

Université de Montréal

**Les ostéoclastes et leur rôle dans le développement
des kystes sous-chondraux du condyle fémoral
médial équin juvénile**

par Rosalie Fortin-Trahan

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M. Sc.)
en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Décembre, 2020

© Rosalie Fortin-Trahan, 2020

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire, département de sciences cliniques

Ce mémoire intitulé

Les ostéoclastes et leur rôle dans le développement des kystes sous-chondraux du condyle fémoral médial équin juvénile

Présenté par
Rosalie Fortin-Trahan

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Monique Doré
Présidente-rapporteuse

Sheila Laverty
Directrice de recherche

Isabelle Masseau
Membre du jury

Résumé

Les ostéoclastes, les seules cellules capables de résorber l'os, sont soupçonnés d'être associés au développement et à la progression des radiotransparences sous-chondrales (SR). Ils n'ont par contre jamais été étudiés *in situ*. Les objectifs de cette étude cadavérique *ex vivo* étaient de mesurer et de comparer la densité ostéoclastique et le pourcentage de chondroclastes se trouvant à différentes profondeurs de l'os sous-chondral à partir de la surface articulaire dans le condyle fémoral médial (CFM) de chevaux Pur-sang juvéniles sains et atteints de SR hâtives spontanées. Les spécimens provenaient d'une banque de tissus et faisaient partie d'une étude précédente sur les caractéristiques structurelles des SR. La tomодensitométrie identifiait les CFM atteints de SR (n=6) et guidait les coupes ostéochondrales. Les contrôles de l'étude étaient composés d'un site histologiquement normal et caudal à la lésion (n=6) et du site controlatéral à la lésion dans le CFM sain (n=5). Après la décalcification et la fixation dans la paraffine, les spécimens étaient colorés à l'immunohistochimie afin de mettre en évidence les ostéoclastes présents dans l'os en périphérie des SR. Les spécimens étaient ensuite séparés en régions d'intérêt (ROI) à différentes profondeurs de l'os sous-chondral: ROI₁ (0-1mm), ROI₂ (1-3mm) et ROI₃ (3-6mm). Les ostéoclastes ont été comptés dans chaque ROI pour calculer leur densité ostéoclastique respective. Les lames ont été contre-colorées avec la Safranine afin d'identifier le cartilage et mesurer le pourcentage de chondroclastes. La densité ostéoclastique était statistiquement plus élevée dans la ROI₁ comparativement à la ROI₃ dans tous les groupes. Cependant, aucune différence significative n'a été détectée en comparant les ROI entre les groupes, même si la densité ostéoclastique était supérieure dans la ROI₁ des SR. Malgré une proportion de chondroclastes dans la ROI₁ des SR inférieure à celle des contrôles, aucune différence significative n'a été détectée. La limite principale de cette étude se révéla être la taille de l'échantillon. Nos résultats démontrent cependant que la pathophysiologie des SR n'est pas uniquement expliquée par l'augmentation du nombre d'ostéoclastes dans l'os sous-chondral en périphérie des lésions.

Mots-clés: Cathepsin K, cheval, chondroclaste, condyle fémoral médial, kyste, ostéoclaste, radiotransparence sous-chondrale.

Abstract

There is a knowledge gap concerning how and when equine medial femoral condyle (MFC) subchondral radiolucencies (SR) arise and evolve. Osteoclasts, the only cells capable of bone resorption, are believed to have a role, but have not been studied in situ. The objectives of this *ex vivo* cadaveric study were to measure and compare the osteoclast density and the percentage of chondroclasts in juvenile (<1 year) Thoroughbred MFCs at varying depths from the weightbearing articular surface in both healthy and early spontaneous MFC SR specimens. The MFCs were available in a tissue bank and were part of a prior study of the structural characteristics of SRs. Computed tomography permitted identification of MFC SR (n=6) and guided osteochondral slab sections. Controls included a histologically normal site caudal to the lesions (n=6) and the healthy contralateral MFC lesion site (n=5). Following decalcification, paraffin embedding sections were cut and stained immunohistochemically with Cathepsin K to permit osteoclast identification and counting. The sections were divided into regions of interest (ROI) at different depths in the subchondral bone from the osteochondral junction: ROI₁ (0-1mm), ROI₂ (1-3mm) and ROI₃ (3-6mm). Osteoclasts were counted in each ROI in order to calculate an osteoclast density. A Safranin-O counterstain was performed to identify the cartilage and measure the chondroclasts percentage. Osteoclast density was significantly higher in ROI₁ when compared with ROI₃ in all groups. When ROIs were compared between the three groups, no statistically significant differences were detected, even if a visible pattern difference and higher osteoclast density values were recorded in ROI₁ in SRs. However, although the proportion of chondroclasts in ROI₁ was lower in the SR sections when compared with controls, no significant difference was detected. The main limitation was the limited sample size. Osteoclasts are important actors in MFC subchondral bone development, digesting both growth cartilage (chondroclasts) and bone, but the pathophysiology of early MFC SRs cannot be explained solely by an increased osteoclast presence in the peripheral subchondral bone.

Keywords: Cathepsin K, chondroclast, cyst, horse, medial femoral condyle, osteoclast, subchondral radiolucency.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Résumé..... | 3 |
| Abstract..... | 4 |
| Table des matières..... | 5 |
| Liste des tableaux..... | 7 |
| Liste des figures..... | 8 |
| Liste des sigles et abréviations | 9 |
| Introduction..... | 12 |
| Chapitre 1 : Recension de la littérature..... | 14 |
| 1. Le grasset équin..... | 14 |
| 1.1. Les os du grasset équin..... | 14 |
| 1.1.1. La physiologie osseuse..... | 14 |
| 1.2. Les compartiments synoviaux du grasset équin..... | 15 |
| 1.2.1. Le cartilage articulaire..... | 16 |
| 1.2.2. Le cartilage de croissance | 17 |
| 1.2.2.1. L'ossification endochondrale..... | 17 |
| 1.2.3. L'os sous-chondral..... | 18 |
| 1.2.4. L'anatomie périarticulaire du grasset | 19 |
| 1.3. La biomécanique | 20 |
| 1.3.1. La biomécanique physiologique | 20 |
| 1.3.2. La biomécanique altérée | 21 |
| 2. Les kystes sous-chondraux du condyle fémoral médial | 23 |
| 2.1. La localisation | 23 |
| 2.2. Les caractéristiques morphologiques..... | 23 |
| 2.3. Les signes cliniques | 24 |
| 2.4. La prévalence | 25 |
| 2.5. L'étiopathogénie du développement des kystes sous-chondraux | 26 |
| 2.5.1. L'ostéocondrose..... | 26 |
| 2.5.2. Les traumatismes du condyle fémoral médial | 28 |
| 2.5.3. L'inflammation associée au tissu fibreux des kystes sous-chondraux..... | 29 |
| 2.6. L'évolution morphologique..... | 30 |
| 2.7. Les méthodes diagnostiques..... | 32 |
| 2.7.1. Les anesthésies intra-articulaires..... | 32 |
| 2.7.2. L'imagerie du grasset équin | 32 |
| 2.8. Le traitement des kystes sous-chondraux..... | 34 |
| 2.8.1. Le traitement médical | 35 |
| 2.8.2. Les interventions chirurgicales | 35 |
| 2.8.2.1. Le débridement..... | 35 |
| 2.8.2.2. L'injection intralésionnelle de corticostéroïdes | 36 |
| 2.8.2.3. La vis transcondylienne | 38 |
| 2.8.2.4. La fixation avec des tiges résorbables chez les jeunes chevaux..... | 38 |
| 2.8.2.5. Le traitement chirurgical avec agents biologiques | 39 |
| 2.8.2.6. Les autres traitements chirurgicaux..... | 40 |
| 2.9. Les facteurs pronostiques..... | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Les ostéoclastes..... | 41 |
| 3.1. Le rôle et l'origine..... | 41 |
| 3.2. Les facteurs influençant les ostéoclastes | 41 |
| 3.2.1. L'ostéoclastogénèse..... | 41 |
| 3.2.1.1. Le ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B..... | 42 |
| 3.2.1.2. Le facteur de stimulation des colonies de macrophages | 42 |
| 3.2.1.3. L'ostéoprotégérine..... | 42 |
| 3.2.2. Les cytokines pro-inflammatoires..... | 43 |
| 3.3. L'activité ostéoclastique | 44 |
| 3.3.1. Le remodelage osseux..... | 44 |
| 3.3.2. L'activité physiologique des ostéoclastes..... | 45 |
| 3.3.3. La Cathepsine K | 45 |
| 3.4. L'activité pathophysiologique des ostéoclastes : l'inflammation osseuse | 45 |
| 3.4.1. L'activité ostéoclastique en situation inflammatoire aiguë | 46 |
| 3.4.1.1. La cicatrisation de fracture | 46 |
| 3.4.1.2. L'ostéomyélite | 47 |
| 3.4.2. L'activité ostéoclastique en situation inflammatoire chronique | 47 |
| 3.5. Les particularités des ostéoclastes équins..... | 48 |
| 3.5.1. Le développement squelettique physiologique équin | 48 |
| 3.5.2. Le débalancement de l'homéostasie osseuse équine..... | 49 |
| 3.5.3. Les facteurs thérapeutiques ostéoclastiques | 50 |
| 3.5.3.1. Le développement thérapeutique <i>in vitro</i> | 50 |
| 3.5.3.2. Le développement thérapeutique <i>in vivo</i> | 50 |
| 3.5.4. Les autres situations impliquant les ostéoclastes..... | 51 |
| 3.5.5. Les ostéoclastes équins et les kystes sous-chondraux | 51 |
| Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs | 53 |
| Chapitre 3 : Article | 54 |
| Chapitre 4 : Discussion..... | 84 |
| Conclusion | 90 |
| Bibliographie | 91 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1. Prévalence radiographique des kystes sous-chondraux du condyle fémoral médial chez des chevaux âgés d'environ 1 an..... | 26 |
| Tableau 2. Comparaison de critères associés au suivi dans le traitement de kystes sous-chondraux du condyle fémoral médial équin | 37 |
| Tableau 3. Influence des principales cytokines pro-inflammatoires sur l'ostéoclastogénèse | 44 |

Liste des figures

| | | |
|------------------|---|----|
| Figure 1. | Illustration des composantes osseuses du grasset équin..... | 15 |
| Figure 2. | Coupe transversale des différentes zones représentant les chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale du complexe de cartilage articulaire-épiphysaire..... | 18 |
| Figure 3. | Anatomie normale du grasset avec une vue dorsale du tibia couvert des ménisques | 19 |
| Figure 4. | Radiographie caudo-craniale d'un kyste sous-chondral du condyle fémoral médial | 24 |
| Figure 5. | Système de gradation radiographique des kystes sous-chondraux | 34 |
| Figure 6. | Radiographie caudo-craniale d'un kyste sous-chondral du condyle fémoral médial droit traité par une vis transcondylienne..... | 39 |
| Figure 7. | Les cytokines ayant un rôle dans l'ostéoclastogénèse | 43 |
| Figure 8. | Présence histologique d'ostéoclastes dans un kyste sous-chondral | 52 |

Liste des sigles et abréviations

| | |
|--------------------|---|
| AAEP : | American Association of Equine Practitioners (Association américaine des praticiens équins) |
| CFM : | Condyle fémoral médial |
| IILC : | Injection intralésionnelle de corticostéroïdes |
| IL : | Interleukine |
| KSC : | Kyste sous-chondral |
| mm : | millimètre |
| M-CSF : | Macrophage colony-stimulating factor (Facteur stimulant la prolifération des macrophages) |
| MSC : | Mesenchymal stem cell (Cellules stromales de la moelle osseuse) |
| OPG : | Ostéoprotégérine |
| PGE ₂ : | Prostaglandine E ₂ |
| RANKL : | Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B) |
| RANK : | Receptor activator of nuclear factor kappa-B (Récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B) |
| SR : | Subchondral radiolucency (Radiotransparence sous-chondrale) |
| TNF : | Tumor necrosis factor (Facteur de nécrose tumorale) |

À ma famille et amis proches qui me soutiennent au quotidien.

