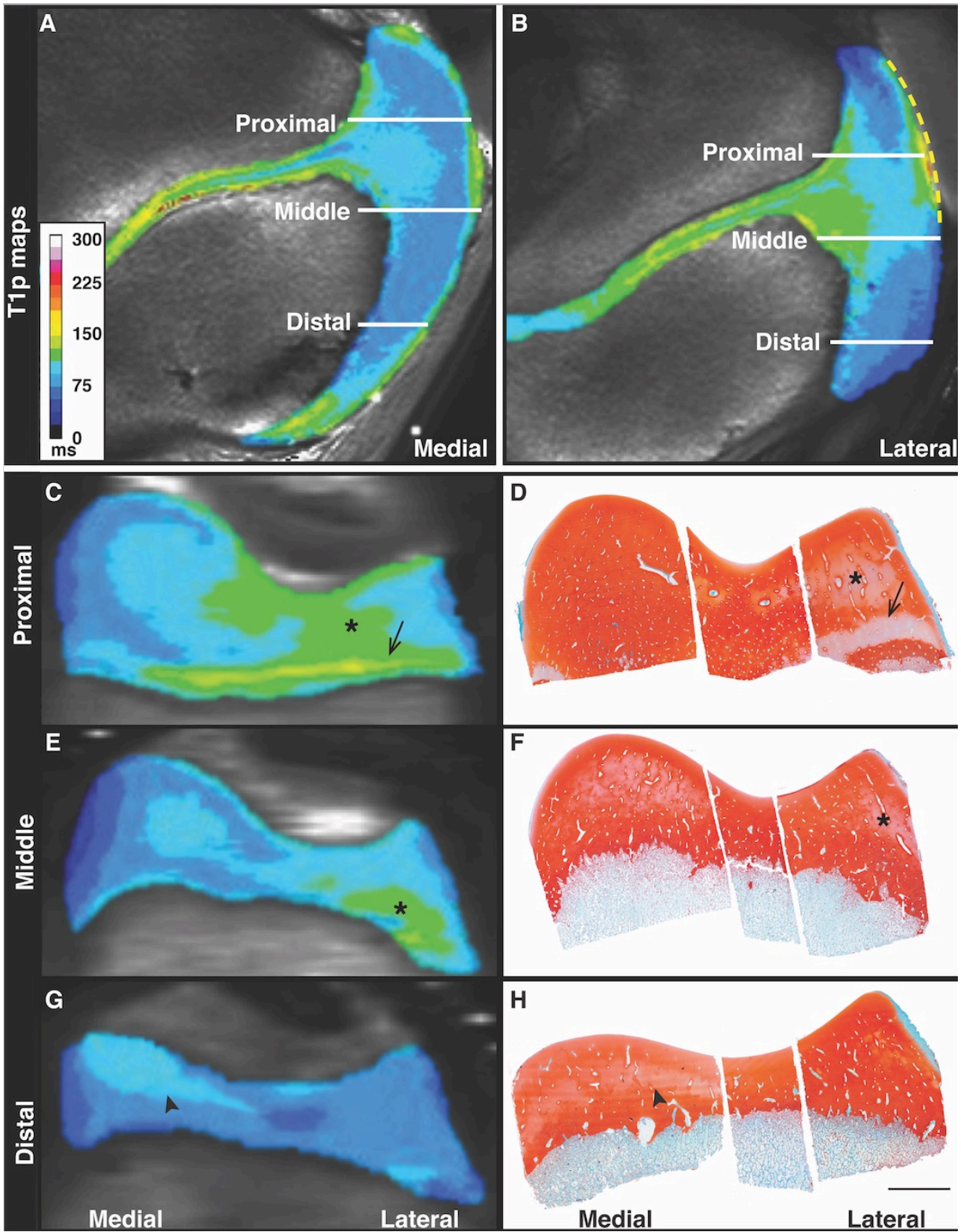


Figure 34. Figure 2. T1ρ maps of proteoglycan content of the epiphyseal growth cartilage in both ridges of the trochlea.

A & B. T1ρ sagittal map of the medial and lateral ridges of the femoral trochlea. Color scale corresponds to T1ρ relaxation times (Koff, Shah et al.). Longer T1ρ relaxation times reflect lower proteoglycan content. The growth cartilage of the proximal and middle ROIs, in both trochlear ridges, has distinct areas with high T1ρ relaxation times. The highest T1ρ relaxation times are located at the osteochondritis dissecans predilection region (yellow dotted line) in the lateral ridge of the trochlea.

C & D. Transverse T1ρ maps of the proximal ROIs with corresponding site-matched safranin O fast green stained sections. At the ROI L_{proximal} , lower proteoglycan content (increased T1ρ relaxation times and low safranin O staining uptake) is visible within a central area (asterisk) and also in a thin layer close to the metaphyseal ossification front (arrow).

E & F. Transverse T1ρ maps of the middle ROIs with corresponding site-matched safranin O fast green stained sections. Increased T1ρ relaxation times are still observed within the ROI L_{middle} (asterisk).

G & H. Transverse T1ρ maps of the distal ROIs with corresponding site-matched safranin o fast green stained sections. There is overall lower T1ρ relaxation times and homogeneous stain uptake in the matrix, except for small focal sites in the M_{distal} (arrow head).

Scale bar = 1cm.

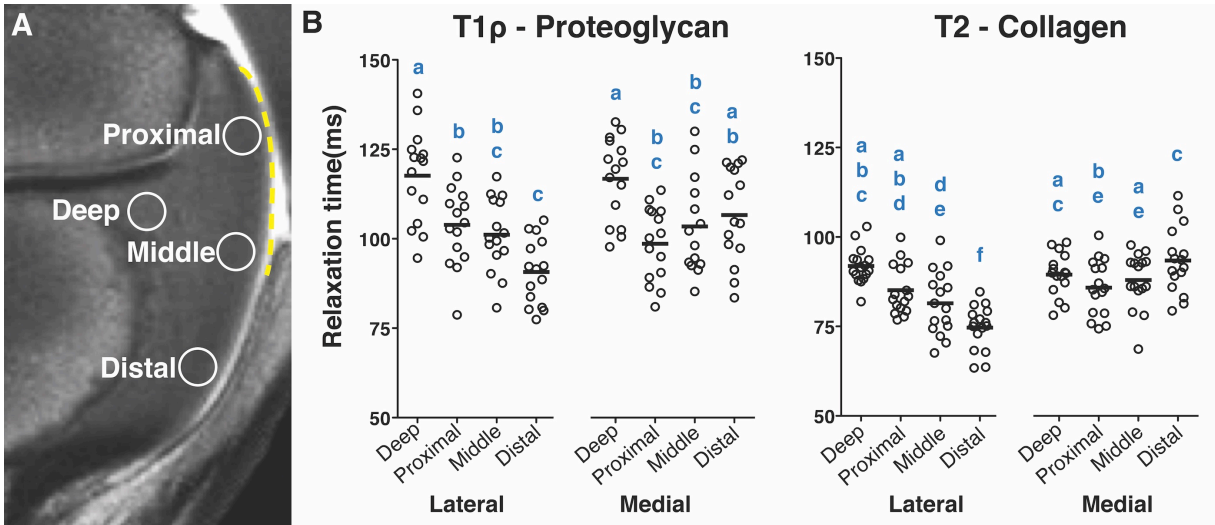


Figure 35. Figure 3. T1 ρ and T2 relaxation times (ms) at ROIs in the femoral trochlea.

A. Sagittal map indicating ROIs used for quantitative MRI assessment. The yellow broken line illustrates the region where osteochondritis dissecans lesions most frequently occur.

B. Dot plots of T1 ρ and T2 relaxation times (ms) at each ROI. An inverse relationship exists between T1 ρ relaxation times and proteoglycan content. An increase of the T2 relaxation times is associated with a decrease of collagen content and anisotropy. A linear mixed model was used, with the individual as a random effect, the ROI as intra-subject factor and the group as factor between specimens to detect differences in T1 ρ relaxation times or T2 relaxation times between ROIs in both control and osteochondrosis predisposed groups. Means that share superscript letters are not significantly different ($p > 0.05$).

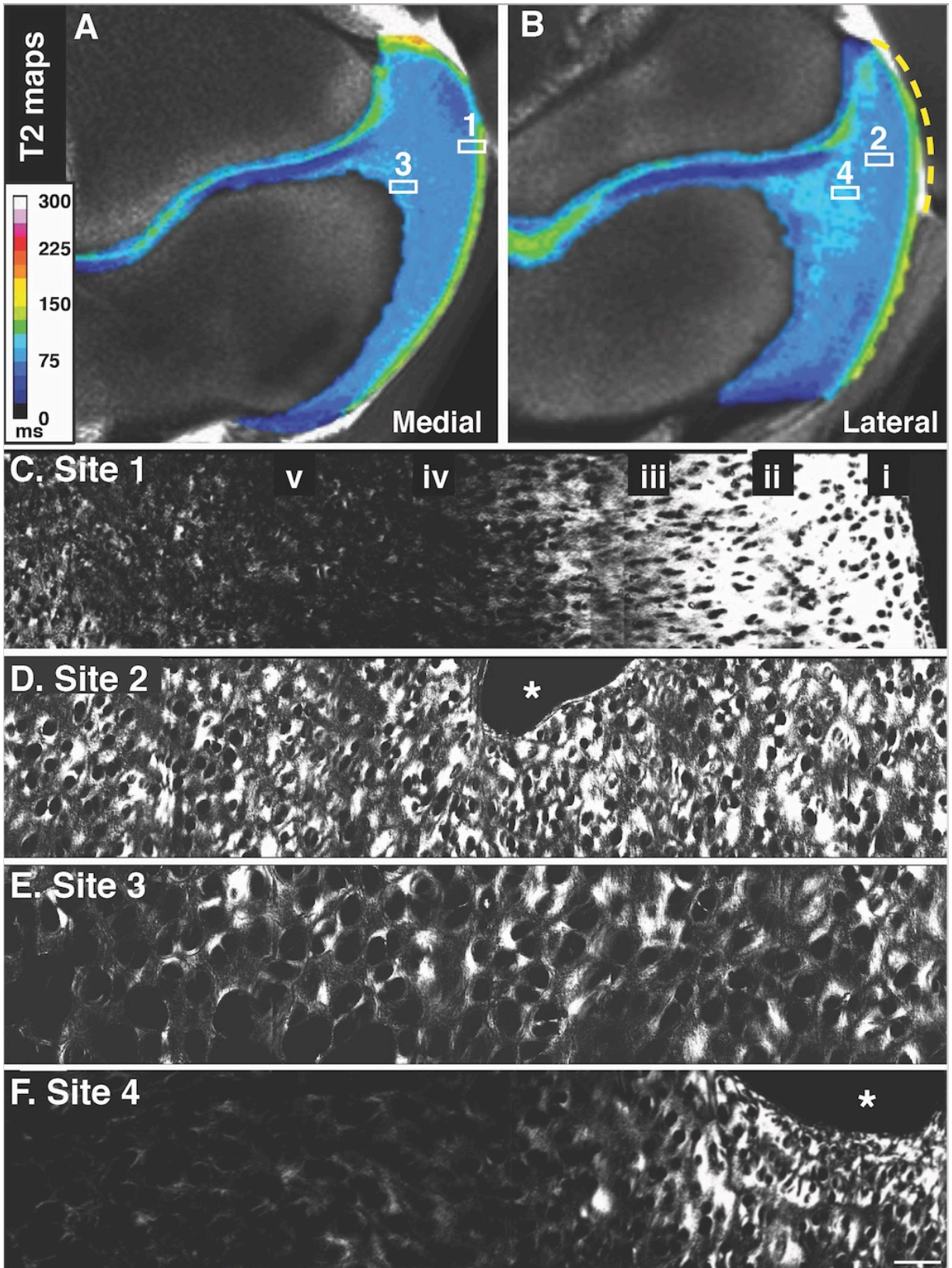


Figure 36. Figure 4. Mapping of collagen structure of epiphyseal growth cartilage of the femoral trochlea.

A & B. Representative T2 sagittal maps of the lateral and medial ridges of the femoral trochlea. Rectangles 1 – 4 in the images represent the sites examined by second-harmonic microscopy. An increase of the T2 relaxation times is associated with a decrease of collagen content and anisotropy.

C. Site 1. Laminar appearance of articular cartilage visible on T2 map and second-harmonic microscopy scan. The collagen is denser at the articular surface and a change in chondrocyte lacunae shape is evident from the surface to the deeper layers (i. superficial; ii. transitional; iii. radial & iv. deeper transitional layers; v. epiphyseal cartilage). Note also the small size of the chondrocyte lacunae.

D. Site 2. Homogeneous T2 values and second-harmonic signal of the epiphyseal cartilage. White asterisk represents a blood vessel in a cartilage canal.

E. Site 3. Epiphyseal cartilage at the ROI M_{deep} with focal increase of T2 values and decrease of second-harmonic signal. The chondrocyte lacunae are very large, when compared to those nearer the articular surface (4.D) and represent hypertrophic cartilage.

F. Site 4. Epiphyseal cartilage at the ROI L_{deep} with expansive increase of T2 values and decrease of second-harmonic signal indicating lower collagen content or anisotropy. A dramatic increase in chondrocyte lacunae size and change in shape occurs from right to left corresponding to chondrocyte hypertrophy. White asterisk represents a blood vessel in a cartilage canal.

Scale bar = 0.1mm.

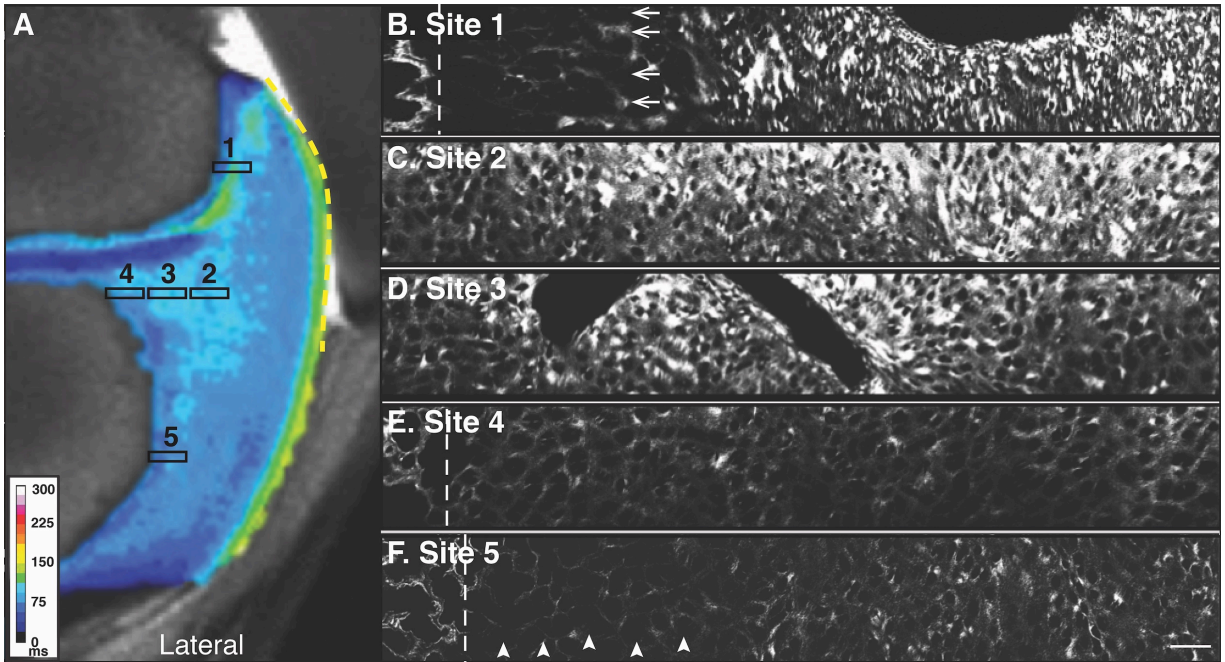


Figure 37. Figure 5. The osteochondral junction zone of the proximal, middle and distal femoral trochlea of the lateral ridge of the trochlea of the femur.

A. Sagittal T2 map of the lateral ridge of the trochlea. Rectangles 1 – 5 in the image represent the sites examined by second-harmonic microscopy.

B. Site 1. Second-harmonic scan of the metaphyseal ossification front at the ROI L_{proximal} . From right to left of the second-harmonic scan, the collagen structure becomes less dense and the chondrocyte lacunae change dramatically in shape and size. The hypertrophic chondrocyte lacunae are very large and aligned at the left (arrows). White dotted line is the osteochondral junction.

C - E. Site 2 - 4. Consecutive second-harmonic scans of the cranio-proximal aspect of the second ossification centre at the ROI L_{deep} . White dotted line is the osteochondral junction. When compared to panel 1, it is evident that the hypertrophy (enlarged chondrocyte lacunae) extends over a much larger area in this region.

F. Site 5. Second-harmonic scan of the secondary ossification centre at the ROI L_{distal} . The hypertrophic region is much narrower in this region and the hypertrophic chondrocytes are randomly distributed (arrow heads). White dotted line is the osteochondral junction.

Scale bar = 0.1mm.

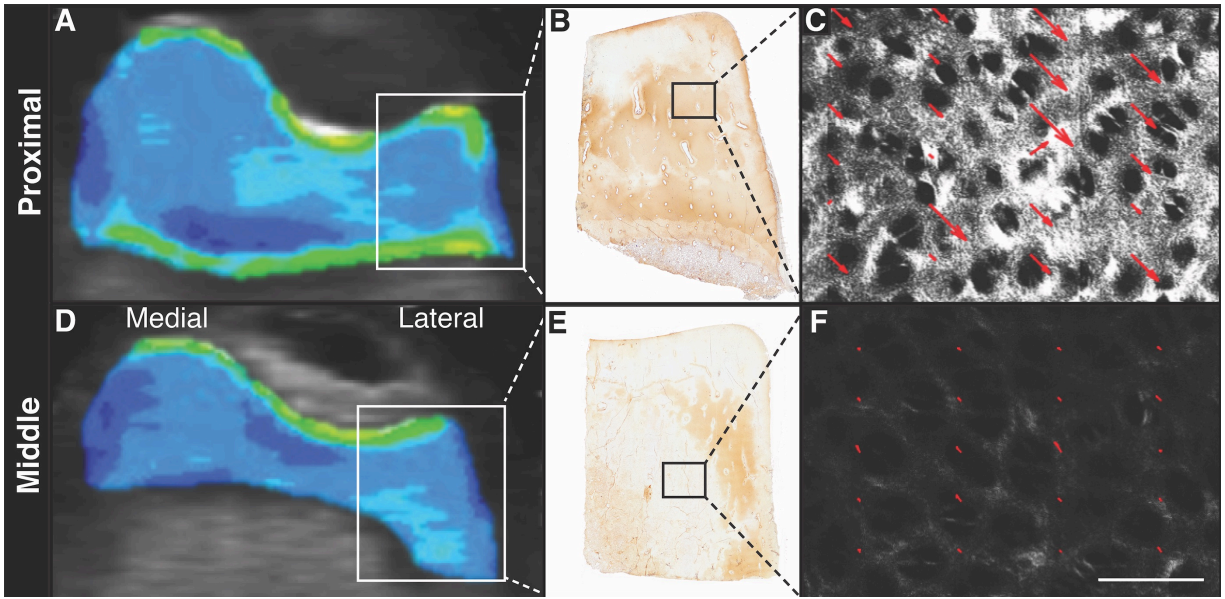


Figure 38. Figure 6: Epiphyseal growth cartilage matrix remodelling in the proximal and middle regions of the lateral ridge of the trochlea.

A & B. T2 transverse map and Type II collagen immunohistochemistry of the ROI L_{proximal} demonstrating a central area with enhanced collagen immunostaining and low T2 relaxation times.

C. Second-harmonic microscopy of rectangle in B. Red arrows represent predominant collagen orientation and their length is proportional to collagen anisotropy. There is enhanced second-harmonic signal and collagen anisotropy.

D & E. T2 transverse map and Type II collagen immunohistochemistry of the ROI L_{middle} demonstrating reduced collagen immunostaining and high T2 relaxation times along the cranio-proximal aspect of the secondary centre of ossification where osteochondritis dissecans frequently arises.

F. Second-harmonic microscopy of rectangle in E. Red arrows represent predominant collagen orientation and their length is proportional to collagen anisotropy. There is a loss of collagen anisotropy and larger chondrocyte lacunae representing hypertrophic-like cartilage.

Scale bar = 0.1 mm.

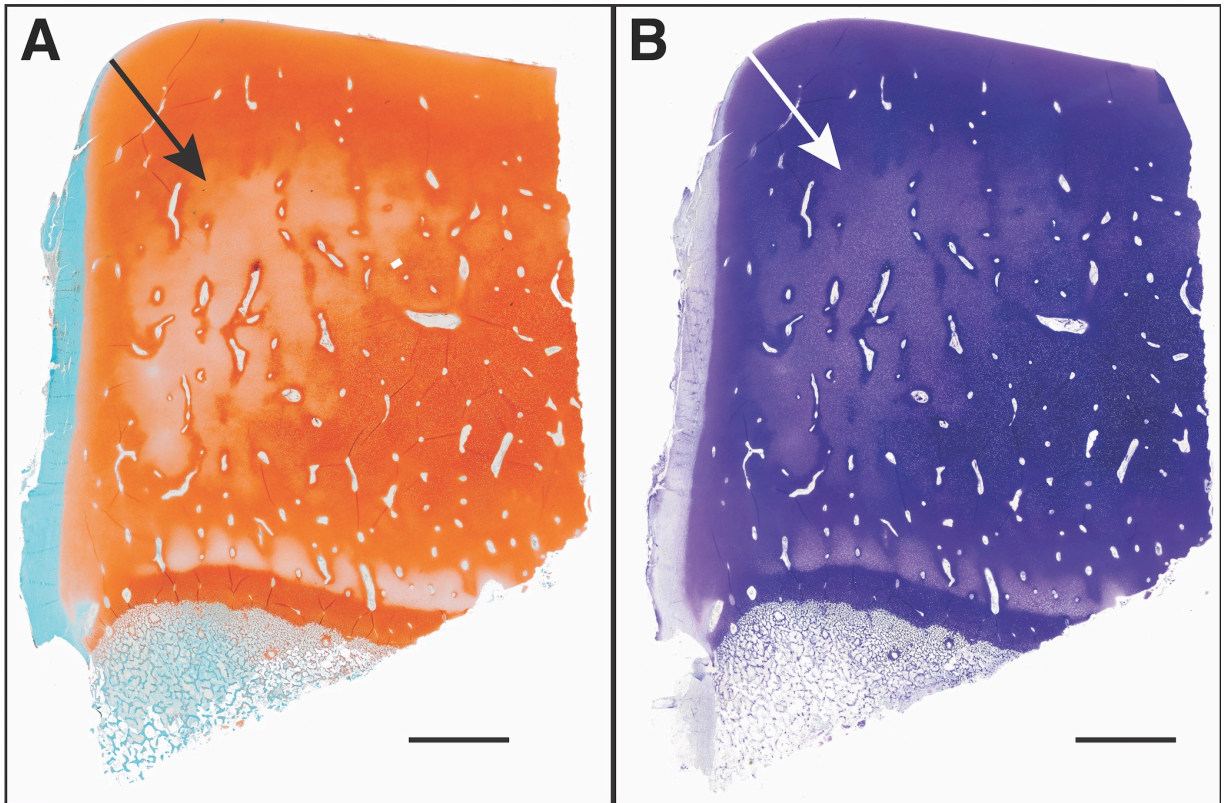


Figure 39. Supplementary figure 1. Validation of safranin O fast green stains.

Selected sections that revealed zones of cartilage matrix pallor were also stained with Toluidine blue to validate findings of reduced metachromasia. Representative site-matched histologic sections stained with safranin O fast green or toluidine blue. Both staining techniques revealed reduced proteoglycan in these focal sites within the epiphyseal growth cartilage.

Scale bar = 3mm.

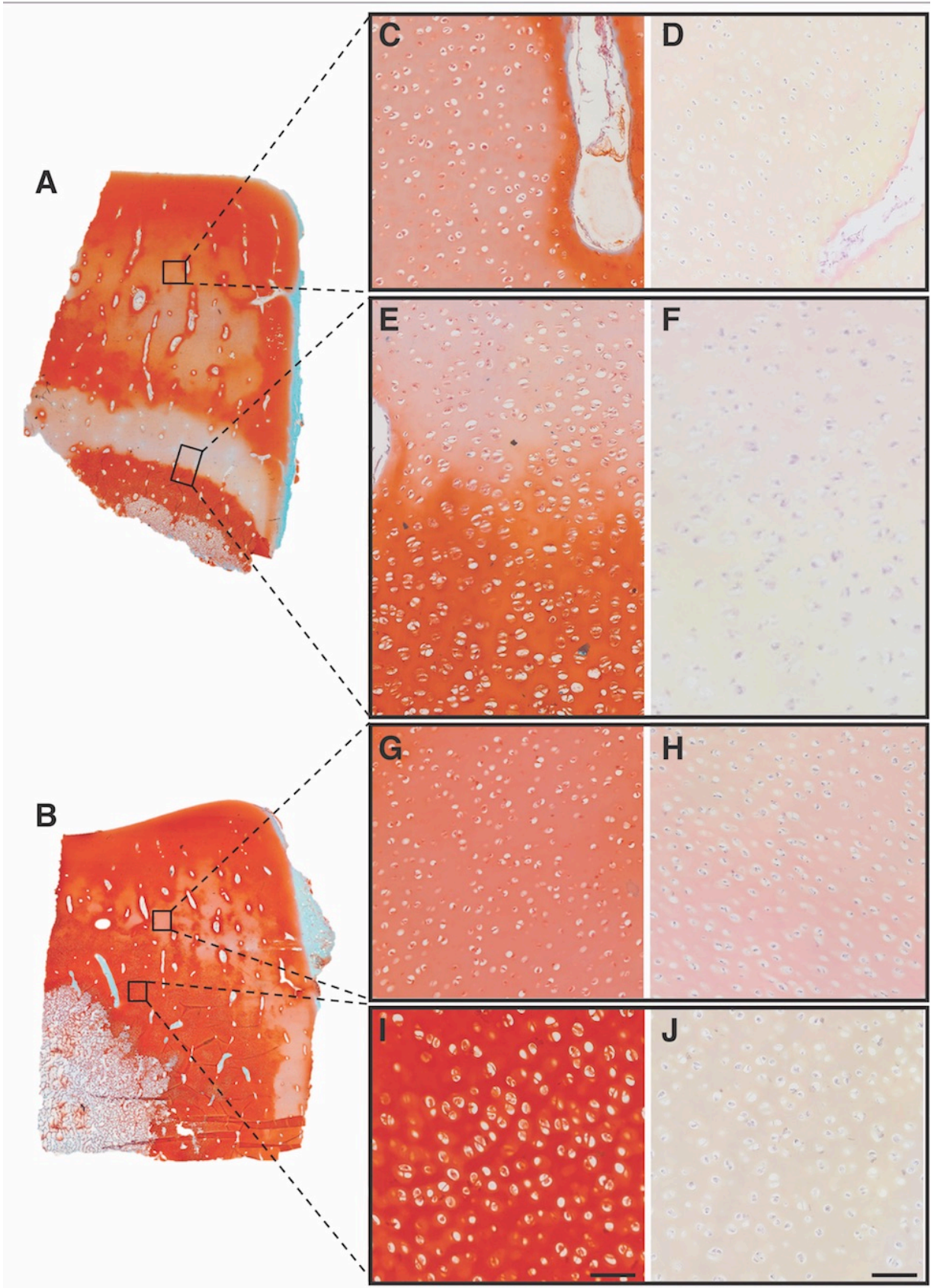


Figure 40. Supplementary figure 2. Magnification of chondrocytes within matrix pallor areas.

A & B. Safranin O fast green slides of the ROIs L_{proximal} and L_{middle} .

C & D. Safranin O fast green and H&E magnification of the central area with reduced metachromasia. Chondrocytes within this area are resting and proliferative.

E & F. Safranin O fast green and H&E magnification of the transition between the layer with low proteoglycan proteoglycan where early proliferative chondrocytes are seen and the hypertrophic cartilage below with good staining uptake.

G & H. Safranin O fast green and H&E magnification of the area with reduced metachromasia. Chondrocytes within this area are resting and proliferative.

I & J. Safranin O fast green and H&E magnification of the hypertrophic-like cartilage along the cranio-proximal aspect of the secondary centre of ossification.

Scale bar = 100 μm .

Tableau XIV. Table S-I: Age, sex, breed, reason for euthanasia, history, osteochondrosis status of parents and limb sampled for each foal in the study

Foal number	Age	Sex	Breed	Reason for euthanasia	Osteochondrosis status of parents	Hindlimb sampled
Osteochondrosis 1	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 2	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 3	< 24h	M	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ³ +	Both
Osteochondrosis 4	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 5	< 24h	M	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ⁴ +	Both
Control 1	0h	M	Paint	Dystocia	* sire - & dam -	Left ⁵
Control 2	< 24h	F	Standardbred	Died suddenly few hours after birth	* sire - & dam -	Both
Control 3	4 d	M	Warmblood	Traumatic patellar luxation right hindlimb	* sire - & dam -	Left ⁶
Control 4	4 d	F	Hanovarian	Ventricular septal defect	* sire - & dam -	Both

¹ Sire from Osteochondrosis foals 1 – 5 had OCD in hocks, bilateral

² Dam from Osteochondrosis foals 1, 2 & 4 had OCD in stifle, unilateral

³ Dam from Osteochondrosis foal 3 had OCD in stifle, unilateral

⁴ Dam from Osteochondrosis foal 5 had OCD in hocks, bilateral

⁵ Right hindlimb of control 1 was not imaged because of a schedule error with MRI scanner

⁶ Right hindlimb of control 3 was excluded because of traumatic patellar luxation

N/A = non applicable

* based on information from clients

Tableau XV. Table S-II: Mean \pm SD of T1 ρ and T2 relaxation times (ms) at each ROI.

ROI		T1 ρ (ms)	T2 (ms)
L_{proximal}	Osteochondrosis :	106.2 \pm 10.8	84.2 \pm 8.1
	Control :	100.3 \pm 12.4	86.7 \pm 4.6
	Pooled* :	103.9 \pm 11.4	85.1 \pm 6.7
L_{middle}	Osteochondrosis :	102.5 \pm 11.5	81.5 \pm 9.5
	Control :	91.9 \pm 13.3	81.3 \pm 8.4
	Pooled* :	98.3 \pm 13.0	81.4 \pm 8.8
L_{distal}	Osteochondrosis :	92.2 \pm 10.5	74.3 \pm 7.2
	Control :	83.2 \pm 14.7	75.3 \pm 4.4
	Pooled* :	88.6 \pm 12.7	74.7 \pm 6.2
M_{proximal}	Osteochondrosis :	108.6 \pm 15.1	89.7 \pm 6.9
	Control :	102.3 \pm 27.9	79.5 \pm 4.6
	Pooled* :	105.9 \pm 20.8	85.9 \pm 7.8
M_{middle}	Osteochondrosis :	109.9 \pm 21.9	88.8 \pm 7.0
	Control :	102.0 \pm 20.9	86.5 \pm 9.4
	Pooled* :	106.5 \pm 21.0	87.9 \pm 7.7
M_{distal}	Osteochondrosis :	110.7 \pm 16.3	92.8 \pm 9.3
	Control :	111.5 \pm 19.5	94.5 \pm 9.8
	Pooled* :	111.1 \pm 17.0	93.4 \pm 9.2

* A linear mixed model was used to evaluate if there was a difference in T1 ρ or T2 relaxation time between the groups at each ROI. There were no significant differences between the ROI T1 ρ or T2 relaxation times of the osteochondrosis predisposed and control group. The ROI data of all the specimens were subsequently pooled for further comparisons between ROIs.

Tableau XVI. TABLE S-III: Significant differences in T1ρ relaxation times between pairs of ROIs; estimates of the mean difference (MD) between the T1ρ relaxation times (ms) of 2 ROIs; pairwise P value

ROIs	MD	P value
$L_{\text{proximal}} > L_{\text{distal}}^{(1)}$	12.9235	0.002
$L_{\text{deep}} > L_{\text{proximal}}$	13.0400	0.001
$L_{\text{deep}} > M_{\text{proximal}}$	18.8902	<0.0001
$L_{\text{deep}} > L_{\text{middle}}$	15.5300	0.0002
$L_{\text{deep}} > M_{\text{middle}}$	14.3600	0.0006
$L_{\text{deep}} > L_{\text{distal}}$	25.9635	<0.0001
$M_{\text{deep}} > L_{\text{proximal}}$	13.2100	0.001
$M_{\text{deep}} > M_{\text{proximal}}$	19.0602	<0.0001
$M_{\text{deep}} > L_{\text{middle}}$	15.7000	0.0001
$M_{\text{deep}} > M_{\text{middle}}$	14.5300	0.0006
$M_{\text{deep}} > L_{\text{distal}}$	26.1335	<0.0001
$M_{\text{distal}} > L_{\text{distal}}$	25.9635	0.0001

⁽¹⁾ $L_{\text{proximal}} > L_{\text{distal}}$ means that the T1ρ relaxation times of the proximal lateral trochlear ridge are higher than that in the distal lateral trochlear ridge by 12.9235 ms on average (p = 0.002).

Tableau XVII. TABLE S-IV: Significant differences in T2 relaxation times between pairs of ROIs; estimates of the mean difference (MD) between the T2 relaxation times (ms) of 2 ROIs; pairwise P value

ROIs	MD	P value
$L_{\text{proximal}} > L_{\text{distal}}^{(1)}$	10.6184	<0.0001
$M_{\text{proximal}} > L_{\text{distal}}$	9.7736	<0.0001
$L_{\text{deep}} > L_{\text{middle}}$	8.4834	0.0001
$L_{\text{deep}} > L_{\text{distal}}$	15.1148	<0.0001
$M_{\text{deep}} > M_{\text{proximal}}$	6.1559	0.001
$M_{\text{deep}} > L_{\text{middle}}$	10.1429	<0.0001
$M_{\text{deep}} > L_{\text{distal}}$	16.7743	<0.0001
$L_{\text{middle}} > L_{\text{distal}}$	6.6314	0.002
$M_{\text{middle}} > L_{\text{distal}}$	12.8478	<0.0001
$M_{\text{distal}} > L_{\text{proximal}}$	18.8317	0.0002
$M_{\text{distal}} > M_{\text{proximal}}$	9.0581	<0.0001
$M_{\text{distal}} > L_{\text{middle}}$	12.2003	0.0006
$M_{\text{distal}} > L_{\text{middle}}$	18.8317	<0.0001

⁽¹⁾ $L_{\text{proximal}} > L_{\text{distal}}$ means that the T2 relaxation times of the proximal lateral trochlear ridge are higher than those in the distal lateral trochlear ridge by 10.6184 ms on average (p <0.0001).

4.2.1 Informations supplémentaires sur l'article 2

4.2.1.1 Précision sur l'anisotropie, le signal T2 et SHG

Des précisions additionnelles sur le temps de relaxation T2 et sur le signal SHG sont ici fournies afin d'aider à l'interprétation des résultats de l'article 2.

D'abord, en ce qui a trait à l'isotropie, la définition de l'adjectif isotrope (s.d.). Dans *Dictionnaire Larousse en ligne*. Repéré à <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/isotrope/44538>, est :

Se dit d'un milieu dont les propriétés (macroscopiques) en un point ne dépendent pas de la direction. (Dans la plupart des liquides, des gaz et des solides amorphes [verres, résines...], les propriétés physiques sont les mêmes dans toutes les directions. Les corps cristallins sont généralement anisotropes ainsi que certains liquides [cristaux liquides].)

La définition de l'adjectif anisotrope (s.d.). Dans *Dictionnaire Larousse en ligne*. Repéré à <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/anisotrope/3618>, est donc :

Se dit des substances dont les propriétés physiques varient en fonction de la direction.

Dans le cas du cartilage et de ses zones, on fait référence à l'orientation des fibres de collagène, on dit qu'elles sont anisotropes si elles sont parallèles et orientées dans une direction alors qu'elles sont isotropes si elles n'ont pas d'orientation particulière. Ainsi, dans le présent contexte, l'anisotropie est un index de l'organisation parallèle des fibrilles de collagène. Plus le tissu est organisé, plus l'anisotropie sera élevée (Nissi, Rieppo et al. 2006). À l'IRM du cartilage, si le fait de placer un échantillon à différentes orientations selon le champ magnétique résulte en des variations du temps de relaxation au même pixel, il sera dit que l'échantillon, à ce pixel, est anisotrope (Xia 2008).

Tel que mentionné à la section 1.5.1.1, le temps de relaxation T2 du cartilage articulaire est sensible à l'organisation tridimensionnelle des fibrilles de collagène (Nieminen, Rieppo et al. 2001, Mosher and Dardzinski 2004), à la concentration de collagène (Fragonas, Mlynárik

et al. 1998, Mosher and Dardzinski 2004) et au contenu en eau des tissus (Lüssea, Claassen et al. 2000, Shapiro, Borthakur et al. 2001, Mosher and Dardzinski 2004). Des résultats contradictoires sont publiés relatifs à la sensibilité du signal T2 au contenu en protéoglycanes (Nieminen, Töyräs et al. 2000, Wayne, Kraft et al. 2003, Mosher and Dardzinski 2004). La figure 40 met d'ailleurs en relation ces facteurs étudiés à partir du cartilage articulaire canin (Xia 2008).

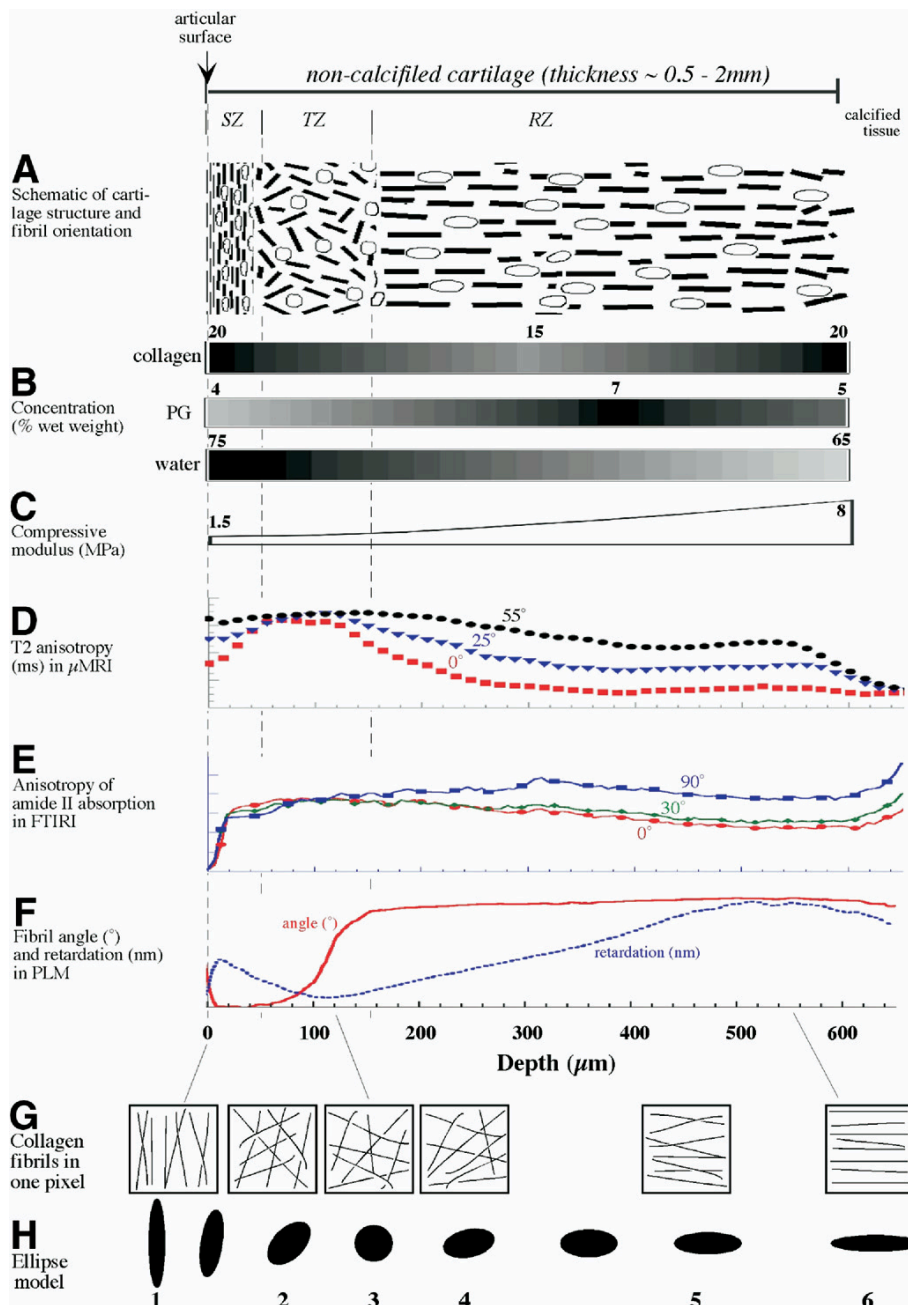


Figure 41. Méta-analyse de plusieurs méthodes multidisciplinaires pour l'évaluation de la structure du

cartilage articulaire du chien. (A) Diagramme schématique de l'orientation des fibrilles de collagène et des chondrocytes dans les différentes zones du cartilage. (B) Concentrations d'eau, de protéoglycanes (PG) et de collagène. (C) Module de compressibilité du cartilage selon la profondeur. (D) Le signal T2 (ms), représentant l'anisotropie, au μ MRI. (E) Le profil d'absorption d'amide II au FITR-MS. (F) L'angle et la retardance à la PLM. (G) Illustration schématique des fibrilles de collagène par pixel à différentes profondeurs. (G) Modèle en ellipse résumant l'anisotropie du cartilage. Selon Xia, 2008.

Pour mieux comprendre l'effet de l'anisotropie sur le signal T2, il faut comprendre l'angle magique. En effet, le temps de relaxation T2 élevé des molécules d'eau est réduit dans une structure comme le cartilage articulaire à cause des interactions dipolaires qui dépendent de l'orientation des fibrilles de collagène. Les interactions dipolaires ont à leur minimum lorsque les fibrilles sont orientées à un angle de référence de 54.7° par rapport au champ magnétique B_0 , soit l'angle magique. Autrement dit, lorsque les fibrilles se retrouvent alignées selon cet angle, le temps de relaxation T2 augmente. Ainsi, en théorie, en orientant un échantillon de cartilage articulaire perpendiculaire à B_0 , le temps de relaxation T2 serait bas dans les zones superficielles et profondes, où les fibrilles de collagène sont respectivement perpendiculaires et parallèles à B_0 , alors que T2 augmenterait dans la zone intermédiaire vu leur orientation courbe (figure 41).

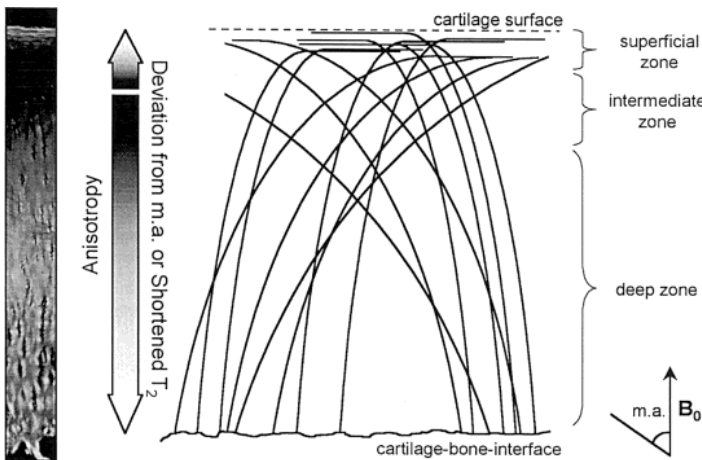


Figure 42. Schéma de l'anisotropie du cartilage articulaire selon l'orientation du collagène et l'angle magique. La double flèche indique les directions de l'augmentation de l'anisotropie et du raccourcissement du temps de relaxation T2 (ou la déviation par rapport à l'angle magique (m.a.). Le m.a. est de 54.7° par rapport à B_0). Selon Niemen et al., 2001.

Cette variation du temps de relaxation T2 selon la profondeur du cartilage articulaire est évidente sur des cartographies de haute résolution, tel que démontré par Nissi et al 2006 avec un IRM 9.4T, où le temps de relaxation T2 est inversement proportionnel à l'anisotropie. Jusqu'à 60% et 44% des variations zonales du signal T2 du cartilage humain et animal (porcin

et bovin), respectivement, dépendaient de l'anisotropie et de l'angle du collagène (Nissi, Rieppo et al. 2006). Ces variations zonales au sein du cartilage articulaire sont moins discernables avec un IRM clinique de plus faible résolution, où le cartilage articulaire apparaît comme une couche hyperintense superficielle au cartilage épiphysaire sur des images pondérées en T2 (Laor and Jaramillo 2009). Cluzel et al. (2013) ont décrit l'apparence trilaminaire du cartilage de l'épiphyse du fémur distal du cheval néonatal à l'IRM 1.5T en pondération T2: le cartilage articulaire était visible comme une zone mince hyperintense sous laquelle se trouve une zone hypointense et finalement se trouve au pourtour du front d'ossification une zone hyperintense (Cluzel, Blond et al. 2013). Selon les résultats de l'analyse histologique en lumière polarisée de Cluzel et al., complémentaires à ceux de Lecocq et al. (2008), le cartilage articulaire du poulain à la naissance est anisotrope vu sa structure en couches, tel que décrit au tableau I. Les cartographies T2 de l'article 2 démontrent également que le cartilage articulaire possède des temps de relaxation plus élevés par rapport au cartilage épiphysaire sous-jacent. Le signal SHG correspondant au cartilage articulaire est élevé en superficie et diminue vers la zone profonde, tel qu'illustré à la figure 35.

Concernant le signal SHG, il dépend des interactions entre les fibrilles de collagène dans un volume focal. Il est dépendant à la fois du contenu en collagène et de l'anisotropie. Ainsi, une zone dense en collagène démontrera un signal SHG intense, de même qu'une zone dont les fibrilles de collagène sont anisotropes. Le signal SHG peut être acquis dans une direction « forward » (F-SHG) ou « backward » (B-SHG) relativement à la propagation du laser et le ratio entre les deux acquisitions (F/B) donne davantage d'information sur la structure du collagène. Dans l'article 2, les résultats présentés sont en F-SHG et l'alignement des fibrilles et leur anisotropie sont illustrés par des flèches dont la direction indique l'orientation des fibrilles et dont la longueur est proportionnelle au degré d'anisotropie. La figure 42 démontre une image de F-SHG correspondant à la zone présentée dans la figure 35c.

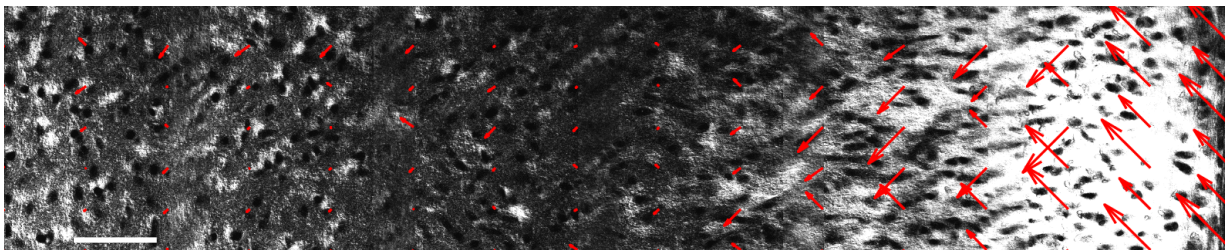


Figure 43. Image de microscopie SHG correspondant à la figure 35C, avec les flèches démontrant l'orientation et l'anisotropie. En effet, plus les flèches sont longues, plus l'anisotropie est importante.

Une étude de SHG du cartilage porcine juvénile a également démontré que le signal F-SHG, et donc aussi le ratio F/B, étaient élevés près de la surface articulaire, à une distance de 50-500 μm de la surface dans la partie centrale des condyles fémoraux (Finnoy, Olstad et al. 2016). Ceci s'expliquait par l'alignement de faisceaux denses de fibrilles de collagène de au niveau de la matrice territoriale. Cette organisation particulière des fibrilles autour des cellules dans la matrice territoriale a été remarquée par Finnoy et al. 2016 près de la surface articulaire, autour de certains canaux de cartilage et au niveau du périchondrium; ils ont émis l'hypothèse que cette organisation particulière correspondait à des zones de croissance active, non pas de prolifération cellulaire mais de déposition de collagène. Dans l'étude par SHG du cartilage bovin adulte, la zone moyenne un ratio F/B significativement plus élevé que la zone superficielle et profonde, et le ratio F/B de la zone superficielle était significativement plus élevé que celui de la zone profonde, ce qui témoigne donc d'une structure plus organisée dans la zone moyenne (Chaudhary, Campbell et al. 2015).

Les résultats de SHG de l'article 2 sont semblables à ceux obtenus par Finnoy et al. (2016) en F-SHG, avec des paramètres similaires. Il semble ainsi y avoir un fort signal SHG avec une forte anisotropie en surface dans ce qui correspondrait à la zone transitionnelle et au début de la zone profonde du cartilage articulaire. La résolution à l'IRM n'est pas suffisante pour démontrer l'organisation zonale du cartilage articulaire, mais démontre, sous toute réserve selon que le temps de relaxation T2 est plus élevé en surface. Le temps de relaxation T2 du cartilage articulaire est plus élevé que celui du cartilage épiphysaire chez l'enfant (Laor and Jaramillo 2009), le poulain (Cluzel, Blond et al. 2013) et le porcelet (Johnson, Wang et al. 2018). En allongent le TE, le signal du cartilage épiphysaire va diminuer, ce qui accentue

d'avantage ce contraste (Ho-Fung and Jaramillo 2013). Les membres postérieurs des spécimens de l'article 2 ont été placés de façon parallèle au champ magnétique B₀. Ceci veut donc dire que la trochlée fémorale se trouvait orientée plus ou moins perpendiculairement à B₀. Vu la courbature de la trochlée, il est probable que des fibrilles des couches proximales du cartilage articulaire se soient retrouvées avec une orientation proche de l'angle magique. Par contre, tel que mentionné précédemment, l'anisotropie à elle seule n'explique pas les variations du temps de relaxation T₂, il y a plusieurs facteurs entrant en ligne de compte. La figure 43 illustre d'ailleurs très bien les variations compositionnelles et structurelles du cartilage articulaire et épiphysaire de poulains à la naissance et durant la croissance.

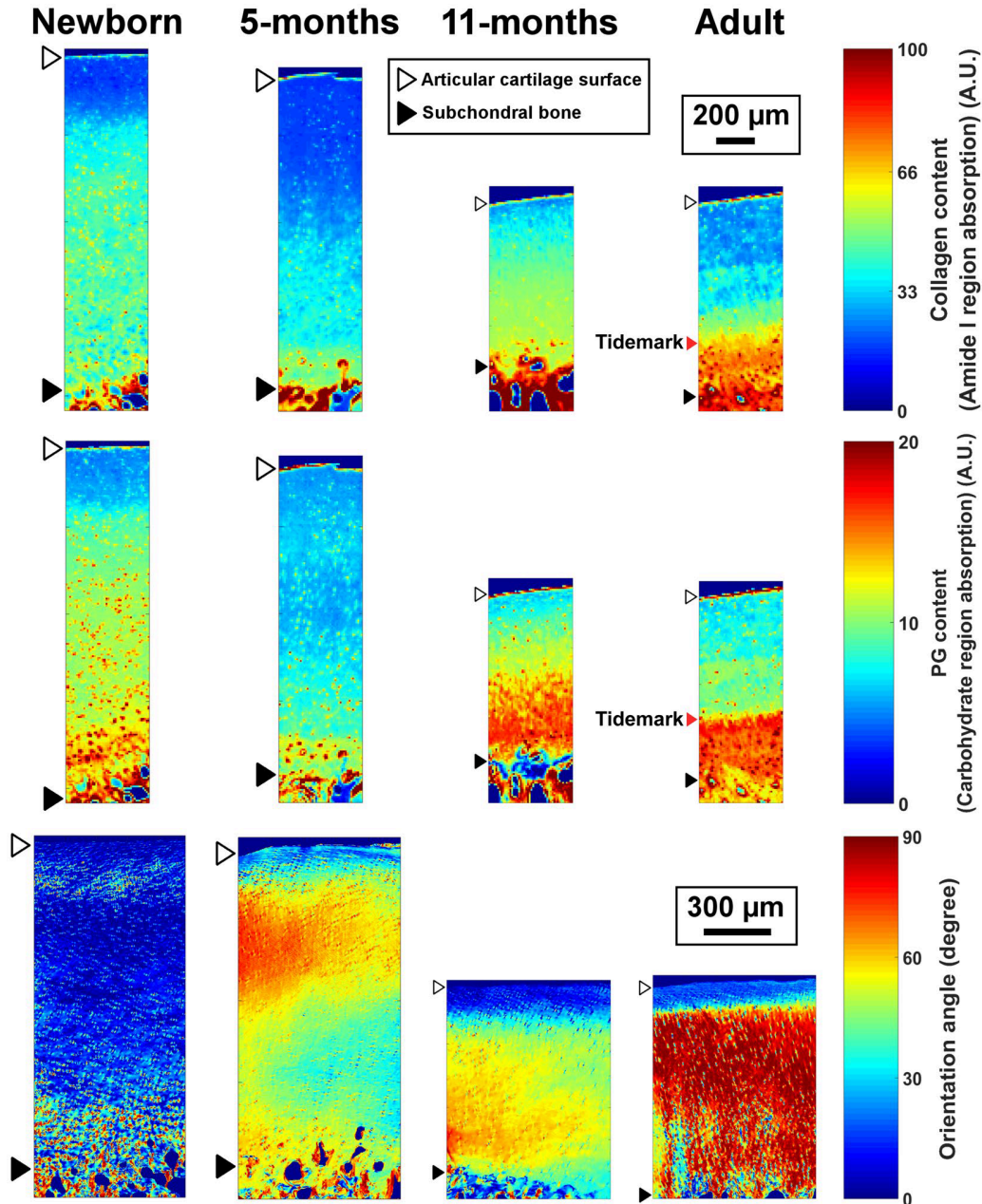


Figure 44. Contenu et structure du cartilage équin selon la maturation. Rangée du haut: Contenu en collagène (absorption de l'amide I à la FITR-MS). Rangée du milieu: Contenu en PG. Rangée du bas: angle moyen des fibrilles de collagène par PLM (angle 0° = parallèle surface articulaire et angle 90° = perpendiculaire à surface articulaire).

Au niveau du cartilage épiphysaire en pourtour de l'aspect cranio-proximal du SOC, une zone hyperintense à la cartographie T2 a été notée. Une telle zone en pourtour du SOC des condyles fémoraux d'enfants est rapportée en médecine humaine et est considérée comme une

zone de préossification (Ho-Fung and Jaramillo 2013). Selon Varich et al. (2000), l'effet de l'angle magique n'est pas rapporté au niveau du cartilage épiphysaire, puisque le collagène y est moins organisé, donc il n'est pas probable que les zones hyperintenses décrites en résultent (Varich, Laor et al. 2000). Les scans SHG correspondant à ces zones dans l'article 2 ont démontré, selon l'apparence des lacunes de chondrocytes, que cette zone était hypertrophique. Le signal SHG y est faible, de même que l'anisotropie. D'ailleurs à l'immunohistochimie des sections correspondantes, ces zones présentaient une plus faible coloration pour le collagène type II.

4.3 Article 3

Validation of the ultrasonographic assessment of the femoral trochlea epiphyseal cartilage in foals at osteochondrosis predilected sites with MRI and histology

Article publié:

Equine Veterinary Journal 2017 Nov;49(6):821-828.

doi: 10.1111/evj.12698. Epub 2017 Jun 19.

Martel, Gabrielle: Université de Montréal, Département des sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, ST-HYACINTHE, QC, CANADA

Forget, Claude: Service vétérinaire Dr Claude Forget, ST-JÉRÔME, QC, CANADA

Gilbert, Guillaume : Philips Healthcare, MR Clinical Science Markham, ON, CANADA

Richard, Hélène: Université de Montréal, Département des sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, ST-HYACINTHE, QC, Canada

Moser, Thomas: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame Montréal, QC, CANADA

Olive, Julien: Animal Oncology and Imaging Center, Rotkreuz, SWITZERLAND

Laverty, Sheila: Université de Montréal, Département des sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, ST-HYACINTHE, QC, CAN

Corresponding author's email: sheila.laverty@umontreal.ca

Keywords: Horse, foal, ultrasonography, osteochondrosis, epiphyseal growth cartilage, vascularity

Abstract

BACKGROUND: Non-invasive imaging tools are needed to screen foal femoropatellar joints to detect subclinical osteochondrosis lesions due to focal failure of endochondral ossification to enhance early management to optimize intrinsic healing events. Recently investigations employing 3T susceptibility-weighted MRI (3T SWI MRI) and CT have demonstrated their capacity for early osteochondrosis diagnosis, but these technologies are not practical for field screening. We postulate that ultrasonography is a valuable field tool for the detection of subclinical osteochondrosis lesions.

OBJECTIVES: The goals were 1) to describe the sonographic features of the femoral trochlea of healthy and osteochondrosis-predisposed neonatal foals, 2) to validate the capacity of ultrasound to assess cartilage canal vascular architecture and the ossification front and 3) to evaluate field feasibility in a pilot study.

STUDY DESIGN: Experimental study.

METHODS: Ultrasonographic evaluation of osteochondrosis predisposed (n=10) and control (n=6) femoral trochleas was performed *ex vivo* and compared with site-matched histological sections and 3T SWI MRI. The articular and epiphyseal cartilage thickness, the ossification front indentation and the cartilage canal vascular architecture were assessed at each ROI. Femoral trochleae of foals (n=3) aged 1, 3 and 6 months were also evaluated with ultrasonography in field.

RESULTS: Ultrasonographic measurements strongly correlated with the histological measurements. There was no difference in the cartilage thickness or ossification front indentation between control and osteochondrosis-predisposed specimens. The cartilage canal vascular architecture on ultrasonograms corresponded with the vessel pattern observed on site-matched histology and 3T SWI MRI.

MAIN LIMITATIONS: The number of specimens for study was limited, and no early osteochondrosis lesions were present within the predilected group, but a field study is now underway.

CONCLUSION: Ultrasonographic examination of the femoral trochlea permitted accurate evaluation of cartilage thickness, cartilage canal vascular architecture and ossification front

indentation in young foals and is a promising, practical tool for screening subclinical osteochondrosis and monitoring and managing lesions at important clinical sites.

INTRODUCTION

Osteochondrosis arises in the first weeks of life and the earliest subclinical lesions are focal areas of ischemic chondronecrosis of the epiphyseal cartilage (Carlson, Meuten et al. 1991) that remain in the expanding ossification front resulting in focal sites of failed endochondral ossification. These lesions may heal up to 8 months of age (Dik, Enzerink et al. 1999) or alternatively progress to classical lesions of osteochondritis dissecans (OCD). The prevalence of osteochondrosis has been reported to be from 25-30% in all breeds of horses combined (reviewed by van Weeren, 2013 (van Weeren and Jeffcott 2013)), but may vary according to number of sites screened, age of the animals and extent to which the given population has been preselected. In a non-preselected population of Dutch Warmblood in which stifles, hocks and fetlocks were examined, the prevalence of osteochondrosis in yearlings was reported to be as high as 67.5% (Van Grevenhof, Ducro et al. 2009). The prognosis for return to expected level of performance after surgical treatment of OCD in the stifle is 66% (UpRichard, Elce et al. 2013) and racehorses and jumping horses perform less well than their peers (Robert, Valette et al. 2006, Jackson, Whitton et al. 2009, Verwilghen, Janssens et al. 2013, Clarke, Reardon et al. 2015).

Early detection and monitoring of femoral osteochondrosis lesions at the farm holds the promise to improve the outcome, as exercise restriction may promote healing of subclinical lesions. Radiographs are currently the mainstay for the diagnosis of OCD but are insensitive to small lesions in joints (Bourzac, Alexander et al. 2009) and do not correlate well with lesions detected at arthroscopy (Foland, McIlwraith et al. 1992, Steinheimer, McIlwraith et al. 1995). Ultrasonographic examination is employed for the diagnosis of clinical femoral trochlea OCD in foals over 6 months old (Bourzac, Alexander et al. 2009) and has been reported to be more sensitive than radiographs (Bourzac, Alexander et al. 2009, Beccati, Chalmers et al. 2013). Recently numerous *ex vivo* and *in vivo* imaging studies, including CT (Fontaine, Blond et al. 2013), 1.5 TMRI (Cluzel, Blond et al. 2013) and 3T susceptibility-weighted imaging MRI (3T SWI MRI) (highlights vessels by differentiating desoxygenated blood from surrounding tissues) (Martel, Kiss et al. 2016), have revealed extensive detail of the equine distal femoral epiphysis. Although this novel imaging-generated knowledge is

important for the understanding of osteochondrosis, these imaging techniques are not currently practically applicable on farms for osteochondrosis screening programs because of limited availability, expense and the need for general anesthesia.

We hypothesize that ultrasonography is an affordable, practical and non-invasive tool for screening of early subclinical osteochondrosis lesions at selected sites of clinical importance. The objectives of this study were 1) to describe the sonographic features of the femoral trochlea of healthy and osteochondrosis predisposed neonatal foals, 2) to validate the capacity of ultrasound to assess epiphyseal cartilage canal vascular architecture and the ossification front employing site matched histology and 3T SWI MRI and 3) to evaluate the field feasibility of the imaging protocol in a proof of concept preliminary pilot study to demonstrate that the ultrasonographic screen is feasible *in vivo*.

MATERIAL AND METHODS

Animal and collection procedures

This is an experimental study. The femoropatellar joints of neonatal osteochondrosis predisposed Standardbred foals (n=5) and control foals (n=4) investigated here are part of a series of investigations imaging the neonatal equine joint and osteochondrosis (Martel, Couture et al. 2016, Martel, Kiss et al. 2016). Information about the age, the sex, the breed, the reason for euthanasia, the history and the osteochondrosis status of parents and the limbs sampled for each foal are presented as supplementary online material (Table S-I).

Ultrasonographic examination and measurements

The limbs (n=16) were thawed at room temperature. The hair was clipped over the cranial aspect of the femoropatellar joint. The skin was moistened with alcohol and an acoustic coupling gel was applied. A 7.5 MHz linear probe with a stand-off pad (Aloka SSDD 1400^a) was employed. The probe was initially positioned in a sagittal plane over the crest of the femoral trochlear ridges and then in a transverse plan. Regions of interest (ROIs) were selected at the proximal, middle and distal trochlea sites, in both the lateral (L_{proximal} , L_{middle} and L_{distal}) and medial (M_{proximal} , M_{middle} and M_{distal}) ridges of the trochlea (Fig. 1A&B).

Qualitative ultrasonographic assessment

Two observers independently evaluated the articular surface, the epiphyseal cartilage and the ossification front on the ultrasonographic images.

Quantitative ultrasonographic measurements

The quantitative ultrasonographic measurements were performed once by one observer.

Cartilage thickness measurement

The combined thickness (mm) of the articular and the epiphyseal cartilage was measured at the middle of each ROI on the transverse ultrasonographic images. A straight line from the articular surface to the osteochondral junction (Fig.1C) was traced with Image J software^b.

Ossification front indentation

An assessment of the degree of ossification front indentation was adapted from a cartilage fibrillation index (Pastoureau and Chomel 2004) and performed by calculating the ratio of the length of the osteochondral junction and the width of the subchondral bone, within the margins of each ROI on the transverse ultrasonographic images (Fig.1C) employing Image J Software^b.

Sample processing for histological assessment

Each femoral ridge of the trochlea was sectioned to obtain 0.5cm to 1cm thick slabs site-matched to the transverse ultrasonographic images (Fig.1A&B).

Sections (4- μ m) were cut from each slab and stained with Safranin O Fast Green (SOFG) to reveal proteoglycans and picosirius red to enhance visualization of collagen structure with polarized light microscopy (Lecocq, Girard et al. 2008, Martel, Couture et al. 2016).

Histologic examination and measurements

Images of the histological sections were digitalised using a Leica DM4000B microscope^c attached to a Leica DFC320 video camera^c. Picosirius red slides were imaged

using polarized light microscopy. Measurements of cartilage thickness and ossification front indentation were performed at each ROI as described in the ultrasonographic section (Fig.1C).

Validation of ultrasonographic detected cartilage canal vascular architecture

A qualitative comparison of the vascular architecture between the ultrasound images, the corresponding site-matched histologic sections and selected 3T SWI MRI images of the same specimens that were acquired for a previously published investigation (Martel, Kiss et al. 2016) was performed (Fig.1D).

Field Ultrasonography

The femoral trochleas of 3 Quarter Horse foals \approx 1, 3 and 6 months-old (respectively 43, 82 and 194 days-old) were also examined with the same scanning protocol. The ultrasonographic examination was performed in box stalls with the mare present. Foals were weight-bearing on both hindlimbs. Light sedation (detomidine (“Dormosedan^{db}” 10 μ g/kg IV) was employed when needed. The hair was not clipped. The cranial area of the stifle was moistened with alcohol, and an acoustic coupling gel was applied. A 10 MHz linear probe with a stand-off pad was used (GE Logiq E portable^e).

Statistical analysis

A mixed model with repeated measurements was employed to detect differences in histologic cartilage thickness or histologic ossification front indentation between ROIs and to evaluate if there was a difference between groups at each ROI. The individual was used as a random effect, the ROI as an intra-subject factor and the group as a factor between specimens. A priori contrasts were used to examine differences between pairs of means adjusting the alpha value for each contrast with the sequential Bonferroni adjustment procedure.

A linear regression and a Bland-Altman bias plotting were used to assess the agreement and limits of agreement of histologic and ultrasonographic cartilage thickness and ossification front indentation. As the goal was to validate the ultrasonographic measurements, the values from the different ROIs of same specimens were considered as independent.

A value of $P < 0.05$ was considered significant for all tests. All analyses were performed with commercial statistical software (SAS version 9.1^f).

RESULTS

Qualitative ultrasonographic assessment

The articular surface was smooth and the articular cartilage appeared as a thin avascular hypoechoic band (Fig.2A&A1). The deeper epiphyseal cartilage was hypoechoic with linear multifocal echoic flecks corresponding to the cartilage canal-vessel interfaces (Fig.2A&A1). The ossification front was hyperechoic (Fig.2A&A2).

In the sagittal sonograms, the metaphysis was easily distinguished from the epiphyseal ossification front distally by the intervening hypoechoic growth plate (Fig.3A&B). The margins of the metaphyseal ossification center were straight. In contrast, the margins of the ossification front of the epiphyseal ossification center were very irregular.

Transverse ultrasound images of the proximal third of the femoral trochlea revealed a greater cartilage thickness and a distinct cartilage canal vascular architecture: some cartilage canal-vessel interfaces were seen in a longitudinal cut, parallel to the the ossification front while many adjacent cartilage canal-vessel interfaces appeared to be cut transversally (Fig.3A1&B1). The middle third transverse ultrasound images revealed a highly indented ossification front and presence of cartilage canal-vessel interfaces cut longitudinally bridging perpendicularly into subchondral bone (Fig.3A2&B2). More distally, the ossification front was less indented and cartilage canal-vessel interfaces were cut longitudinally and mainly perpendicular to the ossification front (Fig.3A3&B3).

Qualitative histologic assessment

The cartilage stained red and the white voids corresponded to empty cartilage canals, and the subchondral bone was blue (Fig.2B). The histological assessment confirmed that the articular cartilage was the clear layer easily distinguished from the underlying vascular epiphyseal cartilage on SOFG (Fig.2B1) and picosirius red stained sections (Fig.2C&C1) (Cluzel, Blond et al. 2013) and contained no cartilage canals (Fig.2B&C). The cartilage canal vascular architecture and the ossification front indentations on histology (Fig.2B&2B2 and Fig.2C&C2) matched those observed on ultrasound images (Fig.2A&A2).

Quantitative ultrasonographic and histologic assessment

Ultrasonographic and site-matched histologic cartilage thickness and ossification front measurements from all the ROIs are provided in Table I. There were 15/96 cartilage thickness and 21/96 ossification front indentation missing histologic values and 5/96 cartilage thickness and 8/96 ossification front missing ultrasound values because of technical challenges. There was no significant difference between control and osteochondrosis predisposed groups at each ROI, so the ROI data of all the specimens were subsequently pooled (Table I). The cartilage was thicker proximally in the medial and lateral ridges of the trochlea compared to middle and distal ROIs (Table S-II and Fig.4A). There were no significant differences in mean histologic ossification front indentation between ROIs (Fig.4B).

Validation of ultrasound detected cartilage canal vascular architecture

A comparison of ultrasound transverse scans and 3T SWI MRI slices revealed a satisfactory match in cartilage canal vascular architecture (Fig.5). On the ultrasound images, the cartilage canal vascular architecture is visible as echoic flecks within the epiphyseal cartilage corresponding to cartilage canal-vessel interfaces whereas on susceptibility-weighted images, the blood vessels (Fig.5A-C) are visible in black within the gray epiphyseal cartilage (Fig.5D-E).

Correlation between ultrasonographic and histologic measurements

There was a strong positive linear correlation between histologic and ultrasonographic cartilage thickness measurements ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.8$) (Fig.4C) and ossification front ratios ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.8$) (Fig.4D). The regression slope and intercept value of the Bland-Altman test for cartilage thickness were not significantly different from 0, indicating no significant bias occurred (mean difference, 0.51 and 95% confidence interval, -2.3 to 3.3) (Fig.4E) whereas those of the Bland-Altman test for ossification front indentation were significantly different from 0 ($p = 0.001$ and $p=0.02$ respectively), indicating that ultrasound underestimated the ossification front indentation and particularly for higher measurements (mean difference, 0.064 and 95% confidence interval, - 0.07 to 0.19) (Fig.4F).

Field ultrasonography

The ultrasonographic protocol for the *in vivo* assessment of the femoral trochlea was feasible in standing 1, 3 and 6 months-old foals (Fig.6). Epiphyseal cartilage thickness, irregularity of the epiphyseal ossification center and cartilage canal vessels decreased with increasing age in these foals (Fig.6).

DISCUSSION

Earlier studies from our group reported, for the first time, that ultrasonography was a valuable diagnostic tool for the accurate assessment of femoral OCD lesions in a cohort of foals (>6 months old) and that it was more sensitive than radiology in some cases (Bourzac, Alexander et al. 2009).

Based on these results, we speculated that ultrasonography would also be a valuable diagnostic modality to detect subclinical osteochondrosis lesions in the first months of life. In the present study we now demonstrate that ultrasonography reveals accurate details of the structure of the articular and epiphyseal cartilage and its vascularization and the ossification front in neonatal foals. The ultrasonographic findings were confirmed with both gold standard histological assessment of site-matched sections and also more novel 3T SWI MRI (Martel, Kiss et al. 2016).

Previous studies of femoral epiphyseal cartilage blood supply and early osteochondrosis initially employed invasive methods such as *ex vivo* contrast-enhanced micro- and conventional CT scans (Olstad, Cnudde et al. 2008a, Olstad, Hendrickson et al. 2010), *ex vivo* T2 weighted MRI (Babyn, Kim et al. 1996) and *in vivo* contrast-enhanced MRI (Jaramillo, Villegas-Medina et al. 2004) in a variety of species including horses (Olstad, Ytrehus et al. 2008c, Olstad, Hendrickson et al. 2010) and pigs (Babyn, Kim et al. 1996, Jaramillo, Villegas-Medina et al. 2004). More recent studies from our laboratory and others have revealed the capacity of MRI susceptibility-weighted imaging to identify, non-invasively and in exquisite detail the femoral epiphyseal cartilage vessels at osteochondrosis predilection sites in both foals (Martel, Kiss et al. 2016), pigs (Toth, Nissi et al. 2013, Nissi, Toth et al.

2014), goats (Toth, Nissi et al. 2015, Wang, Nissi et al. 2016) and children (Toth, Nissi et al. 2015). Despite the promising advantages of susceptibility-weighted imaging, it is not yet a practical imaging modality in a clinical context because of limited access to high field MRI combined with the elevated cost of the procedure and necessity for general anesthesia. Ultrasonographic examination, on the other hand, is non-invasive, readily available, cost-effective and an easily applicable method at the farm for monitoring relevant structural features of the epiphysis.

The ultrasonographic cartilage thickness measurements at equine femoral osteochondrosis predilection sites correlated strongly with the corresponding histologic measurements. The accuracy of the ultrasonographic measurement of adult equine articular cartilage thickness has been previously evaluated, but not in foals (Barthez, Bais et al. 2007). A high level of agreement has been reported between ultrasound and MRI measurements of juvenile cartilage thickness in both healthy children (Spannow, Stenboeg et al. 2011) and those affected by juvenile rheumatoid arthritis (Pradsgaard, Fiirgaard et al. 2015).

Focal or multi-focal radiolucent defects within the ossification front, so-called “stair-step” lesions observed on CT scans, are considered pathognomonic for chondronecrosis in the distal femur of pigs (Carlson, Meuten et al. 1991, Olstad, Ytrehus et al. 2011, Olstad, Kongsro et al. 2014). Similar defects within the ossification front in foals have also been confirmed on histology to be a focal failure of endochondral ossification due to ischemic chondronecrosis (32). The hyperechogenicity of the epiphyseal cartilage/bone interface, described in the study herein, provided excellent detail of the ossification front, and we are confident that ultrasound has the capacity to detect these lesions. Although the ultrasonographic measurements of the ossification front indentation were strongly correlated with histological assessments, the accuracy decreased as the ossification front indentation increased, and this was likely due to lower ultrasound resolution compared to histology.

Age-dependent variations of cartilage thickness and ossification front indentation within the lateral ridge of the femoral trochlea were subjectively observed from birth to 6 months-old, but additional studies of more specimens are now required to describe normal equine sonographic structural features at different stages of maturity.

We propose that ultrasound screening to detect and monitor sites of focal failure of endochondral ossification within the ossification front of the lateral ridge of the femoral

trochlea should be performed from the first months of life up to 8 months of age to identify foals with subclinical osteochondrosis. A previous investigation, employing CT in pigs, has revealed that the radiolucent defects they observed within the ossification front were sites of failed endochondral ossification with ischemic chondronecrosis (33). Dik et al. also made the important discovery that a high proportion (97%) of ossification front defects in the femoral trochlea, suggestive of focal failure of endochondral ossification, can regress or heal up to 8 months of age (Dik, Enzerink et al. 1999). Similarly, 51% of porcine lesions of failed endochondral ossification on CT undergo spontaneous resolution probably due to healing (34). There are a number of possible explanations for the fact that no osteochondrosis lesions were identified in the foals despite efforts to create an osteochondrosis phenotype. First it may be because of the small number of specimens available because of ethical constraints. A study with a greater number of foals may have resulted in a greater number of lesions. Second, it could also be due to the early investigation timepoint. The earliest described macroscopic osteochondrosis lesion in the literature is 2 days old (Rejno and Stromberg 1978). Based on this information, it should be possible to detect an osteochondrosis lesion at the early timepoints we investigated. Indeed a theory of osteochondrosis is that a change in loading after birth may be instrumental in subclinical lesions becoming manifest (van Weeren and Jeffcott 2013).

As no osteochondrosis lesions were detected in the foals of the present study, the capacity of ultrasound to image them still remains to be elucidated. Despite this limitation, our data clearly indicates that accurate information of normal femoral epiphyseal growth cartilage structure and morphology of the ossification front is provided by ultrasonographic examination and suggests that if osteochondrosis lesions had been present they would have been picked up. Ongoing farm prospective ultrasound screening studies of this site are providing additional data that this technique is feasible for identifying subclinical osteochondrosis lesions (unpublished data, abstract in AAEP proceedings 2016).

In summary, a systematic ultrasonographic examination of the equine femoral trochlea, employing readily available equipment, permitted accurate evaluation of parameters relevant to the diagnosis of early osteochondrosis: growth cartilage structure, cartilage canal vascular architecture and ossification front indentation at osteochondrosis predilected sites in young foals. Ultimately, ultrasonographic examination may provide a better understanding of

osteochondrosis development and healing and consequently lead to improved clinical outcomes at selected clinically important sites such as the femoral trochlea.

Manufacturer's details

^a Hitachi Aloka Medical America Inc, Wallingford, CT, United-States

^b Wright Cell Imaging Facility, Toronto Western Research Institute, Toronto, Canada

^c Leica microsystems, Richmond Hill, Ontario, Canada

^d Zoetis Canada Inc, Kirkland, Quebec, Canada

^e GE Healthcare

^f SAS, version 9.1, SAS Institute Inc, Cary, NC

Supplementary information list

Table S-I: Age, sex, breed, reason for euthanasia, history, osteochondrosis status of parents and limb sampled for each foal in the study

Table S-II: Differences in histologic cartilage thickness measurements between pairs of ROIs.

Competing interests: None

Sources of funding: This project was funded by Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ).

Sheila Laverty's laboratory is currently funded by the National Science and Engineering Council of Canada (NSERC) the Réseau ThéCell, Fonds de Recherche en Santé Québec (FRSQ) and also by a generous gift from Mr and Mrs J Magnier, Coolmore Stud, Fethard, Ireland.

Acknowledgements : We would like to thank the following people for their contributions: Danielle Blain for her technical assistance with MRI SWI, Dr Claude Forget DVM for providing osteochondrosis affected animals, Dr Rejean Lefebvre DVM PhD DACVR for

embryo transfer, Dr Christiane Girard DVM DACVP for valuable insight on the histological assessment of the tissues and Dr Guy Beauchamps for statistical analyses.

Authors' contribution: G.M., J.O. and S.L. contributed to the study design. The ultrasonographic work was conducted by G.M., C.F and J.O., with histology by H.R. and MRI by G.G. The analysis and interpretation was done by G.M., J.O. and S.L. The preparation of the manuscript was done by G.M. and S.L. The final manuscript was approved by all authors.

Tableau XVIII. Table I: Ultrasonographic and histologic cartilage thickness and ossification front indentation measurements at each region of interest (ROI).

ROI		Cartilage thickness		Ossification front indentation	
		Ultrasonography	Histology	Ultrasonography	Histology
		Mean \pm SD (mm)	Mean \pm SD (mm)	Mean \pm SD	Mean \pm SD
L_{proximal}	Osteochondrosis	12.5(\pm 2.0)	15.8(\pm 3.0)	1.18(\pm 0.10)	1.30(\pm 0.11)
	Control	11.5(\pm 1.7)	13.5(\pm 0.0)	1.06(\pm 0.03)	1.20(\pm 0.18)
	Pooled	12.0(\pm 1.9)	15.5(\pm 2.9)	1.13(\pm 0.10)	1.28(\pm 0.12)
L_{middle}	Osteochondrosis	14.0(\pm 1.1)	14.1(\pm 1.2)	1.35(\pm 0.12)	1.31(\pm 0.15)
	Control	13.9(\pm 1.2)	15.6(\pm 0.9)	1.25(\pm 0.12)	1.54(\pm 0.07)
	Pooled	14.0(\pm 1.1)	14.7(\pm 1.3)	1.28(\pm 0.13)	1.38(\pm 0.17)
L_{distal}	Osteochondrosis	12.2(\pm 1.0)	13.0(\pm 2.1)	1.24(\pm 0.08)	1.31(\pm 0.10)
	Control	12.1(\pm 2.5)	14.5(\pm 0.8)	1.21(\pm 0.10)	1.37(\pm 0.07)
	Pooled	12.2(\pm 1.6)	13.5(\pm 1.9)	1.22(\pm 0.09)	1.33(\pm 0.09)
M_{proximal}	Osteochondrosis	16.0(\pm 4.2)	16.1(\pm 2.0)	1.16(\pm 0.18)	1.33(\pm 0.21)
	Control	15.5(\pm 2.2)	19.5(\pm 2.7)	1.07(\pm 0.01)	1.11(\pm 0.00)
	Pooled	15.8(\pm 3.5)	17.2(\pm 2.7)	1.12(\pm 0.14)	1.30(\pm 0.21)
M_{middle}	Osteochondrosis	13.0(\pm 2.0)	12.2(\pm 2.2)	1.22(\pm 0.11)	1.29(\pm 0.08)
	Control	12.7(\pm 3.0)	12.2(\pm 2.5)	1.21(\pm 0.22)	1.47(\pm 0.28)
	Pooled	12.9(\pm 2.3)	12.5(\pm 2.4)	1.21(\pm 0.15)	1.33(\pm 0.16)
M_{distal}	Osteochondrosis	9.2(\pm 2.7)	9.8(\pm 3.0)	1.18(\pm 0.11)	1.23(\pm 0.10)
	Control	7.5(\pm 1.5)	8.1(\pm 1.6)	1.18(\pm 0.09)	1.21(\pm 0.10)
	Pooled	8.5(\pm 2.4)	9.1(\pm 2.6)	1.18(\pm 0.10)	1.22(\pm 0.10)

References

- [1] Carlson, C.S., Meuten, D.J. and Richardson, D.C. (1991) Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res* 9, 317-329.
- [2] Dik, K.J., Enzerink, E. and van Weeren, P.R. (1999) Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine Vet J Suppl* . 31, 9-15.
- [3] van Weeren, P.R. and Jeffcott, L.B. (2013) Problems and pointers in osteochondrosis: Twenty years on. *Vet J* 197, 96-102.
- [4] Van Grevenhof, E.M., Ducro, B.J., Van Weeren, P.R., Van Tartwijk, J.M., Van den Belt, A.J. and Bijma, P. (2009) Prevalence of various radiographic manifestations of osteochondrosis and their correlations between and within joints in Dutch warmblood horses. *Equine Vet J* 41, 11-16.
- [5] UpRichard, K., Elce, Y.A., Piat, P., Beauchamp, G. and Laverty, S. (2013) Outcome after arthroscopic treatment of lateral femoral trochlear ridge osteochondrosis in sport horses. A retrospective study of 37 horses. *Vet Comp Orthopaed* 26, 105-109.
- [6] Clarke, K.L., Reardon, R. and Russell, T. (2015) Treatment of osteochondrosis dissecans in the stifle and tarsus of juvenile thoroughbred horses. *Vet Surg* 44, 297-303. [7] Jackson, M., Whitton, C., Vizard, A., Anderson, G. and Clarke, A. (2009) A prospective study of presale radiographs of Thoroughbred yearlings, RIRDC, Publication No. 09/082.
- [8] Robert, C., Valette, J.P. and Denoix, J.M. (2006) Correlation between routine radiographic findings and early racing career in French trotters. *Equine Vet J Suppl* 38, 473-478.
- [9] Verwilghen, D.R., Janssens, S., Busoni, V., Pille, F., Johnston, C. and Serteyn, D. (2013) Do developmental orthopaedic disorders influence future jumping performances in Warmblood stallions? *Equine Vet J* 45, 578-581.
- [10] Bourzac, C., Alexander, K., Rossier, Y. and Laverty, S. (2009) Comparison of radiography and ultrasonography for the diagnosis of osteochondritis dissecans in the equine femoropatellar joint. *Equine Vet J* 41, 685-692.
- [11] Steinheimer, D.N., McIlwraith, C.W., Park, R.D. and Steyn, P.F. (1995) Comparison of radiographic subchondral bone changes with arthroscopic findings in the equine femoropatellar and femorotibial joints: a retrospective study of 72 joints (50 horses). *Vet Radiol Ultrasoun* 36, 478-484.
- [12] Foland, J.W., McIlwraith, C.W. and Trotter, G.W. (1992) Arthroscopic surgery for osteochondritis dissecans of the femoropatellar joint of the horse. *Equine Vet J* 24, 419-423.
- [13] Beccati, F., Chalmers, H.J., Dante, S., Lotto, E. and Pepe, M. (2013) Diagnostic sensitivity and interobserver agreement of radiography and ultrasonography for detecting trochlear ridge osteochondrosis lesions in the equine stifle. *Vet Radiol Ultrasoun* 54, 176-184.
- [14] Fontaine, P., Blond, L., Alexander, K., Beauchamp, G., Richard, H. and Laverty, S. (2013) Computed tomography and magnetic resonance imaging in the study of joint development in the equine pelvic limb. *Vet J* 197, 103-111.
- [15] Cluzel, C., Blond, L., Fontaine, P., Olive, J. and Laverty, S. (2013) Foetal and postnatal equine articular cartilage development: magnetic resonance imaging and polarised light microscopy. *European cells & materials* 26, 33-47.