Merci de m'encourager dans mes projets les plus fous.

Je vous aime.

You did it.

Remerciements

À Dre Laverty, pour m’ avoir accueillie dans le monde inconnu de la recherche. En prêchant par l’ exemple, vous m’ avez montré que l’ humilité est une valeur admirable chez un spécialiste. For reminding me that composure is a work in progress in every aspect of life. For promoting self-improvement and hard work and encouraging it with kind words simultaneously: you made me want to reach higher goals. You are an incredibly inspiring person and I am more than blessed to have had you as a part of my journey. Yes, I was sure I wanted to engage in a Master and no, I don’ t regret it!

À Dre Doré, pour avoir accepté de présider ce jury.

À Dre Masseau, pour votre participation à l’ évaluation de ce travail.

Au Dr Lemirre, pour le temps et le travail soigné dans l’ élaboration du projet et la préparation des spécimens. Merci encore une fois de m’ avoir guidé en ce début de maîtrise.

À Hélène, pour ton soutien, ta générosité de temps et d’ énergie, ton partage de connaissances et le travail rigoureux et acharné que tu as investi dans ce projet. Je n’ y serais jamais arrivé sans toi.

À Dre Girard, pour votre temps dans l’ analyse des spécimens.

À Dr Kamus et Dre Malek, pour votre temps et vos précieux commentaires dans l’ amélioration de ce mémoire et des présentations.

À Dre Dubuc, qui m’ inspire, en tant que femme et vétérinaire, et qui m’ a encouragée à poursuivre aux cycles supérieurs.

Introduction

Différents termes sont employés dans la littérature vétérinaire pour désigner les kystes osseux sous-chondraux (KSC) (Frazer et al., 2017) du condyle fémoral médial équin (CFM), voici quelques exemples : les radiotransparences sous-chondrales (SR) (Santschi et al., 2016), les lésions kystiques sous-chondrales (Ortved et al., 2012) et les lésions osseuses pseudo-kystiques (Stewart and Reid, 1982). L'image histopathologique d'un kyste inclut la présence d'un épithélium (Zachary, 2017). Puisque les SR ne sont pas recouvertes d'épithélium, le terme « kyste » est donc inexact.

Les KSC sont le plus fréquemment retrouvés à l'aspect crânial du CFM (Lemirre et al., 2021; Santschi et al., 2019; von Rechenberg et al., 1998). Les radiographies préachat obtenues sur des populations de *yearlings* Pur-sang de course démontrent une prévalence radiographique de 3,4-7,8% de chevaux atteints de KSC du CFM. Ces lésions ont une importance économique, puisque les chevaux atteints sont vendus à un prix inférieur aux chevaux sains (Whitman et al., 2006). De plus, elles doivent être prises en considération pour assurer le bien-être de l'animal, puisque les lésions causent des boiteries et peuvent mener à l'euthanasie dans les cas sévères (Whitman et al., 2006).

L'étiologie exacte des KSC du CFM apparaissant spontanément demeure inconnue. Deux hypothèses principales visant à déterminer une cause probable sont proposées: les KSC constituent une forme d'ostéochondrose (Rejno and Stromberg, 1978) ou alternativement, surviennent suite à un événement traumatique (Kold et al., 1986; Ray et al., 1996).

L'ostéochondrose est caractérisée par un défaut focal de l'ossification endochondrale secondaire à une chondronécrose ischémique (mort des chondrocytes) du cartilage de croissance épiphysaire (Carlson et al., 1991). Néanmoins, la cause de l'ischémie n'a toujours pas été élucidée. L'ostéochondrose a été postulée comme une cause sous-jacente des KSC du CFM, puisque ces conditions partagent plusieurs caractéristiques similaires : les lésions surviennent en bas âge, elles affectent fréquemment les chevaux bilatéralement et des défauts d'ossification endochondrale associés à la chondronécrose ont été identifiés histologiquement dans les KSC (Jackson et al., 2009; Olstad et al., 2015b).

Récemment, les sites lésionnels de KSC du CFM ont été décrits comme étant initialement situés axialement dans le CFM chez les poulains âgés de 6 mois ou moins (Lemirre et al., 2021; Santschi et al., 2019). À notre connaissance, le plus jeune poulain rapporté dans la littérature avec une lésion spontanée axiale du CFM étudiée par histologie était âgé de 5 semaines (Lemirre et al., 2021). De plus, cette étude rapporte aussi que quelques spécimens n'avaient pas d'évidence histologique de chondronécrose, qui est une caractéristique pathognomonique de l'ostéochondrose (Lemirre et al., 2021). De plus, certains KSC guérissent ou se développent après la fin de l'ossification endochondrale, survenant à 6 mois dans le CFM équin (Lemirre et al., 2019; Perez-Nogues et al., 2020; Santschi et al., 2019). Combinés, les résultats de ces études suggèrent que l'ostéochondrose, couramment définie par analyses histologiques, ne cause pas ou n'est pas la seule cause du développement des KSC.

Deux études expérimentales où un trauma chirurgical a été appliqué ont rapporté que les KSC se développent suite à un dommage focal au CFM (Kold et al., 1986; Ray et al., 1996). De plus, dans une étude histologique récente de KSC apparaissant spontanément, la séparation ostéochondrale entre le cartilage et l'os sous-chondral à la jonction ostéochondrale dans les spécimens juvéniles contenait de la fibrine (une évidence d'un microsaignement) dans la majorité des lésions (Lemirre et al., 2021). Il n'a pu être établi si la présence de fibrine était attribuable à un trauma primaire ou secondaire tel qu'une instabilité et la présence de mouvement au cœur de la lésion (Lemirre et al., 2021).

Un aspect central au développement et à la progression des KSC devrait nécessairement impliquer une résorption osseuse ostéoclastique (Boyle et al., 2003). Celle-ci n'a jamais été étudiée *in situ* dans les tissus de spécimens atteints de lésions se produisant de façon spontanée. L'étude histologique de KSC apparaissant spontanément pourrait offrir des évidences pour mieux comprendre la pathophysiologie de cette maladie.

Des chercheurs ont identifié des médiateurs pro-inflammatoires (PGE₂, IL-1 β and IL-6) dans le tissu extrait par arthroscopie de l'intérieur des KSC de chevaux matures (von Rechenberg et al., 2000; von Rechenberg et al., 2001). Ils ont démontré que ce tissu avait la capacité de recruter les ostéoclastes et de stimuler l'activité de résorption osseuse *in vitro* (von Rechenberg et al., 2000). Cependant, les ostéoclastes n'ont jamais été étudiés dans l'os en périphérie de KSC *in situ* et *ex vivo*.

Chapitre 1 : Recension de la littérature

1. Le grasset équin

Le grasset est une des articulations équines les plus complexes. Il est essentiel de connaître l'anatomie et la biomécanique physiologique de cette articulation afin de mieux comprendre le développement de certaines lésions comme les kystes sous-chondraux.

1.1. Les os du grasset équin

Le grasset est composé de trois os, à savoir le fémur, le tibia et la patella. Le fémur est un os long qui se divise en trois portions : les épiphyses (proximale et distale) qui sont les extrémités osseuses, la diaphyse qui est le corps de l'os situé au milieu de celui-ci et les métaphyses, situées entre les épiphyses et la diaphyse. L'aspect distal du fémur comprend crânialement la trochlée du fémur. Caudalement, les condyles médial et latéral sont séparés par une fosse intercondyloire (Figure 1). Chaque condyle possède un épicondyle sur sa face abaxiale où s'attachent les ligaments collatéraux fémoro-tibiaux. La surface articulaire proximale du tibia recouvre les condyles tibiaux médial et latéral, aussi appelés plateaux tibiaux médial et latéral et les éminences intercondyloires médiale et latérale (Figure 1) (Barone, 1986).

Les condyles fémoraux sont séparés du plateau tibial par les ménisques médial et latéral. Ces structures fibrocartilagineuses contribuent à la stabilisation des articulations fémoro-tibiales.

1.1.1. La physiologie osseuse

Les os, comme le fémur, le tibia et la patella, sont constitués de composantes inorganique et organique qui assurent la rigidité mécanique et l'élasticité des os et l'homéostasie osseuse. La composante inorganique de l'os est majoritairement constituée de cristaux d'hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ alors que la composante organique est constituée à 90% de collagène de type I (révisé par Clarke, 2008).

Les cellules osseuses associées à l'intégrité de la matrice osseuse sont les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Les **ostéoblastes** sont responsables de la

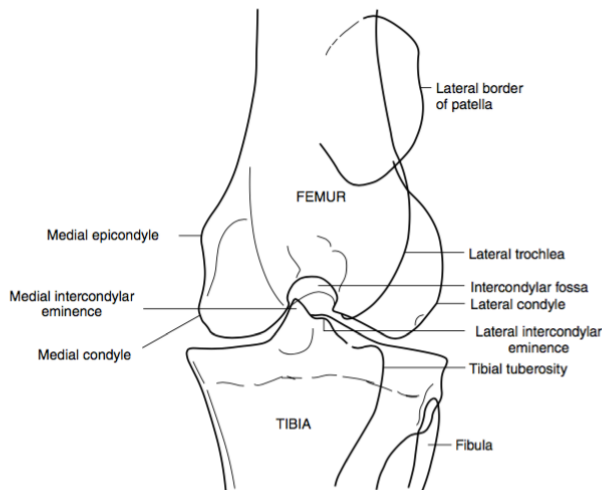


Figure 1. Illustration des composantes osseuses du grasset équin (selon Butler et al. 2016).

production d'ostéoïde, le tissu osseux immature non minéralisé, et de la minéralisation de la matrice osseuse. Les **ostéocytes** sont des ostéoblastes entourés de matrice osseuse. Ils constituent 90% des cellules osseuses (Bonewald, 2011), se situent dans les lacunes osseuses de façon concentrique lamellaire autour d'un canal central, formant ainsi les ostéons disposés selon le système Haversien. Enfin, les **ostéoclastes** sont les seules cellules ayant la capacité de résorber la matrice osseuse et seront abordés plus en détail dans la section subséquente 3 (Boyle et al., 2003).

Une autre population cellulaire composée de cellules hématopoïétiques et de cellules mésenchymateuses est présente dans la moelle osseuse. Les cellules hématopoïétiques sont des cellules pluripotentes précurseurs des cellules sanguines (les érythrocytes, les leucocytes et les plaquettes) et des ostéoclastes, cellules d'intérêt de ce manuscrit (révisé par Clarke, 2008).

1.2. Les compartiments synoviaux du grasset équin

Le grasset est divisé en trois compartiments synoviaux : l'articulation fémoro-patellaire et les articulations fémoro-tibiales médiale et latérale (Barone, 1986). Les articulations fémoro-patellaire et fémoro-tibiale médiale communiquent dans environ 65-85% des cas, alors que les articulations fémoro-patellaire et fémoro-tibiale latérale dans seulement 3-20% des cas (Barone, 1986). Théoriquement, il y a entre 0-5% de communication entre les articulations fémoro-tibiales médiale et latérale (Barone, 1986;

Reeves et al., 1991; Vacek et al., 1992).