- [16] Martel, G., Kiss, S., Gilbert, G., Anne-Archard, N., Richard, H., Moser, T. and Laverty, S. (2016) Differences in the vascular tree of the femoral trochlear growth cartilage at osteochondrosis-susceptible sites in foals revealed by SWI 3T MRI. *J Orthop Res*.
- [17] Martel, G., Couture, C.A., Gilbert, G., Bancelin, S., Richard, H., Moser, T., Kiss, S., Légaré, F. and Laverty, S. (2016) Femoral epiphyseal cartilage matrix changes at predilection sites of equine osteochondrosis: Quantitative MRI, second-harmonic microscopy, and histological findings. *J Orthop Res* 34, 1743-1752
- [18] Pastoureau, P. and Chomel, A. (2004) Methods for cartilage and subchondral bone histomorphometry. *Method Mol Med* 101, 79-91.
- [19] Lecocq, M., Girard, C.A., Fogarty, U., Beauchamp, G., Richard, H. and Laverty, S. (2008) Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine Vet J* 40, 442-454.
- [20] Olstad, K., Cnudde, V., Masschaele, B., Thomassen, R. and Dolvik, N.I. (2008) Microcomputed tomography of early lesions of osteochondrosis in the tarsus of foals. *Bone* 43, 574-583.
- [21] Olstad, K., Hendrickson, E. and Dolvik, N. (2010) Diagnostic imaging of induced lesions of osteochondrosis in the distal femur of Norwegian Fjord Pony foals. In: *British Equine Veterinary Association Congress*, British Equine Veterinary Association, Birmingham, p 95.
- [22] Babyn, P.S., Kim, H.K., Lemaire, C., Gahunia, H.K., Cross, A., DeNanassy, J. and Pritzker, K.P. (1996) High-resolution magnetic resonance imaging of normal porcine cartilaginous epiphyseal maturation. *J Magn Reson Imaging* 6, 172-179.
- [23] Jaramillo, D., Villegas-Medina, O.L., Doty, D.K., Rivas, R., Strife, K., Dwek, J.R., Mulkern, R.V. and Shapiro, F. (2004) Age-related vascular changes in the epiphysis, physis, and metaphysis: normal findings on gadolinium-enhanced MRI of piglets. *AJR. Am J Roentgenol* 182, 353-360.
- [24] Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C.S. and Dolvik, N.I. (2008) Epiphyseal cartilage canal blood supply to the distal femur of foals. *Equine Vet J* 40, 433-439.
- [25] Toth, F., Nissi, M.J., Zhang, J., Benson, M., Schmitter, S., Ellermann, J.M. and Carlson, C.S. (2013) Histological confirmation and biological significance of cartilage canals demonstrated using high field MRI in swine at predilection sites of osteochondrosis. *J Orthop Res* 31, 2006-2012.
- [26] Nissi, M.J., Toth, F., Zhang, J., Schmitter, S., Benson, M., Carlson, C.S. and Ellermann, J.M. (2014) Susceptibility weighted imaging of cartilage canals in porcine epiphyseal growth cartilage ex vivo and in vivo. *Magn Reson Med* 71, 2197-2205.
- [27] Toth, F., Nissi, M.J., Ellermann, J.M., Wang, L., Shea, K.G., Polousky, J. and Carlson, C.S. (2015) Novel Application of Magnetic Resonance Imaging Demonstrates Characteristic Differences in Vasculature at Predilection Sites of Osteochondritis Dissecans. *Am J Sports Med* 43, 2522-2527.
- [28] Wang, L., Nissi, M.J., Toth, F., Johnson, C.P., Garwood, M., Carlson, C.S. and Ellermann, J. (2016) Quantitative susceptibility mapping detects abnormalities in cartilage canals in a goat model of preclinical osteochondritis dissecans. *Magn Reson Med*.
- [29] Barthez, P.Y., Bais, R.J. and Vernooij, J.C. (2007) Effect of ultrasound beam angle on equine articular cartilage thickness measurement. *Vet Radiol Ultrasound* 48, 457-459.
- [30] Spannow, A.H., Stenboeg, E., Pfeiffer-Jensen, M., Fiirgaard, B., Haislund, M., Ostergaard, M., Andersen, N.T. and Herlin, T. (2011) Ultrasound and MRI measurements of joint cartilage in healthy children: a validation study. *Ultraschall Med* 32 Suppl 1, S110-116.

- [31] Pradsgaard, D.O., Fiirgaard, B., Spannow, A.H., Heuck, C. and Herlin, T. (2015) Cartilage thickness of the knee joint in juvenile idiopathic arthritis: comparative assessment by ultrasonography and magnetic resonance imaging. *J rheumatol* 42, 534- 540.
- [32] Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C.S. and Dolvik, N.I. (2011) Early lesions of articular osteochondrosis in the distal femur of foals. *Vet Pathol* 48, 1165-1175.
- [33] Olstad, K., Kongsro, J., Grindflek, E. and Dolvik, N.I. (2014) Ossification defects detected in CT scans represent early osteochondrosis in the distal femur of piglets. *J Orthop Res* 32, 1014-1023.
- [34] Olstad, K., Kongsro, J., Grindflek, E. and Dolvik, N.I. (2014) Consequences of the natural course of articular osteochondrosis in pigs for the suitability of computed tomography as a screening tool. *BMC Vet Res* 10, 212.
- [35] Rejno, S. and Stromberg, B. (1978) Osteochondrosis in the horse. II. Pathology. *Acta Radiol Suppl* 358, 153-178.

Figure legends

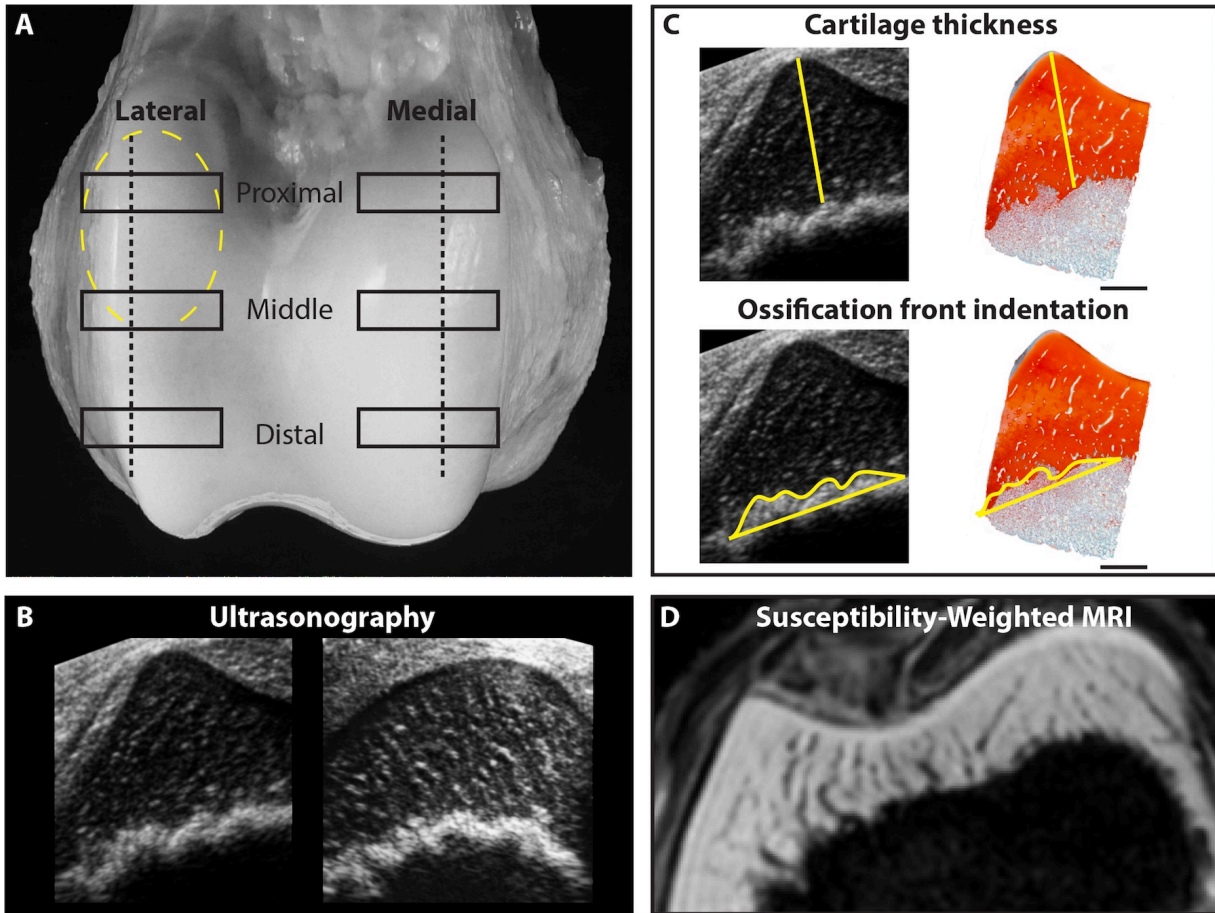


Figure 45. Figure 1. Study design. A. Distal femoral trochlea illustrating regions of interest (ROIs:proximal, middle, and distal rectangles) in the lateral and medial ridges. Broken lines indicates the position of the probe for sagittal assessment. Yellow broken oval illustrates the region where osteochondritis dissecans lesions most frequently occur. B. Transverse ultrasonographic image of the lateral and medial trochlear ridge. C. Quantitative assessments at ROIs to validate ultrasonographic imaging of structures. The combined thickness (mm) of the articular and the epiphyseal cartilage was measured by tracing a straight line from the articular surface to the osteochondral junction. The assessment of the degree of ossification front indentation was performed by calculating the ratio of the length of the osteochondral junction and the width of the subchondral bone within the margins of each ROI. Scale bar = 5 mm. D. Transverse 3T SWI MRI (Martel, Kiss et al. 2016).

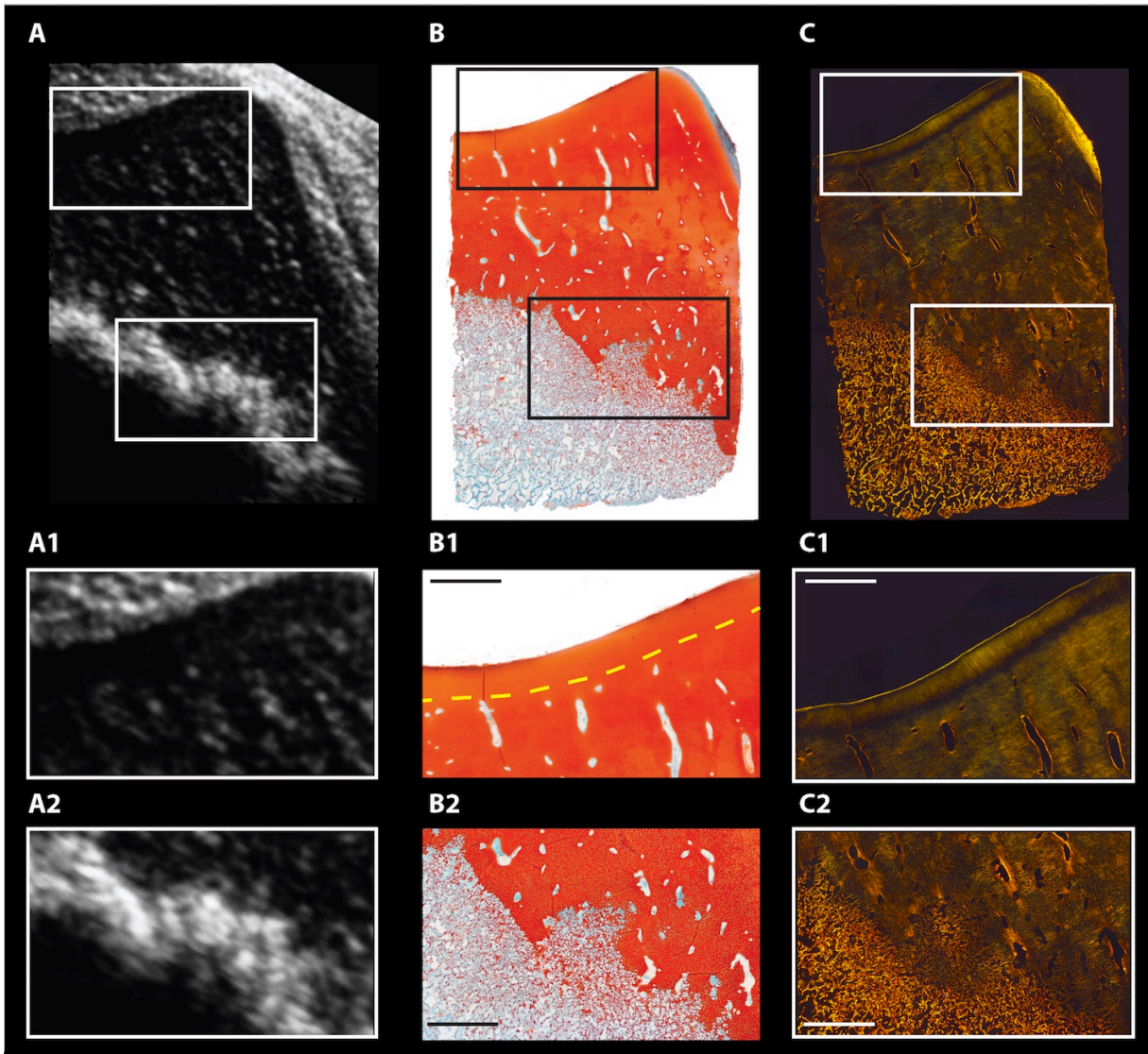
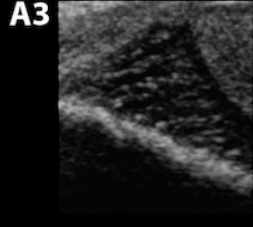
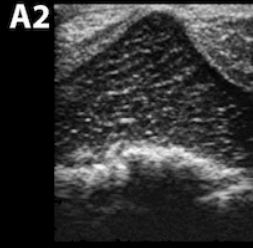
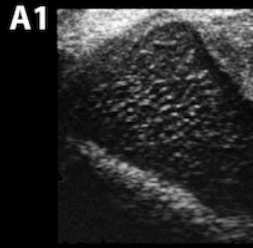
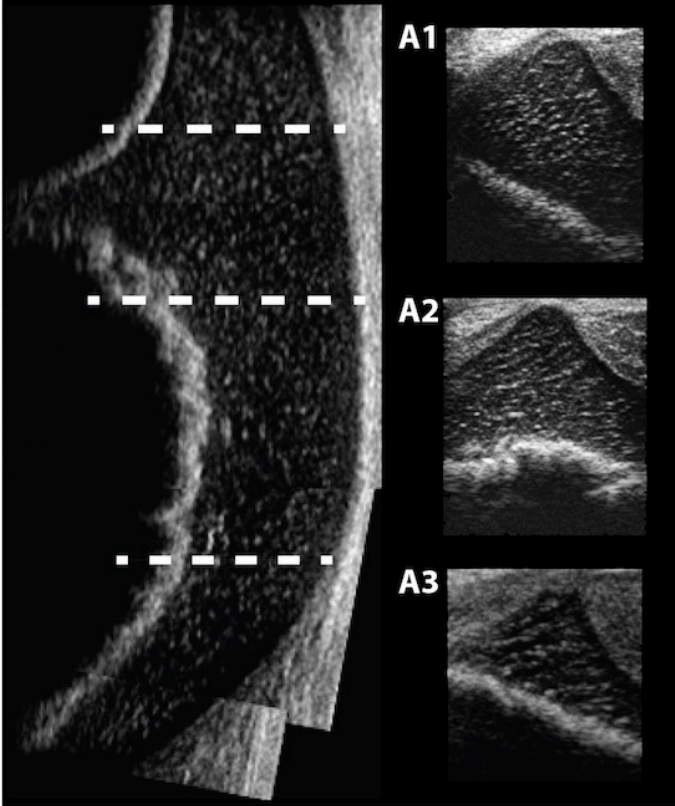


Figure 46. Figure 2. Ultrasonographic and histologic appearance of the articular and epiphyseal cartilage and the ossification front. Transverse ultrasonographic image (A), site –matched SOFG stained section (B) and picosirius red stained section (C) of the middle ROI of the lateral trochlear ridge. Rectangles in A, B & C are magnified in the bottom panels. A1. The articular cartilage is a thin hypoechoic band and below it lies the epiphyseal cartilage that contains echoic flecks corresponding to cartilage canal-vessel interfaces. A2. The ossification front is hyperechoic and is indented. B1. The superficial cartilage is avascular (demarcated by the dotted line) compared to underlying vascularized epiphyseal cartilage. B2. The ossification front indentations correspond to A2. C1. The avascular articular cartilage is easily distinguished from the underlying

epiphyseal cartilage because of variation in collagen ultrastructure between both as described previously (Cluzel, Blond et al. 2013). C2. The osteochondral junction is clearly outlined. Scale bar = 2 mm.

A Lateral Trochlea



B Medial Trochlea

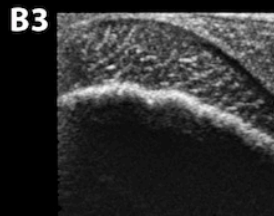
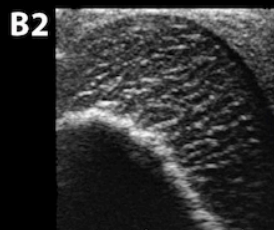
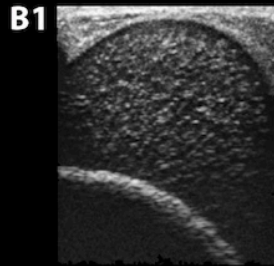
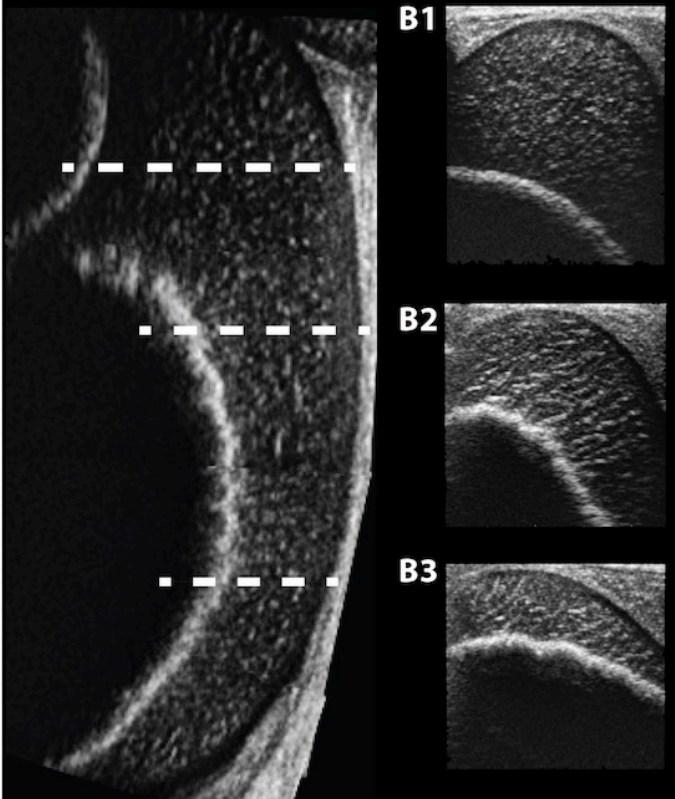


Figure 47. Figure 3. Representative ultrasonographic features of the femoral trochlea of neonatal foals. A&B. Sagittal images of the lateral (A) and medial (B) trochlear ridge revealing a thin hypoechoic layer at the surface corresponding to the articular cartilage, a thick hypoechoic layer with multifocal echoic flecks corresponding to the epiphyseal cartilage and the cartilage canal-vessel interfaces and the hyperechoic ossification front. The metaphyseal and epiphyseal ossification centers are separated by the growth plate. Broken lines on the images correspond to the inserts in the panel on right. A1-3. Transverse images of the proximal (A1), middle (A2) and distal (A3) lateral trochlear ridge revealing that the ossification front is more indented and thicker in the middle region of interest and there are fewer cartilage canal vessels distally. B1-3. Transverse image of the proximal (B1), middle (B2) and distal (B3) medial trochlear ridge revealing the thicker cartilage proximally and the cartilage canal vessels bridging into the ossification front in the middle and distal sections.

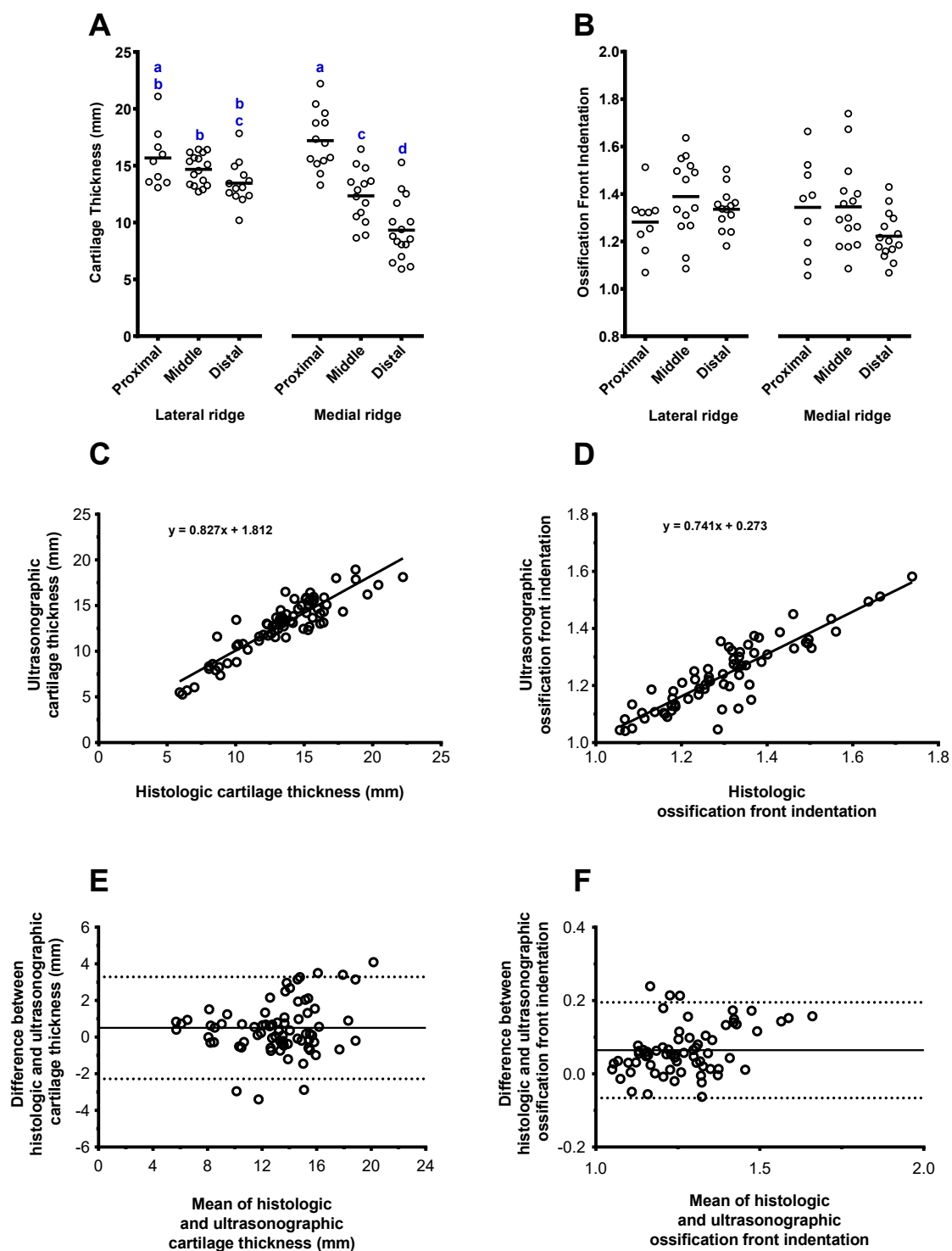


Figure 48. Figure 4. Ultrasonographic and histologic measurements of cartilage and ossification front. A&B. Histologic cartilage thickness measurements (mm) and

ossification front indentation at each ROI. A linear mixed model was employed, with the individual as a random effect, the ROI as an intra-subject factor and the group as a factor between specimens to detect differences. Means that share superscript letters are not significantly different ($p > 0.05$). C&D. The association between ultrasonographic and histologic cartilage thickness (C) and ossification front indentation (D). There was a significant positive linear correlation between histologic and ultrasonographic cartilage thickness measurements ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.8$) and ossification front indentation ratios ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.8$). E&F. Bland-Altman plot of ultrasonographic cartilage thickness (mm) (E) and ossification front indentation (F) compared with histologic measurements. No significant bias was observed for cartilage thickness, but there was a loss of precision of the ultrasound measurements that tend to be smaller than histologic measurements with increasing ossification front indentation. Black line indicates level of bias, and dashed lines indicate 95% limits of agreement.

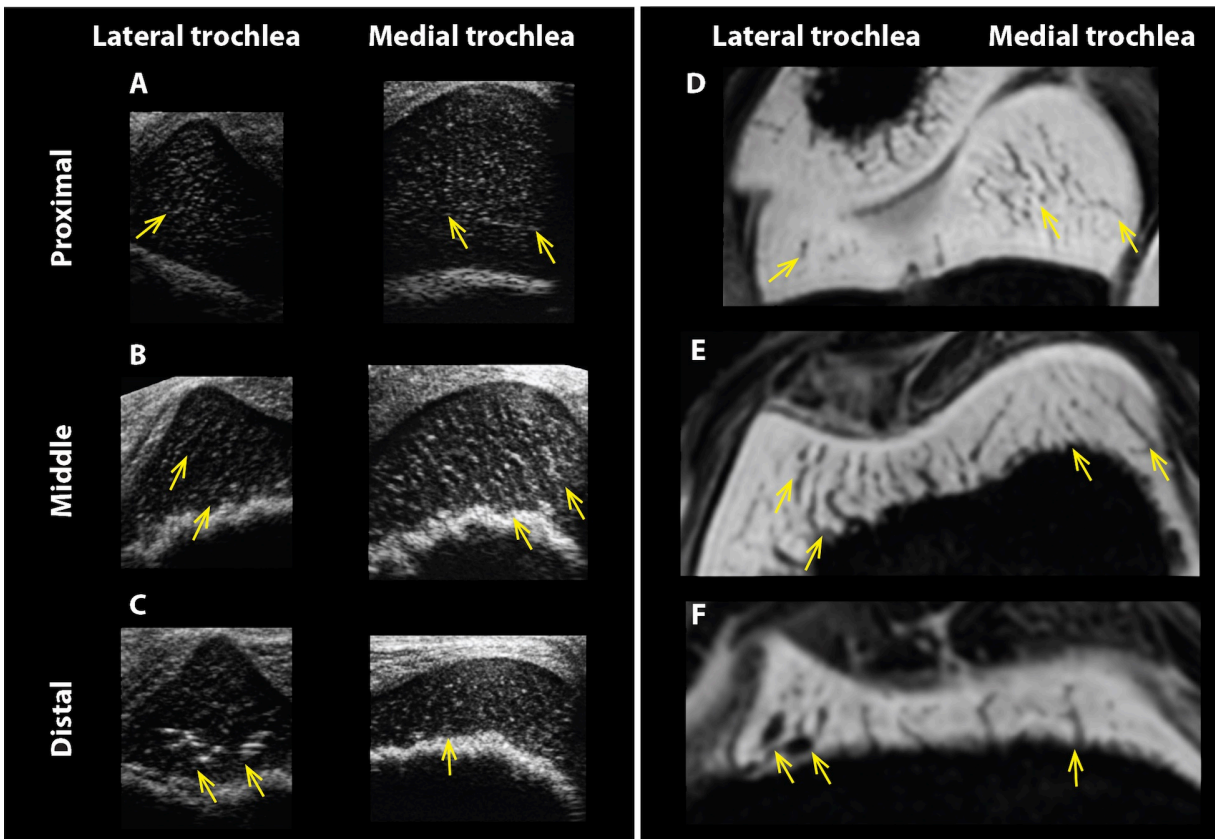


Figure 49. Figure 5. Validation of ultrasonographic detected cartilage canal vascular architecture. A-C. Transverse ultrasonographic images of the proximal (A), middle (B) and distal (C) ROIs of lateral and medial trochlear ridges. D-F. Site- matched 3T SWI MRI images. The cartilage is gray, the blood vessels are dark and the ossification center is black as described previously (Martel, Kiss et al. 2016). The blood vessels on SWI images have a similar disposition (yellow arrows) as the echoic flecks within the epiphyseal cartilage on ultrasonographic images.

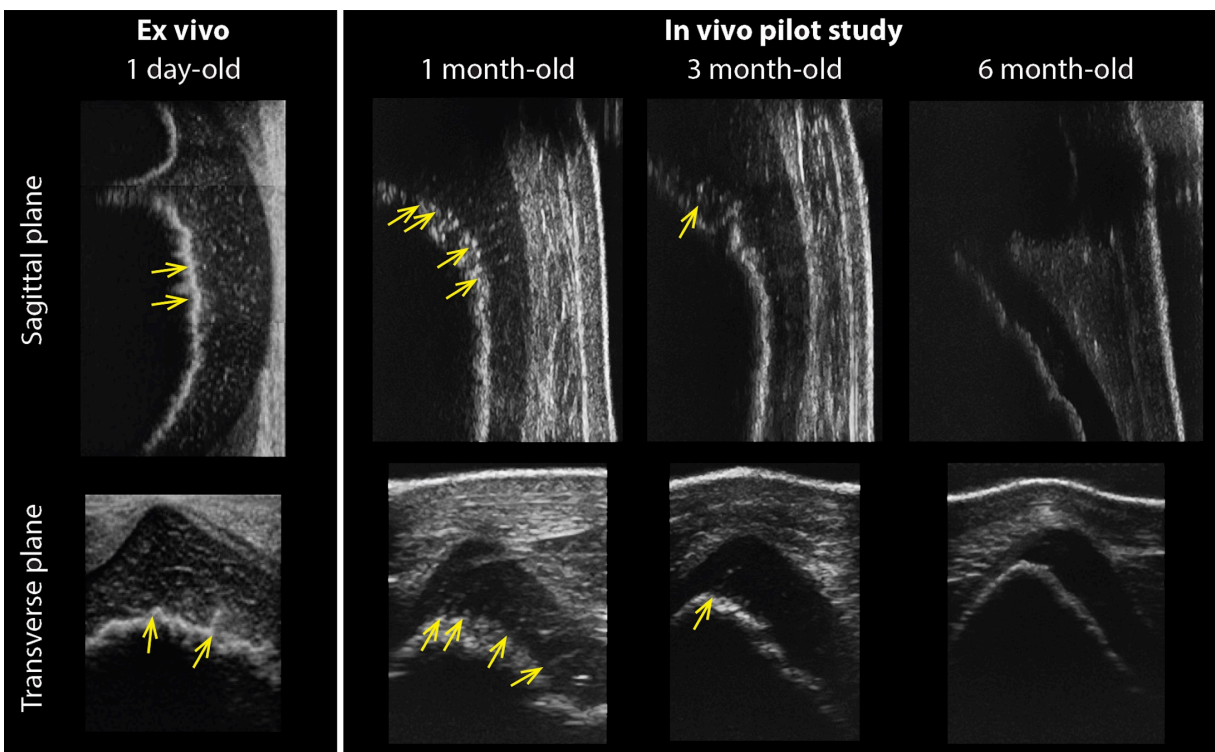


Figure 50. Figure 6. Field ultrasonography (pilot study). A. Sagittal and middle transverse images of the lateral trochlear ridge of a 1 day-old foal obtained ex-vivo. B. Sagittal and middle transverse images of the lateral trochlear ridge of 1, 3 and 6 month-old foals obtained in vivo. A decrease in cartilage thickness and in the presence of cartilage canal-vessel interfaces within the epiphyseal cartilage (arrows) occurs with increasing age.

Tableau XIX. Table S-I: Age, sex, breed, reason for euthanasia, history, osteochondrosis status of parents and limbs sampled for each foal in the study

Foal number	Age	Sex	Breed	Reason for euthanasia	Osteochondrosis status of parents	Hindlimb sampled
Osteochondrosis 1	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 2	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 3	< 24h	M	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ³ +	Both
Osteochondrosis 4	< 24h	F	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ² +	Both
Osteochondrosis 5	< 24h	M	Standardbred	N/A	Sire ¹ + & dam ⁴ +	Both
Control 1	0h	M	Paint	Dystocia	* sire - & dam -	Left ⁵
Control 2	< 24h	F	Standardbred	Died suddenly few hours after birth	* sire - & dam -	Both
Control 3	4 d	M	Warmblood	Traumatic patellar luxation right hindlimb	* sire - & dam -	Left ⁶
Control 4	4 d	F	Hanovarian	Ventricular septal defect	* sire - & dam -	Both
Pilot study 1	43 d	M	Quater Horse	N/A	* sire - & dam -	Both
Pilot study 2	82 d	F	Appendix	N/A	* sire - & dam -	Both
Pilot study 3	194 d	M	Quarter Horse	N/A	* sire - & dam -	Left

¹ Sire from Osteochondrosis foals 1 – 5 had OCD in hocks, bilateral

² Dam from Osteochondrosis foals 1, 2 & 4 had OCD in stifle, unilateral

³ Dam from Osteochondrosis foal 3 had OCD in stifle, unilateral

⁴ Dam from Osteochondrosis foal 5 had OCD in hocks, bilateral

⁵ Right hindlimb of control 1 was not imaged because of a schedule error with MRI scanner

⁶ Right hindlimb of control 3 was excluded because of traumatic patellar luxation

N/A = non applicable

* based on information from clients

Tableau XX. TABLE S-II: Differences in histologic cartilage thickness measurements between pairs of ROIs.

ROIs	Mean difference (mm)	p value
$M_{\text{proximal}} > M_{\text{distal}}^{(1)}$	8.55	<0.0001
$L_{\text{proximal}} > M_{\text{distal}}$	6.15	<0.0001
$L_{\text{middle}} > M_{\text{distal}}$	5.57	<0.0001
$M_{\text{proximal}} > M_{\text{middle}}$	5.08	<0.0001
$L_{\text{distal}} > M_{\text{distal}}$	4.45	<0.0001
$M_{\text{proximal}} > L_{\text{distal}}$	4.10	<0.0001
$M_{\text{middle}} > M_{\text{distal}}$	3.47	0.003
$M_{\text{proximal}} > L_{\text{middle}}$	2.98	0.002
$L_{\text{proximal}} > M_{\text{middle}}$	2.68	0.007
$L_{\text{middle}} > M_{\text{middle}}$	2.10	0.003

Estimates of the mean difference between the cartilage thickness (mm) of 2 ROIs and pairwise P value are illustrated. A mixed model with repeated measurements was employed to detect differences in histologic cartilage thickness between ROIs. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

⁽¹⁾ $M_{\text{proximal}} > M_{\text{distal}}$ means that the histologic cartilage thickness of the proximal medial trochlear ridge is higher than that in the distal medial trochlear ridge by 8.55 mm on average ($p < 0.0001$).

4.3.1 Informations supplémentaires sur l'article 3

4.3.1.1 Spécifications sur l'indentation front d'ossification

La méthodologie de la mesure de l'indentation du front d'ossification est adaptée de l'index de fibrillation du cartilage articulaire dans le contexte d'osteoarthrite, tel qu'illustré à la figure 50 (Pastoureau, Leduc et al. 2003). La mesure est le ratio de la longueur de la surface articulaire (l) par la largeur de l'échantillon (w), ou, dans le cas de l'article 3, l'indentation du front d'ossification divisé par la largeur de l'échantillon.

4

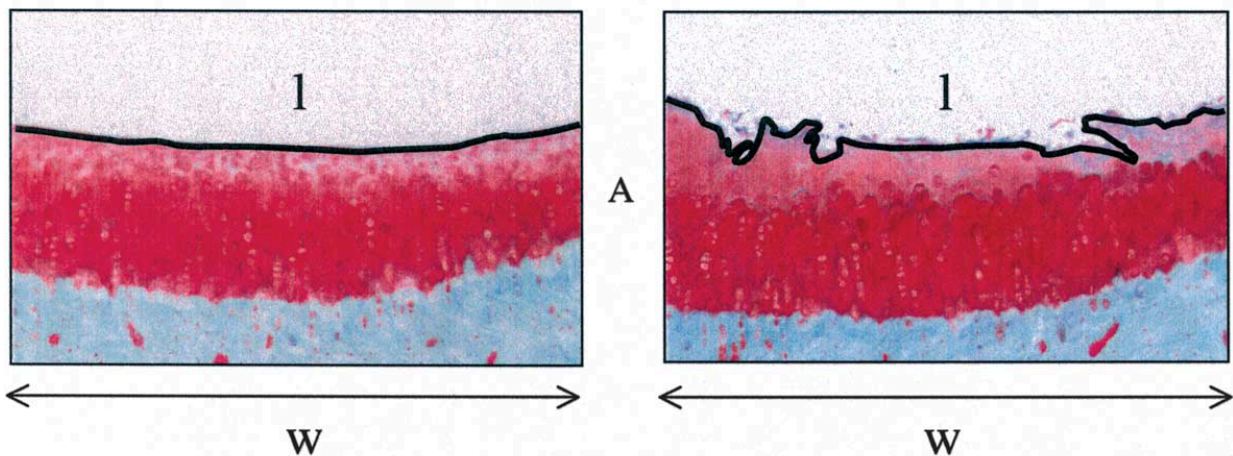


Figure 51. Index de fibrillation du cartilage articulaire. Selon Pastourneau, 2003.

4.3.1.2 Lien entre l'indentation du front d'ossification et l'OC

L'indentation du front d'ossification est inhérente au processus physiologique d'ossification endochondrale. Bien qu'il ait été démontré que ce soit un facteur physiologique du développement, associé à l'entrée d'un vaisseau sous-chondral dans 92% du temps (Lecocq, Girard et al. 2008), ces indentations pourraient avoir un lien avec la susceptibilité à développer de l'OC (van Weeren and Barneveld 1999). En effet, les indentations sont potentiellement des zones biomécaniquement plus faibles (Lewis 1986), et les vaisseaux traversant l'interface cartilage-os peuvent donc être susceptibles à une atteinte vasculaire menant à la chondronécrose ischémique (Hurtig 1996, Lecocq, Girard et al. 2008, Olstad,

Ytrehus et al. 2008c, Olstad, Ytrehus et al. 2011). L'indentation du front d'ossification a été observée surtout au niveau de l'épiphyse distal du fémur (Adams and Thiisted 1985, Fontaine, Blond et al. 2013). Il faut faire la différence entre indentations normales du front d'ossification et lésions précoces du front d'OC. Selon Lecocq et al. (2008), les indentations physiologiques du front d'ossification sont en forme de V alors que, selon Olstad et al. (2014), les lésions d'OC sous-cliniques visibles au niveau du front d'ossification sont en forme semi-circulaire, focales ou multifocales, disposées en escalier (Olstad, Kongsro et al. 2014). Des variations du front d'ossification des condyles des enfants sont aussi rapportées (Laor and Jaramillo 2009, Jans, Jaremko et al. 2012), mais sont souvent considérées comme physiologiques. Une étude récente de Olstad et al. (2018) imageant au CT des épiphyses fémorales distales d'enfants a permis de démontrer grâce à la validation histologique que, comme chez les animaux, certaines variations du front d'ossification ne sont pas physiologiques mais plutôt des lésions sous-cliniques d'OC (Finnoy, Olstad et al. 2018).

4.4 Article 4

Ultrasonographic screening for subclinical osteochondrosis of the femoral trochlea in foals (28-166 days-old): a prospective farm study

Article publié:

Equine Veterinary Journal 2018 May;50(3):312-320

doi: 10.1111/evj.12772. Epub 2017 Nov 9.

Martel, Gabrielle, Comparative Orthopedic Research Laboratory, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada;

Crowley, Daniel, DVM, Fethard Equine Hospital, Fethard, IRELAND;

Olive, Julien, Radiology, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada;

Halley, John, DVM, Fethard Equine Hospital, Fethard, IRELAND;

Laverty, Sheila, Comparative Orthopedic Research Laboratory, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada

Corresponding author's email: sheila.laverty@umontreal.ca

Keywords: Horse, foal, ultrasonography, osteochondrosis, epiphyseal growth cartilage, vascularity

ABSTRACT

BACKGROUND: Extensive osteochondritis dissecans (OCD) lesions of the lateral ridge of the trochlea of the femur (LRTF), the most common OCD- affected site in the stifle, have a poor outcome with surgical debridement and can be career ending. The early detection of osteochondrosis lesions and their conservative management holds the promise to enhance outcome. We hypothesize that ultrasonography is a valuable field screening tool to detect and monitor early subclinical LRTF osteochondrosis.

OBJECTIVES: The goals were 1) to describe the normal ultrasonographic features of the LRTF in foals of different ages and 2) to screen a foal cohort at the farm for early subclinical osteochondrosis lesions.

STUDY DESIGN: Field prospective study.

METHODS: The LRTF of both hindlimbs of Thoroughbred foals (n = 46, 27-166 days-old) were imaged once with ultrasonography and radiography (lateromedial and caudolateral-craniomedial oblique views). Cartilage thickness, ossification front indentation of the chondro-osseous junction and epiphyseal vascularization were assessed on ultrasonography. Follow-up radiographs were taken as yearlings.

RESULTS: The cartilage thickness, ossification front indentation and epiphyseal vascularization significantly decreased with advancing maturity. Subclinical osteochondrosis lesions, characterized by semicircular indentations in the ossification front (indirect evidence of focal failure of ossification and retained cartilage) were detected in 6 foals (28 to 145 days old), both with radiography and ultrasonography. Ultrasonography provided a better overall subjective assessment of the osteochondrosis lesion topography (length, depth and the width) compared with radiography.

MAIN LIMITATIONS: Post mortem validation of lesions was not possible.

CONCLUSION: Ultrasonography of the LRTF is a practical, inexpensive and reliable technique to discriminate physiological from pathological events at the LRTF in young foals. It revealed the complex topography of the chondro-osseous junction permitting a rapid, comprehensive assessment of the subclinical osteochondrosis lesions in very young foals.

INTRODUCTION

Osteochondritis dissecans (OCD) of the femoral trochlea is of economic importance for the equine industry as it is a site with one of the worst prognoses for return to performance following arthroscopic debridement (54%-68%)(Foland, McIlwraith et al. 1992) (UpRichard, Elce et al. 2013). In addition, postoperative performance of operated horses is below that than of their peers (Clarke, Reardon et al. 2015). The real outcome for OCD at this site is probably worse than that reported as surgery may also be declined in horses with extensive lesions. However, in recent years the outcome was reported in North America to be enhanced when fixation of the flaps with resorbable pins was performed in selected cases at an earlier age (Nixon, Fortier et al. 2004, Sparks, Nixon et al. 2011), but some of these very young foals may also have healed naturally with time.

Osteochondrosis lesions of the lateral ridge of the trochlea of the femur (LRTF) may heal up to 8 months of age (Dik, Enzerink et al. 1999). A shear or impact force to the lesion may induce instability or displacement of a cartilaginous flap from its bed, usually laterally (Lavery, unpublished data), preventing ideal healing (Ytrehus, Carlson et al. 2007, Lavery and Girard 2013). The early and accurate detection, and monitoring of subclinical LRTF osteochondrosis lesions holds the promise to improve their outcome, by tailoring management to promote a favorable endogenous healing environment.

There has recently been a plethora of experimental imaging investigations with a goal to detect early osteochondrosis lesions in foals and pigs including CT (both clinical (Olstad, Kongsro et al. 2014) and micro-CT (Olstad, Cnudde et al. 2008a)) and MRI (quantitative (Toth, Nissi et al. 2015, Wang, Nissi et al. 2015, Martel, Couture et al. 2016) and susceptibility-weighted imaging (Toth, Nissi et al. 2013, Nissi, Toth et al. 2014, Toth, Nissi et al. 2015, Martel, Kiss et al. 2016)). However, although advancing knowledge of early lesions and their morphology, these methods are not widely available or economically practical for screening purposes at the farm.

We first reported (2009) that ultrasonography is an accurate diagnostic tool (more sensitive than radiography) for clinical LRTF OCD in foals > 6 months (Bourzac, Alexander et al. 2009) and reveals irregularity of the subchondral bone interface (a “stair-like” discontinuity or disruption due to a fragment). These findings were later confirmed by others (Hinz and Fischer 2011, Beccati, Chalmers et al. 2013). We have also recently reported that

ultrasonography is an accurate tool for assessing the complex epiphyseal structure (ossification front, growth cartilage and vascular architecture) of the LRTF of very young foals (Martel, Forget et al. 2017).

The goals of the current study were to describe the normal ultrasonographic features of the LRTF of foals <6 months-old, and screen a foal cohort for early subclinical osteochondrosis lesions.

METHODS

Animals

Forty-six Thoroughbred foals (26 colts and 20 fillies) were selected from the same farm (Table I). For the descriptive section of the study, the foals were categorized into 3 age groups: group 1, 0-62 days-old (n =15); group 2, 66-121 days-old (n =15) and group 3, 122-166 days-old (n =16).

Ultrasonographic examination

Ultrasonographic screening of both LRTFs was performed employing a 7.5 MHz linear probe (ExaGo^a). The LRTF was selected as 97% of clinical lesions are detected at this site (Bourzac, Alexander et al. 2009) and to facilitate a rapid, practical field imaging technique in foals difficult to handle. The foals were sedated (xylazine (“Rompun^b”) 0.5mg/kg and burtorphanol (“Torbugesic^c”) 0.02mg/kg IV) to facilitate the procedure. The skin was moistened with alcohol and acoustic gel but the hair was not clipped. Sagittal ultrasonographic images of the summit and transverse images (proximal, middle and distal third) of the LRTF were archived for later assessment (Fig.S1).

The cartilage thickness (combined articular and epiphyseal cartilage) and the ossification front indentation (ratio of the length of the chondro-osseous junction to the width of the subchondral bone) were calculated on transverse images with Image J software^d, as described by Martel et al, (Martel, Forget et al. 2017). The cartilage canal patterns (hyperechoic lines or flecks corresponding to the cartilage-vessel interfaces (Martel, Forget et al. 2017) were also subjectively assessed on sagittal and transverse images. The archived sonograms were evaluated for evidence of subclinical osteochondrosis lesions by consensual agreement of 2 observers.

Radiographic evaluation

Lateromedial (LM) and caudolateral-craniomedial oblique (CdL-CrMO) radiographic projections of both stifles of all foals were also acquired. Follow up radiographs were also taken when the foals were yearlings. The radiographs were assessed for osteochondrosis lesions by 2 observers.

Statistical analysis

A mixed model was employed to perform polynomial regressions between cartilage thickness or ossification front indentation and age at the different sites (LRTF proximal, middle and distal) and to evaluate if there was a difference between the slopes at the different sites. To assess the relationship between cartilage thickness or ossification front indentation and age, a linear mixed model was used with the individual as a random effect, the sites and the side (left or right) as fixed effects and the age as a fixed continuous value. A value of $P < 0.05$ was considered significant for all tests. All analyses were performed with commercial statistical software (SAS version 9.4^e).

RESULTS

Standardization of the ultrasound protocol

The best quality images were acquired when the foals were weight-bearing and standing square. When performing the sagittal evaluation, it was important that the probe was placed on the pinnacle of the crest of the LRTF. When positioned axially, the ossification front near the intertrochlear groove was more irregular than at the pinnacle. We observed that foals less than 3 months-old had longer hair over the stifle and required the additional application of alcohol and acoustic gel, with a waiting period before the scan, in order to get the best image.

Normal sonographic features of the LRTF

Cartilage thickness, ossification front indentation and the presence of cartilage canal-vessel interfaces all decreased with increasing maturity (Fig.1&2). Foals in the same age group also had occasionally variable levels of epiphyseal maturation (Fig.S2).

Group 1: 27 – 62 day-old foals

The cartilage was thick and contained abundant cartilage canal-vessel interfaces with a different architecture within each third of the LRTF (Fig.1c-f). Proximally, the cartilage was thicker and the cartilage canal-vessel interfaces were parallel to the ossification front (Fig.1d). In the middle third of the trochlea, some cartilage canal-vessel interfaces bridged perpendicular to the ossification front (Fig.1e). Distally, the cartilage was thinner, compared to the proximal site on the trochlea, and there were fewer cartilage canal-vessel interfaces, mainly perpendicular to the ossification front (Fig.1f).

The ossification front was highly indented in this age group and therefore ultrasonography permitted a better assessment of normal developmental variations compared with radiography. It was possible to assess the shape of the indentations with ultrasonography to determine whether the indentations were within physiological limits or not. Indentations with a V shape (Fig.3a,b) are considered physiological based on our previous histological investigations of this site (Lecocq, Girard et al. 2008) whereas semicircular and wider indentations (Fig.3e,f) were judged to be subclinical osteochondrosis. Some small focal circular areas of cartilage retention within the ossification front were often observed in this group, and not considered of clinical concern (Fig.3c,d).

The CdL-CrMO radiographic view permitted a better overview of the ossification front indentations, in this age group compared to the LM views.

Group 2: 66-121 day-old foals

The cartilage canal-vessel interfaces were still visible, but the cartilage was thinner and the ossification front was less indented, appearing more homogeneous and thinner when compared to group 1 (Fig.1i-l). There were more indentations within the middle third of the trochlear ridge when compared to proximal and distal trochlear sites (Fig.1j-l). The difference in cartilage thickness between proximal and distal region was less obvious (Fig.1j-l). The cartilage canal-vessel interfaces in the middle and distal thirds were mainly perpendicular to the ossification front (Fig.1k,l).

Radiographs were easier to interpret compared with Group 1. In the LM view, the proximal medial ridge of the trochlea was not superimposed with the LRTF (Fig.1g).

Group 3: 122 – 180 day-old foals

The ultrasonographic appearance was very different from groups 1 and 2. The cartilage thickness was similar between the proximal, middle and distal thirds of the trochlear ridge (Fig.1o-r) and was thinner. There were still a few remaining cartilage canal-vessel interfaces present, and all bridged perpendicular into the ossification front. The ossification front is thinner and smoother when compared to younger foals. Very subtle or no indentations remained.

On the radiographs, the bone contour of the LRTF is smooth and homogeneous from proximal to distal (Fig.1m,n).

Ultrasonographic appearance of early osteochondrosis lesions

Subclinical osteochondrosis lesions were suspected in 6 foals: 28 (Fig.4a-d), 54 (Fig.4e-h), 67 (Fig.5a-d), 118 (Fig.5e-h) and 145 (n=2) (Fig.6) days-old (Table I). No prior lameness or femoropatellar effusion was detected in these foals. Lesions were either focal or multifocal hypoechoic semicircular areas within the ossification front (Fig.5c,d). Although an abnormal chondro-osseous interface (increased irregularity or radiolucent areas) was also observed on the concurrent radiographs in all the foals, the ultrasound sagittal and transverse images permitted a better assessment of the topography (depth and width), particularly in the youngest foals and helped confirm a radiographic suspicion of lesions. A fragment was suspected on the CdL-CrMO radiograph of foal #12 (Fig.4f), and was also visible on the sagittal sonogram (Fig.4g). On the transverse images of the same foal, the lesion was deep and the ossification front was interrupted in the depth of the semicircular lesion (Fig.4h). Foal #28 had a lesion identified before the present study at 75 days-old (Fig.S3). On the CdL-CrMO radiograph, the lesion appeared almost healed (Fig.5f), but was revealed to be much more extensive on the ultrasonographic examination (Fig.5g,h).

Follow-up radiographs at 1 year of age or more

None of the foals had evidence of osteochondrosis lesions on the radiographic examination at one year of age or older, indicating that all the foals identified earlier as healthy based on the radiographic and ultrasonographic examination remained osteochondrosis free at this site and those with subclinical lesions healed (data not shown).

Statistical analysis

Ultrasonographic cartilage thickness and ossification front measurements are provided in Table SI and illustrated in Figure 2. Some values (7/276) were excluded because of the presence of a suspected subclinical lesion and 5/276 cartilage thickness and 3/276 ossification front values were considered inaccurate because of technical challenges. No significant difference were detected between left and right limb values. There was a significant non-linear negative relationship between cartilage thickness and age (β [SEM] for the linear component: -0.0039 [0.00027], $p < 0.0001$; β [SEM] for the non-linear component: 0.000024 [0.000007], $p < 0.0001$) and between ossification front indentation and age (β [SEM] for the linear component: -0.0012 [0.00016], $p < 0.0001$; β [SEM] for the non-linear component: 0.000012 [0.000003], $p < 0.0001$). The slope of the relationship between cartilage thickness and age was significantly higher in the proximal LRTF (β [SEM]: 0.001 [0.00019], $p < 0.0001$) and the middle LRTF (β [SEM]: 0.0011 [0.00019], $p < 0.0001$) compared to the distal LRTF, and there was no significant difference between the proximal and middle LRTF (β [SEM]: 0.00007 [0.00019], $p = 0.72$). The slope of the relationship between ossification front indentation and age was also significantly higher in the middle LRTF compared to the proximal LRTF (β [SEM]: 0.0012 [0.0002], $p < 0.0001$) and the distal LRTF (β [SEM]: 0.0013 [0.0002], $p < 0.0001$), and there was no significant difference between the proximal and distal LRTF (β [SEM]: 0.00014 [0.0002], $p = 0.49$). Post-hoc Turkey tests when pooling values from all ages revealed the mean cartilage thickness was significantly lower in the distal LRTF compared to the proximal and middle LRTF and the mean ossification front indentation was significantly higher in the middle LRTF compared to the proximal and distal LRTF.

DISCUSSION

This is the first study, to the best of our knowledge, that describes the complex ultrasonographic features of the LRTF in foals younger than 6 months-old and will serve as a reference for the interpretation of ultrasonographic images at this site. The understanding of the normal hyperechogenic pattern of the epiphyseal cartilage-bone interface in the different regions of the trochlea and at various stages of development and on different ultrasonographic

views permitted the identification of focal or multifocal semicircular areas that we interpreted as delays of ossification front progression, pathognomonic of early osteochondrosis (Olstad, Kongsro et al. 2014).

We previously validated the accuracy of the ultrasonographic measurements of the cartilage thickness and ossification front indentation in neonatal foals (Martel, Forget et al. 2017). The present study extends these findings and provides both qualitative and quantitative data of the normal cartilage thickness and ossification front indentation at different ages, in addition to a description of the maturing cartilage canal architecture at this site in a substantial sample of young foals.

It is well known that some femoropatellar osteochondrosis lesions were missed or underestimated on radiographs in the past (Steinheimer, McIlwraith et al. 1995, Sullins 2002). Ultrasound has the advantage of being cost effective, readily available, and is an easily applicable method for field screening of subclinical osteochondrosis lesions. Furthermore, ultrasonography allows the additional assessment of the depth and width of the lesions in multiple planes, compared with radiography, providing a more accurate assessment. We previously reported that ultrasonography is a sensitive and specific diagnostic modality for clinical femoral OCD in foals >6 months-old (Bourzac, Alexander et al. 2009). The current study extends our previous observations to younger foals and reveals that ultrasonography permits assessment of subclinical osteochondrosis lesions. It does so by revealing the complete topography of the lesion at the chondro-osseous interface in all dimensions, unlike standard radiographic views that are limited because of superposition issues.

The expression of osteochondrosis lesions depends on polygenic traits and their interaction with environmental conditions such as exercise and nutrition (van Weeren and Jeffcott 2013). This is particularly important in respect to LRTF osteochondrosis, as heritability is low at this site compared to other joints (van Grevenhof, Schurink et al. 2009, Russell, Matika et al. 2016). Subclinical osteochondrosis lesions of the LRTF can regress up to 8 months of age (Dik, Enzerink et al. 1999). Consequently, it is important to diagnose them early in this healing window, as exercise restriction may create a more stable microenvironment in the joint and diminish risks of focal trauma to lesions, and provide an optimal scenario for healing and lesion regression. Successful healing of small LRTF lesions with conservative treatment (foals 5.5 to 17 months-old) has been reported (McIntosh and

McIlwraith 1993). Conservative treatment has, in the past, been recommended for osteochondrosis lesions less than 2 cm long and 5 mm deep without radiographic fragmentation (McIlwraith 2013). A greater success rate with conservative treatment was also reported when the LRTF osteochondrosis lesions were diagnosed younger (5.5 to 8 months-old) compared to older (10-17 months-old) (McIntosh and McIlwraith 1993). In human medicine, conservative management of OCD lesions of the femur is proposed initially to patients when the articular surface is intact on MRI and no fragments are visible (McCoy, Toth et al. 2013).

The earliest histological lesions of LRTF osteochondrosis are focal areas of ischemic chondronecrosis of the epiphyseal cartilage (Carlson, Meuten et al. 1991) that do not undergo endochondral ossification. Contrast-enhanced power doppler ultrasound examination has revealed cartilage ischemia of the femoral head induced by hip hyperabduction experimentally in piglets (Barnewolt, Jaramillo et al. 2003). However, preliminary results of Doppler ultrasound to detect growth cartilage vascularity or ischemic events in our laboratory have been disappointing (unpublished data) because of foal movement, even with sedation, precluding a satisfactory examination.

As this was a field study, a limitation is that no histologic validation of the observed lesions could be performed for obvious reasons. However we have previously extensively validated the ultrasonographic features of the femoral trochlea epiphyseal cartilage with both histology and sophisticated MRI imaging techniques for vascularity assessment (3T susceptibility-weighted imaging (Martel, Forget et al. 2017) and are confident that the lesions we observed here not normal features of development. It would of interest to perform larger scale longitudinal studies to assess the capacity of this imaging technique to monitor evolution of subclinical lesions over time.

In summary, ultrasonography is a reliable imaging technique for screening the LRTF in young foals for early osteochondrosis as it permits an accurate assessment of delays of ossification front progression pathognomonic of osteochondrosis. The ultrasonographic features of the femoral epiphysis of foals (0-6 months) changes with maturity and discrimination between ossification variations and early subclinical osteochondrosis is now possible.

Manufacturer's details

^a Echo Control Mondial, Angoulême, France

^b Zoetis, Madison, New Jersey, United-States

^c Bayer, Leverkusen, North Rhine-Westphalia, Germany

^d Wright Cell Imaging Facility, Toronto Western Research Institute, Toronto, Canada

^e SAS, version 9.4, SAS Institute Inc, Cary, NC

Supplementary information list

Table S-I: Cartilage thickness (cm) and ossification front indentation measurements.

Figure S1: Ultrasonographic evaluation.

Figure S2: Example of different rate of maturation in foals the same age.

Figure S3: Foal#24 radiographs at 75 d. and 118 d. showing a healing lesion.

Competing interests: None

Sources of funding: This project was founded by Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ).

Sheila Laverty's laboratory is currently funded by the National Science and Engineering Council of Canada (NSERC) the Réseau ThéCell, Fonds de Recherche en Santé Québec (FRSQ) and also by a generous gift from Mr and Mrs J Magnier, Coolmore Stud, Fethard, Ireland.

Acknowledgements

We would like to thank the following people for their contributions: Marie-Maude Bolduc for her technical assistance with ultrasonographic examination, Dr Guy Beauchamps for statistical analyses and Hélène Richard for the layout of the figures and manuscript

Tableau XXI. Table I: Foals included in the study

	<u>Foal #</u>	<u>Sex</u>	<u>Age (days)</u>	
Group 1	1	M	27	
	2*	F	28	* subclinical lesion LH, middle, femoropatellar effusion
	3	M	31	
	4	F	32	
	5	M	33	
	6	F	35	
	7	F	42	
	8	F	43	
	9	M	45	
	10	F	47	
	11	M	51	
	12*	M	54	* subclinical lesion LH, middle, presence of a fragment
	13	M	61	
	14	F	62	
	15	M	62	
Group 2	16	F	66	
	17*	M	67	* subclinical lesion RH, proximal and middle
	18	M	68	
	19	F	73	
	20	M	77	
	21	M	90	
	22	M	96	
	23	F	98	
	24	F	98	
	25	F	103	
	26	M	107	
	27	F	115	
	28*	M	118	* subclinical lesion RH, middle, lesion identified at 75 days
	29	F	120	
	30	F	121	
Group 3	31	F	122	
	32	M	123	
	33	F	123	
	34	M	124	
	35	M	126	
	36	M	127	
	37	F	128	
	38	F	132	
	39	M	139	
	40	M	142	
	41*	F	145	* subclinical lesion LH, middle
	42	M	145	
	43*	M	145	* subclinical lesion RH, middle
	44	M	150	
	45	M	153	
	46	M	166	

References

- [1] Foland, J.W., McIlwraith, C.W. and Trotter, G.W. (1992) Arthroscopic surgery for osteochondritis dissecans of the femoropatellar joint of the horse. *Equine Vet J* **24**, 419-423.
- [2] UpRichard, K., Elce, Y.A., Piat, P., Beauchamp, G. and Laverty, S. (2013) Outcome after arthroscopic treatment of lateral femoral trochlear ridge osteochondrosis in sport horses. A retrospective study of 37 horses. *Vet Comp Orthopaed* **26**, 105-109.
- [3] Clarke, K.L., Reardon, R. and Russell, T. (2015) Treatment of osteochondrosis dissecans in the stifle and tarsus of juvenile thoroughbred horses. *Vet Surg* **44**, 297-303.
- [4] Nixon, A., Fortier, L., Goodrich, L. and Ducharme, N. (2004) Arthroscopic reattachment of osteochondritis dissecans lesions using resorbable polydioxanone pins. *Equine Vet J* **36**, 376-383.
- [5] Sparks, H.D., Nixon, A.J., Fortier, L.A. and Mohammed, H.O. (2011) Arthroscopic reattachment of osteochondritis dissecans cartilage flaps of the femoropatellar joint: long-term results. *Equine Vet J* **43**, 650-659.
- [6] Dik, K.J., Enzerink, E. and van Weeren, P.R. (1999) Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine Vet J Suppl* **31**, 9-15.
- [7] Ytrehus, B., Carlson, C.S. and Ekman, S. (2007) Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Vet Pathol* **44**, 429-448.

- [8] Laverty, S. and Girard, C. (2013) Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis. *Vet J* **197**, 3-12.
- [9] Olstad, K., Kongsro, J., Grindflek, E. and Dolvik, N.I. (2014) Ossification defects detected in CT scans represent early osteochondrosis in the distal femur of piglets. *J Orthop Research* **32**, 1014-1023.
- [10] Olstad, K., Cnudde, V., Masschaele, B., Thomassen, R. and Dolvik, N.I. (2008) Micro-computed tomography of early lesions of osteochondrosis in the tarsus of foals. *Bone* **43**, 574-583.
- [11] Toth, F., Nissi, M.J., Wang, L., Ellermann, J.M. and Carlson, C.S. (2015) Surgical induction, histological evaluation, and MRI identification of cartilage necrosis in the distal femur in goats to model early lesions of osteochondrosis. *Osteoarthritis Cartilage* **23**, 300-307.
- [12] Wang, L., Nissi, M.J., Toth, F., Shaver, J., Johnson, C.P., Zhang, J., Garwood, M., Carlson, C.S. and Ellermann, J.M. (2015) Multiparametric MRI of Epiphyseal Cartilage Necrosis (Osteochondrosis) with Histological Validation in a Goat Model. *PloS one* **10**, e0140400.
- [13] Martel, G., Couture, C.A., Gilbert, G., Bancelin, S., Richard, H., Moser, T., Kiss, S., Légaré, F. and Laverty, S. (2016) Femoral epiphyseal cartilage matrix changes at predilection sites of equine osteochondrosis: Quantitative MRI, second-harmonic microscopy, and histological findings. *J Orthop Res* **34**, 1743-1752.
- [14] Nissi, M.J., Toth, F., Zhang, J., Schmitter, S., Benson, M., Carlson, C.S. and Ellermann, J.M. (2014) Susceptibility weighted imaging of cartilage canals in porcine epiphyseal growth cartilage ex vivo and in vivo. *Magn Reson Med* **71**, 2197-2205.

- [15] Toth, F., Nissi, M.J., Zhang, J., Benson, M., Schmitter, S., Ellermann, J.M. and Carlson, C.S. (2013) Histological confirmation and biological significance of cartilage canals demonstrated using high field MRI in swine at predilection sites of osteochondrosis. *J Orthop Res* **31**, 2006-2012.
- [16] Toth, F., Nissi, M.J., Ellermann, J.M., Wang, L., Shea, K.G., Polousky, J. and Carlson, C.S. (2015) Novel Application of Magnetic Resonance Imaging Demonstrates Characteristic Differences in Vasculature at Predilection Sites of Osteochondritis Dissecans. *Am J Sports Med* **43**, 2522-2527.
- [17] Martel, G., Kiss, S., Gilbert, G., Anne-Archard, N., Richard, H., Moser, T. and Laverty, S. (2016) Differences in the vascular tree of the femoral trochlear growth cartilage at osteochondrosis-susceptible sites in foals revealed by SWI 3T MRI. *J Orthop Res* **34**, 1539-1546.
- [18] Bourzac, C., Alexander, K., Rossier, Y. and Laverty, S. (2009) Comparison of radiography and ultrasonography for the diagnosis of osteochondritis dissecans in the equine femoropatellar joint. *Equine Vet J* **41**, 685-692.
- [19] Beccati, F., Chalmers, H.J., Dante, S., Lotto, E. and Pepe, M. (2013) Diagnostic sensitivity and interobserver agreement of radiography and ultrasonography for detecting trochlear ridge osteochondrosis lesions in the equine stifle. *Vet Radiol Ultrasound* **54**, 176-184.
- [20] Hinz, A. and Fischer, A.T., Jr. (2011) Comparison of the accuracy of radiography and ultrasonography for detection of articular lesions in horses. *Vet Surg* **40**, 881-885.
- [21] Martel, G., Forget, C., Gilbert, G., Richard, H., Moser, T., Olive, J. and Laverty, S. (2017) Validation of the ultrasonographic assessment of the femoral trochlea epiphyseal cartilage in foals at osteochondrosis predilected sites with MRI and histology. *Equine Vet J*.

- [22] Lecocq, M., Girard, C.A., Fogarty, U., Beauchamp, G., Richard, H. and Lavery, S. (2008) Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis? *Equine Vet J* **40**, 442-454.
- [23] Sullins, K.E. (2002) The stifle. In: *Adams' Lameness in Horses, 5th edn.*, 5th edn., Ed: L.W.W. T.S. Stashak, Philadelphia. pp 999-1027.
- [24] Steinheimer, D.N., McIlwraith, C.W., Park, R.D. and Steyn, P.F. (1995) Comparison of radiographic subchondral bone changes with arthroscopic findings in the equine femoropatellar and femorotibial joints: a retrospective study of 72 joints (50 horses). *Vet Radiol Ultrasound* **36**, 478-484.
- [25] van Weeren, P.R. and Jeffcott, L.B. (2013) Problems and pointers in osteochondrosis: Twenty years on. *Vet J* **197**, 96-102.
- [26] Russell, J., Matika, O., Russell, T. and Reardon, R.J. (2016) Heritability and prevalence of selected osteochondrosis lesions in yearling Thoroughbred horses. *Equine Vet J*.
- [27] van Grevenhof, E.M., Schurink, A., Ducro, B.J., van Weeren, P.R., van Tartwijk, J.M., Bijma, P. and van Arendonk, J.A. (2009) Genetic variables of various manifestations of osteochondrosis and their correlations between and within joints in Dutch warmblood horses. *J Anim Sci* **87**, 1906-1912.
- [28] McIntosh, S. and McIlwraith, C. (1993) Natural history of femoropatellar osteochondrosis in three crops of Thoroughbreds. *Equine Vet J* **25**, 54-61.
- [29] McIlwraith, C.W. (2013) Surgical versus conservative management of osteochondrosis. *Vet J* **197**, 19-28.

- [30] McCoy, A.M., Toth, F., Dolvik, N.I., Ekman, S., Ellermann, J., Olstad, K., Ytrehus, B. and Carlson, C.S. (2013) Articular osteochondrosis: a comparison of naturally-occurring human and animal disease. *Osteoarthritis Cartilage* **21**, 1638-1647.
- [31] Carlson, C.S., Meuten, D.J. and Richardson, D.C. (1991) Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res* **9**, 317-329.
- [32] Barnewolt, C.E., Jaramillo, D., Taylor, G.A. and Dunning, P.S. (2003) Correlation of contrast-enhanced power Doppler sonography and conventional angiography of abduction-induced hip ischemia in piglets. *Am J Roentgenol* **180**, 1731-1735.

Figure legends

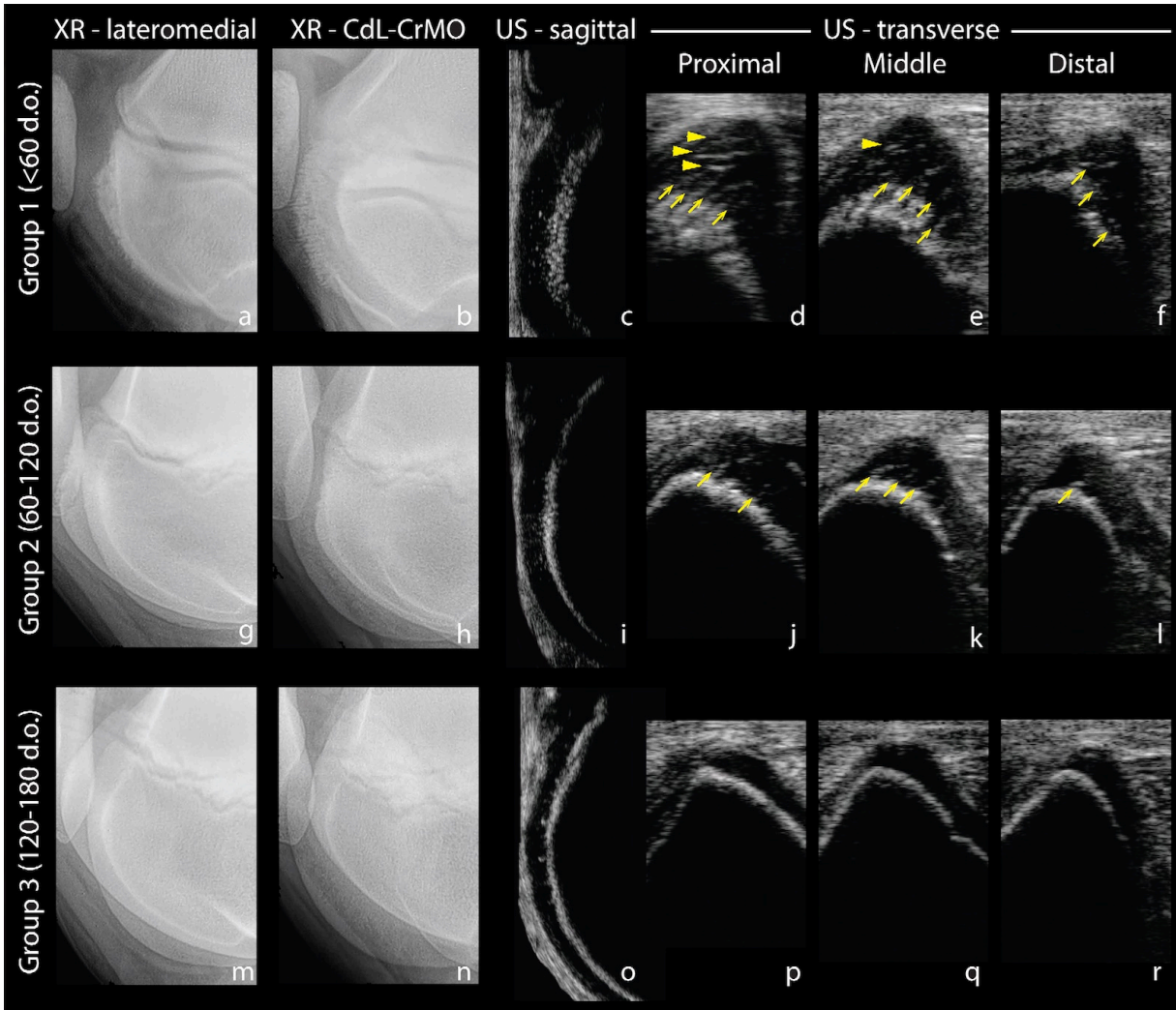


Figure 52. Figure 1. Normal radiographic and ultrasonographic appearance of the LRTF (< 6 months). Representative radiographic and ultrasound images of the LRTF in foals of different ages. Radiographs :There is a superimposition of the lateral and medial trochlear ridges on LM radiographic view in the younger foals (a). The CdL-CrMO view exposes the irregular chondro-osseous interface of the LRTF (b). The chondro-osseous interface is more defined with increasing age (g,h) and is uniformly smooth in the older foals (m,n). US examination: The total cartilage thickness (articular and underlying epiphyseal growth cartilage), the topography of the chondro-osseous interface of the ossification front and the cartilage canal-vessel interface of the epiphyseal growth cartilage are revealed. The cartilage thickness is greatest in the youngest foals (c-f)

compared to older foals and at the proximal site (c,d;i,j;o,p) compared to middle and distal sites. The chondro-osseous interface of the ossification front is highly indented in the youngest foals, particularly in the proximal (d) and middle thirds (e) of the LRTF and becomes smoother and thinner in the oldest foals. Many cartilage-vessel interfaces are present (arrows) in the epiphyseal growth cartilage of the youngest foals. Some of these cartilage-vessel interfaces, within the thickest cartilage, run parallel to the ossification front (d,e) in the proximal and middle sites (arrow heads) compared with a more perpendicular orientation in the distal site (f). Cartilage-vessel interfaces are mainly perpendicular in the older foals and only a few cartilage-vessel interfaces remain present in the third age group. Key: LRTF = lateral ridge of the trochlea of the femur, XR = radiography, LM = Lateromedial view, CdL-CRMO = Caudolateral – Craniomedial Oblique, US = ultrasound, d. = days of age.

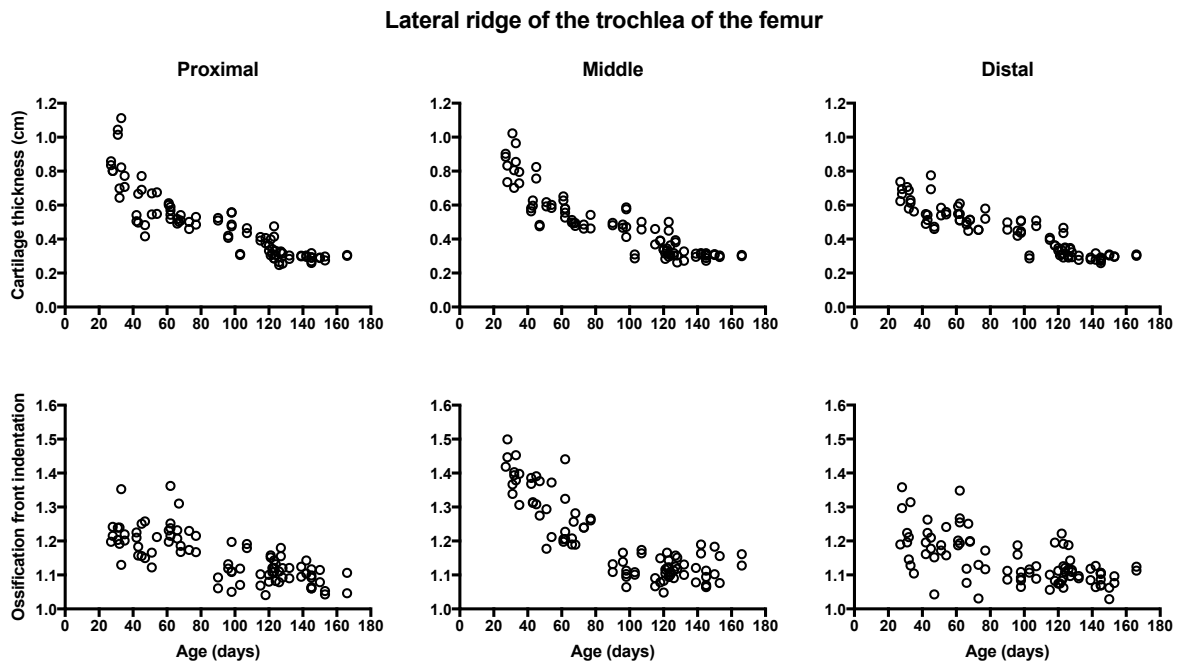


Figure 53. Figure 2. Cartilage thickness and ossification front indentation values measured on ultrasonographic examination at 3 LRTF sites. 46 foals were examined. Both the cartilage thickness and the ossification front decreases with increasing age.

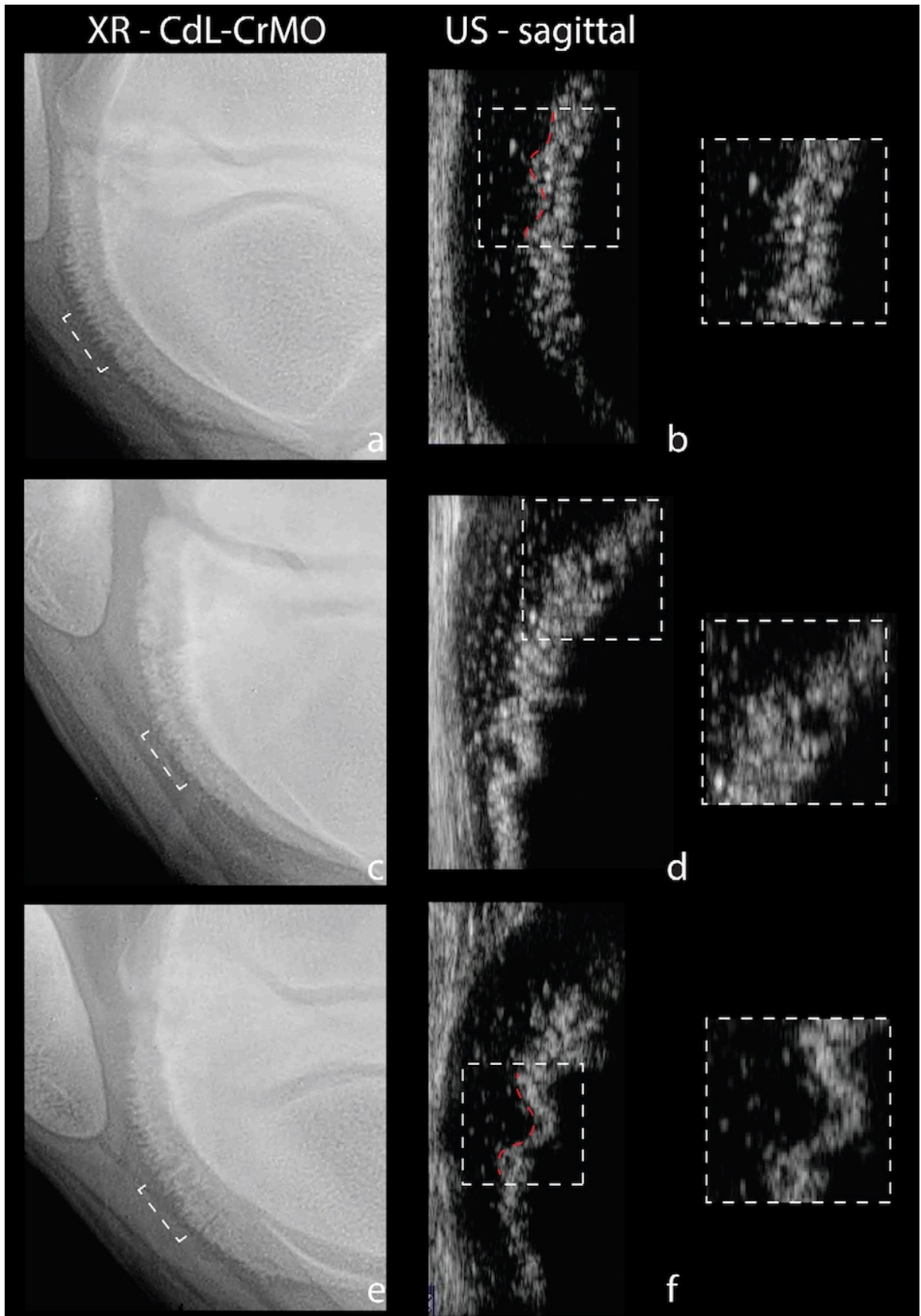


Figure 54. Figure 3. Physiological morphologic ultrasonographic variations within the ossification front in younger foals (Group 1) compared with early subclinical osteochondrosis lesions. The left panel illustrates the CdL-CRMO radiographic view (a,c,e) and corresponding US images (b,d,f). The broken line on radiographs corresponds to the dotted squares (US images). Distinct V shape indentations within the ossification front (b) were considered normal for the purposes of this investigation as we have previously reported (Lecocq, Girard et al. 2008). Small focal circular areas of cartilage retention within the ossification front were also considered normal and in the process of endochondral ossification (d). A semicircular wider, focal or multifocal, US lesion was considered to be early osteochondrosis (f). Key: see Figure 1.