1.2.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire, situé aux extrémités des os longs et recouvrant les épiphyses, sert de surface articulaire. Il est composé d'un tissu conjonctif spécialisé, avasculaire, sans vaisseau lymphatique et sans tissu nerveux. Il résiste aux chocs, aux forces de cisaillement et de compression et permet la transmission des charges sans friction entre les os au sein de l'articulation (Martel-Pelletier et al., 2008).

Les chondrocytes sont les seules cellules résidentes du cartilage articulaire. Ils représentent environ 2% de sa composition et ont un potentiel limité de réplication (Sophia Fox et al., 2009) pouvant expliquer leur capacité limitée de guérison. Ils sont métaboliquement actifs et synthétisent, maintiennent, réparent et dégradent la matrice extracellulaire (Martel-Pelletier et al., 2008). L'eau, majoritairement extracellulaire, compose environ 70% du cartilage articulaire et permet la résilience du tissu, la lubrification du système et la nutrition de celui-ci. Lorsque l'eau diffuse du liquide synovial vers le cartilage, elle apporte les nutriments qui nourriront les chondrocytes (Martel-Pelletier et al., 2008).

Le poids sec du cartilage articulaire est composé à 50% de collagène, 35% de protéoglycanes, 10% de glycoprotéines et 5% de minéraux (van Weeren, 2016). Le collagène est une composante essentielle du cartilage articulaire, déterminant ses propriétés mécaniques (van Weeren, 2016). Le réseau de fibres de collagène de type II offre une résistance aux différentes forces appliquées sur le cartilage articulaire, comme les forces de cisaillement et les forces de tension. Le collagène de type II prédomine à hauteur de 90-98%, mais les types I, IV, V, VI, IX et XI sont aussi présents en plus faibles proportions (Sophia Fox et al., 2009). Les protéoglycanes sont composés d'une protéine et d'un glycosaminoglycane et sont majoritairement retrouvés sous forme d'aggrécane. Les aggrécanes se regroupent autour d'une molécule d'acide hyaluronique et sont présents en très grande quantité dans le cartilage articulaire (Martel-Pelletier et al., 2008).

1.2.2. Le cartilage de croissance

Deux plaques de croissances sont présentes dans l'aspect distal du fémur: la plaque de croissance métaphysaire, aussi nommée la plaque de croissance ou la physe, responsable de la croissance en longueur des os, ainsi que la plaque de croissance épiphysaire, plutôt sphérique, située directement sous le cartilage articulaire dans l'épiphyse, soit le principal intérêt de ce projet (Figure 2). L'association du cartilage articulaire et du cartilage de croissance épiphysaire est définie comme le complexe cartilage articulaire-épiphysaire dans la littérature et est le centre d'intérêt d'étude de l'ostéochondrose, une maladie développementale discutée ci-dessous (voir section 2.5.1). Le cartilage de croissance épiphysaire se transforme normalement en os au cours de la croissance d'un individu par le mécanisme d'ossification endochondrale.

1.2.2.1. L'ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le mécanisme d'ossification qui transforme le cartilage de croissance en os. Dans l'épiphyse, il y a le développement du centre d'ossification secondaire et une ossification progressive du cartilage de croissance, vascularisé par des vaisseaux sanguins provenant du périchondre. Ces vaisseaux sont responsables de la nutrition du cartilage de croissance (van Weeren, 2019).

Au cours de l'ossification endochondrale, le front d'ossification endochondrale avance progressivement du second front d'ossification, situé au centre de l'épiphyse, jusqu'au cartilage articulaire. La morphologie des chondrocytes varie selon leur localisation par rapport au front d'ossification, ce qui sépare le complexe de cartilage articulaire-épiphysaire en différentes zones (Figure 2). Les chondrocytes se divisent rapidement dans la zone proliférative, puis s'hypertrophient jusqu'à l'apoptose dans la zone hypertrophique. La matrice extracellulaire autour des chondrocytes hypertrophiques se minéralise dans la zone de minéralisation. L'invasion subséquente de vaisseaux sanguins permet l'apport de précurseurs ostéoblastiques, d'ostéoclastes et des cellules stromales de la moelle osseuse (MSC) au site d'ossification endochondrale (Mackie et al., 2008).

Les ostéoclastes sont nécessaires à l'ossification endochondrale, puisqu'ils résorbent et modifient le cartilage calcifié dans la zone de minéralisation et remodelent ensuite aussi l'os spongieux déposé par les ostéoblastes (Mackie et al., 2008). La plaque

de croissance épiphysaire dans le CFM termine ce processus de maturation par ossification endochondrale à l'âge de 6-7 mois chez les chevaux (Lemirre et al., 2019).

1.2.3. L'os sous-chondral

L'os sous-chondral, situé sous le cartilage articulaire auquel il reste connecté par une mince couche de cartilage calcifié, atténue les forces générées par les mouvements (van Weeren, 2016). Le grasset transfère les forces lors de la locomotion, du cartilage articulaire vers l'os sous-chondral grâce au cartilage calcifié. Ce dernier minimise les

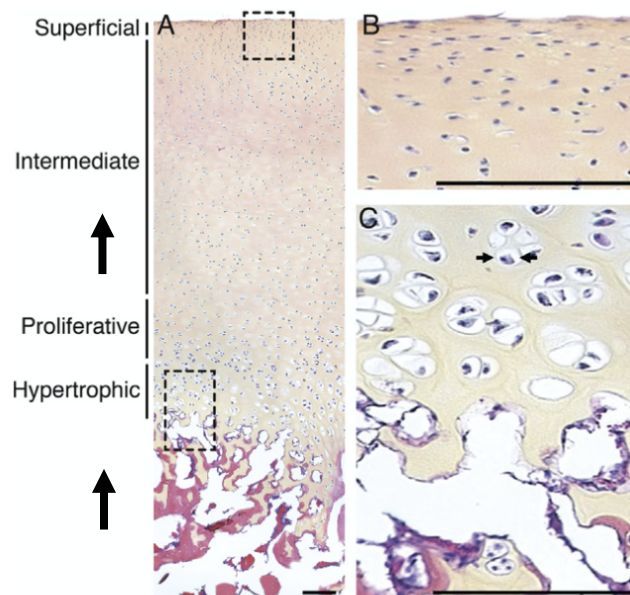


Figure 2. Coupe transversale des différentes zones représentant les chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale du complexe de cartilage artéculaire-épiphysaire (image A). Les chondrocytes situés dans la zone superficielle (image B) sont aplatis avec un noyau allongé et grossissent progressivement jusqu'à la zone hypertrophique (image C). Les flèches indiquent la direction de la progression du front d'ossification. La barre d'échelle représente 100 μm . Selon Lemirre et al., (2019).

forces de cisaillement et les dommages au cartilage artéculaire (Kawcak, 2016)

L'os sous-chondral est subdivisé en cartilage calcifié, plaque osseuse sous-chondrale et plaque osseuse trabéculaire (Stewart and Kawcak, 2018). L'épaisseur et l'architecture varient selon la localisation anatomique (van Weeren, 2016). La plaque osseuse sous-chondrale est la portion la plus compacte de l'os sous-chondral. Elle lui

apporte un bon support alors que la composante trabéculaire apporte de l'élasticité et absorbe les chocs (Stewart and Kawcak, 2018). L'os sous-chondral s'adapte continuellement aux charges qui lui sont appliquées (Stewart and Kawcak, 2018). Les forces répétées appliquées à une articulation donnée entraînent une augmentation de l'épaisseur de l'os sous-chondral (Kawcak et al., 2016).

1.2.4. L'anatomie périarticulaire du grasset

Quatorze ligaments stabilisent les articulations du grasset et facilitent la transmission des forces pour permettre une locomotion efficace : deux ligaments fémoro-patellaires (médial et latéral), trois ligaments patellaires (central ou intermédiaire, médial et latéral), quatre ligaments fémoro-tibiaux (collatéraux médial et latéral et croisés crânial et caudal), quatre ligaments méniscotibiaux (pour chaque ménisque, un crânial et un caudal) et le ligament ménisconfémoral (Figure 3) (Barone, 1986; Walmsley, 2011). Leur intégrité assure le maintien d'une biomécanique physiologique.

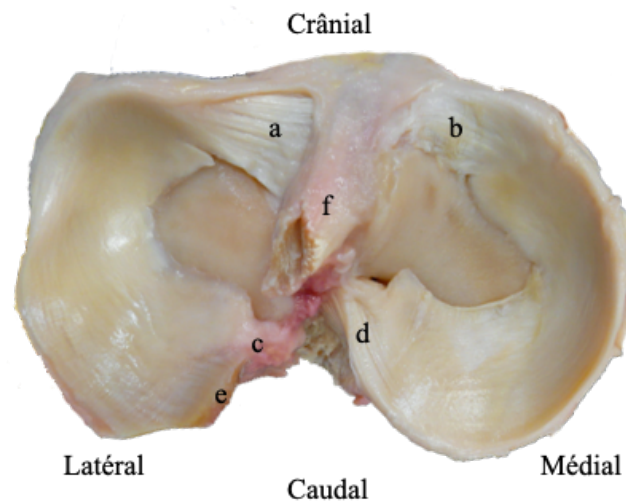


Figure 3. Anatomie normale du grasset avec une vue dorsale du tibia couvert des ménisques. Les ligaments ménisconfémoral (e) et croisé crânial (f) sont transectés sur cette image où les ligaments méniscotibiaux crâniens latéral (a) et médial (b) ainsi que les caudaux latéral (c) et médial (d) sont intacts et illustrés. *Source : Hélène Richard*

1.3. La biomécanique

La biomécanique est l'étude des forces appliquées sur un organisme vivant en mouvement. Lorsque le cheval est en mouvement, les os et les articulations sont soumis à différentes forces. Il est possible que certaines forces appliquées au CFM altèrent la biomécanique normale du grasset et prédisposent au développement des KSC. Comme les traumatismes à cette localisation anatomique sont émis comme hypothèse de l'initiation des KSC du CFM (voir section 2.5.2), une compréhension de la biomécanique pourrait mener vers la prévention de la lésion. Chez le cheval, il n'existe pas encore d'études sur la transmission des forces dans l'articulation fémoro-tibiale *in vivo*. Cependant, quelques études ont tenté de démontrer certaines caractéristiques biomécaniques *ex vivo* dans le but de le transposer *in vivo*.

1.3.1. La biomécanique physiologique

Les mouvements du grasset sont difficiles à caractériser, s'exerçant dans les axes x, y et z. Dans une position debout immobile, le grasset équin a un angle de 150° (Baxter et al., 2011). L'angle du membre varie entre 160° et 140° *in vivo* au pas et au trot (Back et al., 1995; Hodson et al., 2001), alors que des données non publiées rapportent que l'angle du grasset d'un cheval de course au galop oscillent entre 130° et 145° (Fowlie et al., 2012). Le grasset effectue aussi un mouvement dans les trois axes lors de l'extension et le tibia effectue une rotation externe, une abduction entre 110° et 135° et une adduction entre 135° et 160° (Halley et al., 2014). Ce dernier mouvement a été étudié *ex vivo* sur des grassets adultes de spécimens cadavériques par analyse radiostéréométrique, une méthode utilisant les radiographies biplanaires pour visualiser en trois dimensions les mouvements de l'articulation grâce aux marqueurs présents sur l'aspect distal du fémur et l'aspect proximal du tibia.