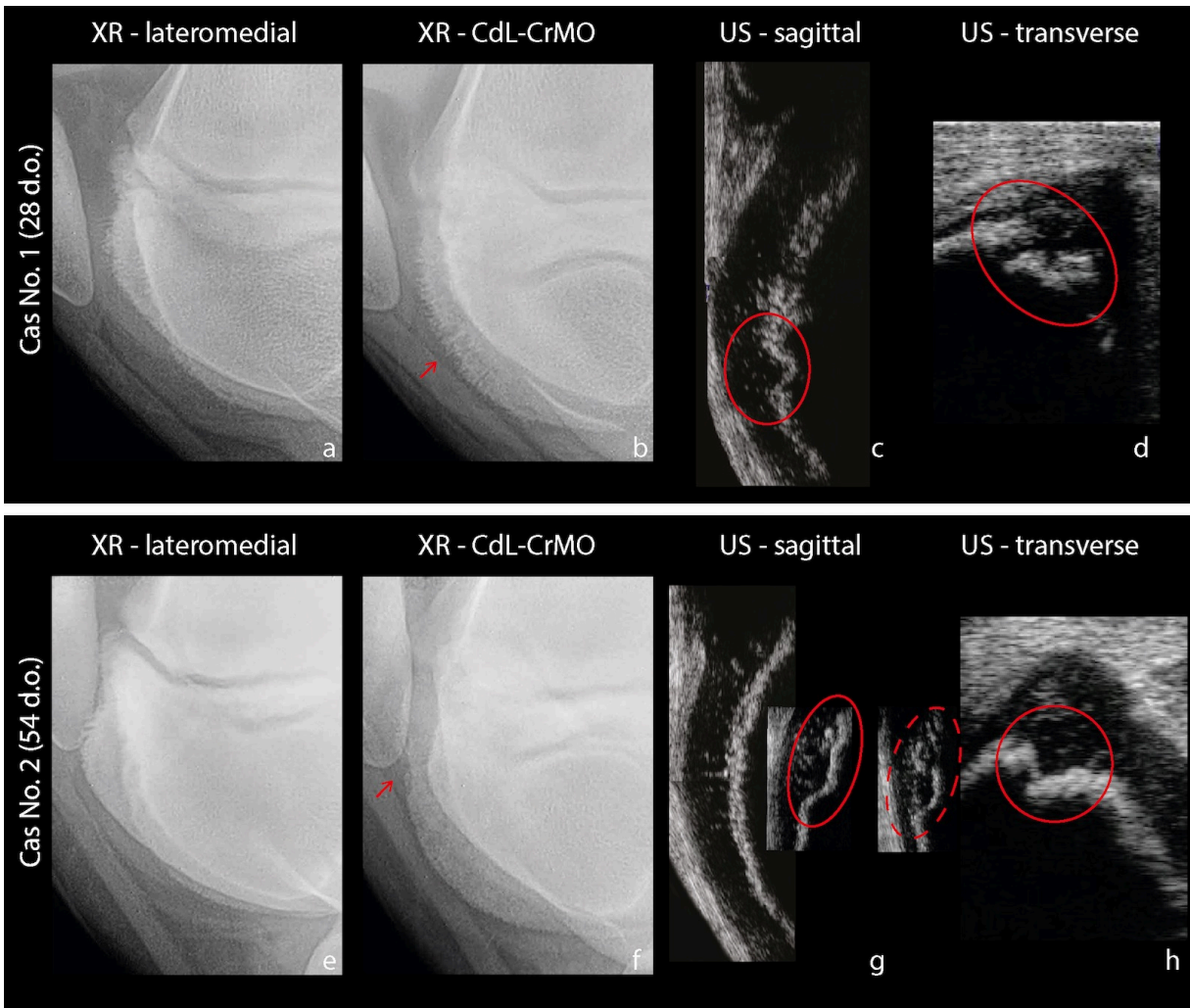


Figure 55. Figure 4. Subclinical osteochondrosis lesions: Group 1. Case 1 a 28 d. filly with a lesion in the middle third of the LRTF (a-d). Patchy radiolucent areas on the CdL-CrMO radiographic view (arrow) (b). The ultrasonographic examination revealed focal, semi-lunar, hypoechogetic areas (c, red circle). The transverse sonogram (d) reveals complimentary topography (width and depth) of the chondro-osseous interface axially. Case 2 a 54 d. foal with a lesion within the middle third of the LRTF (e-h). Irregularity of the subchondral bone is visible on the LM view (arrow) (e), and further confirmed on the CdL-CrMO view (f). The latter view also reveals an osteochondral fragment. A semilunar lesion was visible with the US probe oriented axio-abaxially (red circle) and a fragment was also visualized (red dotted circle) confirming the radiographic findings (g). The transverse sonogram revealed the topography (width and depth) of chondro-osseous interface axially (h). Key: see Figure 1.

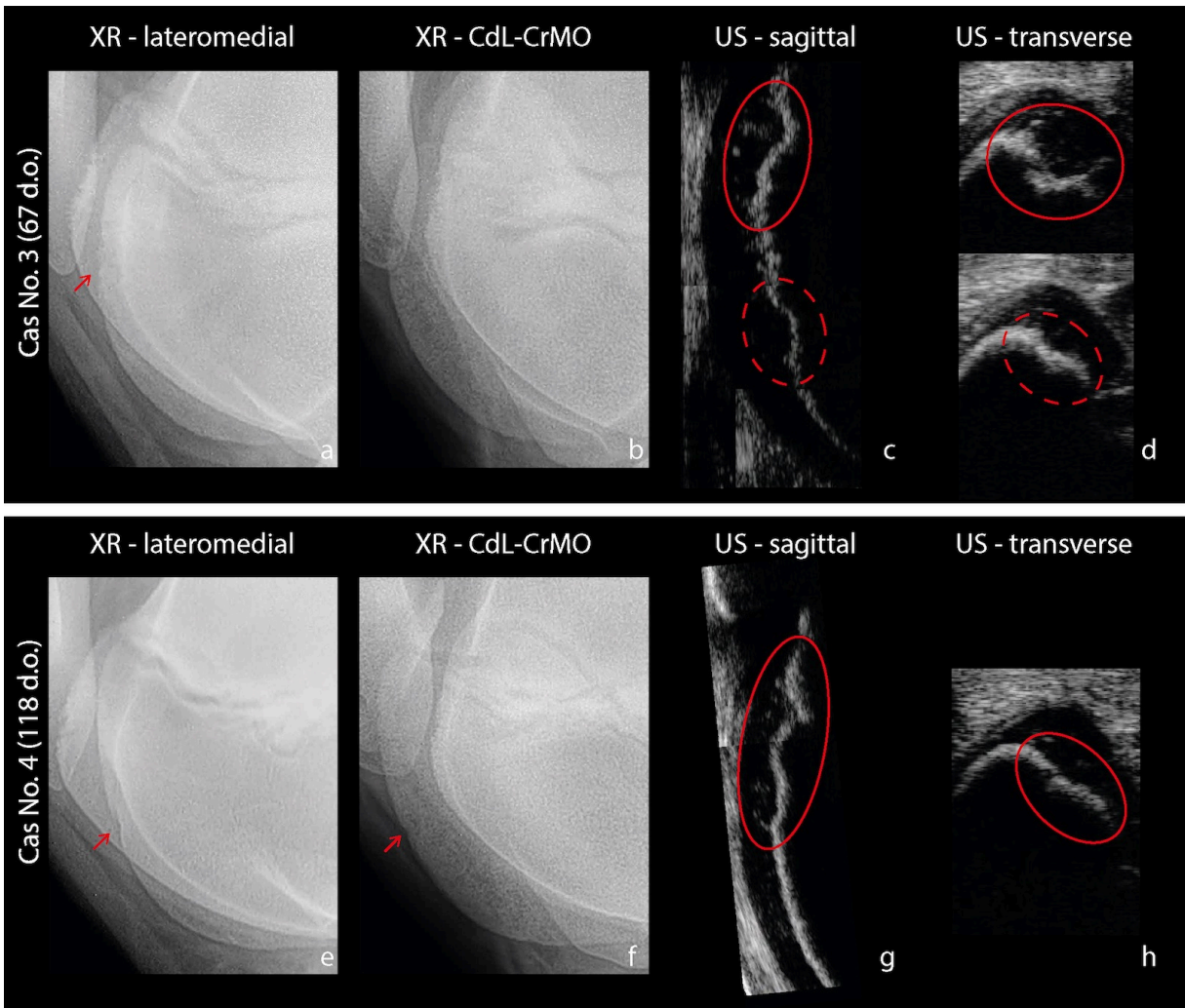


Figure 56. Figure 5. Subclinical osteochondrosis lesions: Group 2. Case 3 (a-d) a 67 d. foal with a lesion in the proximal/middle third of the LRTF (a-d). Lesion on the LM view (arrow) (a) but not on the CdL-CrMO (b). The ultrasonographic examination revealed a multifocal semilunar depression in the ossification front (red circle) and also another focal semilunar depression more distally (red dotted circle) visible on the sagittal scan (c). The transverse sonogram (d) reveals the complimentary topography (width and depth) of chondro-osseous interface axially of the proximal site (top) and the distal site (bottom). Case 4 a 118 d. foal with an healing lesion in the middle third of the LRTF (previously identified at 75 d.) (e-h). The lesions appeared mostly healed on the radiographs (arrows) (e, f), but the ultrasonographic examination revealed a multi focal semi-circular defect (red circle) (g, h). Key: see Figure 1.

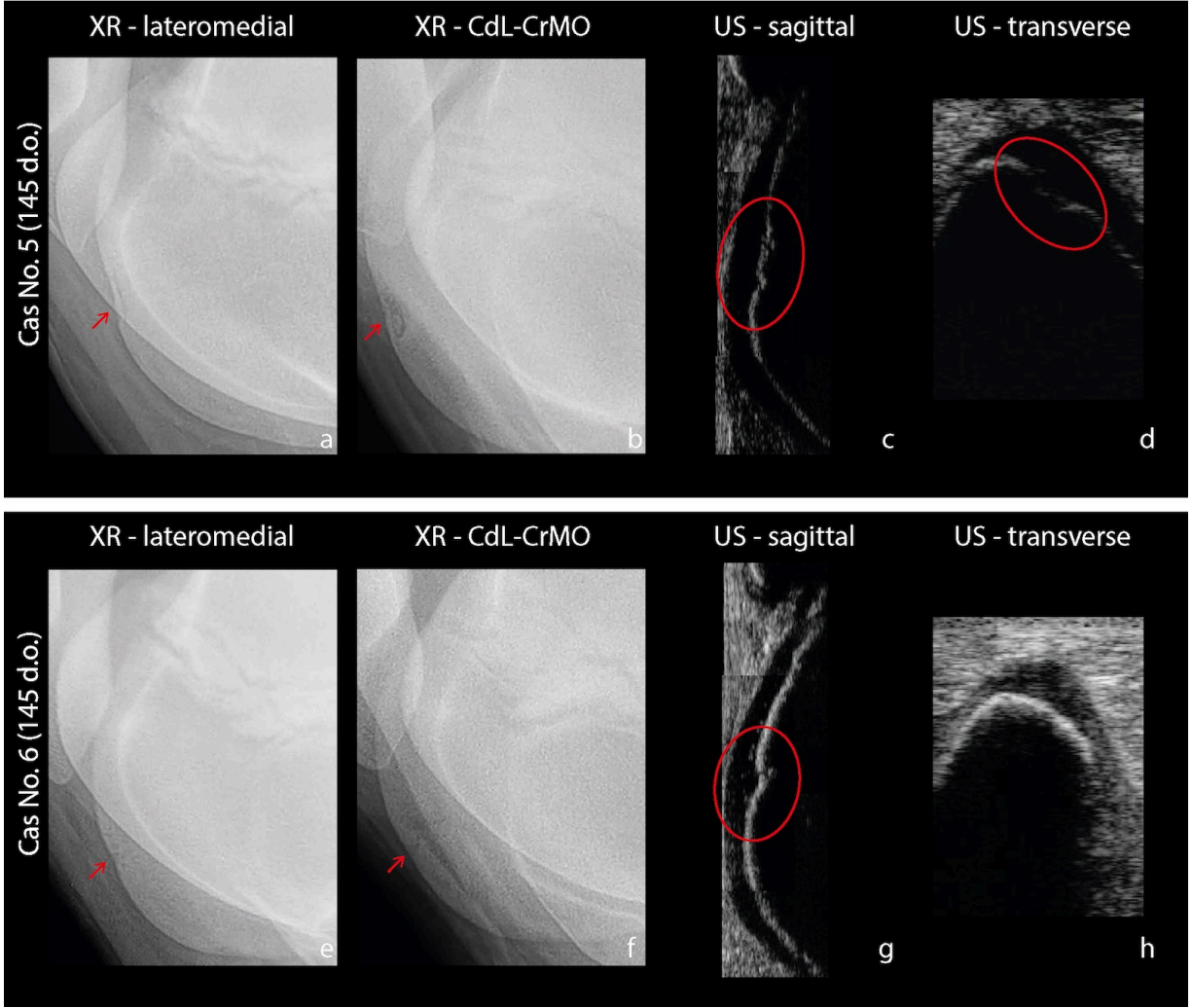


Figure 57. Figure 6. Subclinical osteochondrosis lesions in Group 3. Case 5 a 145 d. filly with a lesion in the middle third of the LRTF, visible on the LM (arrow) (a) and CdL-CrMO (b) radiographic views. The ultrasonographic examination of this site revealed a semilunar large depression, of minimal depth (red circle) on the sagittal (c) and transverse (d) scan. Case 6 a 145 d. foal with a small lesion in the middle third of the LRTF barely visible (arrows) on radiographs (e, f). On the sagittal assessment, a focal small semi-lunar lesion (red circle) was visible (g), and the transverse sonogram revealed only a focal thickening of the cartilage (h). Key: see Figure 1.

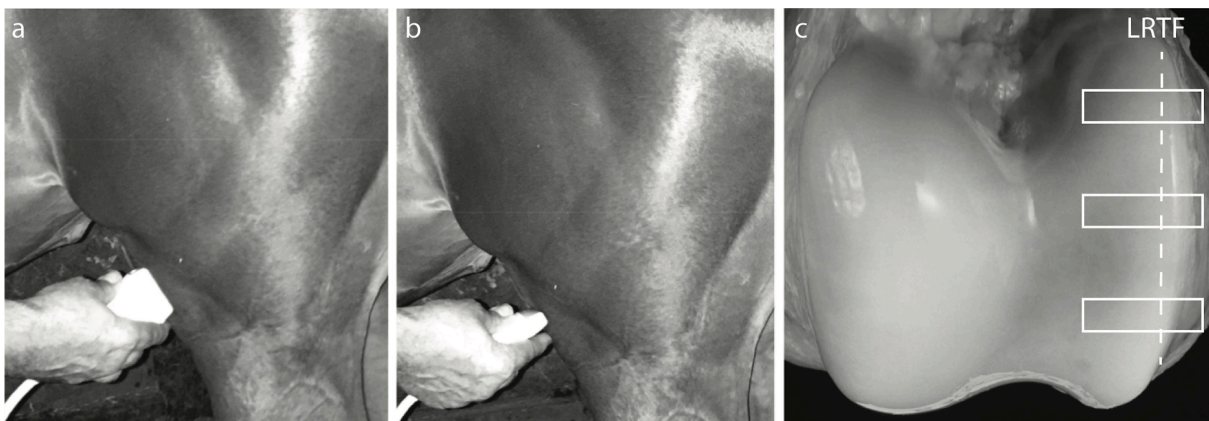


Figure 58. Figure S1. Ultrasonographic evaluation. Probe positioned over the LRTF for the sagittal (a) and transverse (b) assessment. Distal femoral trochlea illustrating the regions of the LRTF studied (c). The dotted lines illustrate the position of the probe over the pinnacle of the LRTF for the sagittal assessment and the rectangles illustrate the proximal, middle and transverse regions selected for ultrasonographic assessment. Key: LRTF: see Figure 1.

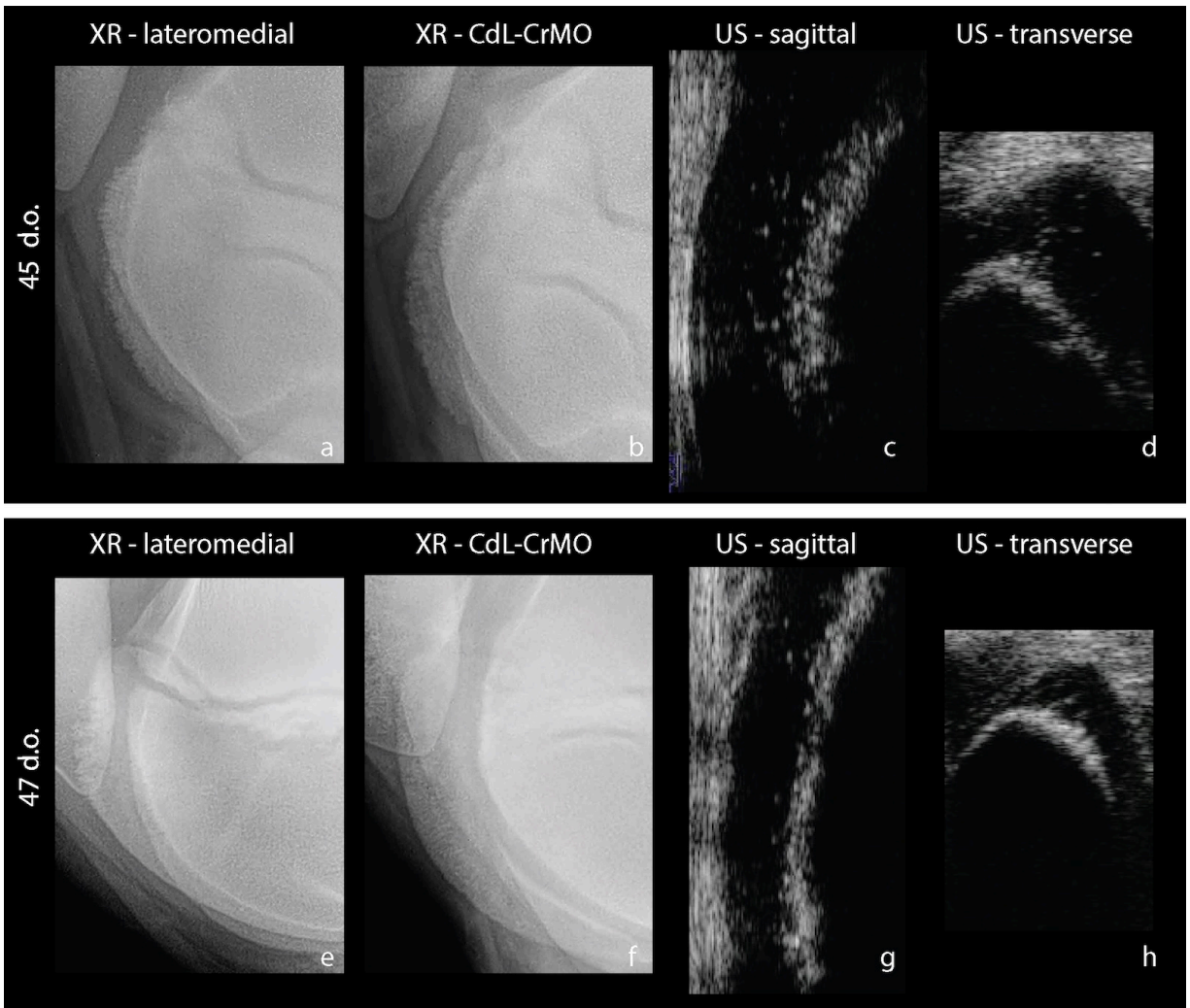


Figure 59. Figure S2. Example of different rates of maturation in foals the same age. Lateromedial (a) and CdL-CrMO (b) radiograph and sagittal (c) and transverse (d) US images of the middle LR TF of a 45 d. foal and a 47 d. foal (e-h). The subchondral border was more irregular on the first foal radiographs (a&b) compared to the second (e&f). The ultrasonographic assessment revealed that the cartilage was thicker and the ossification front was more indented in the first foal (c&d) compared to the second (g&h). Key: see Figure 1.

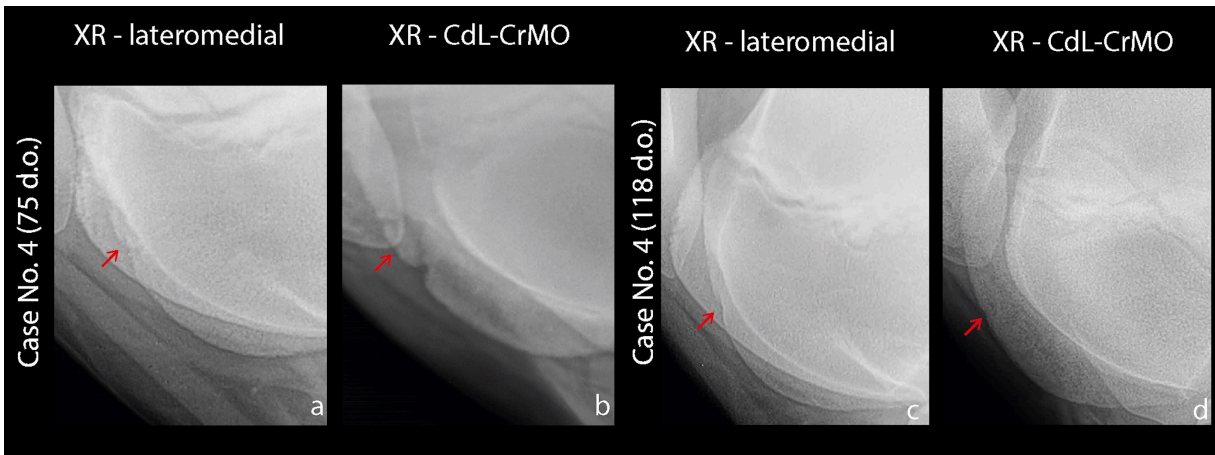


Figure 60. Figure S3. Foal #24 radiographs at 75 d. and 118 d. showing a healing lesion. Lateromedial (a) and CdL-CrMO (b) radiographs taken at 75 d. revealed an extensive lesion with fragmentation of the subchondral bone within the middle third of the LRTF (arrows). Lateromedial (c) and CdL-CrMO (d) radiographs taken at 118 d. revealed that the lesion was almost healed (arrows). Key: see Figure 1.

Tableau XXII.

Table S-I: Cartilage thickness (cm) and ossification front indentation

	Foal #	Sex	Age (days)	Cartilage thickness (cm)						Ossification front indentation					
				Proximal		Middle		Distal		Proximal		Middle		Distal	
				LH	RH	LH	RH	LH	RH	LH	RH	LH	RH	LH	RH
Group 1	1	M	27	0,86	0,84	0,88	0,90	0,62	0,74	1,22	1,20	1,51	1,42	1,30	1,19
	2 *	F	28	0,80	0,80	*	0,83	0,67	0,70	1,21	1,24	*	1,45	1,30	1,36
	3	M	31	1,01	1,04	1,02	- ^a	0,71	- ^a	1,20	1,24	1,37	1,34	1,20	1,22
	4	F	32	0,64	0,70	0,81	0,70	0,58	0,69	1,24	1,19	1,39	1,40	1,15	1,21
	5	M	33	1,11	0,82	0,85	0,96	0,63	0,61	1,13	1,35	1,38	1,45	1,13	1,31
	6	F	35	0,71	0,77	0,80	0,73	0,56	- ^b	1,20	1,22	1,31	1,40	1,10	- ^b
	7	F	42	0,54	0,51	0,58	0,56	0,49	0,55	1,21	1,23	1,37	1,39	1,16	1,20
	8	F	43	0,67	0,50	0,60	0,63	0,51	0,54	1,18	1,16	1,31	1,31	1,22	1,26
	9	M	45	0,69	0,77	0,83	0,76	0,69	0,78	1,16	1,25	1,31	1,39	1,21	1,18
	10	F	47	0,48	0,42	0,48	0,48	0,47	0,46	1,15	1,26	1,28	1,38	1,04	1,15
	11	M	51	0,67	0,55	0,62	0,59	0,58	0,54	1,12	1,17	1,18	1,29	1,17	1,19
	12 *	M	54	*	0,55	0,60	0,58	0,56	0,55	*	1,21	1,21	1,37	1,24	1,16
	13	M	61	0,60	0,61	0,65	0,63	0,55	0,59	1,23	1,20	1,20	1,21	1,19	1,20
	14	F	62	0,59	0,54	0,53	0,56	0,51	0,51	1,24	1,21	1,23	1,32	1,25	1,35
	15	M	62	0,57	0,52	0,58	0,58	0,55	0,61	1,36	1,25	1,21	1,44	1,19	1,27
Group 2	16	F	66	0,52	0,49	0,51	0,50	0,50	0,49	1,21	1,23	1,21	1,19	1,08	1,12
	17 *	M	67	0,50	*	0,49	*	0,45	- ^c	1,31	*	1,26	*	1,25	- ^c
	18	M	68	0,51	0,54	0,48	0,49	0,51	0,51	1,17	1,19	1,28	1,19	1,20	1,20
	19	F	73	0,50	0,46	0,46	0,49	0,45	0,45	1,23	1,17	1,24	1,24	1,13	1,03
	20	M	77	0,49	0,53	0,54	0,46	0,52	0,58	1,17	1,21	1,27	1,26	1,17	1,12
	21	M	90	0,52	0,51	0,48	0,50	0,50	0,46	1,06	1,09	1,13	1,11	1,09	1,11
	22	M	96	0,41	0,42	0,49	0,47	0,42	0,45	1,13	1,12	1,17	1,14	1,16	1,19
	23	F	98	0,48	0,49	0,41	0,47	0,44	0,45	1,11	1,11	1,06	1,10	1,07	1,11
	24	F	98	0,56	0,56	0,59	0,58	0,51	0,51	1,05	1,20	1,11	1,10	1,08	1,09
	25	F	103	0,31	0,31	0,31	0,29	0,30	0,29	1,12	1,07	1,10	1,11	1,12	1,11
	26	M	107	0,44	0,46	0,50	0,46	0,48	0,51	1,19	1,18	1,17	1,16	1,13	1,09
	27	F	115	0,41	0,39	0,46	0,37	0,41	0,40	1,07	1,10	1,07	1,09	1,06	1,10
	28 *	M	118	0,38	*	0,39	0,39	0,36	0,36	1,04	*	1,15	1,08	1,19	1,08
	29	F	120	0,33	0,36	0,34	0,34	0,33	0,35	1,08	1,10	1,08	1,05	1,07	1,11
	30	F	121	0,40	0,30	0,31	0,28	- ^d	0,30	1,16	1,15	1,12	1,10	- ^d	1,07
Group 3	31	F	122	0,34	0,31	0,33	0,35	0,31	0,33	1,12	1,11	1,17	1,12	1,22	1,08
	32	M	123	0,48	0,42	0,50	0,45	0,47	0,44	1,12	1,14	1,09	1,10	1,09	1,06
	33	F	123	0,29	0,29	0,31	0,30	0,31	0,29	1,11	1,12	1,14	1,12	1,13	1,19
	34	M	124	0,33	0,31	0,31	0,36	0,35	0,35	1,13	1,08	1,11	1,10	1,12	1,11
	35	M	126	0,26	0,25	0,30	0,32	0,30	0,29	1,11	1,08	1,09	1,11	1,19	1,12

36	M	127	0,32	0,33	0,39	0,38	0,35	0,34	1,18	1,16	1,16	1,13	1,14	1,10
37	F	128	0,32	0,26	0,26	0,30	0,32	0,29	1,09	1,12	1,15	1,12	1,12	1,11
38	F	132	0,30	0,28	0,27	0,33	0,30	0,28	1,12	1,09	1,10	1,13	1,10	1,09
39	M	139	0,30	0,30	0,30	0,31	0,28	0,29	1,12	1,10	1,08	1,12	1,12	1,09
40	M	142	0,30	0,30	0,31	0,32	0,28	0,32	1,14	1,10	1,16	1,19	1,13	1,06
41 *	F	145	0,32	0,29	*	0,30	0,28	0,29	1,06	1,09	*	1,07	1,11	1,07
42	M	145	0,26	0,29	0,27	0,29	0,28	0,28	1,10	1,12	1,07	1,11	1,11	1,09
43 *	M	145	0,27	0,29	0,31	*	0,26	0,27	1,06	1,06	1,09	*	1,10	1,07
44	M	150	0,29	0,29	0,31	0,31	0,30	0,31	1,12	1,08	1,18	1,10	1,06	1,03
45	M	153	0,30	0,27	0,30	0,29	0,30	0,30	1,05	1,04	1,08	1,16	1,08	1,10
46	M	166	0,31	0,30	0,31	0,30	0,30	0,31	1,05	1,11	1,16	1,13	1,12	1,11

4.4.1 Informations supplémentaires sur l'article 4

4.4.1.1 Précision sur la validation échographique

De manière générale, la validation d'une méthode d'imagerie comprend plusieurs étapes allant de la validation initiale de la technique jusqu'à des études cliniques multi-institutionnelles à grand échantillonnage. La validation d'une méthode d'imagerie permet de mettre en lumière ses caractéristiques, sa performance et ses limitations, de clarifier son potentiel clinique et même d'estimer son impact social ou économique (Jannin, Fitzpatrick et al. 2002). Si on s'inspire du génie logiciel, il a été défini que la conception d'un logiciel regroupait trois étapes: la vérification, soit s'assurer que le système est construit correctement; la validation, soit s'assurer que le système remplit les fonctions pour lesquelles il a été construit; et finalement l'évaluation, soit s'assurer que le système est valable et performant dans un but spécifique (Jannin, Krupinski et al. 2006). La dernière étape, soit l'évaluation, est complexe en médecine, surtout en imagerie de diagnostic, et on peut distinguer différents niveaux: 1- efficacité technique, 2- efficacité sur la précision du diagnostic, 3- impact diagnostique (amélioration du diagnostic), 4- impact thérapeutique, 5- pronostic du patient et 6- efficacité sociétal (Jannin, Fitzpatrick et al. 2002). Parmi des critères de validation applicables (Jannin, Fitzpatrick et al. 2002), on pourrait considérer entre autre la précision, la reproductibilité, la robustesse (performance en présence de facteurs perturbateurs comme la variabilité intrinsèque, la pathologie ou la variabilité physiologique ou inter-individuelle). De manière générale, il manque de standardisation dans les méthodologies de validation, ce qui complique la comparaison et la compréhension des différentes méthodes (Jannin, Fitzpatrick et al. 2002). Des groupes d'experts tendent à être mis en place pour établir des consensus sur les définitions, les échelles de gradation et les protocoles d'imagerie, entre autre concernant l'arthrite juvénile idiopathique, comme les groupes OMERACT (Outcome Measures in Rheumatology Clinical Trials). Ceci est compliqué par le fait que chaque modalité d'imagerie présente ses limitations. Par exemple, les cartographies quantitatives d'IRM, surtout le T2, sont sujettes à la variabilité du protocole, à l'influence de l'exercice et de la répartition du poids, de l'analyse, de l'appareil, des méthodes segmentation, etc. (Surowiec, Lucas et al.

2014), ce qui entraîne de la variabilité entre les acquisitions longitudinales, entre les patients et entre les centres de référence.

Dans l'article 3, une comparaison avec l'histologie et les images de SWI a été faite pour valider les images d'échographie. En plus des analyses qualitatives, des mesures quantitatives de l'épaisseur du cartilage et de l'indentation du front d'ossification ont été obtenues, montrant ainsi une corrélation entre l'échographie et l'histologie. Les limitations de la méthodologie ont été discutées dans l'article 3. En médecine humaine, l'échographie est d'intérêt pour l'évaluation du cartilage d'enfants atteints d'arthrite juvénile idiopathique. Quelques études de validation de la mesure échographique de l'épaisseur du cartilage juvénile ont été faites. Une étude pilote clinique a évalué la reproductibilité de la mesure échographique de l'épaisseur du cartilage entre un observateur expérimenté et non expérimenté (Spannow, Stenboeg et al. 2007). Les variations inter et intra-observateur de la mesure échographique de l'épaisseur du cartilage d'enfants en santé ont également été évaluées au niveau du genou, de la cheville, du poignet et des articulations métacarpophalangienne et interphalangienne proximale (Spannow, Pfeiffer-Jensen et al. 2009). De plus, les mesures échographiques ont été comparées avec des mesures prises à l'IRM (Spannow, Stenboeg et al. 2011). Des valeurs de référence selon l'âge et le sexe ont été établies pour l'épaisseur du cartilage du genou, de la cheville, du poignet, de l'articulation métacarpophalangienne et interphalangienne proximale d'enfants de 7 à 16 ans (Spannow, Pfeiffer-Jensen et al. 2010). L'échographie a aussi été utilisée pour identifier des changements dans l'épaisseur du cartilage d'enfants avec de l'arthrite juvénile idiopathique (Pradsgaard, Spannow et al. 2013) et ensuite évaluée en comparaison avec des images d'IRM (Pradsgaard, Fiirgaard et al. 2015). Une méthode de segmentation informatique d'images échographiques a été nouvellement développée pour mesurer l'épaisseur du cartilage (Faisal, Ng et al. 2018), ce qui peut s'avérer une option méthodologique à considérer éventuellement.

Dans l'article 4, des images ont été acquises selon un protocole défini et regroupées en atlas de référence selon l'apparence développementale normale et lésionnelle. En médecine humaine, afin de standardiser l'évaluation échographique en rhumatologie pédiatrique, une étude prospective multicentrique réalisée par 4 experts qui ont acquis des images

échographiques de 4 articulations selon un protocole prédéfini (Collado, Vojinovic et al. 2016).

De plus, afin de standardiser l'utilisation de l'échographie des articulations juvéniles, des définitions des caractéristiques échographiques des articulations juvéniles normales (Roth, Jousse-Joulin et al. 2015) et en présence de synovite (Roth, Ravagnani et al. 2017) ont été développées par la méthode Delphes, expliquée à la figure 60, et validées sur une banque d'images. Des définitions relatives à l'apparence l'articulation juvénile au Doppler ont également été établies (Collado, Windschall et al. 2018). Le tel développement de définition constitue une base pour favoriser la standardisation de l'évaluation échographique en recherche et en pratique.

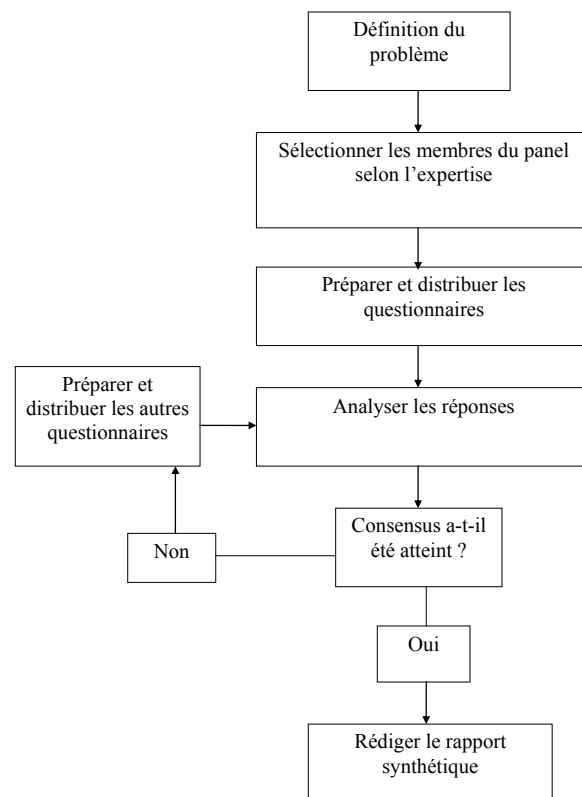


Figure 61. Méthode Delphes. (s. d.). Dans *Wikipédia, l'encyclopédie libre*. Repéré le 15 octobre 2018 à https://fr.wikipedia.org/wiki/Méthode_de_Delphes

Toujours dans le but de standardiser l'évaluation échographique du cartilage juvénile, l'apparence normale du genou de 435 enfants entre 1 et 18 ans a été décrite et des valeurs de référence selon l'âge et le sexe ont été établies (Collado, Vojinovic et al. 2016). Un score semi-quantitatif de 0-3 pour décrire le SOC et le degré d'ossification a été établi, allant de 0-épiphyse non ossifiée à 3-épiphyse complètement ossifiée (Windschall, Collado et al. 2017).

Une limitation évidente de l'article 3 et 4 d'un point de vue de validation de la méthode échographiques est l'acquisition unique des images par un seul observateur, ce qui ne permet pas d'évaluer la reproductibilité du protocole proposé. Le protocole aurait pu être reproduit dans le temps par le même observateur et par différents observateurs pour évaluer la variabilité intra et inter-observateur. Une étude avec une population similaire à celle de l'étude 4, avec la possibilité d'obtenir des échantillons post-mortems pour la validation histologique des changements suggestifs d'OC sous-cliniques. Une fois l'obtention des résultats, il serait possible d'évaluer la sensibilité et la spécificité de l'échographie pour le diagnostic de lésions d'OC sous-cliniques. Éventuellement, tel que réalisé pour la validation de l'échographie pour l'arthrite juvénile idiopathique, le développement et la validation par la méthode Delphi de définitions des trouvailles échographiques normales et pathologiques, un consensus sur la méthode d'acquisition des images et la réalisation d'un atlas

Discussion générale

Les présents travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient des objectifs pouvant être regroupés en deux objectifs généraux: d'abord investiguer davantage la pathophysiologie de l'OC chez des chevaux prédisposés dès la naissance et ensuite développer et valider des méthodes d'imagerie utilisables d'un point de vue de recherche pour comprendre le développement de la maladie et d'un point de vue clinique pour le dépistage et le suivi des lésions sous-cliniques.

Discussion des résultats obtenus relatifs à la pathophysiologie de l'OC

En ce qui concerne le premier objectif général, les études réalisées ont infirmé l'hypothèse initialement posée, soit qu'il existait, dès la naissance, des changements dans la matrice cartilagineuse de poulains prédisposés à l'OC qui pourraient expliquer leur susceptibilité à développer des lésions d'OC en début de vie. Les études 1 et 2, réalisées à partir d'un groupe prédisposé à l'OC, soit des poulains provenant de parents atteints d'OC et d'un groupe contrôle, se voulaient la suite logique des travaux précédemment effectués au sein du laboratoire qui ont étudié le développement épiphysaire et le cartilage épiphysaire in utero et en début de vie chez des poulains normaux (Lecocq, Girard et al. 2008, Cluzel, Blond et al. 2013, Fontaine, Blond et al. 2013). En effet, puisqu'aucune lésion d'OC n'ait été identifiée in utero (Lecocq, Girard et al. 2008, Olstad, Ytrehus et al. 2011) et puisque des lésions d'OC soient rapportées chez des poulains très jeunes (Rejnö 1978), il était de mise d'étudier les composantes du cartilage épiphysaire dès la naissance, avant que les influences biomécaniques subies en début de vie ne puissent modifier quelqueconque paramètre. Contrairement à l'hypothèse émise, à la lumière des résultats des études 1 et 2, aucun changement significatif, ni au niveau de la matrice cartilagineuse, ni au niveau de la structure vasculaire, n'a été démontré à la naissance entre les poulains prédisposés à l'OC et les poulains du groupe contrôle.

Par contre, les études 1 et 2 ont mis en évidence des changements matriciels et vasculaires significatifs au niveau des sites de prédilection de l'OC, qui pourraient contribuer à la susceptibilité accrue de ces zones à développer des lésions d'OC.

L'étude 1 a démontré, grâce aux analyses quantitatives de l'orientation des vaisseaux et de la densité vasculaire, des changements significatifs au niveau du site de prédilection de l'OC sur la LTRF, soit le site du milieu. En effet, à ce site, la densité vasculaire était significativement plus élevée et la proportion de vaisseaux avec une orientation perpendiculaire au front d'ossification (entre 60° et 120°) était significativement moins élevée. C'est la première fois que de tels changements sont objectivés de façon quantitative. De façon descriptive, il était possible d'apprécier également ces changements (figure 3, article 1; figure 4, article 1; figure 5, article 1), de même que de constater que cette partie de la trochlée fémorale était moins ossifiée (cartilage plus épais) et présentait un front d'ossification plus irrégulier.

En considérant l'ensemble des constats publiés dans la littérature, ces changements vasculaires démontrent clairement la susceptibilité accrue de cette zone à subir des dommages ischémiques, notamment à cause de l'orientation parallèle des vaisseaux par rapport au front d'ossification. Cette configuration vasculaire mène à la formation d'anastomoses avec les vaisseaux de l'os sous-chondrale lors de l'avancement du front d'ossification, étape lors de laquelle le développement d'ischémie est propice (Carlson, Meuten et al. 1991, Ytrehus, Ekman et al. 2004b), tel que discuté à la section 1.2.3.1. Une telle disposition des vaisseaux est rapportée au site de prédilection de l'OC au niveau du tarse de poulains (Olstad, Ytrehus et al. 2008b). Par contre, au niveau du fémur distal, tel que rapporté par Olstad et al. (Olstad, Ytrehus et al. 2008c) et tel qu'observé dans l'étude 1, des vaisseaux parallèles au front d'ossification ne se trouvent pas exclusivement au site de prédilection de l'OC. Les présents résultats quantitatifs démontrent par contre que leur présence est significativement plus marquée au niveau du site de prédilection sur la LTRF. De plus, à ce site, l'épaisseur du cartilage est plus grande de même que l'indentation du front d'ossification. Il a déjà été rapporté que le front d'ossification du fémur distal est physiologiquement plus irrégulier chez les foetus (Lecocq, Girard et al. 2008, Fontaine, Blond et al. 2013), ce confirme la présente étude à la naissance. Bien que ce soit observé à la fois chez les poulains prédisposés et les

poulains contrôle, ceci consiste en un facteur de susceptibilité accru pour les vaisseaux traversant cette jonction irrégulière. Des indentations au sein du front d'ossification des condyles des enfants sont aussi rapportées (Laor and Jaramillo 2009, Jans, Jaremko et al. 2012). Il n'est par contre pas rapporté, chez des poulains plus vieux, que le cartilage de la LTRF soit plus épais que celui de la MTRF (Firth and Greydanus 1987, Fontaine, Blond et al. 2013), tel qu'ici clairement démontré au niveau de l'aspect proximal du SOC dans la LTRF.

D'après les résultats de l'étude 1, il semble que le site de prédilection de l'OC au niveau de la LTRF démontre une maturation moins avancée à la naissance. Concernant la maturation, il est intéressant de noter qu'une étude morphologique de Toth et al., (Toth, Nissi et al. 2015) a démontré une maturation plus avancée au niveau du fémur distal de chèvres en bas âge par rapport au porc et à l'humain, avec la majorité des vaisseaux déjà perpendiculaires au front d'ossification, ce qui pourrait expliquer pourquoi cette espèce n'est pas sujette à développer de lésions d'OC. Ceci explique également la difficulté rencontrée par le même groupe à induire chirurgicalement des lésions ischémiques chez la chèvre (Toth, Nissi et al. 2015). Dans le même ordre d'idées, des poneys démontrent un cartilage moins épais avec moins de vaisseaux au niveau de la trochlée latérale distale du talus que des poulains de race Standardbred de même âge, ce qui pourrait en partie expliquer pourquoi ils sont moins susceptibles au développement d'OC à ce site (Hendrickson, Olstad et al. 2015). Au niveau du fémur distal de poulains Standardbred, il a été démontré durant les premières semaines de vie que l'épaisseur du cartilage épiphysaire de même que sa vascularisation diminuent avec l'âge de manière régionale, à l'exception de l'aspect abaxial de la LTRF qui conserve une vascularisation disproportionnée par rapport à l'épaisseur de son cartilage (Olstad, Ytrehus et al. 2008c). Il serait intéressant de suivre de façon quantitative, à l'aide de la méthodologie décrite dans l'étude 1, la densité vasculaire et l'orientation des vaisseaux jusqu'à ce que la trochlée fémorale devienne avasculaire, soit à 7 mois d'âge (Carlson, Cullins et al. 1995).

L'étude 2 a démontré des variations substantielles de la composition matricielle entre les différentes régions d'intérêt, surtout au niveau de la LTRF, avec des variations quantitatives significatives des temps de relaxation T1rho et T2, tel que schématisé sur la figure 48.

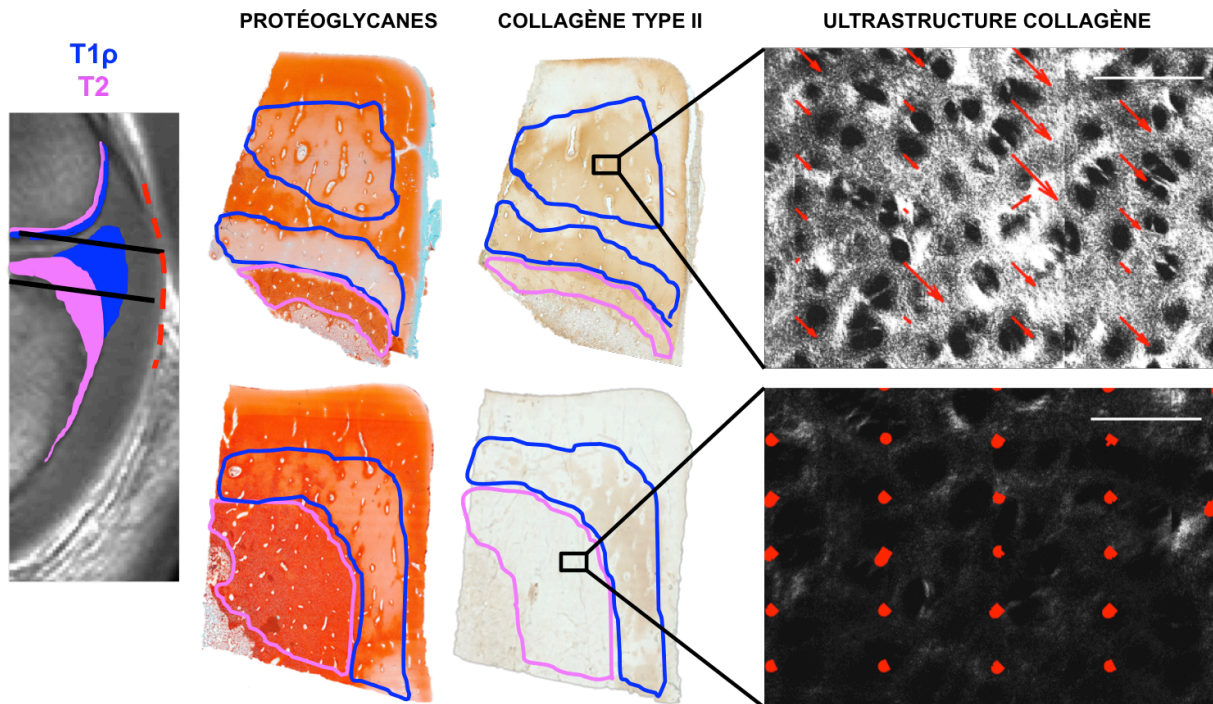


Figure 62. Scéma récapitulatif des zones présentant un signal T1rho et T2 augmenté au niveau de la LTRF. Les images correspondantes dans le plan transverse d'histologie, d'immunohistochimie et de microscopie SHG démontrent la délimitation de ces zones. Les lignes noires sur l'image de gauche représentent les coupes transverses des images de droite. La ligne pointillée rouge correspond au site de prédilection de l'OC au niveau de la LTREF

En effet, une large zone avec un contenu réduit en protéoglycanes (signal T1rho augmenté) a été identifiée au niveau de la trochlée fémorale proximale et moyenne, de façon plus importante au niveau de la LTRF, au site de prédilection de l'OC, qui correspondait à l'histologie à une zone de paleur matricielle sans chondronécrose (figure 2, article 2). La zone proliférative de la métaphyse démontrait également un contenu réduit en protéoglycanes (figure 2, article 2). Les temps de relaxation T1rho étaient significativement augmentés à l'aspect cranio-proximal du SOC au niveau de la LTRF (figure 3, article 2). De tels changements, présents autant chez les spécimens prédisposés que contrôle, reflètent probablement un processus physiologique lié à la maturation du cartilage épiphysaire, quoiqu'il demeure à élucider si ces changements reflètent une augmentation du turnover des

protéoglycanes ou une diminution de leur synthèse. Chez le bovin (Tchetina, Mwale et al. 2014) et l'humain (Mundlos, Meyer et al. 1991), il a été démontré via l'expression génique que la synthèse d'aggrécan varie selon la zone de la plaque de croissance, mais de telles études ne sont pas disponibles chez le cheval. Chez le rat, des zones focales de résorption matricielle également visibles à l'IRM quantitatif et à l'histologie, sont observées soit au pourtour de la physe et du SOC ou soit sans association avec ni la physe ni le SOC (Lee, Lamplugh et al. 2001). Chez le poulain, des zones avec un contenu réduit en protéoglycanes ont été identifiées au niveau de plusieurs articulations avant la naissance et seulement au niveau du fémur distal après la naissance, soulignant la maturation tardive de ce site (Lecocq, Girard et al. 2008). Par contre, la zone identifiée dans l'étude 2 était beaucoup plus extensive que celles rapportées dans les autres études (Ekman and Heinegard 1992, Lecocq, Girard et al. 2008, Olstad, Ytrehus et al. 2008b). Il faudra davantage d'investigations pour comprendre la signification de ces zones chez le poulain.

Une zone extensive d'apparence hypertrophique a également été démontré à l'aspect cranio-proximal du SOC, s'étendant abaxialement au niveau de la LTRF, encore une fois correspondant au site de prédilection de l'OC (figure 4, article 2; figure 5, article 2). Cette zone se traduisait par un temps de relaxation T2 significativement augmenté, une réduction de la coloration à l'immunohistochimie et une diminution de l'anisotropie à la microscopie de génération de seconde harmonique (figure 6, article 2). Des changements de signal T2 ont également été rapportés au niveau de condyles fémoraux d'enfants, au pourtour de SOC (Varich, Laor et al. 2000). Une étude par microscopie de génération de seconde harmonique chez le porc semble également démontrer des zones avec variation de signal vers le front d'ossification au niveau des condyles (Finnoy, Olstad et al. 2016). Il est fort probable que cette zone reflète encore une fois une étape physiologique de la maturation du cartilage, quoique davantage d'investigations sont nécessaires pour mieux expliquer ces observations.

Néanmoins, il est intéressant de noter que ces zones de changements matriciels au niveau cranio-proximal du SOC correspondent à la zone identifiée dans l'étude 1 comportant une densité vasculaire et un nombre de vaisseaux de configuration parallèle au front d'ossification augmentés (Figure 49). Il est reconnu que la zone hypertrophique de la plaque

de croissance représente une zone de faiblesse biomécanique, étant la zone la moins rigide (Villemure and Stokes 2009) et que la jonction osteochondrale de la physe est moins résistante aux forces de traction et plus sujette à fracturer que du tissu adulte (Flachsmann, Broom et al. 2000, Klein, Chaudhry et al. 2007). En prenant en considération l'ensemble des résultats de l'étude 1 et 2, soit à la fois les changements vasculaires et matriciels, trouvés de façon concomitante au niveau de site de prédilection de l'OC sur la LTRF, combinés avec l'épaisseur du cartilage et l'irrégularité du front d'ossification augmentés, il est indéniable que la zone de prédilection de l'OC au niveau de la LTRF présente une susceptibilité accrue à subir un dommage vasculaire.

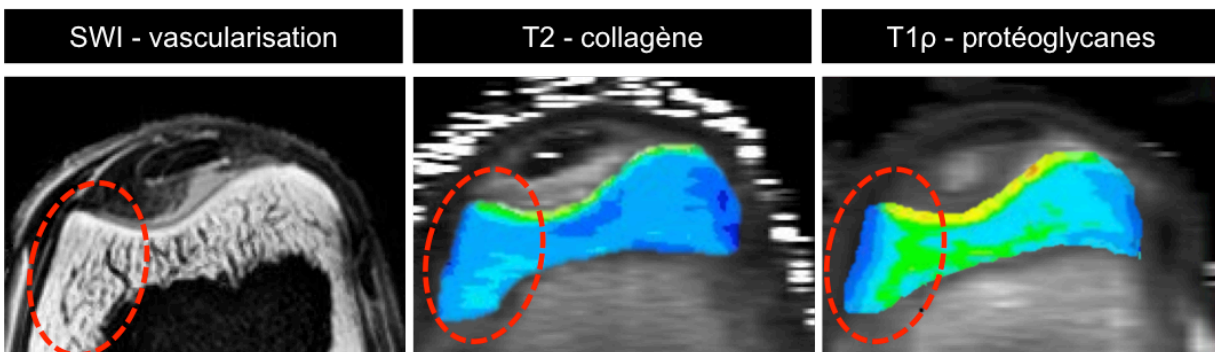


Figure 63. Images correspondantes de SWI, T1rho et T2 mettant en relation les résultats des 3 études. La zone de prédilection est identifiée en pointillé rouge.

Bien que davantage d'études soient nécessaires pour soutenir cette hypothèse, il semble plausible que les influences biomécaniques puissent initier ce dommage vasculaire, tel que discuté à la section 1.2.3.3.3. En effet, l'absence de lésions à la naissance chez les spécimens prédisposés renforce cette théorie. D'ailleurs, Denoix et al. (Denoix, Jeffcott et al. 2013a) stipulent que le point de pression maximale exercé par la patella sur la trochlée latérale correspond au site de prédilection d'OC sur la LTRF, où les changements matriciels et vasculaires de l'étude 1 et 2 ont été notés. De plus, l'équilibre postural des poulains se développe surtout dans les deux premières semaines de vie (Nauwelaerts, Malone et al. 2013).

En notant qu'il faut 21 jours suite à une interruption vasculaire chirurgicale pour voir apparaître une zone de chondronécrose ischémique représentative d'une lésion sous-clinique d'OC (Olstad, Hendrickson et al. 2013), que des lésions microscopiques soient visibles chez des poulains aussi jeunes que 31 jours d'âge (Olstad, Ytrehus et al. 2011) et qu'on dénote un changement dès la 4^e semaine d'âge dans les paramètres locomoteurs kinétiques de poulains démontrant plus tard des lésions radiographiques d'OC, il semble plausible que l'élément déclencheur initiant la formation d'une lésion d'OC ait lieu dans les premiers jours de vie. Davantage d'études longitudinales sont nécessaires pour corrélérer les changements matriciels et vasculaires et les influences biomécaniques en début de vie avec le développement de lésions d'OC.

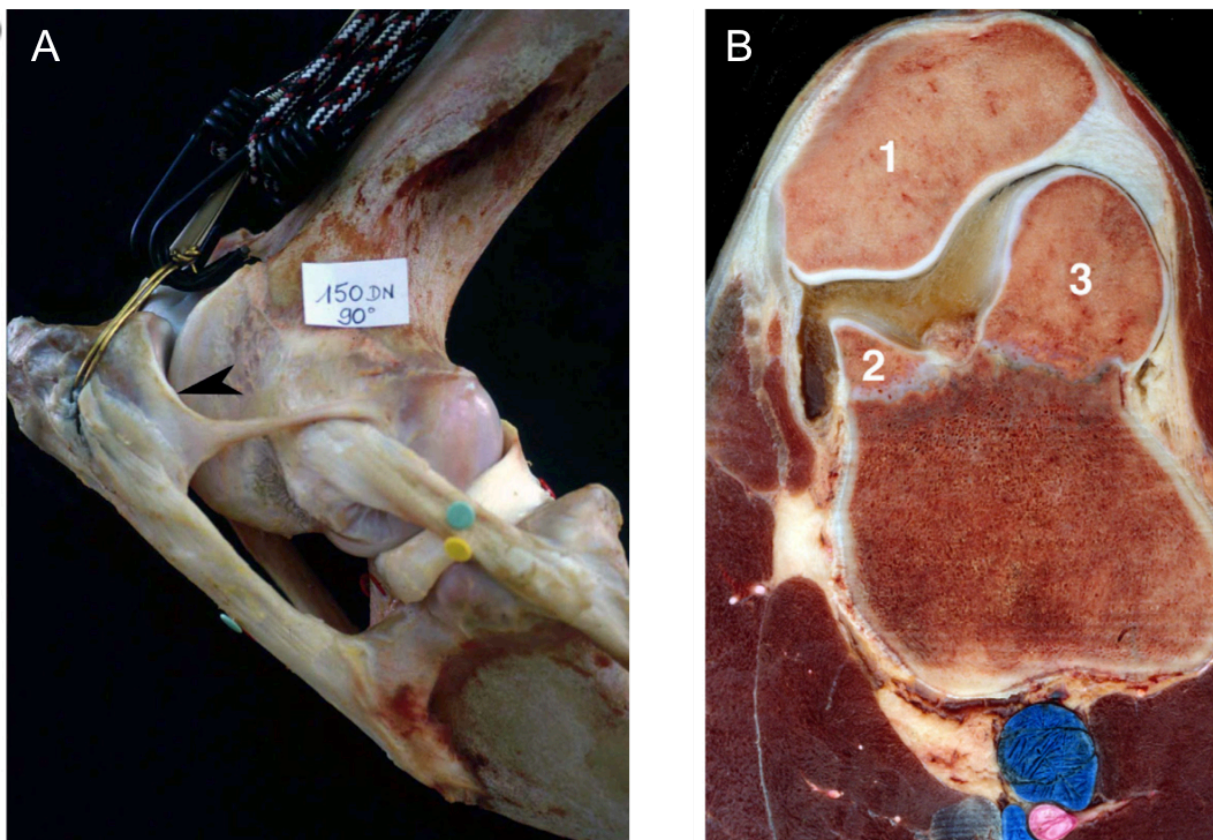


Figure 64. Représentation du poids de compression maximale au niveau de la LTRF. Selon Denoix et al. (2013).

Brièvement, tel que mentionné dans les limitations des études 1 et 2, en ce qui concerne l'absence de lésions dans le groupe prédisposé, la méthode employée pour augmenter la prévalence d'OC en sélectionnant des parents atteints d'OC a déjà été utilisée pour la conception d'autres études (van Weeren, Sloet van et al. 1999a, Olstad, Ytrehus et al. 2008c). Si aucune lésion n'a été observée, ceci peut être dû au temps d'investigation, tôt après la naissance, au faible nombre de spécimens ou à l'héritabilité faible au niveau de grasset, tel que discuté à la section 1.3.3.

Discussion des résultats obtenus relatifs à la validation de méthodes d'imagerie

Le deuxième objectif général du présent travail était d'explorer et de valider des méthodes d'imagerie pouvant être utiles à la fois pour étudier le développement de lésions d'OC et pour faire le dépistage et le suivi des lésions dans le temps. La validation d'une méthode d'imagerie comprend plusieurs étapes allant de la validation initiale de la technique jusqu'à des études cliniques multi-institutionnelles à grand échantillonnage, tel que mentionné à la section 4.4.1. De manière à valider une méthode d'imagerie, on doit la comparer à une référence reconnue, un «gold-standard». L'histologie est largement utilisée de valider les techniques d'imagerie, lorsque l'obtention d'échantillons pour le faire est possible, et les techniques utilisées de routine sont simples, standardisées et fiables (Schmitz, Laverty et al. 2010). D'un un contexte d'imagerie in vivo, où la réalisation d'histopathologie est impossible, on peut faire référence à une autre modalité d'imagerie déjà reconnue comme valide ou utiliser des fantômes de test, soit des objets avec des propriétés connues qui sont conçus pour évaluer la performance d'une méthode d'imagerie, notamment dans le cas de l'échographie, tel que révisé par Culjat et al. (2010) (Culjat, Goldenberg et al. 2010).

Les études de ce présent travail sont des études pionnières qui contribuent à la validation de méthodes d'imagerie appliquées pour la première fois sur du cartilage juvénile équin. Elles sont évidemment qu'une étape dans le processus de développement et de validation menant à l'application de la méthodologie dans un contexte clinique. En effet, les articles 1, 2 et 3 témoignent de la capacité des modalités d'imagerie utilisées à identifier des composantes spécifiques de l'épiphyse néonatale équine qui sont des éléments clés en lien avec la pathogénèse des lésions d'OC. L'article 4 démontre l'applicabilité du protocole

proposé dans un contexte clinique et présente des images échographiques de référence de la LTRF équine normale selon l'âge et de changements suggestifs d'OC sous-clinique. L'échographie offre l'avantage d'être une méthode d'imagerie pratique, non dispendieuse, réalisable en temps réel et offrant une perspective supérieure à la radiographie pour évaluer la largeur, la profondeur et la longueur d'une potentielle lésion d'OC.

Validation de l'IRM SWI

Dans le cadre de la première étude, l'objectif visant à valider l'utilité du SWI pour l'étude du cartilage équin a été atteint. C'est la première étude à démontrer l'utilité d'une telle séquence chez le cheval. Des lames d'histologie SOFG ont été obtenues pour des comparaisons qualitatives et quantitatives. Des lames d'immunohistochimie avec le facteur Von Willebrand ont également été obtenues pour valider la présence de cellules endothéliales dans les canaux de cartilage. La validation histologique obtenue était très convaincante (figure 2 article 1). Les principaux vaisseaux nourriciers étaient visibles, tel que décrit par Olstad et al. (Olstad, Ytrehus et al. 2008c) (figure S1, article 1). Il y avait une bonne association entre l'aire vasculaire à l'histologie et la densité vasculaire à l'IRM, quoique les analyses statistiques aient démontré un biais (densité vasculaire supérieure à l'aire vasculaire), ce qui peut s'expliquer un artefact de «blooming», tel que décrit à la section 3.2.2.2, par la nature de l'acquisition (2D vs 3D) et par la différence des coupes (4µm à l'histologie et 2mm à l'IRM). Afin de contrer à cette limitation liée à l'épaisseur des coupes, une méthodologie inspirée de Toth et al. (2013) aurait pu être utilisée. En effet, dans cette étude, les images SWI de fémurs distaux de porcelets ont été validés à l'aide de la sommation de lames d'histologie au bleu de toluidine consécutives espacées chacune de 50 µm, pour obtenir une image histologique représentative de l'épaisseur de la coupe d'IRM (figure 15) (Toth, Nissi et al. 2013).

Les images ont été acquises in situ, et les paramètres de la séquence SWI utilisés pour l'étude 1 sont les mêmes que ceux actuellement utilisés en clinique pour imager le cerveau humain (CHUM, Montréal) et ressemblent à ceux fournis avec l'appareil Siemens en clinique, ce qui témoigne de l'éventuelle translation clinique de cette méthodologie. Ces résultats

confirment ceux d'un autre groupe de recherche qui, parallèlement à la réalisation de cette étude, ont employé des séquences de SWI 9.4T (*ex vivo*) et 7T (*in vivo*), avec des temps d'acquisition plus long, pour étudier le cartilage de croissance du porc (Nissi, Toth et al. 2013, Toth, Nissi et al. 2013). La meilleure qualité des images de SWI obtenues lors de l'étude 1, même à l'aide d'un IRM 3T, par rapport à celles obtenues dans les études initiales chez le porc, peut s'expliquer par l'emploi d'une antenne de genou à canaux multiples (8 canaux) (Nissi, Toth et al. 2014). Le traitement des images de SWI a été fait en utilisant l'algorithme PADRE, tel que décrit à la section 3.2.2.1, contrairement aux autres études (Toth, Nissi et al. 2013, Nissi, Toth et al. 2014), et nous avons obtenu moins de «doubling artefact», probablement également vu le plan d'acquisition choisi, comme mentionné à la section 3.2.2.2. Par contre, nous aurions pu améliorer la résolution spatiale tout en conservant un temps d'acquisition comparable en utilisant une séquence multi-écho (Denk and Rauscher 2010, Gilbert, Savard et al. 2012). Par la suite, Nissi et al. (2015) ont amélioré leur technique en utilisant une technique «quantitative susceptibility mapping» (QSM) pour réduire les artefacts inhérents au SWI et améliorer la visualisation des vaisseaux. Cette technique de QSM a par la suite été utilisée *in vivo* chez la chèvre pour démontrer des lésions de chondronécrose induites chirurgicalement (Wang, Nissi et al. 2017).

Le SWI est une méthode de choix pour évaluer le cartilage épiphysaire et sa vascularisation, et ce de façon totalement non-invasive, sans l'utilisation de matériel de contraste, autant *in vivo* que *ex vivo*, et offre d'ailleurs un meilleur contraste que l'IRM avec gadolinium (Haacke, Mittal et al. 2009) et permet la visualisation non seulement des vaisseaux d'origine péri-chondriale mais également d'origine sous-chondrale (Toth, Nissi et al. 2013). La translation en médecine humaine est évidente, également pour d'autres pathologies impliquant une atteinte vasculaire telle que la maladie de Legg-Perthes. D'ailleurs, une très récente étude a employé la séquence SWI avec un IRM 7T *in vivo* pour décrire la vascularisation de l'épiphyse du fémur distal chez les enfants (Kolb, Robinson et al. 2018).

Validation de l'IRM quantitatif T1rho et T2

Dans le cadre de la deuxième étude, les objectifs visaient à valider l'utilité de l'IRM quantitatif pour l'étude du cartilage équin a été atteint. Cette étude est la première à

investiguer en parallèle à la fois le contenu en protéoglycanes et en collagène ainsi que la structure de collagène du cartilage juvénile, en validant les séquences quantitatives d'IRM avec de l'histologie, de l'immunohistochimie et de la microscopie de génération de seconde harmonique.

Le T1rho mapping a été utilisé pour la première fois chez le cheval pour étudier le cartilage et pour la première fois sur le cartilage juvénile dans le cadre d'étude développementale. Afin de valider la séquence, des lames histologiques avec les colorations SOFG et toluidine bleue, reconnues pour leur spécificité envers les protéoglycanes et glycosaminoglycanes, ont été utilisées pour des comparaisons qualitatives avec les cartographies correspondantes. Les variations de signal T1rho corrèlent avec les variations de coloration identifiées à l'histologie (figure 2, article 2). Un autre groupe a utilisé le T1rho adiabatique pour démontrer des zones de chondronécrose induite chirurgicalement chez la chèvre (Toth, Nissi et al. 2015). Malgré la précision de cette séquence, son acquisition ex vivo dans un IRM 9.4T n'est pas transposable dans un contexte clinique. Le même groupe a également fait une étude multiparamétrique à l'IRM 9,4T pour comparer la capacité des temps de relaxation T1, T1rho, T1rho adiabatique, T2 et TRAFF à évaluer le cartilage nécrotique de chèvres, générant ainsi des constats intéressants: chacune des séquences sauf le T1 était efficace pour identifier la zone nécrotique, bien qu'aucun des temps de relaxation ne soient corrélés avec la durée des lésions ou le contenu en protéoglycanes; les séquences T1rho et T1rho adiabatique semblait mieux corrélées avec le contenu en protéoglycanes; la séquence T2 semblait aussi efficace que les autres séquences et plus facilement utilisable dans un contexte clinique (Wang, Nissi et al. 2015).

Pour améliorer la méthodologie de validation, une gradation semi-quantitative de l'apparence de la matrice tel que réalisée par Lecocq et al. (2008) aurait permis l'analyse statistique des résultats histologiques. Pour des analyses quantitatives plutôt que qualitatives, une cartographie quantitative du contenu en protéoglycanes aurait pu être obtenue en utilisant notamment la microspectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FITR-MS) (Oinas, Ronkainen et al. 2018).

Dans le cadre de l'étude 2, le T2 mapping a été utilisé pour la première fois pour imager du cartilage équin juvénile, à l'aide de paramètres applicables en clinique. La

microscopie SHG est elle aussi utilisée pour la première pour l'étude du cartilage juvénile, a mis en évidence un fort lien entre les temps de relaxation T2 et les variations structurelles du collagène dans le cartilage articulaire, le cartilage épiphysaire et celui de la physe (figure 4, article 2). La validation de la séquence T2 mapping a été faite à l'aide de la microscopie SHG et d'immunohistochimie pour le collagène II. La microscopie permet d'obtenir un signal forward et backward ainsi que le ratio forward/backward (F/B). Le signal SHG est sensible à la densité de collagène (Brown, Houle et al. 2013), à la taille des fibrilles (surtout le F-SHG) (Bancelin, Aime et al. 2014) et à leur orientation (Stoller, Celliers et al. 2003). Le signal F-SHG augmente selon le regroupement («bundling») de fibrilles de même direction (Brown, Houle et al. 2013). Le F/B permet davantage la caractérisation de la microstructure du collagène et varie selon les zones du cartilage et selon la dégradation en présence d'ostéoarthrite (Brown, Houle et al. 2013, Matcher 2015). La microscopie SHG a permis de démontrer des variations de signal B-SHG dans des zones chondronécrotiques chez le porc (Finnoy, Olstad et al. 2018). La microscopie SHG présente des avantages par rapport aux techniques conventionnelles telle que la PLM (Chaudhary, Campbell et al. 2015). D'abord, un échantillon intact, non fixé et non coloré, de plus grande taille peut être imagé, ce qui réduit d'ailleurs les artefacts liés à l'histologie conventionnelle. De plus, c'est aussi une modalité de choix pour imager du cartilage de bio-ingénierie de façon non destructive (Islam, Romijn et al. 2017). Vu l'absence de coloration, il est possible de visualiser les fibrilles de collagène plutôt que seulement le contenu global de collagène. Il est possible d'extraire davantage d'informations que seulement la biréfringence. Il est possible de différencier le collagène type I du collagène type II (Su, Chen et al. 2010). Le ratio F/B n'a pas d'équivalent en microscopie optique classique. Il a été prouvé que la microscopie SHG était sensible à la détection de fibrilles de collagène 15 fois plus petite que la résolution de la microscopie optique (Bancelin, Aime et al. 2014).

Toth et al. (Toth, David et al. 2017) ont réalisé une autre étude à l'aide de leur modèle chirurgical de chondronécrose ischémique chez la chèvre pour valider l'utilisation in vivo du T2 mapping à l'aide d'un IRM 3T, avec des paramètres disponibles en clinique. Toth et al. (Toth, David et al. 2017) mentionnent que le temps d'acquisition (environ 1h/ articulation) limite l'utilisation clinique. Par contre, le temps d'acquisition de la séquence de l'étude 2 était de 19 min 52s, ce qui est acceptable d'un point de vue clinique.

Les séquences utilisées dans les études 1 et 2 sont d'intérêt en médecine humaine, d'autant plus qu'elles vont permettre d'obtenir plus d'informations pour comprendre la pathogenèse de la maladie, palliant l'impossibilité d'avoir recours à des moyens de validation postmortem. Par contre, aucune des séquences d'IRM décrites ci-haut n'est facilement applicable en médecine équine dans un contexte clinique. L'évaluation du grasset in vivo est plus complexe, vu la taille du grasset et la nécessité de l'anesthésie générale lorsqu'on utilise un IRM à haut champs (>1T). Il est possible de faire des IRM debout chez le cheval, mais à l'aide d'IRM dit bas champs (<0.3T) qui n'offre pas une résolution spatiale adéquate pour bien évaluer le cartilage (Nelson, Kawcak et al. 2018). Le CT soit un outil de choix pour le dépistage et le suivi des lésions d'OC manifesta chez le porc puisque les porcs subissent déjà des évaluations de CT de routine pour d'autres motifs (Olstad, Kongsro et al. 2014b). Par contre, en médecine équine, l'évaluation du grasset au CT compte des limitations similaires à l'IRM, soit la nécessité d'anesthésie générale, et les coûts et risques associés en limite l'utilisation d'un point de vue de dépistage.

Nous avons donc envisagé utiliser l'échographie comme méthode de dépistage et de suivi chez le cheval. En effet, l'échographie gagne en popularité en pédiatrie humaine vu les avantages ses notables, tel que discuté à la section 1.5.3. Des travaux dans le laboratoire ont d'ailleurs déjà décrit l'apparence de lésion d'OC au grasset mais chez des poulains de plus de 6 mois d'âge (Bourzac, Alexander et al. 2009).

Validation de l'échographie

L'objectif de la troisième étude était de valider l'utilité de l'échographie pour l'évaluation de la trochlée fémorale des poulains prédisposés et contrôle à la naissance, ce qui a été largement atteint. Les images échographiques obtenus ont été comparées avec des lames histologiques correspondantes et avec des images de SWI. L'échographie révèle de façon claire le cartilage articulaire, le cartilage épiphysaire et le front d'ossification (figure 2, article 3) ainsi que les vaisseaux cartilagineux (figure 5, article 3). Les mesures échographiques de l'épaisseur du cartilage et celles de l'indentation du front d'ossification corrèlent avec les mesures histologiques, quoique la précision des mesures échographiques diminue lorsque

l'indentation du front d'ossification augmente, ce qui s'explique par la résolution moindre l'échographie par rapport à l'histologie. La précision de la mesure échographique du cartilage a été validée chez le cheval adulte (Barthez, Bais et al. 2007) et chez l'enfant (Spannow, Stenboeg et al. 2011). Des images échographiques descriptives de l'apparence de la trochlée fémorale à la naissance ont été fournies en guise de référence (figure 3, article 3).

Dans le cadre de la troisième étude également, la faisabilité d'un protocole échographique pour évaluer in vivo la LTRF a été démontrée chez des poulains âgés de 1, 3 et 6 mois, en référence pour une étude prospective éventuelle sur une population de Thoroughbreds, où déjà des échographies du parenchyme pulmonaire sont faites de routine en dépistage de rhodococcus equi. Une limitation évidente de la validation de ce protocole proposé dans l'article 3 est l'acquisition unique des images par un seul observateur, ce qui ne permet pas d'évaluer la reproductibilité du protocole proposé. Le protocole aurait pu être reproduit dans le temps par le même observateur et par différents observateurs pour évaluer la variabilité intra et inter-observateur.

Les objectifs de la quatrième étude qui visaient à décrire d'une part l'apparence échographique de la LTRF in vivo chez des poulains de <6 mois d'âge à l'aide d'un protocole standardisé et, d'autre part, de faire le dépistage de changements indicatifs de lésions sous-cliniques ont été réalisés. En effet, d'abord le protocole a été standardisé (position du poulain lors de l'examen, position de la sonde, régions d'intérêt). Une description détaillée par groupes d'âge de même qu'une banque d'images échographiques de l'apparence sagittale et transverse de la LTRF proximale, moyenne et distale de 0-2 mois, 2-4 mois et 4-6 mois sont fournies, avec en référence des radiographies correspondantes (figure 1, article 4). Les mesures de l'épaisseur du cartilage à chacun des sites, de même que l'indentation du front d'ossification sont rapportées à chaque âge (figure 2, article 4). Une relation non-linéaire négative a été significativement démontrée entre l'âge et l'épaisseur de cartilage ou l'indentation du front d'ossification. En comparant la pente de la relation entre les sites, la pente était plus élevée au niveau de la LTRF proximal et moyenne que distale pour l'épaisseur de cartilage et plus élevée au niveau de la LTRF moyenne que proximale et distale pour l'indentation du front d'ossification. Ces données descriptives et quantitatives selon l'âge forme une ressource clé à

laquelle se référer pour les autres vétérinaires devant pratiquer ce protocole de dépistage. Tel que fait en médecine humaine, il pourrait être indiqué de procéder à une étude à large effectif afin de valider la répétabilité entre les observateurs (Windschall, Collado et al. 2017).

La description de variations morphologiques vues à l'échographie du front d'ossification chez les poulains de <2 mois a été rapportée (figure 3, article 4). L'évaluation échographique est plus compliquée en bas âge vu la plus grande irrégularité du front d'ossification chez les poulains de <2 mois et également à cause du poil plus abondant à moins de 3 mois d'âge.

La description détaillée de même que les images échographiques en deux plans et les radiographies correspondantes de changements jugés pathologiques ont été incluses (figure 4, 5 et 6, article 4). L'identification de zones semicirculaires focales ou multifocales dans le front d'ossification ont été identifiées comme des lésions sous-cliniques d'OC à l'échographie, puisque de tels défauts radioluents au sein du front d'ossification au CT, appelés des lésions «stair-step» sont considérés comme pathognomoniques pour la chondronécrose dans le fémur distal de porcs (Olstad, Kongsro et al. 2014). Il a également été confirmé à l'histologie que des défauts similaires chez le poulain correspondaient à des zones de chondronécrose (Olstad, Ytrehus et al. 2011).

La plus grande limitation de cette étude est l'absence de validation histologique, bien évidemment puisque ce n'était pas une étude terminale. Nous réalisons à l'heure actuelle une étude sur des spécimens ex vivo avec CT, échographie et histologie pour démontrer hors de tout doute la capacité de l'échographie à diagnostiquer des lésions d'OC sous-cliniques.

L'évaluation échographique du fémur distal de poulains à des fins de dépistage et de suivi permettra, on l'espère, de mieux adapter le plan thérapeutique, en détaillant mieux l'apparence des lésions, puisque souvent le choix du traitement dépend du caractère de la lésion, tel que discuté à la section 1.5.2.

Conclusion

L'ensemble du travail réalisé à travers des 4 études présentées ci-haut a permis de tirer des conclusions intéressantes relatives à la pathophysiologie de l'OC et aussi de valider des méthodes d'imagerie utiles pour mieux comprendre la maladie et également utiles, dans un contexte clinique, pour le dépistage et le suivi des lésions sous-cliniques d'OC.

En effet, il n'existe pas de différence matricielle et vasculaire à la naissance au sein du cartilage épiphysaire de la trochlée fémorale distale de poulains prédisposés à l'OC. Par contre, il existe, à la naissance, des variations vasculaires et matricielles notables du cartilage épiphysaire au site de prédilection de l'OC sur la LTRF, qui peuvent augmenter le risque de développer des lésions d'OC, probablement sous l'influence de forces biomécaniques.

Il a été validé et démontré que les séquences d'IRM 3T SWI et de qIRM T1rho et T2 sont applicables dans un contexte clinique, notamment en médecine humaine, et permettent d'obtenir des informations essentielles sur les propriétés du cartilage épiphysaire, respectivement sa vascularisation, son contenu en protéoglycanes et son contenu et la structure du collagène.

Dans un contexte de médecine équine, où une méthode d'imagerie non-invasive et accessible est nécessaire pour faire le dépistage et le suivi de lésions d'OC sous-cliniques au niveau du grasset, il a été démontré que l'échographie est une modalité de choix pour évaluer l'épaisseur du cartilage et sa vascularisation, de même que l'indentation et l'intégrité du front d'ossification.

L'utilisation de l'échographie dans un contexte clinique de dépistage, à la ferme, est possible, d'autant plus que des valeurs référentielles sur le développement épiphysaire normal chez les poulains de <6 mois sont maintenant accessibles.

Perspectives

À la lumière des résultats des présentes études, de nombreux aspects restent à investiguer.

D'abord, en ce qui concerne les changements vasculaires et matriciels démontrés, il faudrait investiguer davantage l'évolution de ces changements dans le temps pour en déterminer leur signification. Il faudrait aussi investiguer à savoir si les propriétés biomécaniques du cartilage de ces zones sont différentes ou non. Des études longitudinales à l'aide des séquences d'IRM décrites pourraient permettre de mieux comprendre la relation entre les changements observés et le développement de lésions d'OC.

Afin de répondre à la question qui persiste à savoir pourquoi certains chevaux développent des lésions d'OC et d'autres non, il faudrait étudier davantage la locomotion des chevaux en début de vie, de même que la répartition intraarticulaire des forces subies par le cartilage.

En ce qui concerne l'échographie, une étude de validation histologique est déjà en cours afin de démontrer que les changements dénotés à l'échographie suggestifs d'OC correspondent bel et bien histologiquement à des zones de chondronécrose ischémique, tel que mentionné dans la discussion générale.

Puisque l'échographie permet un suivi longitudinal des lésions, il faudrait élaborer un plan de traitement d'abord conservateur suite à l'identification de lésions sous-cliniques d'OC et en évaluer les bénéfices sur plusieurs années.

Puisque l'imagerie est un champ d'intérêt à évolution exponentielle, il faudrait valider la fonction Doppler de l'échographie pour visualiser le flot sanguin, déjà utilisée en médecine humaine et déjà démontré dans le contexte d'ischémie de la tête proximale du fémur. Puisque les résultats préliminaires obtenus par le laboratoire n'étaient pas concluants (data non), un protocole adéquat reste à développer.

Bibliographie

Adams, W. M. and J. P. Thiisted (1985). "Radiographic appearance of the equine stifle from birth to 6 months." Veterinary Radiology & Ultrasound **26**(4): 126-132.

Aghajanian, P., W. Xing, S. Cheng and S. Mohan (2017). "Epiphyseal bone formation occurs via thyroid hormone regulation of chondrocyte to osteoblast transdifferentiation." Sci Rep **7**(1): 10432.

Ahmed Abdelbaset-Ismail, M. B. G., Alaa Ghazy, Mohamed Gomaa, Ahmed Abdelaal, Amarपाल , Ahmed Behery, Abdel-Basit Abdel-Aal, Mohamed-Tayiser Samy and Kuldeep Dhama (2016). "Radiographic Specification of Skeletal Maturation in Donkeys: Defining the Ossification Time of Donkey Growth Plates for Preventing Irreparable Damage." Asian Journal of Animal and Veterinary Advances **11**: 204-209.

AUER, J. S. J. (2012). Equine Surgery.

B. SANDGREN, G. D. a. J. C. (1993). "Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints in Standardbred trotter. I. Epidemiology." Equine Vet J Suppl **25**(s16): 31-37.

Babyn, P. S., H. K. Kim, C. Lemaire, H. K. Gahunia, A. Cross, J. DeNanassy and K. P. Pritzker (1996). "High-resolution magnetic resonance imaging of normal porcine cartilaginous epiphyseal maturation." J Magn Reson Imaging **6**(1): 172-179.

Babyn, P. S., H. K. Kim, C. Lemaire, H. K. Gahunia, A. Cross, J. Denanassy and K. P. Pritzker (1996). "High-resolution magnetic resonance imaging of normal porcine cartilaginous epiphyseal maturation." Journal of Magnetic Resonance Imaging **6**(1): 172-179.

Bancelin, S., C. Aime, I. Gusachenko, L. Kowalczyk, G. Latour, T. Coradin and M. C. Schanne-Klein (2014). "Determination of collagen fibril size via absolute measurements of second-harmonic generation signals." Nat Commun **5**: 4920.

Barneveld, A. and P. R. van Weeren (1999). "Conclusions regarding the influence of exercise on the development of the equine musculoskeletal system with special reference to osteochondrosis." Equine Vet J Suppl(31): 112-119.

Barnewolt, C. E., D. Jaramillo, G. A. Taylor and P. S. Dunning (2003). "Correlation of contrast-enhanced power Doppler sonography and conventional angiography of abduction-induced hip ischemia in piglets." AJR Am J Roentgenol **180**(6): 1731-1735.

Barnewolt, C. E., F. Shapiro and D. Jaramillo (1997). "Normal gadolinium-enhanced MR images of the developing appendicular skeleton: Part I. Cartilaginous epiphysis and physis." AJR Am J Roentgenol **169**(1): 183-189.