Dans un grasset sain, l'aire de contact articulaire entre le CFM, le centre d'intérêt de notre étude, et le plateau tibial varie selon le mouvement effectué par le cheval. Lorsque le membre fléchit, le centre du contact articulaire adopte un mouvement de direction craniocaudale (Fowlie et al., 2011; Halley et al., 2014) et l'aire de contact articulaire augmente (Bonilla et al., 2015; Fowlie et al., 2011; Halley et al., 2014). Ces données ont

été mesurées *ex vivo* et, entre autres, par des capteurs de pression électroniques. Les forces subies par le CFM semblent importantes lors de la flexion du membre, puisque c'est la position du grasset lorsque le membre, en mouvement, touche le sol avec sa force maximale. Appliquées à répétition, ces forces pourraient engendrer des traumatismes au CFM et favoriser le développement des KSC.

Les ménisques stabilisent l'articulation fémoro-tibiale durant les mouvements ; ils absorbent et transfèrent les forces appliquées à cette articulation (Fithian et al., 1990; Walker et al., 2015). Les ménisques, de forme semi-lunaire, ne couvrent seulement qu'une portion du plateau tibial médial et les pics de pression se concentrent sur le cartilage découvert du ménisque (Bonilla et al., 2015), ce qui pourrait prédisposer au développement de lésions au CFM ou au plateau tibial médial.

1.3.2. La biomécanique altérée

Les composantes biomécaniques du grasset peuvent entre autres être altérées par les déchirures méniscales, l'ostéoarthrose et les KSC du CFM (Bonilla et al., 2015; Fowlie et al., 2011; Setton et al., 1999).

Certaines études rapportent l'altération biomécanique qu'engendre la présence de KSC du CFM. Dans un grasset atteint de KSC, la flexion change le plus les forces biomécaniques normales. Premièrement, la force appliquée sur le plateau tibial médial est diminuée et l'aire de contact sur le plateau tibial médial est aussi diminuée sur un modèle *ex vivo* de chevaux adultes atteints d'un KSC au centre du CFM (Bonilla et al., 2015). Deuxièmement, la flexion du membre atteint de KSC amplifie la pression caudale et abaxiale sur le plateau tibial médial d'un modèle *ex vivo* de chevaux adultes (Bonilla et al., 2015). Ces données sont pertinentes à considérer puisqu'il a récemment été démontré qu'avec l'âge, les KSC migrent d'une position cranioaxiale au CFM avant l'âge de 7 mois en direction caudo-abaxiale après cet âge (Lemirre et al., 2021; Perez-Nogues et al., 2020; Santschi et al., 2019), qui pourrait être causé par des variations biomécaniques causées par la présence des KSC et/ou la croissance d'un animal sain.

En 2015, la distribution des forces au centre des KSC du CFM a aussi été décrite pour la première fois dans un modèle d'éléments finis (Frazer et al., 2019a). Ce modèle incluait une rotation fémorale interne afin de reproduire le mouvement naturel du grasset.

En présence d'un KSC du CFM de 2 cm³, les forces de compression et de cisaillement sont augmentées respectivement de 25% et 50% dans le CFM et le plateau tibial médial, à l'endroit où les os s'articulent et les forces de tension sont augmentées de 200% à l'aspect proximo-médial et disto-latéral au KSC (Frazer et al., 2019a). Une augmentation des forces de tension disto-latérales au KSC, c'est-à-dire près de l'éminence intercondyloire médiale du tibia, a aussi été démontrée dans un modèle d'éléments finis d'une lésion de 0.5 cm³ (Frazer et al., 2017). Ces forces altérées dans le CFM pourraient être à l'origine de la progression des lésions, mais les connaissances sur l'impact de la biomécanique sur la progression des lésions doivent être approfondies. De nos jours, la mécanobiologie est un domaine de grand intérêt en orthopédie. Ce domaine s'intéresse aux liens entre les forces et le remodelage tissulaire effectué par les cellules et est peu étudié chez le cheval.

2. Les kystes sous-chondraux du condyle fémoral médial

Les KSC, aussi appelés lésion osseuse pseudo-kystique (Stewart and Reid, 1982) ou lésion kystique sous-chondrale (Jackson et al., 2019), sont des lésions osseuses avec une densité radiographique localement diminuée (Figure 4). Une autre terminologie provient du diagnostic radiologique, c'est-à-dire une SR (Santschi et al., 2016).

2.1. La localisation

La localisation la plus fréquente des KSC est le CFM, c'est-à-dire dans 48,5% des cas, mais plusieurs autres os peuvent être atteints tels que les phalanges, l'os naviculaire et les os du carpe (von Rechenberg et al., 1998). De plus, chez les *yearlings*, le membre postérieur droit a tendance à être plus fréquemment affecté que le membre postérieur gauche (Jackson et al., 2009). Lorsqu'étudiée, cette différence était statistiquement significative (Oliver et al., 2008).

2.2. Les caractéristiques morphologiques

Les KSC du CFM sont situés dans l'os sous-chondral épiphysaire, sous le cartilage articulaire, à la surface d'appui du CFM. Ils sont variables en taille et en forme. Ils peuvent être réguliers, irréguliers, aplatis ou en forme de dôme (Jeffcott and Kold, 1982b). Ces lésions sont superficielles ou profondes et varient de quelques millimètres (mm) à plus de trois centimètres (Jackson and Fürst, 2019). Les petits et moyens KSC sont irréguliers et multilobés, tandis que les gros KSC sont distincts, lisses et ont un ratio aire-volume comparable à celui d'une sphère (Walker et al., 2016).

Les examens définitifs pour reconnaître une communication exacte entre l'articulation et les KSC sont l'imagerie par résonance magnétique, peu disponible pour le grasset, l'arthroscopie *in vivo* ou l'histologie post mortem *ex vivo*, mais cela n'a jamais été étudié chez les chevaux. Cependant, une évaluation radiographique, plus subjective, est soulevée dans trois études. Celles-ci rapportent un taux de communication suspecté de 25% (n= 458), 72% (n =32) et 100% (n=7, n=7) (Contino et al., 2012; Jeffcott and Kold, 1982a; Jeffcott et al., 1983; Walker et al., 2016). Lorsqu'elle est présente, la communication entre

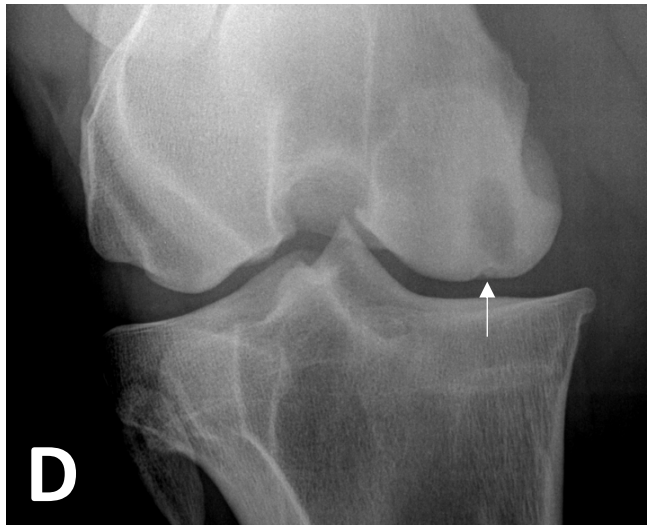


Figure 4. Radiographie caudo-craniale d'un kyste sous-chondral du condyle fémoral médial droit d'un cheval de 7 ans. La flèche indique une irrégularité de la surface articulaire du condyle médial et, proximatement, une plage de forme ovoïde dont l'opacité est inférieure à celle du condyle latéral. Cette plage est également entourée d'une bande mal délimitée dont l'opacité est augmentée comparativement au reste de l'os du condyle médial et du condyle latéral. Cette lésion est communément connue sous le nom de « kyste sous-chondral ». D = Droit. *Source : Laboratoire d'orthopédie comparée de l'Université de Montréal*

l'articulation et le KSC se situe dans la portion crâniale du CFM, plus précisément dans le 15-20% crânial, alors que le centre de la lésion est situé plus caudo-proximo-abaxial à cette ouverture, cette localisation exacte déterminée plus fréquemment par examen tomодensitométrie majoritairement *in vivo* (Walker et al., 2016).

2.3. Les signes cliniques

Certains changements cliniques sont manifestés de façon variable chez les chevaux atteints de KSC. La distension articulaire fémoro-tibiale médiale est plus fréquente lors de condition chronique (McIlwraith, 2005), et demeure difficile à reconnaître par un propriétaire. Elle est généralement mise en évidence par l'examen de boiterie. La distension articulaire fémoro-patellaire peut aussi être présente, suite à la communication entre les compartiments synoviaux, rendant la distension plus facilement décelable par un propriétaire (Howard et al., 1995).

La boiterie se manifeste souvent seulement au début de l'entraînement des jeunes chevaux (Baxter, 2020), mais les chevaux atteints ne présentent pas toujours de boiterie (McIlwraith, 1982; Santschi et al., 2016; Trotter and McIlwraith, 1981). La réponse à la flexion du grasset en présence d'un KSC est aussi variable (Howard et al., 1995; Jeffcott and Kold, 1982a, b; Schneider et al., 1997; Scott et al., 2004). En général, lorsqu'une boiterie est causée par un KSC du CFM, la flexion sera positive (Baxter, 2020), mais une flexion négative n'exclut pas la présence d'un kyste. À ce jour, les chevaux se destinant majoritairement à la course, sont de plus en plus diagnostiqués lors de radiographies de dépistage d'ostéochondrose avant les ventes.

2.4. La prévalence

Les KSC du CFM équin sont souvent diagnostiqués par imagerie, plus précisément par radiographie considérant l'accessibilité de la modalité et du coût associé. Les données de prévalence radiographique sont souvent obtenues sur des populations de *yearlings* Pur-sang de course, chez lesquels les radiographies préachat sont facilement accessibles et nombreuses. Une étude rapporte qu'environ 5,6% des chevaux sont atteints (Jackson et al., 2009), alors qu'une autre suggère une prévalence pouvant atteindre jusqu'à 20% (Santschi et al., 2016) (Tableau 1). Une prévalence radiographique est rapportée chez les *yearlings* avec des résultats divergents, puisqu'un auteur rapporte une augmentation (de 5,6% à 6%) et un autre rapporte une diminution (de 7,8% à 6%) entre 6 et 18 mois d'âge. Les études s'entendent finalement sur la prévalence radiographique d'environ 6% vers 18 mois d'âge.

Une étude récente sur l'évaluation de CFM en post mortem rapporte une prévalence tomodensitométrie de 19% chez des chevaux Pur-sang juvéniles âgés de 2-12 mois et ce chiffre semble mieux représenter la prévalence obtenue réelle des KSC grâce à l'utilisation de techniques d'imagerie diagnostiques sophistiquées (Lemirre et al., 2021). Une seule étude de prévalence radiographique des KSC existe pour les chevaux de sport et rapporte une prévalence de 19,1% (Tableau 1) chez des Quarter Horse de cutting, une discipline d'équitation western visant à isoler un bovin de son troupeau. À ce jour, aucune étude épidémiologique sur les races atteintes n'a été publiée. Néanmoins, plusieurs études rapportent la présence de KSC chez différentes races tels que les chevaux Selle Français, Warmblood, Paint Horse, Arabe et Appaloosa (Jacquet et al., 2007; Wallis et al., 2008). Le

diagnostic des KSC est cependant idéal lorsqu'il est effectué en bas âge afin que le cheval puisse avoir accès à un traitement optimal avec un meilleur pronostic que s'il est diagnostiqué plus tard (voir section 2.9).