- Barr, E. D., G. L. Pinchbeck, P. D. Clegg, A. Boyde and C. M. Riggs (2009). "Post mortem evaluation of palmar osteochondral disease (traumatic osteochondrosis) of the metacarpo/metatarsophalangeal joint in Thoroughbred racehorses." Equine Vet J **41**(4): 366-371.
- Barthez, P. Y., R. J. Bais and J. C. Vernooij (2007). "Effect of ultrasound beam angle on equine articular cartilage thickness measurement." Vet Radiol Ultrasound **48**(5): 457-459.
- Bates, J. T., J. C. Jacobs, Jr., K. G. Shea and J. T. Oxford (2014). "Emerging genetic basis of osteochondritis dissecans." Clin Sports Med **33**(2): 199-220.
- Baysson, H., N. Journy, T. Roue, H. Ducou-Lepointe, C. Etard and M. O. Bernier (2016). "[Exposure to CT scans in childhood and long-term cancer risk: A review of epidemiological studies]." Bull Cancer **103**(2): 190-198.
- Beccati, F., H. J. Chalmers, S. Dante, E. Lotto and M. Pepe (2013). "Diagnostic sensitivity and interobserver agreement of radiography and ultrasonography for detecting trochlear ridge osteochondrosis lesions in the equine stifle." Vet Radiol Ultrasound **54**(2): 176-184.
- Bertone, A. L., L. R. Bramlage, C. W. McIlwraith and C. J. Malemud (2005). "Comparison of proteoglycan and collagen in articular cartilage of horses with naturally developing osteochondrosis and healing osteochondral fragments of experimentally induced fractures." Am J Vet Res **66**(11): 1881-1890.
- Billingham, R. C., P. A. Brama, P. R. van Weeren, M. S. Knowlton and C. W. McIlwraith (2004). "Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals." Am J Vet Res **65**(2): 143-150.
- Billingham, R. C., E. M. Buxton, M. G. Edwards, M. S. McGraw and C. W. McIlwraith (2001). "Use of an antineoepitope antibody for identification of type-II collagen degradation in equine articular cartilage." Am J Vet Res **62**(7): 1031-1039.
- Billingham, R. C., L. Dahlberg, M. Ionescu, A. Reiner, R. Bourne, C. Rorabeck, P. Mitchell, J. Hambor, O. Diekmann and H. Tschesche (1997). "Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage." The Journal of clinical investigation **99**(7): 1534-1545.
- Binks, D. A., R. J. Hodgson, M. E. Ries, R. J. Foster, S. W. Smye, D. McGonagle and A. Radjenovic (2013). "Quantitative parametric MRI of articular cartilage: a review of progress and open challenges." Br J Radiol **86**(1023): 20120163.
- Blumer, M. J., S. Longato and H. Fritsch (2008). "Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone." Ann Anat **190**(4): 305-315.

- Bourzac, C., K. Alexander, Y. Rossier and S. Laverty (2009). "Comparison of radiography and ultrasonography for the diagnosis of osteochondritis dissecans in the equine femoropatellar joint." Equine Vet J **41**(7): 685-692.
- Brama, P. A., J. M. Tekoppele, R. A. Bank, A. Barneveld and P. R. van Weeren (2000). "Functional adaptation of equine articular cartilage: the formation of regional biochemical characteristics up to age one year." Equine Vet J **32**(3): 217-221.
- Brama, P. A., J. M. TeKoppele, R. A. Bank, A. Barneveld and P. R. van Weeren (2002). "Development of biochemical heterogeneity of articular cartilage: influences of age and exercise." Equine Vet J **34**(3): 265-269.
- Brama, P. A., J. M. Tekoppele, R. A. Bank, P. R. van Weeren and A. Barneveld (1999). "Influence of different exercise levels and age on the biochemical characteristics of immature equine articular cartilage." Equine Vet J Suppl(31): 55-61.
- Bramono, D. S., J. C. Richmond, P. P. Weitzel, D. L. Kaplan and G. H. Altman (2004). "Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics." Clin Orthop Relat Res(428): 272-285.
- Brendov, E. (1997). Osteochondrosis in Standardbred trotters: heritability and effects on racing performance.
- Bridges, C. H., J. E. Womack, E. D. Harris and W. L. Scrutchfield (1984). "Considerations of copper metabolism in osteochondrosis of suckling foals." J Am Vet Med Assoc **185**(2): 173-178.
- Brommer, H., P. A. Brama, M. S. Laasanen, H. J. Helminen, P. R. van Weeren and J. S. Jurvelin (2005). "Functional adaptation of articular cartilage from birth to maturity under the influence of loading: a biomechanical analysis." Equine Vet J **37**(2): 148-154.
- Brown, C. P., M. A. Houle, K. Popov, M. Nicklaus, C. A. Couture, M. Laliberte, T. Brabec, A. Ruediger, A. J. Carr, A. J. Price, H. S. Gill, L. Ramunno and F. Legare (2013). "Imaging and modeling collagen architecture from the nano to micro scale." Biomed Opt Express **5**(1): 233-243.
- Bruin, G., J. J. H. M. Creemers and E. E. A. Smolders (1992). "Effect of exercise on osteochondrosis in the horse." Equine osteochondrosis in the '90s, Cambridge, UK.
- Byers, P. D. and R. A. Brown (2006). "Cell columns in articular cartilage physes questioned: a review." Osteoarthritis Cartilage **14**(1): 3-12.
- Cahill, B. R. (1995). "Osteochondritis Dissecans of the Knee: Treatment of Juvenile and Adult Forms." J Am Acad Orthop Surg **3**(4): 237-247.

Cao, J., B. Zheng, X. Meng, Y. Lv, H. Lu, K. Wang, D. Huang and J. Ren (2018). "A novel ultrasound scanning approach for evaluating femoral cartilage defects of the knee: comparison with routine magnetic resonance imaging." J Orthop Surg Res **13**(1): 178.

Carlson, C. S., L. D. Cullins and D. J. Meuten (1995). "Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply." Vet Pathol **32**(6): 641-647.

Carlson, C. S., H. D. Hilley, C. K. Henrikson and D. J. Meuten (1986). "The ultrastructure of osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in growing swine." Calcif Tissue Int **38**(1): 44-51.

Carlson, C. S., H. D. Hilley and D. J. Meuten (1989). "Degeneration of cartilage canal vessels associated with lesions of osteochondrosis in swine." Vet Pathol **26**(1): 47-54.

Carlson, C. S., D. J. Meuten and D. C. Richardson (1991). "Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis." J Orthop Res **9**(3): 317-329.

Carmona, J. U., D. Arguelles, R. Deulofeu, D. Martinez-Puig and M. Prades (2009). "Effect of the administration of an oral hyaluronan formulation on clinical and biochemical parameters in young horses with osteochondrosis." Vet Comp Orthop Traumatol **22**(6): 455-459.

Carstens, A., R. M. Kirberger, L. E. Dahlberg, L. Prozesky, L. Fletcher and E. Lammentausta (2013b). "VALIDATION OF DELAYED GADOLINIUM-ENHANCED MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF CARTILAGE AND T2 MAPPING FOR QUANTIFYING DISTAL METACARPUS/METATARSUS CARTILAGE THICKNESS IN THOROUGHBRED RACEHORSES." Veterinary Radiology & Ultrasound **54**(2): 139-148.

Carstens, A., R. M. Kirberger, M. Velleman, L. E. Dahlberg, L. Fletcher and E. Lammentausta (2013). "FEASIBILITY FOR MAPPING CARTILAGE T1 RELAXATION TIMES IN THE DISTAL METACARPUS3/METATARSUS3 OF THOROUGHBRED RACEHORSES USING DELAYED GADOLINIUM-ENHANCED MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF CARTILAGE (dGEMRIC): NORMAL CADAVER STUDY." Veterinary Radiology & Ultrasound **54**(4): 365-372.

Changoor, A., M. Nelea, S. Methot, N. Tran-Khanh, A. Chevrier, A. Restrepo, M. S. Shive, C. D. Hoemann and M. D. Buschmann (2011). "Structural characteristics of the collagen network in human normal, degraded and repair articular cartilages observed in polarized light and scanning electron microscopies." Osteoarthritis Cartilage **19**(12): 1458-1468.

Chaudhary, R., K. R. Campbell, K. B. Tilbury, R. Vanderby, Jr., W. F. Block, R. Kijowski and P. J. Campagnola (2015). "Articular cartilage zonal differentiation via 3D Second-Harmonic Generation imaging microscopy." Connect Tissue Res **56**(2): 76-86.

Chauvin, N. A., V. Ho-Fung, D. Jaramillo, J. C. Edgar and P. F. Weiss (2015). "Ultrasound of the joints and entheses in healthy children." Pediatr Radiol **45**(9): 1344-1354.

- Chien, D., K. K. Kwong, D. R. Gress, F. S. Buonanno, R. B. Buxton and B. R. Rosen (1992). "MR diffusion imaging of cerebral infarction in humans." AJNR Am J Neuroradiol **13**(4): 1097-1102; discussion 1103-1095.
- Clarke, K. L., R. Reardon and T. Russell (2015). "Treatment of osteochondrosis dissecans in the stifle and tarsus of juvenile thoroughbred horses." Vet Surg **44**(3): 297-303.
- Cluzel, C., L. Blond, P. Fontaine, J. Olive and S. Laverty (2013). "Foetal and postnatal equine articular cartilage development: magnetic resonance imaging and polarised light microscopy." Eur Cell Mater **26**: 33-47; discussion 47-38.
- Collado, P., J. Vojinovic, J. C. Nieto, D. Windschall, S. Magni-Manzoni, G. A. Bruyn, A. Iagnocco, A. D'Agostino M and E. Naredo (2016). "Toward Standardized Musculoskeletal Ultrasound in Pediatric Rheumatology: Normal Age-Related Ultrasound Findings." Arthritis Care Res (Hoboken) **68**(3): 348-356.
- Collado, P., D. Windschall, J. Vojinovic, S. Magni-Manzoni, P. Balint, G. A. W. Bruyn, C. Hernandez-Diaz, J. C. Nieto, V. Ravagnani, N. Tzaribachev, A. Iagnocco, M. A. D'Agostino and E. Naredo (2018). "Amendment of the OMERACT ultrasound definitions of joints' features in healthy children when using the DOPPLER technique." Pediatr Rheumatol Online J **16**(1): 23.
- Connolly, S. A., D. Jaramillo, J. K. Hong and F. Shapiro (2004). "Skeletal development in fetal pig specimens: MR imaging of femur with histologic comparison." Radiology **233**(2): 505-514.
- Crema, M. D., F. W. Roemer, M. D. Marra, D. Burstein, G. E. Gold, F. Eckstein, T. Baum, T. J. Mosher, J. A. Carrino and A. Guermazi (2011). "Articular cartilage in the knee: current MR imaging techniques and applications in clinical practice and research." Radiographics **31**(1): 37-61.
- Culjat, M. O., D. Goldenberg, P. Tewari and R. S. Singh (2010). "A review of tissue substitutes for ultrasound imaging." Ultrasound Med Biol **36**(6): 861-873.
- DABAREINER, R. M., K. E. SULLINS and N. A. WHITE (1993). "Progression of Femoropatellar Osteochondrosis in Nine Young Horses Clinical, Radiographic and Arthroscopic Findings." Veterinary Surgery **22**(6): 515-523.
- Dardzinski, B. J., T. Laor, V. J. Schmithorst, L. Klosterman and T. B. Graham (2002). "Mapping T2 relaxation time in the pediatric knee: feasibility with a clinical 1.5-T MR imaging system." Radiology **225**(1): 233-239.
- de Grauw, J. C., M. Donabedian, C. H. van de Lest, G. Perona, C. Robert, O. Lepage, W. Martin-Rosset and P. R. van Weeren (2011). "Assessment of synovial fluid biomarkers in healthy foals and in foals with tarsocrural osteochondrosis." Vet J **190**(3): 390-395.

De Smet, A. A., D. R. Fisher, B. K. Graf and R. H. Lange (1990). "Osteochondritis dissecans of the knee: value of MR imaging in determining lesion stability and the presence of articular cartilage defects." AJR Am J Roentgenol **155**(3): 549-553.

De Smet, A. A., O. A. Ilahi and B. K. Graf (1996). "Reassessment of the MR criteria for stability of osteochondritis dissecans in the knee and ankle." Skeletal Radiol **25**(2): 159-163.

Denecke, R. and G. Trautwein (1986). "Articular cartilage canals—a new pathogenetic mechanism in infectious arthritis." Experientia **42**(9): 999-1001.

Denecke, R., G. Trautwein and F.-J. Kaup (1986). "The role of cartilage canals in the pathogenesis of experimentally induced polyarthritis." Rheumatology international **6**(6): 239-243.

Denk, C. and A. Rauscher (2010). "Susceptibility weighted imaging with multiple echoes." J Magn Reson Imaging **31**(1): 185-191.

Denoix, J. M., L. B. Jeffcott, C. W. McIlwraith and P. R. van Weeren (2013a). "A review of terminology for equine juvenile osteochondral conditions (JOCC) based on anatomical and functional considerations." Vet J.

Der Kinderen, L. (2005). "Heritability of osteochondrosis in Dutch Warmblood stallions from the second stallion inspection." Unpublished dissertation, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands **292**.

Dik, K. J., E. Enzerink and P. R. van Weeren (1999). "Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months." Equine Vet J Suppl(31): 9-15.

Distl, O. (2013). "The genetics of equine osteochondrosis." Vet J **197**(1): 13-18.

Donabédian, M. F., G. Perona, G. Robert, C. Lepage, O. Trillaud-Geyl, C. Leger, S. Ricard, A. Bergero, D. Martin-Rosset, W. (2006). "Effect of fast vs. moderate growth rate related to nutrient intake on developmental orthopaedic disease in the horse " Anim. Res. **55**(5): 471-486.

Doschak, M. R., D. M. Cooper, C. N. Huculak, J. R. Matyas, D. A. Hart, B. Hallgrímsson, R. F. Zernicke and R. C. Bray (2003). "Angiogenesis in the distal femoral chondroepiphysis of the rabbit during development of the secondary centre of ossification." J Anat **203**(2): 223-233.

Dwek, J. R., F. Shapiro, T. Laor, C. E. Barnewolt and D. Jaramillo (1997). "Normal gadolinium-enhanced MR images of the developing appendicular skeleton: Part 2. Epiphyseal and metaphyseal marrow." AJR Am J Roentgenol **169**(1): 191-196.

Ekman, S. and C. S. Carlson (1998). "The pathophysiology of osteochondrosis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **28**(1): 17-32.

Ekman, S., C. S. Carlson and P. R. van Weeren (2009). "Workshop report. Third International Workshop on Equine Osteochondrosis, Stockholm, 29-30th May 2008." Equine Vet J **41**(5): 504-507.

Ekman, S. and D. Heinegard (1992). "Immunohistochemical localization of matrix proteins in the femoral joint cartilage of growing commercial pigs." Vet Pathol **29**(6): 514-520.

Ekman, S., H. Rodriguez-Martinez and L. Ploen (1990). "Morphology of normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage. A study in the domestic pig and minipig of wild hog ancestry." Acta Anat (Basel) **139**(3): 239-253.

Ellermann, J., C. P. Johnson, L. Wang, J. A. Macalena, B. J. Nelson and R. F. LaPrade (2017). "Insights into the Epiphyseal Cartilage Origin and Subsequent Osseous Manifestation of Juvenile Osteochondritis Dissecans with a Modified Clinical MR Imaging Protocol: A Pilot Study." Radiology **282**(3): 798-806.

Emslie, K. R. and S. Nade (1983). "Acute hematogenous staphylococcal osteomyelitis. A description of the natural history in an avian model." The American journal of pathology **110**(3): 333.

Etterlin, P. E., S. Ekman, R. Strand, K. Olstad and C. J. Ley (2017). "Osteochondrosis, Synovial Fossae, and Articular Indentations in the Talus and Distal Tibia of Growing Domestic Pigs and Wild Boars." Vet Pathol **54**(3): 445-456.

Faisal, A., S. C. Ng, S. L. Goh and K. W. Lai (2018). "Knee cartilage segmentation and thickness computation from ultrasound images." Med Biol Eng Comput **56**(4): 657-669.

Finnoy, A., K. Olstad and M. B. Lilledahl (2016). "Second harmonic generation imaging reveals a distinct organization of collagen fibrils in locations associated with cartilage growth." Connect Tissue Res **57**(5): 374-387.

Finnoy, A., K. Olstad and M. B. Lilledahl (2017). "Non-linear optical microscopy of cartilage canals in the distal femur of young pigs may reveal the cause of articular osteochondrosis." BMC Vet Res **13**(1): 270.

Finnoy, A., K. Olstad and M. B. Lilledahl (2018). "Characterization of cellular and matrix alterations in the early pathogenesis of osteochondritis dissecans in pigs using second harmonic generation and two-photon excitation fluorescence microscopy." J Orthop Res.

Firth, E. C. and Y. Greydanus (1987). "Cartilage thickness measurement in foals." Res Vet Sci **42**(1): 35-46.

Firth, E. C. and P. W. Poulos (1982). "Blood vessels in the developing growth plate of the equine distal radius and metacarpus." Res Vet Sci **33**(2): 159-166.

Flachsmann, R., N. D. Broom, A. E. Hardy and G. Moltschaniwskyj (2000). "Why is the adolescent joint particularly susceptible to osteochondral shear fracture?" Clin Orthop Relat Res(381): 212-221.

Floyd, W. E., 3rd, D. J. Zaleske, A. L. Schiller, C. Trahan and H. J. Mankin (1987). "Vascular events associated with the appearance of the secondary center of ossification in the murine distal femoral epiphysis." J Bone Joint Surg Am **69**(2): 185-190.

Flynn, J. M., M. S. Kocher and T. J. Ganley (2004). "Osteochondritis dissecans of the knee." J Pediatr Orthop **24**(4): 434-443.

Foland, J. W., C. W. McIlwraith and G. W. Trotter (1992). "Arthroscopic surgery for osteochondritis dissecans of the femoropatellar joint of the horse." Equine Vet J **24**(6): 419-423.

Fontaine, P., L. Blond, K. Alexander, G. Beauchamp, H. Richard and S. Laverty (2013). "Computed tomography and magnetic resonance imaging in the study of joint development in the equine pelvic limb." Vet J **197**(1): 103-111.

Fontaine, P., L. Blond, K. Alexander, G. Beauchamp, H. Richard and S. Laverty (2013). "Computed tomography and magnetic resonance imaging in the study of joint development in the equine pelvic limb." Vet J.

Fragonas, E., V. m. Mlynárik, V. m. Jellús, F. Micali, A. Piras, R. Toffanin, R. Rizzo and F. Vittur (1998). "Correlation between biochemical composition and magnetic resonance appearance of articular cartilage." Osteoarthritis and cartilage **6**(1): 24-32.

Frantz, N. Z., K. G. Friesen, G. A. Andrews, M. D. Tokach, R. M. Yamka, T. L. Loughin, J. L. Nelssen and S. S. Dritz (2010). "Use of serum biomarkers to predict the development and severity of osteochondrosis lesions in the distal portion of the femur in pigs." Am J Vet Res **71**(8): 946-952.

Frisbie, D., C. Ray, M. Ionescu, A. Poole, P. Chapman and C. McIlwraith (1999). "Measurement of synovial fluid and serum concentrations of the 846 epitope of chondroitin sulfate and of carboxy propeptides of type II procollagen for diagnosis of osteochondral fragmentation in horses." American journal of veterinary research **60**(3): 306-309.

Garvican, E. R., A. Vaughan-Thomas, C. Redmond and P. D. Clegg (2008). "Chondrocytes harvested from osteochondritis dissecans cartilage are able to undergo limited in vitro chondrogenesis despite having perturbations of cell phenotype in vivo." J Orthop Res **26**(8): 1133-1140.

Garvican, E. R., A. Vaughan-Thomas, C. Redmond and P. D. Clegg (2008). "MT3-MMP (MMP-16) is downregulated by in vitro cytokine stimulation of cartilage, but unaltered in naturally occurring equine osteoarthritis and osteochondrosis." Connect Tissue Res **49**(2): 62-67.

Geor, R. J., M. Coenen and P. Harris (2013). Equine Applied and Clinical Nutrition E-Book: Health, Welfare and Performance, Elsevier Health Sciences.

George, L., W. Staniar, K. Treiber, P. Harris and R. Geor (2009). "Insulin sensitivity and glucose dynamics during pre-weaning foal development and in response to maternal diet composition." Domestic animal endocrinology **37**(1): 23-29.

Gilbert, G., G. Savard, C. Bard and G. Beaudoin (2012). "Quantitative comparison between a multiecho sequence and a single-echo sequence for susceptibility-weighted phase imaging." Magn Reson Imaging **30**(5): 722-730.

Glade, M. J. (1986a). "The control of cartilage growth in osteochondrosis: A review." J Equine Vet Sci **6**: 175.

Glade, M. J. (1987). "The role of endocrine factors in equine developmental orthopedic disease." Proc Am Assoc Equine Pract **33**: 171.

Gorissen, B. M. C., C. F. Wolschrijn, F. M. Serra Braganca, A. A. J. Geerts, W. Leenders, W. Back and P. R. van Weeren (2017). "The development of locomotor kinetics in the foal and the effect of osteochondrosis." Equine Vet J **49**(4): 467-474.

Grunder, W. (2006). "MRI assessment of cartilage ultrastructure." NMR Biomed **19**(7): 855-876.

Haacke, E. M., S. Mittal, Z. Wu, J. Neelavalli and Y. C. Cheng (2009). "Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 1." AJNR Am J Neuroradiol **30**(1): 19-30.

Haacke, E. M., Y. Xu, Y. C. N. Cheng and J. R. Reichenbach (2004). "Susceptibility weighted imaging (SWI)." Magnetic resonance in medicine **52**(3): 612-618.

Haacke, E. M. and Y. Ye (2012). "The role of susceptibility weighted imaging in functional MRI." Neuroimage **62**(2): 923-929.

Haeusler, G., I. Walter, M. Helmreich and M. Egerbacher (2005). "Localization of matrix metalloproteinases, (MMPs) their tissue inhibitors, and vascular endothelial growth factor (VEGF) in growth plates of children and adolescents indicates a role for MMPs in human postnatal growth and skeletal maturation." Calcif Tissue Int **76**(5): 326-335.

Haggett, E., A. Foote, M. Head, A. McGladdery and S. Powell (2012). "Necrosis of the femoral condyles in a four-week-old foal: clinical, imaging and histopathological features." Equine veterinary journal **44**(s41): 91-95.

Haines, R. W. (1974). "The pseudoepiphysis of the first metacarpal of man." J Anat **117**(Pt 1): 145-158.

Hance, S., R. Schneider, R. Embertson, L. Bramlage and J. Wicks (1993). "Lesions of the caudal aspect of the femoral condyles in foals: 20 cases (1980-1990)." Journal of the American Veterinary Medical Association **202**(4): 637-646.

Harris, P., W. Staniar and A. D. Ellis (2004). Effect of exercise and diet on the incidence of DOD. The Growing Horse: Nutrition and Prevention of Growth Disorders. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. 2nd European Conference on Equine Nutrition. Dijon, France.

Hayashi, K. (1992). "Three-dimensional organization of the cartilage canal--a scanning electron-microscopic study by vascular cast of the rabbit's femoral head." Nihon Seikeigeka Gakkai zasshi **66**(5): 548-559.

Hellings, I. R., N. I. Dolvik, S. Ekman and K. Olstad (2017). "Cartilage canals in the distal intermediate ridge of the tibia of fetuses and foals are surrounded by different types of collagen." J Anat **231**(4): 615-625.

Hellings, I. R., S. Ekman, K. Hultenby, N. I. Dolvik and K. Olstad (2016). "Discontinuities in the endothelium of epiphyseal cartilage canals and relevance to joint disease in foals." J Anat **228**(1): 162-175.

Hendrickson, E. H., K. Olstad, A. Nødtvedt, E. Pauwels, L. Van Hoorebeke and N. I. Dolvik (2015). "Comparison of the blood supply to the articular-epiphyseal growth complex in horse vs. pony foals." Equine veterinary journal **47**(3): 326-332.

Henrotin, Y., M. Deberg, J. E. Dubuc, E. Quettier, S. Christgau and J. Y. Reginster (2004). "Type II collagen peptides for measuring cartilage degradation." Biorheology **41**(3-4): 543-547.

HENSON, F., C. Davenport, L. Butler, I. Moran, W. Shingleton, L. Jeffcott and P. Schofield (1997). "Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes." Equine veterinary journal **29**(6): 441-447.

Hill, B. D., R. H. Sutton and H. Thompson (1998). "Investigation of osteochondrosis in grazing beef cattle." Aust Vet J **76**(3): 171-175.

Hill, M. A., G. R. Ruth, H. D. Hilley, J. L. Torrison, J. K. Bagent and A. D. Leman (1985). "Dyschondroplasias of growth cartilages (osteochondrosis) in crossbred commercial pigs at one and 15 days of age: radiological, angiomicrographical and histological findings." Vet Rec **116**(2): 40-47.

Hinton, R., Y. Jing, J. Jing and J. Feng (2017). "Roles of chondrocytes in endochondral bone formation and fracture repair." Journal of dental research **96**(1): 23-30.

Hinz, A. and A. T. Fischer, Jr. (2011). "Comparison of the accuracy of radiography and ultrasonography for detection of articular lesions in horses." Vet Surg **40**(7): 881-885.

Ho-Fung, V. M. and D. Jaramillo (2013). "Cartilage imaging in children: current indications, magnetic resonance imaging techniques, and imaging findings." Radiol Clin North Am **51**(4): 689-702.

Hontoir, F., P. Clegg, J. F. Nisolle, S. Tew and J. M. Vandeweerde (2015). "Magnetic resonance compositional imaging of articular cartilage: What can we expect in veterinary medicine?" Vet J **205**(1): 11-20.

Howald, H. (1942). "Zur Kenntnis der Osteochondrosis dissecans (Osteochondritis dissecans)." Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie, mit besonderer Berücksichtigung der Frakturenlehre und der orthopädisch-chirurgischen Technik **41**(4): 730-788.

Hughes, L. C., C. W. Archer and I. ap Gwynn (2005). "The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review." Eur Cell Mater **9**: 68-84.

Hunziker, E. B., E. Kapfinger and J. Geiss (2007). "The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development." Osteoarthritis Cartilage **15**(4): 403-413.

Hurtig, M. B., Pool, R.R. (1996). Pathogenesis of equine osteochondrosis Joint Disease in the Horse. Saunders. Philadelphia: 335-358.

Hyttinen, M. M., J. P. Arokoski, J. J. Parkkinen, M. J. Lammi, T. Lapveteläinen, K. Mauranen, K. Kiraly, M. I. Tammi and H. J. Helminen (2001). "Age matters: collagen birefringence of superficial articular cartilage is increased in young guinea-pigs but decreased in older animals after identical physiological type of joint loading." Osteoarthritis Cartilage **9**(8): 694-701.

Hyttinen, M. M., J. Holopainen, P. R. van Weeren, E. C. Firth, H. J. Helminen and P. A. Brama (2009). "Changes in collagen fibril network organization and proteoglycan distribution in equine articular cartilage during maturation and growth." J Anat **215**(5): 584-591.

Ide, S., S. Kakeda, Y. Korogi, T. Yoneda, J. Nishimura, T. Sato, Y. Hiai, N. Ohnari, M. Takahashi, K. Hachisuka, H. Fujiwara and A. Matsuyama (2012). "Delineation of optic radiation and stria of Gennari on high-resolution phase difference enhanced imaging." Acad Radiol **19**(10): 1283-1289.

Islam, A., E. I. Romijn, M. B. Lilledahl and I. Martinez-Zubiaurre (2017). "Non-linear optical microscopy as a novel quantitative and label-free imaging modality to improve the assessment of tissue-engineered cartilage." Osteoarthritis Cartilage **25**(10): 1729-1737.

Jackson, M., C. Whitton, A. Vizard, G. Anderson and A. Clarke (2009). A prospective study of presale radiographs of Thoroughbred yearlings, RIRDC.

Jacquet, S., C. Robert, J.-P. Valette and J.-M. Denoix (2013). "Evolution of radiological findings detected in the limbs of 321 young horses between the ages of 6 and 18 months." The Veterinary Journal **197**(1): 58-64.

Jaimes, C., N. A. Chauvin, J. Delgado and D. Jaramillo (2014). "MR imaging of normal epiphyseal development and common epiphyseal disorders." Radiographics **34**(2): 449-471.

Jaimes, C., M. Jimenez, D. Marin, V. Ho-Fung and D. Jaramillo (2012). "The trochlear pre-ossification center: a normal developmental stage and potential pitfall on MR images." Pediatr Radiol **42**(11): 1364-1371.

Janet A. Butler, C. M. C., Sue J. Dyson, Svend E. Kold, Paul W. Poulos (2017). Appendix A Fusion times of physes and suture lines. Clinical Radiology of the horse Wiley Blackwell: 749-751.

Jannin, P., J. M. Fitzpatrick, D. J. Hawkes, X. Pennec, R. Shahidi and M. W. Vannier (2002). "Validation of medical image processing in image-guided therapy." IEEE Trans Med Imaging **21**(12): 1445-1449.

Jannin, P., E. Krupinski and S. Warfield (2006). "Validation in medical image processing." IEEE Trans Med Imaging **25**(11): 1405-1409.

Jans, L., J. Jaremko, M. Ditchfield, T. De Coninck, W. Huysse, A. Moon and K. Verstraete (2012). "Ossification variants of the femoral condyles are not associated with osteochondritis dissecans." Eur J Radiol **81**(11): 3384-3389.

Jans, L. B., J. L. Jaremko, M. Ditchfield, W. C. Huysse and K. L. Verstraete (2011a). "MRI differentiates femoral condylar ossification evolution from osteochondritis dissecans. A new sign." Eur Radiol **21**(6): 1170-1179.

Jaramillo, D., S. A. Connolly, R. V. Mulkern and F. Shapiro (1998). "Developing epiphysis: MR imaging characteristics and histologic correlation in the newborn lamb." Radiology **207**(3): 637-645.

Jaramillo, D., S. A. Connolly, S. Vajapeyam, R. L. Robertson, P. S. Dunning, R. V. Mulkern, A. Hayward, S. E. Maier and F. Shapiro (2003). "Normal and ischemic epiphysis of the femur: diffusion MR imaging study in piglets." Radiology **227**(3): 825-832.

Jaramillo, D., O. Villegas-Medina, T. Laor, F. Shapiro and M. B. Millis (1998). "Gadolinium-enhanced MR imaging of pediatric patients after reduction of dysplastic hips: assessment of femoral head position, factors impeding reduction, and femoral head ischemia." AJR Am J Roentgenol **170**(6): 1633-1637.

Jaramillo, D., O. L. Villegas-Medina, D. K. Doty, J. R. Dwek, B. J. Ransil, R. V. Mulkern and F. Shapiro (1996). "Gadolinium-enhanced MR imaging demonstrates abduction-caused hip ischemia and its reversal in piglets." AJR Am J Roentgenol **166**(4): 879-887.

Jaramillo, D., O. L. Villegas-Medina, D. K. Doty, R. Rivas, K. Strife, J. R. Dwek, R. V. Mulkern and F. Shapiro (2004). "Age-related vascular changes in the epiphysis, physis, and metaphysis: normal findings on gadolinium-enhanced MRI of piglets." AJR Am J Roentgenol **182**(2): 353-360.

Jeffcott, L. B. (1991). "Osteochondrosis in the horse--searching for the key to pathogenesis." Equine Vet J **23**(5): 331-338.

Jenner, F., I. J. A. M. Cleary, D. Heijnsman, R. Narcisi, P. J. van der Spek, A. Kremer, R. van Weeren, P. Brama and G. J. van Osch (2014). "Differential gene expression of the intermediate and outer interzone layers of developing articular cartilage in murine embryos." Stem Cells Dev **23**(16): 1883-1898.

Jensen, R., R. D. Park, L. H. Lauerman, P. M. Braddy, D. P. Horton, D. E. Flack, M. F. Cox, N. Einertson, G. K. Miller and C. E. Rehfeld (1981). "Osteochondrosis in feedlot cattle." Vet Pathol **18**(4): 529-535.

Johnson, C. P., L. Wang, F. Toth, O. Aruwajoye, C. S. Carlson, H. K. W. Kim and J. M. Ellermann (2018). "Quantitative MRI Helps to Detect Hip Ischemia: Preclinical Model of Legg-Calve-Perthes Disease." Radiology **289**(2): 386-395.

Julkunen, P., T. Harjula, J. Iivarinen, J. Marjanen, K. Seppanen, T. Narhi, J. Arokoski, M. J. Lammi, P. A. Brama, J. S. Jurvelin and H. J. Helminen (2009). "Biomechanical, biochemical and structural correlations in immature and mature rabbit articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **17**(12): 1628-1638.

Julkunen, P., J. Iivarinen, P. A. Brama, J. Arokoski, J. S. Jurvelin and H. J. Helminen (2010). "Maturation of collagen fibril network structure in tibial and femoral cartilage of rabbits." Osteoarthritis Cartilage **18**(3): 406-415.

Kakeda, S., Y. Korogi, T. Yoneda, J. Nishimura, T. Sato, Y. Hiai, N. Ohnari, K. Okada, H. Hayashi, E. Matsusue, T. Uozumi and S. Tsuji (2011). "A novel tract imaging technique of the brainstem using phase difference enhanced imaging: normal anatomy and initial experience in multiple system atrophy." Eur Radiol **21**(10): 2202-2210.

Khanna, P. C. and M. M. Thapa (2009). "The growing skeleton: MR imaging appearances of developing cartilage." Magn Reson Imaging Clin N Am **17**(3): 411-421, v.

Kijowski, R., D. G. Blankenbaker, K. Shinki, J. P. Fine, B. K. Graf and A. A. De Smet (2008). "Juvenile versus adult osteochondritis dissecans of the knee: appropriate MR imaging criteria for instability." Radiology **248**(2): 571-578.

Kincaid, S., R. Allhands and G. Pijanowski (1985). "Chondrolysis associated with cartilage canals of the epiphyseal cartilage of the distal humerus of growing pigs." American journal of veterinary research **46**(3): 726-732.

Klein, T. J., M. Chaudhry, W. C. Bae and R. L. Sah (2007). "Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage." J Biomech **40**(1): 182-190.

Kocher, M. S., R. Tucker, T. J. Ganley and J. M. Flynn (2006). "Management of osteochondritis dissecans of the knee: current concepts review." Am J Sports Med **34**(7): 1181-1191.

Koff, M. F., P. Shah, S. Pownder, B. Romero, R. Williams, S. Gilbert, S. Maher, L. A. Fortier, S. A. Rodeo and H. G. Potter (2013). "Correlation of meniscal T2* with multiphoton microscopy, and change of articular cartilage T2 in an ovine model of meniscal repair." Osteoarthritis Cartilage **21**(8): 1083-1091.

Kolb, A., S. Robinson, D. Stelzener, M. Schreiner, C. Chiari, R. Windhager, S. Trattnig and K. Bohndorf (2018). "Vessel architecture in human knee cartilage in children: an in vivo susceptibility-weighted imaging study at 7 T." Eur Radiol.

Konig, F. (1888). "Ueber freie Korper in den Gelenken." Dtsch Zeitschr Chir **27**: 90-109.

Kronenberg, H. M. and U. Chung (2001). "The parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog feedback loop in the growth plate." Novartis Found Symp **232**: 144-152; discussion 152-147.

Kugler, J. H., A. Tomlinson, A. Wagstaff and S. M. Ward (1979). "The role of cartilage canals in the formation of secondary centres of ossification." Journal of Anatomy **129**(Pt 3): 493-506.

Kurkijarvi, J. E., M. J. Nissi, J. Rieppo, J. Toyras, I. Kiviranta, M. T. Nieminen and J. S. Jurvelin (2008). "The zonal architecture of human articular cartilage described by T2 relaxation time in the presence of Gd-DTPA2." Magn Reson Imaging **26**(5): 602-607.

Kuroki, K., J. L. Cook, A. M. Stoker, S. E. Turnquist, J. M. Kreeger and J. L. Tomlinson (2005). "Characterizing osteochondrosis in the dog: potential roles for matrix metalloproteinases and mechanical load in pathogenesis and disease progression." Osteoarthritis Cartilage **13**(3): 225-234.

L.C., V., F. M. D. Henson, P. D and e. al. (1997). "Lesions of the lateral trochlear ridge of the distal femur in ponies with histological features of equine dyschondroplasia." Proc Br Equin Vet Assoc **36**(153).

Lamer, S., S. Dorgeret, A. Khairouni, K. Mazda, P. Y. Brillet, E. Bacheville, J. Bloch, G. F. Pennecot, M. Hassan and G. H. Sebag (2002). "Femoral head vascularisation in Legg-Calve-Perthes disease: comparison of dynamic gadolinium-enhanced subtraction MRI with bone scintigraphy." Pediatr Radiol **32**(8): 580-585.

Lang, P., M. Mauz, W. Schorner, G. Schwetlick, H. Henkes, Y. Berthezene, S. Grampp, H. E. Jergesen, A. Muhler, R. Felix and et al. (1993). "Acute fracture of the femoral neck: assessment of femoral head perfusion with gadopentetate dimeglumine-enhanced MR imaging." AJR Am J Roentgenol **160**(2): 335-341.

Laor, T. and D. Jaramillo (2009). "MR imaging insights into skeletal maturation: what is normal?" Radiology **250**(1): 28-38.

Lavery, S. and C. Girard (2013). "Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis." Vet J.

Lavery, S. and C. Girard (2013). "Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis." Vet J **197**(1): 3-12.

Lavery, S., M. Ionescu, M. Marcoux, L. Boure, B. Doize and A. R. Poole (2000). "Alterations in cartilage type-II procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis." J Orthop Res **18**(3): 399-405.

Lavery, S., S. Okouneff, M. Ionescu, A. Reiner, I. Pidoux, C. Webber, Y. Rossier, R. C. Billinghamurst and A. R. Poole (2002). "Excessive degradation of type II collagen in articular cartilage in equine osteochondrosis." J Orthop Res **20**(6): 1282-1289.

Lecocq, M., C. A. Girard, U. Fogarty, G. Beauchamp, H. Richard and S. Lavery (2008). "Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis?" Equine Vet J **40**(5): 442-454.

Lee, E. R., L. Lamplugh, M. A. Davoli, A. Beauchemin, K. Chan, J. S. Mort and C. P. Leblond (2001). "Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats ages 0-21 days: I. Two groups of proteinases cleave the core protein of aggrecan." Dev Dyn **222**(1): 52-70.

Lehner, K. B., H. P. Rechl, J. K. Gmeinwieser, A. F. Heuck, H. P. Lukas and H. P. Kohl (1989). "Structure, function, and degeneration of bovine hyaline cartilage: assessment with MR imaging in vitro." Radiology **170**(2): 495-499.

Lepeule, J., N. Bareille, C. Robert, P. Ezanno, J. P. Valette, S. Jacquet, G. Blanchard, J. M. Denoix and H. Seegers (2009). "Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the prevalence of Developmental Orthopaedic Disease in limbs of French foals at weaning." Prev Vet Med **89**(3-4): 167-177.

Lewis, R. (1986). Incidence of developmental orthopedic lesions. AQHA Developmental Orthopedic Disease Symposium, American Quarter Horse Association.

Li, X. and S. Majumdar (2013). "Quantitative MRI of articular cartilage and its clinical applications." J Magn Reson Imaging **38**(5): 991-1008.

Li, X., A. Pai, G. Blumenkrantz, J. Carballido-Gamio, T. Link, B. Ma, M. Ries and S. Majumdar (2009). "Spatial distribution and relationship of T1rho and T2 relaxation times in knee cartilage with osteoarthritis." Magn Reson Med **61**(6): 1310-1318.

Li, X., R. Wang, Y. Li, L. Tang, J. Hu and A. Xu (2005). "Epiphyseal and physeal cartilage: normal gadolinium-enhanced MR imaging." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **25**(2): 209-211.

Limaye, A. (2012). Drishti: a volume exploration and presentation tool.

Loeuille, D., P. Olivier, A. Watrin, L. Grossin, P. Gonord, G. Guillot, S. Etienne, A. Blum, P. Netter and P. Gillet (2002). "The biochemical content of articular cartilage: an original MRI approach." Biorheology **39**(1-2): 269-276.

Lüssea, S., H. Claassen, T. Gehrke, J. Hassenpflug, M. Schünke, M. Heller and C.-C. Glüer (2000). "Evaluation of water content by spatially resolved transverse relaxation times of human articular cartilage." Magnetic resonance imaging **18**(4): 423-430.

MacKay, J. W., S. B. L. Low, T. O. Smith, A. P. Toms, A. W. McCaskie and F. J. Gilbert (2018). "Systematic review and meta-analysis of the reliability and discriminative validity of cartilage compositional MRI in knee osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage.

Mackie, E. J., Y. A. Ahmed, L. Tatarczuch, K. S. Chen and M. Mirams (2008). "Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 46-62.

Mackie, E. J., L. Tatarczuch and M. Mirams (2011). "The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification." J Endocrinol **211**(2): 109-121.

Malemud, C. J. (2006). "Matrix metalloproteinases: role in skeletal development and growth plate disorders." Front Biosci **11**: 1702-1715.

Marques, J. P., Bowtell, R. (2005). "Application of a Fourier-Based Method for Rapid Calculation of Field Inhomogeneity Due to Spatial Variation of Magnetic Susceptibility." Concepts in Magnetic Resonance Part B (Magnetic Resonance Engineering) **25B**: 65-78.

Martel, G., C. A. Couture, G. Gilbert, S. Bancelin, H. Richard, T. Moser, S. Kiss, F. Légaré and S. Laverty (2016). "Femoral epiphyseal cartilage matrix changes at predilection sites of equine osteochondrosis: Quantitative MRI, second-harmonic microscopy, and histological findings." Journal of Orthopaedic Research.