Tableau 1. Prévalence radiographique des kystes sous-chondraux du condyle fémoral médial chez des chevaux âgés d'environ 1 an

| Référence | Race | Chevaux inclus dans l'étude | Chevaux atteints | Prévalence |
|-------------------------|---------------|-----------------------------|------------------|------------|
| (Kane et al., 2003) | Pur-sang | 170 | 0 | 0% |
| (Scott et al., 2005) | Pur-sang | 755 | 26 | 3,4% |
| (Oliver et al., 2008) | Pur-sang | 1505 | 247 | 18%* |
| (Jackson et al., 2009) | Pur-sang | 2401 | 134 | 5,6% |
| (Furniss et al., 2011) | Pur-sang | 252 | 1 | 0,4% |
| (Contino et al., 2012) | Quarter Horse | 277 | 53 | 19,1% |
| (Santschi et al., 2016) | Pur-sang | 837 | 164 | 19,6% |

* L'aplatissement du CFM est inclus dans la prévalence, ce qui augmente à tort la prévalence des radiotransparences sous-chondrales.

2.5. L'étiopathogénie du développement des kystes sous-chondraux

Dans la littérature actuelle, deux hypothèses sont proposées pour expliquer le développement des KSC. D'une part, l'ostéochondrose (OC) et d'autre part, les traumatismes du CFM.

2.5.1. L'ostéochondrose

Plusieurs auteurs proposent l'ostéochondrose comme à l'origine du développement des KSC, mais ce lien demeure peu soutenu par la littérature.

L'OC est un défaut d'ossification endochondrale focal caractérisé histologiquement par une zone de chondronécrose (révisé par Laverty and Girard, 2013), un épaissement focal du cartilage articulaire et une séparation ostéochondrale dans la lésion (Olstad et al., 2015a). Cette chondronécrose ischémique provient d'une perte pathologique de la vascularisation du cartilage de croissance épiphysaire (Carlson et al., 1991; Olstad et al., 2013; Ytrehus et al., 2004), mais la cause exacte de cette perte demeure inconnue.

Il existe des similarités entre l'OC et les KSC du CFM puisque les jeunes animaux en croissance sont affectés et cette atteinte est fréquemment bilatérale, à savoir 50% pour l'OC des articulations fémoro-patellaire et tibio-tarsienne (McIlwraith, 1982) et 12-17% pour les KSC du CFM (Jackson et al., 2009; Oliver et al., 2008).

Il est important de réaliser que la plupart des KSC sont permanents vers l'âge de 1 an, puisque 81% des KSC affectant les chevaux âgés d'environ 7 mois étaient permanents (Perez-Nogues et al., 2020). Ceci implique que les études portant sur l'étiopathogénie de ces lésions devraient inclure des chevaux âgés de moins de 1 an. À ce jour, seulement deux études se sont penchées sur le lien entre l'OC et les KSC équins histologiquement (Carlson et al., 1995; Olstad et al., 2015b; Olstad et al., 2011). Ensemble, ces études incluaient un total de 8 chevaux, âgés de moins de 1 an dont les lésions étaient définies comme une zone de chondronécrose ischémique accompagnée, chez certains d'entre eux, d'un défaut d'ossification endochondrale. Il est difficile de déterminer si ces lésions constituaient de véritables KSC précoces, puisque les spécimens provenant des deux plus jeunes chevaux étaient histologiquement associés à de l'ostéomyélite et des cellules inflammatoires dégénérées, respectivement, compatibles avec une inflammation suppurative et plusieurs canaux du cartilage nécrotiques associés à des bactéries (Olstad et al., 2011; Wormstrand et al., 2018). À l'histologie de KSC de chevaux matures, les KSC sont composés en périphérie de la lésion de tissu fibreux dense et d'os trabéculaire immature et lamellaire. En son centre, il est composé de tissu fibreux, avec ou sans matériel gélatineux ce qui explique la faible opacité de la lésion (Jackson and Fürst, 2019).

Les hypothèses sur le lien entre les KSC et l'OC reposent donc sur un faible nombre de spécimens dans la littérature. Une étude récente de notre laboratoire remet aussi en question ce lien puisqu'à l'histologie, 17% des spécimens lésionnels de KSC du CFM étaient dépourvus de chondronécrose (Lemirre et al., 2021). Considérant que la chondronécrose est un signe pathognomonique d'OC, son absence chez un certain nombre de chevaux atteints remet en question sa légitimité comme source unique de KSC.

2.5.2. Les traumatismes du condyle fémoral médial

Les traumatismes subis par le CFM représentent la seconde hypothèse étiologique des KSC, proposée dès 1982 alors qu'un historique traumatique avait précédé l'apparition d'un KSC était rapporté (Jeffcott and Kold, 1982a; Jeffcott et al., 1983; Verschooten and De Moor, 1982). Les KSC du CFM ont aussi été rapportés en parallèle avec des lésions d'origine traumatique telles que les fractures de l'éminence intercondyloire du tibia et les lésions du ménisque médial (Jeffcott and Kold, 1982b; Rubio-Martinez et al., 2018; Verschooten and De Moor, 1982; Walmsley, 1995). En effet, environ 9,1% des chevaux atteints de KSC sont atteints d'une lésion concomitante au ménisque médial, diagnostiquée par arthroscopie (Hendrix et al., 2010). Dans un même ordre d'idées, un modèle récent d'éléments finis de grasset équin a démontré que les KSC du CFM augmentent les forces de tension et de cisaillement de 30% sur le ménisque médial (Frazer et al., 2019a). Un traumatisme commun pourrait causer le KSC et la lésion au ménisque médial ou une pourrait engendrer l'autre, mais ceci doit encore être élucidé.

À ce jour, seulement deux études expérimentales ont investigué l'importance des traumatismes dans le développement des KSC chez des chevaux matures. Une contradiction est soulevée entre ces deux articles sur la nature du traumatisme requis pour induire un kyste (Kold et al., 1986; Ray et al., 1996). Il a d'abord été démontré que la création chirurgicale d'une lésion linéaire dans le cartilage articulaire à la surface d'appui du CFM causait le développement de KSC (Kold et al., 1986). Cette étude n'était pas sans lacune, puisqu'elle incluait un faible nombre d'animaux et une méthode expérimentale variable (Kold et al., 1986). Une autre étude expérimentale mieux contrôlée (plus d'animaux, une seule méthode chirurgicale utilisée) a aussi engendré le développement d'un KSC à la surface d'appui du CFM équin, mais par contraste avec l'étude précédente, celui-ci survenait uniquement suite à la création d'une lésion dans le cartilage articulaire et l'os sous-chondral (Ray et al., 1996). Les différences entre ces résultats pourraient s'expliquer par des protocoles de recherche variables. Bien que ces conclusions soient en contradiction, Ray et al. (1996) démontrent de façon plus soutenue qu'un traumatisme focal au cartilage articulaire et à l'os sous chondral sous-jacent est nécessaire au développement des KSC des CFM.

La complétion de l'ossification endochondrale du CFM équin a été récemment décrite à 6-7 mois d'âge par examens microtomodensitométrique, histologique et immunohistochimique. Ces résultats sont appuyés par l'émergence histologique de la plaque osseuse sous-chondrale à l'âge de 7 mois associé à la disparition du cartilage de type X à l'immunohistochimie, un marqueur d'ossification endochondrale (Schmid and Linsenmayer, 1985), indiquent la fin de l'ossification endochondrale (Lemirre et al., 2019). Les lésions survenant après cet âge seraient donc d'origine traumatique plutôt qu'un défaut d'ossification endochondrale (la définition de l'ostéochondrose), puisque l'ossification endochondrale est terminée. Des études publiées récemment démontrent radiographiquement le développement de KSC du CFM de chevaux de course après l'âge de 6 mois (Perez-Nogues et al., 2020; Santschi et al., 2019), ce qui soutient à nouveau l'hypothèse traumatique du développement des KSC, puisqu'un défaut d'ossification endochondrale ne peut pas être créé après la fin de l'ossification endochondrale.

La cause précise des traumatismes au CFM reste encore à déterminer, mais il est possible que les variations biomécaniques et cinématiques des poulains en croissance prédisposent à des traumatismes internes au grasset. Avec le développement de l'articulation, la morphologie du grasset pourrait varier, entraînant une modification de la localisation des points de contact et, influençant subséquemment la localisation des traumas et le lieu de développement des lésions.

2.5.3. L'inflammation associée au tissu fibreux des kystes sous-chondraux

La pathophysiologie des KSC a été étudiée dans les années 2000 en mettant l'accent sur les médiateurs inflammatoires pouvant stimuler la résorption osseuse par les ostéoclastes et donc favoriser le développement des lésions (von Rechenberg et al., 2000). Le tissu fibreux présent au centre de trois KSC provenant de trois sites différents a été étudié *in vitro* (KSC du CFM, d'un os du tarse et de l'aspect distal du métacarpe). Suite à sa collection et croissance en milieu de culture, la concentration de prostaglandines E₂ (PGE₂), un facteur inflammatoire, était plus élevée dans le tissu kystique fibreux en comparaison avec le cartilage articulaire sain, ce qui rappelait l'importance de l'inflammation dans cette lésion (von Rechenberg et al., 2000).

Les interleukines (IL)-1 β et IL-6 ont aussi été mises en évidence par hybridation *in situ* et par réaction en chaîne de la polymérase en temps réel à la périphérie et au centre du tissu fibreux présent à l'intérieur des KSC, respectivement, et ce dans différentes localisations anatomiques (von Rechenberg et al., 2001). Ces cytokines ont un potentiel ostéoclastogénique (voir section 3.2.2). Les auteurs suggèrent donc qu'une augmentation des médiateurs inflammatoires dans le tissu fibreux présent au centre des KSC pourrait être liée à la résorption osseuse excessive secondaire reliée au développement et à la progression des KSC équin (von Rechenberg et al., 2000; von Rechenberg et al., 2001).

La seule étude s'intéressant au lien entre les ostéoclastes, qui résorbent la matrice osseuse, et les KSC est celle de von Rechenberg en 2000. Elle démontre *in vitro* que le tissu kystique fibreux récolté au centre des KSC et cultivé *in vitro* avait la capacité de recruter et d'activer des ostéoclastes *in vitro* par analyse des lacunes de résorption osseuse visualisées par microscope optique (von Rechenberg et al., 2000). Les auteurs ont conclu à la présence de résorption osseuse pathologique dans les KSC en général, stimulée par le tissu fibreux inflammatoire dans les lésions. Cependant, aucun tissu de contrôle n'a été utilisé pour comparer la résorption osseuse physiologique à celle du tissu fibreux kystique. Il est donc difficile de conclure hors de tout doute que la résorption osseuse *in vitro* est anormale.

2.6. L'évolution morphologique

Les KSC sont décrits comme étant des lésions dynamiques. Plusieurs facteurs associés au KSC peuvent varier dans le temps sans intervention thérapeutique comme la position axiale à centrale, la taille qui augmente, diminue ou est stable et l'apparition d'un contour sclérotique (Santschi et al., 2019).

La position dynamique des KSC a été observée dans le CFM. Les lésions présentes chez les poulains de 6 mois sont situées plus axialement, par rapport à l'axe du grasset, que les lésions observées chez les chevaux âgés de plus de 6 mois, alors qu'elles sont plutôt situées au centre du CFM (Santschi et al., 2019). Ces observations radiographiques ont été confirmées récemment avec examens tomodynamométrique et histologique (Lemirre et al., 2021). La variation de la position du KSC chez les jeunes chevaux pourrait suggérer la migration d'une même lésion ou la guérison d'une lésion axiale et le développement

subséquent d'une lésion centrale, causée par un impact traumatique après l'achèvement de l'ossification endochondrale. Avec la croissance normale du poulain et la morphologie du CFM, une lésion axiale en bas âge pourrait se retrouver située dans une position plus abaxiale avec l'âge, et donc centrale au CFM. Cependant, plus d'études sont nécessaires afin d'approfondir les connaissances sur l'évolution et la pathophysiologie du lien entre ces deux lésions.

Les KSC du CFM varient de taille avec le temps lorsqu'un traitement médical ou une intervention chirurgicale sont effectués (Howard et al., 1995; Jackson et al., 2000; Santschi et al., 2020; Stewart and Reid, 1982; Verschooten and De Moor, 1982). Deux études récentes se sont intéressées à l'évolution des dimensions radiographiques des KSC du CFM de jeunes chevaux de course, sans intervention médicale (Perez-Nogues et al., 2020; Santschi et al., 2019). Il a été démontré que 12 et 48% des chevaux sains âgés entre 6 et 12 mois étaient atteints d'un KSC 6 mois plus tard. Inversement, un KSC du CFM affectant un cheval du même âge était résolu dans 6% et 67% des cas lors de la réévaluation radiographique 6 mois plus tard (Perez-Nogues et al., 2020; Santschi et al., 2019).

Plus d'études sont nécessaires afin de comprendre pourquoi la taille de certaines lésions varie, mais des hypothèses ont été émises. La diminution de la taille des KSC est suspectée de refléter une guérison de la lésion. L'augmentation de la taille des KSC est suspectée d'être causée par la résorption osseuse par les ostéoclastes, stimulés par les facteurs inflammatoires présents au centre des KSC (von Rechenberg et al., 2000). De plus, tel que mentionné dans la section 1.3.2, en présence d'un KSC, les forces de cisaillement sont augmentées au pourtour de la lésion et pourraient être à l'origine de la progression de certaines lésions (Frazer et al., 2019a). Cependant, la compréhension de l'impact de la biomécanique sur la biologie de la résorption osseuse et de la progression des lésions doit être approfondie.

En bref, la variation de la position et de la dimension des KSC, évalués par radiographie, suggèrent fortement un métabolisme osseux actif présent au sein du CFM atteint de KSC.

2.7. Les méthodes diagnostiques

À ce jour, plusieurs méthodes diagnostiques sont disponibles afin d'évaluer la présence et l'évolution des KSC du CFM.

2.7.1. Les anesthésies intra-articulaires

L'anesthésie intra-articulaire fémoro-tibiale médiale est une procédure effectuée dans le but de confirmer une douleur causée par les KSC du CFM (Ferris et al., 2014; Howard et al., 1995; Plevin and McLellan, 2014; Santschi et al., 2015). Cependant, cette anesthésie amène une réponse variable entre les sujets atteints pouvant améliorer partiellement la boiterie allant jusqu'à la résoudre (Howard et al., 1995; Smith et al., 2005; Walmsley, 2011; White et al., 1988).

2.7.2. L'imagerie du grasset équin

La radiographie

Le diagnostic de KSC s'effectue le plus fréquemment par radiographie (Figure 4) (McIlwraith, 1990). Les KSC peuvent avoir différentes morphologies radiographiques et plusieurs systèmes de classification existent pour les catégoriser dont celui de Santschi et al. (2015) séparé en 6 grades (Figure 5). Les vues radiographiques employées pour mieux visualiser les KSC sont la caudo-craniale, la caudolatérale-crâniomédiale oblique 30° et la latéromédiale en flexion (Walmsley, 2011). Il est fortement suggéré de radiographier le membre controlatéral pour détecter les lésions bilatérales, présentes dans environ 12-17% des cas de KSC (Jackson et al., 2009; Oliver et al., 2008).

L'aplatissement du CFM est un changement radiographique rapporté dans la littérature, mais aucune étude n'existe sur la prévalence chez les chevaux sains. Les chevaux avec uniquement un aplatissement du CFM sont habituellement asymptomatiques (McIlwraith, 2016). Cependant, certains auteurs pensent que l'aplatissement du CFM précède la formation de KSC (Contino et al., 2012; Frazer et al., 2017) alors que cette association n'a pas été prouvée à ce jour. La prévalence des chevaux atteints d'un KSC et de l'aplatissement du CFM varie entre 7 et 52% (Contino et al., 2012; Oliver et al., 2008; Scott et al., 2005). Les chevaux atteints d'une boiterie d'un membre pelvien et un aplatissement du CFM devraient cependant être évalués par arthroscopie, puisque 90% des

chevaux sont atteints d'une lésion ostéochondrale au CFM (Scott et al., 2004). En contrepartie, cette étude ne rapporte aucun suivi radiographique de ces lésions ostéochondrales, lequel aurait pu contribuer à la compréhension du développement de ces lésions en KSC chez les chevaux de plus de 3 ans.

L'évaluation de l'aplatissement du CFM sur des radiographies de chevaux adultes avec ostéoarthrose (77 spécimens), confirmé par une évaluation macroscopique *gold standard* post mortem, démontre seulement un accord radiographique interobservateurs acceptable (0,34) pour ce paramètre et de faibles sensibilité et spécificité de 33,3% et 58,8% respectivement (De Lasalle et al., 2016). Ces résultats remettent en question la fiabilité de la mesure de l'aplatissement du CFM par radiographie.

L'échographie

Le diagnostic des KSC du CFM par échographie est complémentaire au diagnostic radiographique. L'échographie permet la visualisation du cartilage et du ménisque médial. La détection d'un ménisque endommagé en présence d'un KSC du CFM diminue le pronostic de 75% à 20% (Hendrix et al., 2010; Santschi et al., 2015) lorsque le ménisque est endommagé concomitant à un KSC du CFM (voir section 2.9) (Jacquet et al., 2007).

La tomодensitométrie et l'imagerie par résonance magnétique

D'autres modalités peuvent être utilisées pour diagnostiquer les KSC du CFM comme la tomодensitométrie et l'imagerie par résonance magnétique (Lemirre et al., 2021; Walker et al., 2016; Waselau et al., 2020). Des contraintes importantes limitent le diagnostic de KSC du CFM par imagerie alternative comme la taille de l'aimant, la taille du cheval et du grasset, le coût de l'examen et la nécessité d'acquérir les images sous anesthésie générale. La disponibilité des systèmes (tomодensitométrie et imagerie par résonance magnétique) capables d'imager les grassets équins est limitée à certaines institutions dans le monde, puisque les installations doivent être assez grandes pour y accommoder un membre pelvien (Vekens et al., 2011; Waselau et al., 2020). À ce jour, aucune étude n'a comparé les différentes modalités diagnostiques dans les KSC du CFM.

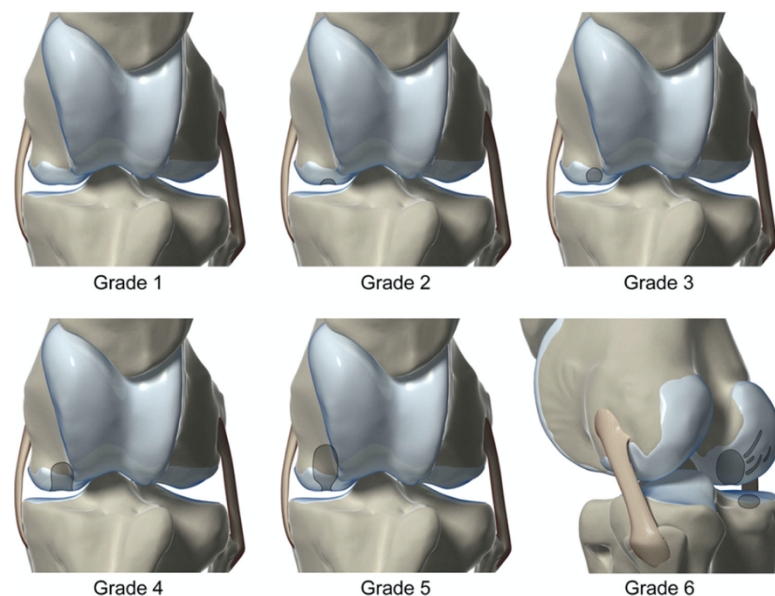


Figure 5. Système de gradation radiographique des kystes sous-chondraux selon une projection caudo-craniale proximale 20° (selon Santschi et al. 2015).

Grades : **1.** Aplatissement ou un petit défaut de l'os sous-chondral au centre du condyle fémoral médial. **2.** Radiotransparence ≤ 10 mm de profondeur en forme de dôme. **3.** Radiotransparence condyalaire sans évidence de cloaque dans l'os sous-chondral. **4.** Radiotransparence ≥ 10 mm de profondeur s'étendant à la surface articulaire. **5.** Radiotransparence ≥ 10 mm de profondeur et possédant un cloaque étroit à la surface articulaire. **6.** Radiotransparence de grade 4 ou 5 dans la portion caudale du condyle fémoral médial ou dans le plateau tibial médial proximal.

La scintigraphie

La scintigraphie, une technique d'imagerie mettant en évidence le métabolisme osseux anormal, n'offre pas de résultats optimaux, et parfois contradictoires, dans le diagnostic des KSC du CFM (Ray et al., 1996; Squire et al., 1992). De plus, cette technique n'est pas spécifique. Les chevaux atteints de KSC sont habituellement jeunes et pourvus métabolisme osseux augmenté dont le rayonnement radiopharmaceutique associé aux KSC du CFM peut être confondu à celui des plaques de croissance (Walmsley, 2011).

2.8. Le traitement des kystes sous-chondraux

Au fil du temps, plusieurs traitements des KSC ont été développés. Leur taux de succès varie généralement entre 50 et 75% (Jeffcott and Kold, 1982a; Santschi et al., 2015). La définition du taux de succès et les critères d'inclusion des cas varient grandement entre les études, ce qui rend la comparaison entre les traitements difficile.

2.8.1. Le traitement médical

Plusieurs protocoles de traitements dits « conservateurs » ont été décrits (Jeffcott and Kold, 1982a; Stewart and Reid, 1982). À l'époque de ces publications, les lésions étaient souvent diagnostiquées tardivement, soit après l'âge de 1 an. Les traitements décrits incluent une période de repos de six mois associée à un retour progressif à l'exercice (Jeffcott and Kold, 1982a) ou encore un travail léger avec l'administration intra-articulaire ou oral d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (Jeffcott and Kold, 1982a; Stewart and Reid, 1982). Le taux de succès pour ces traitements, défini par un cheval non-boiteux, varie entre 56% et 64%, variant selon les critères d'inclusion (Jeffcott and Kold, 1982a; Plevin and McLellan, 2014; Stewart and Reid, 1982).

Un modèle d'éléments finis dont le but est de comprendre la distribution du stress appliqué à un KSC du CFM, soutient que, basé sur les forces mesurées, le traitement des KSC uniquement avec le repos ne stimulerait pas la guérison osseuse (Frazer et al., 2019b). Par contre, ce modèle est basé sur des chevaux adultes et ne reflète probablement pas les forces appliquées dans le grasset de jeunes chevaux chez qui cette pathologie est plus fréquente et dont la capacité de guérison est supérieure. Le traitement chirurgical est toutefois recommandé chez les chevaux athlétiques atteints, pour éviter que les lésions ne progressent, et la récurrence des lésions est plus fréquente avec le traitement médical (McIlwraith, 2010).