Martel, G., C. Forget, G. Gilbert, H. Richard, T. Moser, J. Olive and S. Laverty (2017). "Validation of the ultrasonographic assessment of the femoral trochlea epiphyseal cartilage in foals at osteochondrosis predilected sites with MRI and histology." Equine Vet J.

Martel, G., S. Kiss, G. Gilbert, N. Anne-Archard, H. Richard, T. Moser and S. Laverty (2016). "Differences in the vascular tree of the femoral trochlear growth cartilage at osteochondrosis-susceptible sites in foals revealed by SWI 3T MRI." J Orthop Res.

Matcher, S. J. (2015). "What can biophotonics tell us about the 3D microstructure of articular cartilage?" Quant Imaging Med Surg **5**(1): 143-158.

McCoy AM, T. F., Dolvik NI, Ekman S, Ellermann J, Olstad K, Ytrehus B, Carlson CS. (2013). "Articular osteochondrosis: a comparison of naturally-occurring human and animal disease." Osteoarthritis Cartilage. **21**(11): 1638-1647.

McCoy, A. M., F. Toth, N. I. Dolvik, S. Ekman, J. Ellermann, K. Olstad, B. Ytrehus and C. S. Carlson (2013). "Articular osteochondrosis: a comparison of naturally-occurring human and animal disease." Osteoarthritis Cartilage **21**(11): 1638-1647.

McIlwraith, C. (1982). "SUB-CHONDRAL CYSTIC LESIONS (OSTEOCHONDROSIS) IN THE HORSE." Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian **4**(9): S394-S404.

McIlwraith, C. T. G. (1996). Joint disease in the horse. United States, W.B. Saunders Company.

McIlwraith, C. W. (2013). "Surgical versus conservative management of osteochondrosis." The Veterinary Journal **197**(1): 19-28.

McIlwraith, C. W. (2013). "Surgical versus conservative management of osteochondrosis." Vet J **197**(1): 19-28.

McIlwraith, C. W., J. J. Foerner and D. M. Davis (1991). "Osteochondritis dissecans of the tarsocrural joint: results of treatment with arthroscopic surgery." Equine Vet J **23**(3): 155-162.

McIntosh, S. and C. McIlwraith (1993). "Natural history of femoropatellar osteochondrosis in three crops of Thoroughbreds." Equine Veterinary Journal **25**(S16): 54-61.

McRobbie, D., E. Moore, M. Graves and M. Prince (2007). Chapter 8, Getting in tune: resonance & relaxation, MRI from picture to proton. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Menendez, M., D. Clark, M. Carlton, D. Flanigan, G. Jia, S. Sammet, S. Weisbrode, M. Knopp and A. Bertone (2011). "Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model." Osteoarthritis and cartilage **19**(8): 1066-1075.

Menezes, N. M., S. A. Connolly, F. Shapiro, E. A. Olear, R. M. Jimenez, D. Zurakowski and D. Jaramillo (2007). "Early ischemia in growing piglet skeleton: MR diffusion and perfusion imaging." Radiology **242**(1): 129-136.

Menezes, N. M., M. L. Gray, J. R. Hartke and D. Burstein (2004). "T2 and T1rho MRI in articular cartilage systems." Magn Reson Med **51**(3): 503-509.

Menezes, N. M., E. A. Olear, X. Li, S. A. Connolly, D. Zurakowski, M. Foley, F. Shapiro and D. Jaramillo (2006). "Gadolinium-enhanced MR images of the growing piglet skeleton: ionic versus nonionic contrast agent." Radiology **239**(2): 406-414.

Mesgarzadeh, M., A. A. Sapega, A. Bonakdarpour, G. Revesz, R. A. Moyer, A. H. Maurer and P. D. Alburger (1987). "Osteochondritis dissecans: analysis of mechanical stability with radiography, scintigraphy, and MR imaging." Radiology **165**(3): 775-780.

- Miramis, M., L. Tatarczuch, Y. A. Ahmed, C. N. Pagel, L. B. Jeffcott, H. M. Davies and E. J. Mackie (2009). "Altered gene expression in early osteochondrosis lesions." J Orthop Res **27**(4): 452-457.
- Moktassi, A., C. A. Popkin, L. M. White and M. L. Murnaghan (2012). "Imaging of osteochondritis dissecans." Orthop Clin North Am **43**(2): 201-211, v-vi.
- Mosher, T. J. and B. J. Dardzinski (2004). "Cartilage MRI T2 relaxation time mapping: overview and applications." Semin Musculoskelet Radiol **8**(4): 355-368.
- Mubarak, S. J. and N. C. Carroll (1981). "Juvenile osteochondritis dissecans of the knee: etiology." Clin Orthop Relat Res(157): 200-211.
- Mundlos, S., R. Meyer, Y. Yamada and B. Zabel (1991). "Distribution of cartilage proteoglycan (aggrecan) core protein and link protein gene expression during human skeletal development." Matrix **11**(5): 339-346.
- Naccache, F., J. Metzger and O. Distl (2018). "Genetic risk factors for osteochondrosis in various horse breeds." Equine Vet J.
- Nakano, T. and F. X. Aherne (1988). "Involvement of trauma in the pathogenesis of osteochondritis dissecans in swine." Can J Vet Res **52**(1): 154-155.
- Nauwelaerts, S., S. R. Malone and H. M. Clayton (2013). "Development of postural balance in foals." The Veterinary Journal **198**: e70-e74.
- Nelson, B. B., C. E. Kawcak, M. F. Barrett, C. W. McIlwraith, M. W. Grinstaff and L. R. Goodrich (2018). "Recent advances in articular cartilage evaluation using computed tomography and magnetic resonance imaging." Equine Vet J.
- Nelson, D. W., J. DiPaola, M. Colville and J. Schmidgall (1990). "Osteochondritis dissecans of the talus and knee: prospective comparison of MR and arthroscopic classifications." J Comput Assist Tomogr **14**(5): 804-808.
- Nelson, F., L. Dahlberg, S. Laverty, A. Reiner, I. Pidoux, M. Ionescu, G. L. Fraser, E. Brooks, M. Tanzer and L. C. Rosenberg (1998). "Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis." The Journal of clinical investigation **102**(12): 2115-2125.
- Newman, A. P. (1998). "Articular cartilage repair." Am J Sports Med **26**(2): 309-324.
- Nieminen, M. T., J. Rieppo, J. Toyras, J. M. Hakumäki, J. Silvennoinen, M. M. Hyttinen, H. J. Helminen and J. S. Jurvelin (2001). "T2 relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: a comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study." Magn Reson Med **46**(3): 487-493.
- Nieminen, M. T., J. Töyräs, J. Rieppo, J. M. Hakumäki, J. Silvennoinen, H. J. Helminen and J. S. Jurvelin (2000). "Quantitative MR microscopy of enzymatically degraded articular

cartilage." Magnetic Resonance in Medicine: An Official Journal of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine **43**(5): 676-681.

Nissi, M. J., J. Rieppo, J. Toyras, M. S. Laasanen, I. Kiviranta, J. S. Jurvelin and M. T. Nieminen (2006). "T(2) relaxation time mapping reveals age- and species-related diversity of collagen network architecture in articular cartilage." Osteoarthritis Cartilage **14**(12): 1265-1271.

Nissi, M. J., F. Toth, L. Wang, C. S. Carlson and J. M. Ellermann (2015). "Improved Visualization of Cartilage Canals Using Quantitative Susceptibility Mapping." PLoS One **10**(7): e0132167.

Nissi, M. J., F. Toth, J. Zhang, S. Schmitter, M. Benson, C. S. Carlson and J. M. Ellermann (2013). "Susceptibility weighted imaging of cartilage canals in porcine epiphyseal growth cartilage ex vivo and in vivo." Magn Reson Med.

Nissi, M. J., F. Toth, J. Zhang, S. Schmitter, M. Benson, C. S. Carlson and J. M. Ellermann (2014). "Susceptibility weighted imaging of cartilage canals in porcine epiphyseal growth cartilage ex vivo and in vivo." Magn Reson Med **71**(6): 2197-2205.

Nixon, A., L. Fortier, L. Goodrich and N. Ducharme (2004). "Arthroscopic reattachment of osteochondritis dissecans lesions using resorbable polydioxanone pins." Equine veterinary journal **36**(5): 376-383.

Nixon, A. J. and R. R. Pool (1995). "Histologic appearance of axial osteochondral fragments from the proximoplantar/proximopalmar aspect of the proximal phalanx in horses." J Am Vet Med Assoc **207**(8): 1076-1080.

O'Connor, M. A., M. Palaniappan, N. Khan and C. E. Bruce (2002). "Osteochondritis dissecans of the knee in children. A comparison of MRI and arthroscopic findings." J Bone Joint Surg Br **84**(2): 258-262.

Oeppen, R. S. and D. Jaramillo (2003). "Sports injuries in the young athlete." Top Magn Reson Imaging **14**(2): 199-208.

Oinas, J., A. P. Ronkainen, L. Rieppo, M. A. J. Finnila, J. T. Iivarinen, P. R. van Weeren, H. J. Helminen, P. A. J. Brama, R. K. Korhonen and S. Saarakkala (2018). "Composition, structure and tensile biomechanical properties of equine articular cartilage during growth and maturation." Sci Rep **8**(1): 11357.

Olsson, s. (1973). Osteochondrosis dissecans in dog-study of pathogenesis, clinical signs, pathologic-changes, natural course and sequelae. Journal of the american veterinary radiology society, amer veterinary radiology soc 1800 pickwick ave, glenview, il 60025.

Olstad, K., V. Cnudde, B. Masschaele, R. Thomassen and N. I. Dolvik (2008a). "Micro-computed tomography of early lesions of osteochondrosis in the tarsus of foals." Bone **43**(3): 574-583.

Olstad, K., E. Hendrickson and N. Dolvik (2010). Diagnostic imaging of induced lesions of osteochondrosis in the distal femur of Norwegian Fjord Pony foals. British Equine Veterinary Association Congress: 2010.

Olstad, K., E. Hendrickson and N. Dolvik (2010). Diagnostic imaging of induced lesions of osteochondrosis in the distal femur of Norwegian Fjord Pony foals. Proceedings of British Equine Veterinary Association Congress. Fordham: British Equine Veterinary Association.

Olstad, K., E. H. Hendrickson, C. S. Carlson, S. Ekman and N. I. Dolvik (2013). "Transection of vessels in epiphyseal cartilage canals leads to osteochondrosis and osteochondrosis dissecans in the femoro-patellar joint of foals; a potential model of juvenile osteochondritis dissecans." Osteoarthritis Cartilage **21**(5): 730-738.

Olstad, K., J. Kongsro, E. Grindflek and N. I. Dolvik (2014). "Ossification defects detected in CT scans represent early osteochondrosis in the distal femur of piglets." J Orthop Res **32**(8): 1014-1023.

Olstad, K., J. Kongsro, E. Grindflek and N. I. Dolvik (2014b). "Consequences of the natural course of articular osteochondrosis in pigs for the suitability of computed tomography as a screening tool." BMC Vet Res **10**: 212.

Olstad, K., B. Ytrehus, S. Ekman, C. S. Carlson and N. I. Dolvik (2007). "Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals." J Orthop Res **25**(8): 1094-1105.

Olstad, K., B. Ytrehus, S. Ekman, C. S. Carlson and N. I. Dolvik (2008b). "Epiphyseal cartilage canal blood supply to the tarsus of foals and relationship to osteochondrosis." Equine Vet J **40**(1): 30-39.

Olstad, K., B. Ytrehus, S. Ekman, C. S. Carlson and N. I. Dolvik (2008c). "Epiphyseal cartilage canal blood supply to the distal femur of foals." Equine Vet J **40**(5): 433-439.

Olstad, K., B. Ytrehus, S. Ekman, C. S. Carlson and N. I. Dolvik (2009). "Epiphyseal cartilage canal blood supply to the metatarsophalangeal joint of foals." Equine Vet J **41**(9): 865-871.

Olstad, K., B. Ytrehus, S. Ekman, C. S. Carlson and N. I. Dolvik (2011). "Early lesions of articular osteochondrosis in the distal femur of foals." Vet Pathol **48**(6): 1165-1175.

Ono, N., W. Ono, T. Nagasawa and H. M. Kronenberg (2014). "A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones." Nature cell biology **16**(12): 1157.

Orth, M. W., T. L. Peters and K. A. Chlebek-Brown (2000). "Cartilage turnover in embryonic chick tibial explant cultures." Poult Sci **79**(7): 990-993.

Pagan, J. D., R. J. Geor, S. E. Caddel, P. B. Pryor and K. E. Hoekstra (2005). "The relationship between glycemic response and the incidence of OCD in Thoroughbred weanlings: A field study." Advances in Equine Nutrition III **3**: 433.

- Park, J., M. Gebhardt, S. Golovchenko, F. Perez-Branguli, T. Hattori, C. Hartmann, X. Zhou, M. Stock, H. Schneider and K. von der Mark (2015). "Dual pathways to endochondral osteoblasts: a novel chondrocyte-derived osteoprogenitor cell identified in hypertrophic cartilage." Biology open **4**(5): 608-621.
- Pastoureau, P. and A. Chomel (2004). "Methods for cartilage and subchondral bone histomorphometry." Methods Mol Med **101**: 79-91.
- Pastoureau, P., S. Leduc, A. Chomel and F. De Ceuninck (2003). "Quantitative assessment of articular cartilage and subchondral bone histology in the meniscectomized guinea pig model of osteoarthritis." Osteoarthritis Cartilage **11**(6): 412-423.
- Peugnet, P., M. Robles, L. Mendoza, L. Wimel, C. Dubois, M. Dahirel, D. Guillaume, S. Camous, V. Berthelot and M.-P. Toquet (2015). "Effects of moderate amounts of barley in late pregnancy on growth, glucose metabolism and osteoarticular status of pre-weaning horses." PloS one **10**(4): e0122596.
- Pieramati, C., M. Pepe, M. Silvestrelli and A. Bolla (2003). "Heritability estimation of osteochondrosis dissecans in Maremmano horses." Livestock Production Science **79**(2): 249-255.
- Poole, A. R., M. Ionescu, M. A. Fitzcharles and R. C. Billingham (2004). "The assessment of cartilage degradation in vivo: development of an immunoassay for the measurement in body fluids of type II collagen cleaved by collagenases." J Immunol Methods **294**(1-2): 145-153.
- Poole, A. R., T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi and S. Laverty (2001). "Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair." Clin Orthop Relat Res(391 Suppl): S26-33.
- Poulos, P. W., Jr. (1978). "Tibial dyschondroplasia (osteochondrosis) in the turkey. A morphologic investigation." Acta Radiol Suppl **358**: 197-227.
- Poulos, P. W., Jr., S. Reiland, K. Elwinger and S. E. Olsson (1978). "Skeletal lesions in the broiler, with special reference to dyschondroplasia (osteochondrosis). Pathology, frequency and clinical significance in two strains of birds on high and low energy feed." Acta Radiol Suppl **358**: 229-275.
- Pradsgaard, D. O., B. Fiirgaard, A. H. Spannow, C. Heuck and T. Herlin (2015). "Cartilage thickness of the knee joint in juvenile idiopathic arthritis: comparative assessment by ultrasonography and magnetic resonance imaging." J Rheumatol **42**(3): 534-540.
- Pradsgaard, D. O., A. H. Spannow, C. Heuck and T. Herlin (2013). "Decreased cartilage thickness in juvenile idiopathic arthritis assessed by ultrasonography." J Rheumatol **40**(9): 1596-1603.
- Provot, S. and E. Schipani (2005). "Molecular mechanisms of endochondral bone development." Biochem Biophys Res Commun **328**(3): 658-665.

- Ralston, S. (1996). "Hyperglycemia/hyperinsulinemia after feeding a meal of grain to young horses with osteochondritis dissecans (OCD) lesions." month **3**(1): 4.
- Reiland, S. (1978). "Morphology of osteochondrosis and sequelae in pigs." Acta Radiol Suppl **358**: 45-90.
- Reiland, S., B. Stromberg, S. E. Olsson, I. Dreimanis and I. G. Olsson (1978). "Osteochondrosis in growing bulls. Pathology, frequency and severity on different feedings." Acta Radiol Suppl **358**: 179-196.
- Rejno, S. and B. Stromberg (1978). "Osteochondrosis in the horse. II. Pathology." Acta Radiol Suppl **358**: 153-178.
- Rezakhaniha, R., A. Agianniotis, J. T. Schrauwen, A. Griffa, D. Sage, C. V. Bouten, F. N. van de Vosse, M. Unser and N. Stergiopoulos (2012). "Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy." Biomech Model Mechanobiol **11**(3-4): 461-473.
- Ricard, A. (2002). "Genetic background of osteochondrosis." 55th Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod., Bled, Slovenia, Sep: 5-8.
- Rieppo, J., M. M. Hyttinen, E. Halmesmaki, H. Ruotsalainen, A. Vasara, I. Kiviranta, J. S. Jurvelin and H. J. Helminen (2009). "Changes in spatial collagen content and collagen network architecture in porcine articular cartilage during growth and maturation." Osteoarthritis Cartilage **17**(4): 448-455.
- Rivas, R. and F. Shapiro (2002). "Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit." J Bone Joint Surg Am **84-A**(1): 85-100.
- Robert, C., J. P. Valette and J. M. Denoix (2006). "Correlation between routine radiographic findings and early racing career in French trotters." Equine Vet J Suppl(36): 473-478.
- Robertson, W., B. T. Kelly and D. W. Green (2003). "Osteochondritis dissecans of the knee in children." Curr Opin Pediatr **15**(1): 38-44.
- Robles, M., C. Gautier, L. Mendoza, P. Peugnet, C. Dubois, M. Dahirel, J.-P. Lejeune, I. Caudron, I. Guenon and S. Camous (2017). "Maternal nutrition during pregnancy affects testicular and bone development, glucose metabolism and response to overnutrition in weaned horses up to two years." PloS one **12**(1): e0169295.
- Robles, M., E. Nouveau, C. Gautier, L. Mendoza, C. Dubois, M. Dahirel, B. Lagofun, M. Aubrière, J. Lejeune and I. Caudron (2018). "Maternal obesity increases insulin resistance, low-grade inflammation and osteochondrosis lesions in foals and yearlings until 18 months of age." PloS one **13**(1): e0190309.
- Rosset, A., L. Spadola and O. Ratib (2004). "OsiriX: an open-source software for navigating in multidimensional DICOM images." J Digit Imaging **17**(3): 205-216.

Roth, J., S. Jousse-Joulin, S. Magni-Manzoni, A. Rodriguez, N. Tzaribachev, A. Iagnocco, E. Naredo, M. A. D'Agostino and P. Collado (2015). "Definitions for the sonographic features of joints in healthy children." Arthritis Care Res (Hoboken) **67**(1): 136-142.

Roth, J., V. Ravagnani, M. Backhaus, P. Balint, A. Bruns, G. A. Bruyn, P. Collado, L. De la Cruz, S. Guillaume-Czitrom, T. Herlin, C. Hernandez, A. Iagnocco, S. Jousse-Joulin, S. Lanni, V. Lilleby, C. Malattia, S. Magni-Manzoni, C. Modesto, A. Rodriguez, J. C. Nieto, S. Ohrndorf, L. Rossi-Semerano, A. M. Selvaag, N. Swen, T. V. Ting, N. Tzaribachev, P. Vega-Fernandez, J. Vojinovic, D. Windschall, M. A. D'Agostino and E. Naredo (2017). "Preliminary Definitions for the Sonographic Features of Synovitis in Children." Arthritis Care Res (Hoboken) **69**(8): 1217-1223.

Russell, J., O. Matika, T. Russell and R. J. Reardon (2016). "Heritability and prevalence of selected osteochondrosis lesions in yearling Thoroughbred horses." Equine Vet J.

Salomir, R., B. D. de Senneville and C. T. Moonen (2003). "A fast calculation method for magnetic field inhomogeneity due to an arbitrary distribution of bulk susceptibility." Concepts in Magnetic Resonance Part B: Magnetic Resonance Engineering: An Educational Journal **19**(1): 26-34.

Sandgren B, D. G., Carlsten J (1993). "Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints in Standardbred trotters.I. A radiological survey." Equine Vet J Suppl **16**: 31-37.

Sankar, W. N., T. H. Matheney and I. Zaltz (2013). "Femoroacetabular impingement: current concepts and controversies." Orthop Clin North Am **44**(4): 575-589.

Savage, C., R. McCarthy and L. Jeffcott (1993a). "Effects of dietary energy and protein on induction of dyschondroplasia in foals." Equine Veterinary Journal **25**(S16): 74-79.

Schmitz, N., S. Laverty, V. B. Kraus and T. Aigner (2010). "Basic methods in histopathology of joint tissues." Osteoarthritis Cartilage **18 Suppl 3**: S113-116.

Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-675.

Schober, M., M. Coenen, O. Distl, B. Hertsch, L. Christmann and E. Bruns (2003). "Estimation of genetic parameters of osteochondrosis (OC) in Hanoverian warmblood foals." 54th Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod., Rome, Italy, Aug **31**: 389.

Scott, C. A., H. A. Gibbs and H. Thompson (1996). "Osteochondrosis as a cause of lameness in purebred Suffolk lambs." Vet Rec **139**(7): 165-167.

Semevolos, S. A. (2017). "Osteochondritis Dissecans Development." Vet Clin North Am Equine Pract **33**(2): 367-378.

Semevolos, S. A., A. J. Nixon and B. D. Brower-Toland (2001). "Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II, and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis." Am J Vet Res **62**(7): 1088-1094.

Semevolos, S. A., A. J. Nixon and M. L. Strassheim (2004). "Expression of bone morphogenetic protein-6 and -2 and a bone morphogenetic protein antagonist in horses with naturally acquired osteochondrosis." Am J Vet Res **65**(1): 110-115.

Semevolos, S. A., M. L. Strassheim, J. L. Haupt and A. J. Nixon (2005). "Expression patterns of hedgehog signaling peptides in naturally acquired equine osteochondrosis." J Orthop Res **23**(5): 1152-1159.

Shapiro, E., A. Borthakur, J. Kaufman, J. Leigh and R. Reddy (2001). "Water distribution patterns inside bovine articular cartilage as visualized by ¹H magnetic resonance imaging." Osteoarthritis and Cartilage **9**(6): 533-538.

Shingleton, W. D., E. J. Mackie, T. E. Cawston and L. B. Jeffcott (1997). "Cartilage canals in equine articular/epiphyseal growth cartilage and a possible association with dyschondroplasia." Equine Vet J **29**(5): 360-364.

Shmueli, K., J. A. de Zwart, P. van Gelderen, T. Q. Li, S. J. Dodd and J. H. Duyn (2009). "Magnetic susceptibility mapping of brain tissue in vivo using MRI phase data." Magn Reson Med **62**(6): 1510-1522.

Sonnichsen, H. V., J. Kristoffersen and J. Falk-Ronne (1982). "Joint mice in the fetlock joint--osteochondritis dissecans." Nord Vet Med **34**(11): 399-403.

Spannow, A., E. Stenboeg, M. Pfeiffer-Jensen, B. Fiirgaard, M. Haislund, M. Ostergaard, N. Andersen and T. Herlin (2011). "Ultrasound and MRI measurements of joint cartilage in healthy children: a validation study." Ultraschall in der Medizin-European Journal of Ultrasound **32**(S 01): 110-116.

Spannow, A. H., M. Pfeiffer-Jensen, N. T. Andersen, T. Herlin and E. Stenbøg (2010). "Ultrasonographic measurements of joint cartilage thickness in healthy children: age-and sex-related standard reference values." The Journal of rheumatology **37**(12): 2595-2601.

Spannow, A. H., M. Pfeiffer-Jensen, N. T. Andersen, E. Stenbog and T. Herlin (2009). "Inter - and intraobserver variation of ultrasonographic cartilage thickness assessments in small and large joints in healthy children." Pediatr Rheumatol Online J **7**: 12.

Spannow, A. H., E. Stenboeg, M. Pfeiffer-Jensen, B. Fiirgaard, M. Haislund, M. Ostergaard, N. T. Andersen and T. Herlin (2011). "Ultrasound and MRI measurements of joint cartilage in healthy children: a validation study." Ultraschall Med **32 Suppl 1**: S110-116.

- Spannow, A. H., E. Stenboeg, M. Pfeiffer-Jensen and T. Herlin (2007). "Ultrasound measurement of joint cartilage thickness in large and small joints in healthy children: a clinical pilot study assessing observer variability." Pediatr Rheumatol Online J **5**: 3.
- Sparks, H. D., A. J. Nixon, L. A. Fortier and H. O. Mohammed (2011). "Arthroscopic reattachment of osteochondritis dissecans cartilage flaps of the femoropatellar joint: long-term results." Equine Vet J **43**(6): 650-659.
- Speers, D. J. and S. Nade (1985). "Ultrastructural studies of adherence of *Staphylococcus aureus* in experimental acute hematogenous osteomyelitis." Infection and immunity **49**(2): 443-446.
- Stack, J. D., T. J. Levingstone, W. Lalor, R. Sanders, C. Kearney, F. J. O'Brien and F. David (2017). "Repair of large osteochondritis dissecans lesions using a novel multilayered tissue engineered construct in an equine athlete." Journal of tissue engineering and regenerative medicine **11**(10): 2785-2795.
- Staines, K. A., V. E. Macrae and C. Farquharson (2012). "Cartilage development and degeneration: a Wnt Wnt situation." Cell Biochem Funct.
- Steinheimer, D. N., C. W. McIlwraith, R. D. Park and P. F. Steyn (1995). "Comparison of radiographic subchondral bone changes with arthroscopic findings in the equine femoropatellar and femorotibial joints: a retrospective study of 72 joints (50 horses)." Veterinary Radiology & Ultrasound **36**(6): 478-484.
- Stewart, R. H., S. M. Reed and S. E. Weisbrode (1991). "Frequency and severity of osteochondrosis in horses with cervical stenotic myelopathy." Am J Vet Res **52**(6): 873-879.
- Stockwell, R. A. (1971). "The ultrastructure of cartilage canals and the surrounding cartilage in the sheep fetus." J Anat **109**(Pt 3): 397-410.
- Stoller, P., P. M. Celliers, K. M. Reiser and A. M. Rubenchik (2003). "Quantitative second-harmonic generation microscopy in collagen." Appl Opt **42**(25): 5209-5219.
- Stromberg, B. (1979). "A review of the salient features of osteochondrosis in the horse." Equine Vet J **11**(4): 211-214.
- Su, P.-J., W.-L. Chen, T.-H. Li, C.-K. Chou, T.-H. Chen, Y.-Y. Ho, C.-H. Huang, S.-J. Chang, Y.-Y. Huang and H.-S. Lee (2010). "The discrimination of type I and type II collagen and the label-free imaging of engineered cartilage tissue." Biomaterials **31**(36): 9415-9421.
- Sullins, K. E. (2002). The stifle. Adams' Lameness in Horses, 5th edn., L. W. W. T.S. Stashak. Philadelphia.: 999-1027.
- Surowiec, R. K., E. P. Lucas and C. P. Ho (2014). "Quantitative MRI in the evaluation of articular cartilage health: reproducibility and variability with a focus on T2 mapping." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc **22**(6): 1385-1395.

Takahara, M., M. Shundo, M. Kondo, K. Suzuki, T. Nambu and T. Ogino (1998). "Early detection of osteochondritis dissecans of the capitellum in young baseball players. Report of three cases." J Bone Joint Surg Am **80**(6): 892-897.

Tchetina, E. V., F. Mwale and A. R. Poole (2014). "Changes in gene expression associated with matrix turnover, chondrocyte proliferation and hypertrophy in the bovine growth plate." Acta Naturae **6**(3): 89-97.

Theiss, F., M. Hilbe, A. Furst, K. Klein and B. von Rechenberg (2010). "Histological evaluation of intraarticular osteochondral fragments." Pferdeheilkunde **26**(4).

Toth, F., F. H. David, E. LaFond, L. Wang, J. M. Ellermann and C. S. Carlson (2017). "In vivo visualization using MRI T2 mapping of induced osteochondrosis and osteochondritis dissecans lesions in goats undergoing controlled exercise." J Orthop Res **35**(4): 868-875.

Toth, F., M. J. Nissi, J. M. Ellermann, L. Wang, K. G. Shea, J. Polousky and C. S. Carlson (2015). "Novel Application of Magnetic Resonance Imaging Demonstrates Characteristic Differences in Vasculature at Predilection Sites of Osteochondritis Dissecans." Am J Sports Med **43**(10): 2522-2527.

Toth, F., M. J. Nissi, L. Wang, J. M. Ellermann and C. S. Carlson (2015). "Surgical induction, histological evaluation, and MRI identification of cartilage necrosis in the distal femur in goats to model early lesions of osteochondrosis." Osteoarthritis Cartilage **23**(2): 300-307.

Toth, F., M. J. Nissi, J. Zhang, M. Benson, S. Schmitter, J. M. Ellermann and C. S. Carlson (2013). "Histological confirmation and biological significance of cartilage canals demonstrated using high field MRI in swine at predilection sites of osteochondrosis." J Orthop Res **31**(12): 2006-2012.

Treiber, K., R. Boston, D. Kronfeld, W. Staniar and P. Harris (2005). "Insulin resistance and compensation in Thoroughbred weanlings adapted to high-glycemic meals 1." Journal of animal science **83**(10): 2357-2364.

Tsang, K. Y., D. Chan and K. S. Cheah (2015). "Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: death or lineage extension?" Dev Growth Differ **57**(2): 179-192.

Twyman, R. S., K. Desai and P. M. Aichroth (1991). "Osteochondritis dissecans of the knee. A long-term study." J Bone Joint Surg Br **73**(3): 461-464.

UpRichard, K., Y. A. Elce, P. Piat, G. Beauchamp and S. Lavery (2013). "Outcome after arthroscopic treatment of lateral femoral trochlear ridge osteochondrosis in sport horses. A retrospective study of 37 horses." Vet Comp Orthop Traumatol **26**(2): 105-109.

Valentino L.W., L. J. D., Gaughan E.M., Biller D. R., Raub R. H. (1999). "Radiographic Prevalence of Osteochondrosis in Yearling Feral Horses." Vet Comp Orthop Traumatol **12**(151).

van de Lest, C. H., P. A. Brama, B. van El, J. DeGroot and P. R. van Weeren (2004). "Extracellular matrix changes in early osteochondrotic defects in foals: a key role for collagen?" Biochim Biophys Acta **1690**(1): 54-62.

van Grevenhof, E., A. G. Meerburg, M. van Dierendonck, A. van den Belt, B. van Schaik, P. Meeus and W. Back (2017). "Quantitative and qualitative aspects of standing-up behavior and the prevalence of osteochondrosis in Warmblood foals on different farms: could there be a link?" BMC veterinary research **13**(1): 324.

Van Grevenhof, E. M., B. J. Ducro, P. R. Van Weeren, J. M. Van Tartwijk, A. J. Van den Belt and P. Bijma (2009). "Prevalence of various radiographic manifestations of osteochondrosis and their correlations between and within joints in Dutch warmblood horses." Equine Vet J **41**(1): 11-16.

van Grevenhof, E. M., A. Schurink, B. J. Ducro, P. R. van Weeren, J. M. van Tartwijk, P. Bijma and J. A. van Arendonk (2009). "Genetic variables of various manifestations of osteochondrosis and their correlations between and within joints in Dutch warmblood horses." J Anim Sci **87**(6): 1906-1912.

van Turnhout, M. C., S. Kranenbarg and J. L. van Leeuwen (2011). "Contribution of postnatal collagen reorientation to depth-dependent mechanical properties of articular cartilage." Biomech Model Mechanobiol **10**(2): 269-279.

van Turnhout, M. C., H. Schipper, B. Engel, W. Buist, S. Kranenbarg and J. L. van Leeuwen (2010). "Postnatal development of collagen structure in ovine articular cartilage." BMC Dev Biol **10**: 62.

van Weeren, P. R. and A. Barneveld (1999). "The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal." Equine Vet J Suppl(31): 16-25.

van Weeren, P. R. and A. Barneveld (1999b). "The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal." Equine Vet J Suppl(31): 16-25.

van Weeren, P. R. and A. Barneveld (1999c). "Study design to evaluate the influence of exercise on the development of the musculoskeletal system of foals up to age 11 months." Equine Vet J Suppl(31): 4-8.

van Weeren, P. R. and J. M. Denoix (2013b). "The Normandy field study on juvenile osteochondral conditions: Conclusions regarding the influence of genetics, environmental conditions and management, and the effect on performance." Vet J.

van Weeren, P. R. and E. C. Firth (2008). "Future tools for early diagnosis and monitoring of musculoskeletal injury: biomarkers and CT." Vet Clin North Am Equine Pract **24**(1): 153-175.

van Weeren, P. R. and L. B. Jeffcott (2013). "Problems and pointers in osteochondrosis: Twenty years on." Vet J **197**(1): 96-102.

van Weeren, P. R. and L. B. Jeffcott (2013a). "Problems and pointers in osteochondrosis: Twenty years on." Vet J.

van Weeren, P. R., O.-O. Sloet van and A. Barneveld (1999a). "The influence of birth weight, rate of weight gain and final achieved height and sex on the development of osteochondrotic lesions in a population of genetically predisposed Warmblood foals." Equine Vet J Suppl(31): 26-30.

Vander Heyden, L., J.-P. Lejeune, I. Caudron, J. Detilleux, C. Sandersen, P. Chavatte, J. Paris, B. Deliege and D. Serteyn (2013). "Association of breeding conditions with prevalence of osteochondrosis in foals." Vet Rec **172**(3): 68.

Varich, L. J., T. Laor and D. Jaramillo (2000). "Normal maturation of the distal femoral epiphyseal cartilage: age-related changes at MR imaging." Radiology **214**(3): 705-709.

Verwilghen, D. R., S. Janssens, V. Busoni, F. Pille, C. Johnston and D. Serteyn (2013). "Do developmental orthopaedic disorders influence future jumping performances in Warmblood stallions?" Equine Vet J **45**(5): 578-581.

Villemure, I. and I. A. Stokes (2009). "Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding." J Biomech **42**(12): 1793-1803.

Visco, D. M., M. A. Hill, D. C. Van Sickle and S. A. Kincaid (1990). "The development of centres of ossification of bones forming elbow joints in young swine." Journal of Anatomy **171**: 25-39.

Visco, D. M., D. C. Van Sickle, M. A. Hill and S. A. Kincaid (1989). "The vascular supply of the chondro-epiphyses of the elbow joint in young swine." J Anat **163**: 215-229.

Wang, L., M. J. Nissi, F. Toth, C. P. Johnson, M. Garwood, C. S. Carlson and J. Ellermann (2016). "Quantitative susceptibility mapping detects abnormalities in cartilage canals in a goat model of preclinical osteochondritis dissecans." Magn Reson Med.

Wang, L., M. J. Nissi, F. Toth, C. P. Johnson, M. Garwood, C. S. Carlson and J. Ellermann (2017). "Quantitative susceptibility mapping detects abnormalities in cartilage canals in a goat model of preclinical osteochondritis dissecans." Magn Reson Med **77**(3): 1276-1283.

Wang, L., M. J. Nissi, F. Toth, J. Shaver, C. P. Johnson, J. Zhang, M. Garwood, C. S. Carlson and J. M. Ellermann (2015). "Multiparametric MRI of Epiphyseal Cartilage Necrosis (Osteochondrosis) with Histological Validation in a Goat Model." PLoS One **10**(10): e0140400.

Warach, S., D. Chien, W. Li, M. Ronthal and R. R. Edelman (1992). "Fast magnetic resonance diffusion-weighted imaging of acute human stroke." Neurology **42**(9): 1717-1723.

- Wardale, R. J. and V. C. Duance (1994). "Characterisation of articular and growth plate cartilage collagens in porcine osteochondrosis." J Cell Sci **107 (Pt 1)**: 47-59.
- Wayne, J. S., K. A. Kraft, K. J. Shields, C. Yin, J. R. Owen and D. G. Disler (2003). "MR imaging of normal and matrix-depleted cartilage: correlation with biomechanical function and biochemical composition." Radiology **228(2)**: 493-499.
- Wegener, K. M. and N. I. Heje (1992). "Dyschondroplasia (osteochondrosis) in articular-epiphyseal cartilage complexes of three calves from 24 to 103 days of age." Vet Pathol **29(6)**: 562-563.
- Weiss, S. and K. Loeffler (1996). "[Histological study of cartilage channels in the epiphyseal cartilage of young dogs and their relationship to that of osteochondrosis dissecans in the most frequently affected locations]." Dtsch Tierarztl Wochenschr **103(5)**: 164-169.
- White, L. M., M. S. Sussman, M. Hurtig, L. Probyn, G. Tomlinson and R. Kandel (2006). "Cartilage T2 assessment: differentiation of normal hyaline cartilage and reparative tissue after arthroscopic cartilage repair in equine subjects." Radiology **241(2)**: 407-414.
- Wilke, A. (2003). "Der Einfluss von Aufzucht und Haltung auf Osteochondrose." Thesis.Hannover, Tierärztliche Hochschule.
- Williams, C., D. Kronfeld, W. Staniar and P. Harris (2001). "Plasma glucose and insulin responses of Thoroughbred mares fed a meal high in starch and sugar or fat and fiber." Journal of animal science **79(8)**: 2196-2201.
- Wilsman, N. J. and D. C. Van Sickle (1970). "The relationship of cartilage canals to the initial osteogenesis of secondary centers of ossification." Anat Rec **168(3)**: 381-391.
- Wilsman, N. J. and D. C. Van Sickle (1972). "Cartilage canals, their morphology and distribution." Anat Rec **173(1)**: 79-93.
- Windschall, D., P. Collado, J. Vojinovic, S. Magni-Manzoni, P. Balint, G. A. W. Bruyn, C. Hernandez-Diaz, J. C. Nieto, V. Ravagnani, N. Tzaribachev, A. Iagnocco, M. A. D'Agostino and E. Naredo (2017). "Age-related vascularization and ossification of joints in children: an international pilot study to test multi-observer ultrasound reliability." Arthritis Care Res (Hoboken).
- Windschall, D., M. Pommerenke and R. Haase (2016). "Ultrasound Assessment of the Skeletal Development of the Proximal Tibial, Proximal Femoral, and Distal Femoral Epiphyses in Premature and Mature Newborns." Ultrasound Med Biol **42(2)**: 451-458.
- Woodard, J. C., H. N. Becker and P. W. Poulos, Jr. (1987). "Articular cartilage blood vessels in swine osteochondrosis." Vet Pathol **24(2)**: 118-123.

Wosu, R., K. Sergerie, M. Levesque and I. Villemure (2012). "Mechanical properties of the porcine growth plate vary with developmental stage." Biomech Model Mechanobiol **11**(3-4): 303-312.

Xia, Y. (2008). "Averaged and depth-dependent anisotropy of articular cartilage by microscopic imaging." Semin Arthritis Rheum **37**(5): 317-327.

Xu, Y. and E. M. Haacke (2006). "The role of voxel aspect ratio in determining apparent vascular phase behavior in susceptibility weighted imaging." Magn Reson Imaging **24**(2): 155-160.

Yamaguchi, T., K. Hayashi, N. Tayama and Y. Sugioka (1990). "The role of cartilage canals: experimental study using rabbits' femoral heads." Nihon Seikeigeka Gakkai zasshi **64**(11): 1105-1110.

Yang, L., K. Y. Tsang, H. C. Tang, D. Chan and K. S. Cheah (2014). "Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(33): 12097-12102.

Yoo, W. J., Y.-J. Kim, N. M. Menezes, J.-E. Cheon and D. Jaramillo (2011). "Diffusion-weighted MRI reveals epiphyseal and metaphyseal abnormalities in Legg-Calvé-Perthes disease: a pilot study." Clinical Orthopaedics and Related Research® **469**(10): 2881-2888.

Yoshida, S., T. Ikata, H. Takai, S. Kashiwaguchi, S. Katoh and Y. Takeda (1998). "Osteochondritis dissecans of the femoral condyle in the growth stage." Clin Orthop Relat Res(346): 162-170.

Yoshizuka, M., T. Sunagawa, Y. Nakashima, R. Shinomiya, T. Masuda, M. Makitsubo and N. Adachi (2018). "Comparison of sonography and MRI in the evaluation of stability of capitellar osteochondritis dissecans." J Clin Ultrasound **46**(4): 247-252.

Ytrehus, B., H. Andreas Haga, C. N. Mellum, L. Mathisen, C. S. Carlson, S. Ekman, J. Teige and F. P. Reinholt (2004a). "Experimental ischemia of porcine growth cartilage produces lesions of osteochondrosis." J Orthop Res **22**(6): 1201-1209.

Ytrehus, B., C. S. Carlson and S. Ekman (2007). "Etiology and pathogenesis of osteochondrosis." Vet Pathol **44**(4): 429-448.

Ytrehus, B., C. S. Carlson, N. Lundeheim, L. Mathisen, F. P. Reinholt, J. Teige and S. Ekman (2004). "Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs--development with age, growth rate, weight and joint shape." Bone **34**(3): 454-465.

Ytrehus, B., S. Ekman, C. S. Carlson, J. Teige and F. P. Reinholt (2004b). "Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs." Bone **35**(6): 1294-1306.

Yushkevich, P. A., J. Piven, H. C. Hazlett, R. G. Smith, S. Ho, J. C. Gee and G. Gerig (2006). "User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability." Neuroimage **31**(3): 1116-1128.

Zhou, X., K. von der Mark, S. Henry, W. Norton, H. Adams and B. de Crombrughe (2014). "Chondrocytes Transdifferentiate into Osteoblasts in Endochondral Bone during Development, Postnatal Growth and Fracture Healing in Mice." PLoS Genet **10**(12).