2.8.2. Les interventions chirurgicales

2.8.2.1. Le débridement

Le débridement chirurgical d'un KSC, parfois appelé énucléation (Smith et al., 2005) ou curetage (Kold and Hickman, 1984; White et al., 1988), consiste à retirer le cartilage articulaire et l'os sous-chondral anormaux jusqu'à l'atteinte de l'os sain, puis à percer avec une mèche le pourtour de la lésion débridée. Cette technique se distingue de celle utilisée autrefois qui était moins invasive et consistait en un léger débridement du contenu situé au centre des KSC. Ceci peut être difficile chez les jeunes chevaux dans la mesure où il est difficile de différencier la texture de l'os sous-chondral anormal et de leur os spongieux normal, qui est plutôt mou. Aujourd'hui, ce traitement est reconnu pour être

associé à des complications importantes. Un élargissement radiographique des lésions kystiques et le développement subséquent de lésions au ménisque médial ont été rapportés suite à leur débridement (Hendrix et al., 2010). Les risques importants associés au débridement chirurgical ont donc motivé plusieurs auteurs à développer d'autres stratégies thérapeutiques.

2.8.2.2. L'injection intralésionnelle de corticostéroïdes

L'injection intralésionnelle de corticostéroïdes (IILC) est un traitement qui fut au départ utilisé pour ses effets anti-inflammatoires suite à la découverte de médiateurs inflammatoires, tels que la PGE₂, dans le tissu kystique fibreux des KSC (von Rechenberg et al., 2000). L'injection de corticostéroïdes est effectuée dans le tissu kystique au centre des KSC (Wallis et al., 2008). Cette injection peut se faire sur un cheval debout par approche transcutanée échoguidée (Plevin and McLellan, 2014) ou par arthroscopie sous anesthésie générale, la méthode privilégiée, afin de maximiser la précision de l'injection en visualisant l'articulation, le KSC et les anomalies concomitantes (Wallis et al., 2008).

Le taux de succès rapporté de l'IILC est de 67% (Wallis et al., 2008). Le protocole de l'étude, incluant différents types de corticostéroïdes et l'utilisation d'acétonide de triamcinolone semble donner le meilleur taux de succès à 81% (Wallis et al., 2008). Comparativement au débridement chirurgical, l'IILC semble offrir une réduction de la durée de plusieurs mois de convalescence et une diminution de la progression de KSC après la chirurgie (Tableau 2). Cependant, de nos jours, cette technique diminue en popularité, puisque plusieurs chirurgiens ont remarqué que le produit injecté retournait dans l'articulation via l'ouverture du kyste et questionnent la pertinence de cette approche.

Tableau 2. Comparaison de critères associés au suivi dans le traitement de kystes sous-chondraux du condyle fémoral médial équin.

| Technique | Nombre de chevaux inclus | Âge moyen | Temps de convalescence | Taux de succès | Progression du KSC | Inconvénients | Référence |
|---|--------------------------|-----------------|------------------------|----------------|--------------------|---|----------------------------|
| Traitement médical | 28 | 1-3< ans | 6 mois | 14/25 56% | 4/11 36% | Aucune stimulation de la guérison osseuse (Frazer et al., 2019b). | (Jeffcott and Kold, 1982a) |
| Débridement | 39 | 1-9 ans | 6-8 mois | 56% | 9/14 64% | Progression des lésions. | (Howard et al., 1995) |
| Injection intra-lésionnelle de corticos | 52 | 3 ans | 1-3 mois | 67% | 1/22 5% | Haut risque de récurrence de la boiterie (Foerner et al., 2006). | (Wallis et al., 2008) |
| Vis transcondylienne | 20 | 28 mois | 3-4 mois | 75% | 0/20 0% | Chevaux >3 ans plus associés à l'échec du traitement. | (Santschi et al., 2015) |
| Fixation tiges résorbables | 3 | 13 mois | 3-4 mois | 67% | 0/3 0% | Peu de sujets inclus. Défaut du cartilage articulaire doit être importante (>15mm). | (Sparks et al., 2011) |
| Greffe d'os spongieux | 10 | 4,3 ans | 6-9 mois | 4/9 44% | 0/8 0% | Aucune différence entre ce traitement et un débridement seul (Jackson et al., 2000). | (Kold and Hickman, 1984) |
| Greffe ostéo-chondrale autologue | 5 | 5,2 ans | | 40% | | Exigeant, longue procédure, limitée par la taille du kyste, risquée pour le site donneur. | (Bodo et al., 2004) |
| Chondrocytes allogéniques | 49 | médiane 3,3 ans | >3 mois - >6 mois | 74% | 9/32 28% | Faible accessibilité mondiale | (Ortved et al., 2012) |

2.8.2.3. La vis transcondylienne

La mise en place d'une vis transcondylienne consiste à insérer une vis de 4,5 mm de diamètre en compression dans le CFM en passant à travers le kyste (Santschi et al., 2015) (Figure 6). Les auteurs soutiennent que la radiotransparence dans l'os doit disparaître pour que la boiterie soit résolue à long terme. En lien avec cette affirmation, le traitement proposé a pour but de promouvoir la formation osseuse en modifiant la biomécanique et les forces qui agissent dans le CFM atteint de KSC. Le taux de succès est défini par une diminution radiographique de l'aire du KSC d'au moins 50% et un cheval non boiteux 120 jours post-traitement, tous deux obtenus chez 75% des chevaux de l'étude (Santschi et al., 2015). L'ajout d'adjuvants thérapeutiques autologues (plasma riche en plaquettes, concentré de moelle osseuse, cellules mésenchymateuses ou fibroblastes transfectés avec le gène BMP-2) ne semble pas avoir d'effet sur le taux de succès. Cependant, un cheval âgé de plus de 3 ans au moment du traitement est plus associé à l'échec du traitement (Santschi et al., 2015).

La position proximo-distale oblique de la vis dans le CFM atteint offre une guérison osseuse plus optimale de 25-30% comparativement à une position horizontale dans le KSC ou horizontale et proximale au KSC (Frazer et al., 2019b). La réduction de la taille du KSC visualisé par radiographie au cours de ce traitement laisse présager qu'il y a un métabolisme osseux actif dans le CFM, mais cela est encore mal compris. Un modèle d'éléments finis récemment rapporté suggérait que la vis transcondylienne stimulait la résolution de lésions kystiques par guérison osseuse associée à la production de matrice osseuse (Frazer et al., 2019b).

2.8.2.4. La fixation avec des tiges résorbables chez les jeunes chevaux

D'autres traitements pour améliorer les KSC sont rapportés, à savoir une technique de réattachement du cartilage articulaire par la mise en place de broches en polydioxanone rapportée dans le traitement d'ostéochondrite disséquante (Nixon et al., 2004). Cette technique, combinée à une greffe de concentré de moelle osseuse ou de chondrocytes allogéniques, chez trois chevaux âgés de moins de 2 ans atteints de KSC de plus de 15 mm de largeur, a démontré un taux de succès de 67% (Sparks et al., 2011). Elle est idéalement pratiquée chez les jeunes chevaux compte tenu de la souplesse de l'os en bas âge.

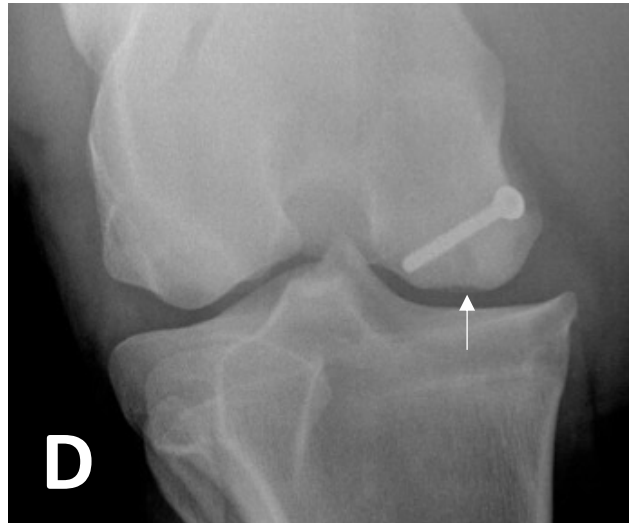


Figure 6. Radiographie caudo-craniale d'un kyste sous-chondral du condyle fémoral médial droit traité par une vis transcondylienne d'un cheval de 3 ans. La flèche indique une irrégularité de la surface articulaire du condyle médial et, proximale, une radiotransparence sous-chondrale. D = Droit. *Source : Laboratoire d'orthopédie comparée de l'Université de Montréal*

2.8.2.5. Le traitement chirurgical avec agents biologiques

Des traitements chirurgicaux réalisés à l'aide d'agents biologiques sont également rapportés dans la littérature. Un débridement de KSC suivi de l'ajout de l'hormone parathyroïdienne enrichie de fibrine hydrogel, comme principe que l'administration systémique de faibles doses de l'analogue de cette hormone augmente la synthèse osseuse des patients atteints d'ostéoporose (Aslan et al., 2012), a un taux de succès de 60% (3/5 chevaux) à 75% (3/4 chevaux), défini comme un cheval non boiteux 12 mois postopératoire pouvant être utilisé au niveau d'activité désiré (Jackson et al., 2018; Jackson et al., 2012).

Une seule étude rapporte l'utilisation de la thérapie extracorporelle par ondes de choc dans le traitement des KSC du CFM. Cette thérapie aide la guérison de tissus mous en réduisant l'inflammation et en augmentant les facteurs de croissance, l'angiogenèse et les MSC localement (Caminoto et al., 2005; Notarnicola and Moretti, 2012). Cette étude rapporte une complication de fracture du CFM deux semaines après la thérapie extracorporelle par ondes de choc combiné à l'IILC et l'ajout de moelle osseuse autologue dans le KSC (Moser et al., 2017).

2.8.2.6. Les autres traitements chirurgicaux

Pour traiter les kystes, d'autres traitements chirurgicaux ont été testés et ont démontré des taux de succès variables. Ces traitements, résumés dans le Tableau 2, consistent principalement en débridements et des greffes (d'os spongieux, d'os intact ou de chondrocytes).

2.9. Les facteurs pronostiques

Plusieurs traitements chirurgicaux ont été développés dans le but d'améliorer le pronostic des KSC du CFM. Au cours des années, les chercheurs ont mis en évidence certains paramètres affectant négativement le pronostic de différents traitements comme la taille de la lésion, l'âge du cheval, la discipline effectuée, l'atteinte bilatérale et la présence de lésions concomitantes. En effet, les chevaux de plus de 3 ans (Santschi et al., 2015; Smith et al., 2005), de discipline western (Foerner et al., 2006; McCoy et al., 2019), atteints d'une lésion de plus de 15 mm (Sandler et al., 2002) ou atteints bilatéralement (Wallis et al., 2008) voient leur pronostic diminuer. Les lésions concomitantes aux KSC comme les ostéophytes associés à l'ostéoarthrose (Howard et al., 1995; Smith et al., 2005; Wallis et al., 2008), les KSC du condyle tibial médial (Bonilla et al., 2016) et les lésions méniscales (Hendrix et al., 2010) diminuent aussi le pronostic de plusieurs techniques chirurgicales. Malgré que ces pronostics réservés soient associés à des techniques chirurgicales spécifiques dans la littérature, cela peut s'extrapoler à d'autres techniques et c'est à garder en tête lors du traitement d'un cheval atteint de lésions concomitantes au KSC.

3. Les ostéoclastes

Il est intéressant d'étudier les ostéoclastes dans le développement des KSC, puisque ces lésions démontrent à la radiographie une diminution de la radio-opacité de l'os, ce qui signifierait qu'il existe une dégradation osseuse locale. De plus, la seule cellule ayant la capacité de résorber la matrice osseuse est l'ostéoclaste (Boyle et al., 2003). Les parties de ce chapitre ont pour but de comprendre le rôle et la fonction des ostéoclastes dans des situations physiologiques comme le remodelage osseux, mais aussi dans des situations pathologiques comme la guérison de fracture et l'ostéomyélite, qui sont des modèles d'inflammation osseuse liés aux ostéoclastes pouvant être appliqués aux KSC. Les connaissances actuelles sur les ostéoclastes équins et plus précisément en lien avec les KSC sont aussi discutées ci-dessous.

3.1. Le rôle et l'origine

Les ostéoclastes sont originaires des cellules souches hématopoïétiques de la lignée des macrophages/monocytes (Teitelbaum, 2000). La fusion des précurseurs mononucléés des ostéoclastes forme les ostéoclastes multinucléés matures (Amarasekara et al., 2018).

3.2. Les facteurs influençant les ostéoclastes

Il est primordial de comprendre comment les ostéoclastes sont différenciés, activés et influencés dans différentes situations physiologiques afin de comprendre l'impact des facteurs qui différencient les ostéoclastes dans les situations pathologiques.

3.2.1. L'ostéoclastogénèse

Certaines cytokines sont essentielles à l'ostéoclastogénèse, c'est-à-dire la différenciation d'ostéoclastes à partir de cellules souches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse. Les cytokines sont des protéines assurant l'interaction et la communication entre certaines cellules. Il existe trois cytokines clés dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes : le ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B (RANKL), le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) et l'ostéoprotégérine (OPG).

3.2.1.1. Le ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B

Les précurseurs ostéoclastiques proviennent de la moelle osseuse et sont transportés par les vaisseaux sanguins périphériques jusqu'à l'os où leur maturation se produit (Boyle et al., 2003). Cette maturation est entre autres possible grâce à RANKL, une protéine membre de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) (Teitelbaum, 2000). La liaison de RANKL au récepteur activateur du facteur nucléaire kappa-B (RANK) présent sur les précurseurs ostéoclastiques induit la différenciation de ces cellules en ostéoclastes matures et leur activation (Amarasekara et al., 2018) (Figure 7).

Les sources principales de RANKL dans le cas d'ostéoclastogénèse physiologique chez l'adulte sont les ostéoblastes et les ostéocytes, alors que chez les juvéniles, ce sont les ostéoblastes et les chondrocytes hypertrophiques (révisé par Ono et al., 2020).

3.2.1.2. Le facteur de stimulation des colonies de macrophages

Pour assurer la différenciation d'un précurseur ostéoclastique en ostéoclaste mature, un contact est nécessaire entre la cellule précurseur et RANKL ainsi que M-CSF (Figure 7) (Teitelbaum, 2000). La liaison de M-CSF à son récepteur présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques, stimule l'expression du récepteur RANK à la surface de ces cellules et amplifie la différenciation ostéoclastique en cellules matures (Ginaldi and De Martinis, 2016; Teitelbaum, 2000; Zachary, 2017). M-CSF est sécrété par les ostéoblastes, les MSC (Kumar et al., 2013) et par les prémonocytes (Maxie and Jubb, 2016).

3.2.1.3. L'ostéoprotégérine

L'ostéoprotégérine (OPG) est un récepteur soluble membre de la famille de récepteurs TNF. Il se lie à RANKL et empêche ainsi la liaison RANKL-RANK. Ce phénomène inhibe l'ostéoclastogénèse en empêchant la différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures (Abu-Amer et al., 2007). Ce récepteur soluble est sécrété entre autres par les ostéoblastes, les MSC et les lymphocytes B (Maxie and Jubb, 2016; Zachary, 2017).

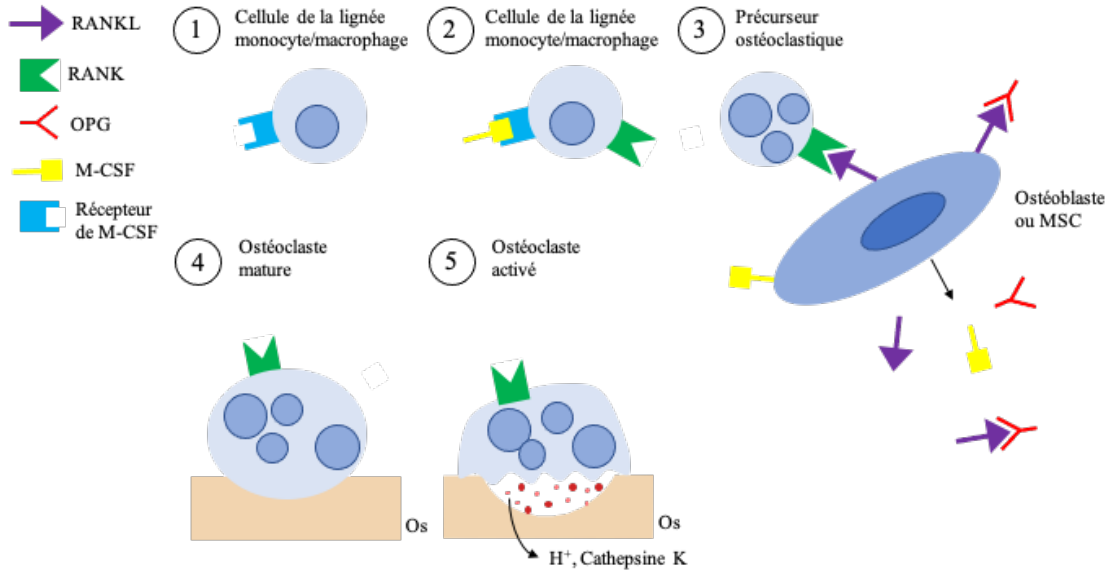


Figure 7. Les cytokines ayant un rôle dans l'ostéoclastogénèse (adaptée de Safadi et al. 2009).

1. La cellule souche hématopoïétique de la lignée des monocytes/macrophages est issue de vaisseaux sanguins provenant de la moelle osseuse. Ces cellules possèdent le récepteur c-fms, récepteur de M-CSF.
2. En contact avec M-CSF, la liaison M-CSF avec c-fms stimule l'expression du RANK à la surface du monocyte/macropage et sa différenciation en précurseur ostéoclastique.
3. Les ostéoblastes et/ou les MSC sécrètent la cytokine RANKL.
4. La liaison RANK-RANKL stimule la fusion de plusieurs précurseurs ostéoclastiques mononucléés et donc la différenciation et l'activation d'un ostéoclaste mature multinucléé.
5. Un ostéoclaste mature sécrète, entre autres, l'ion H^+ pour dissoudre le minéral de l'os et l'enzyme Cathepsine K pour dégrader le collagène de l'os. OPG est un récepteur soluble pouvant bloquer la liaison RANKL-RANK en se liant à RANKL;

RANKL, Ligand du Récepteur Activateur du facteur Nucléaire Kappa-B ; **RANK**, Récepteur Activateur du facteur Nucléaire Kappa-B ; **OPG**, Ostéoprotégérine ; **M-CSF**, Facteur de Stimulation de Colonies de Macrophages ; **MSC**, Cellules mésenchymateuses.

3.2.2. Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires sont majoritairement sécrétées par des macrophages activés (révisé par Zhang and An, 2007). Plusieurs cytokines pro-inflammatoires ont un effet sur l'ostéoclastogénèse; certaines la stimulent, d'autres l'inhibent ou ont les deux propriétés (Zupan et al., 2013). Les cytokines pro-inflammatoires ayant la plus forte action ostéoclastogénique sont $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6 et IL-17 (Ginaldi and De Martinis, 2016). Le Tableau 3 résume les effets des principales cytokines pro-inflammatoires.

Tableau 3. Influence des principales cytokines pro-inflammatoires sur l'ostéoclastogénèse (Amarasekara et al., 2018; Ginaldi and De Martinis, 2016; Maxie and Jubb, 2016; Zupan et al., 2013).

| | TNF- α | IL-1 | IL-6 | IL-17 |
|---|---------------|----------|----------|----------|
| Stimule la production de RANKL | X | X | X | X |
| Augmente la survie des ostéoclastes | X | X | | |
| Stimule la formation d'ostéoclastes indépendamment de RANKL | X | X | | X |

3.3. L'activité ostéoclastique

3.3.1. Le remodelage osseux

L'homéostasie squelettique chez les adultes est une balance coordonnée entre la résorption osseuse par les ostéoclastes et la formation osseuse par les ostéoblastes. Les os sont constamment en remodelage afin de réparer les microdommages osseux induits par l'activité régulière et aussi de s'adapter aux forces mécaniques qui leur sont appliquées (Hadjidakis and Androulakis, 2006). Les ostéoclastes initient d'abord la résorption osseuse localement, puis les ostéoblastes synthétisent la nouvelle matrice osseuse. Les ostéocytes, sont liés à ce remodelage osseux puisqu'ils sont mécanosensitifs, c'est-à-dire qu'ils captent les forces appliquées sur l'os (Repp et al., 2017). Ils envoient ensuite des signaux moléculaires à d'autres cellules telles que les ostéoclastes, les ostéoblastes ainsi que leurs précurseurs ; ce phénomène, appelé mécanotransduction, initie le remodelage osseux (révisé par Chen et al., 2010). Les ostéocytes soumis à des stimuli mécaniques tendent à diminuer le ratio RANKL/OPG ainsi que de diminuer la formation ostéoclastique (You et al., 2008), ce qui signifie qu'il y a une diminution de la résorption osseuse à l'endroit où l'os est soumis à des forces.

3.3.2. L'activité physiologique des ostéoclastes

Afin de dégrader la matrice osseuse, l'ostéoclaste activé entre en contact étroit avec la surface osseuse à l'aide de sa membrane plissée et crée un microenvironnement entre l'os et lui-même (Blair and Athanasou, 2004). L'ostéoclaste acidifie le microenvironnement en sécrétant des ions hydrogènes (Boyle et al., 2003) qui déminéralisent la matrice osseuse inorganique en dissolvant les cristaux d'hydroxyapatite présents dans l'os (Baht et al., 2018). Ils sécrètent ensuite des enzymes hydrolases acides telles que la Cathepsine K et la Phosphatase Acide Tartrate-Résistante dans le microenvironnement. Ces enzymes ont pour rôle de dégrader la matrice osseuse organique de l'os, principalement le collagène type I (Maxie and Jubb, 2016), et créent des fosses de résorption osseuse appelées les lacunes de Howship, visibles à l'histologie.

3.3.3. La Cathepsine K

La Cathepsine K est une protéase lysosomale, une enzyme provenant du lysosome qui dégrade des protéines, dont le rôle principal est la résorption osseuse. Cette enzyme a aussi été reconnue pour être sécrétée par plusieurs autres types cellulaires (révisé par Dai et al., 2020). Dans l'espèce équine, la Cathepsine K est fortement sécrétée par les ostéoclastes (Gray et al., 2002b), les ostéoblastes (Hussein et al., 2017a), les chondrocytes hypertrophiques, les cellules endothéliales associées aux canaux du cartilage et par certaines cellules mononuclées (Gray et al., 2002b).

3.4. L'activité pathophysiologique des ostéoclastes : l'inflammation osseuse

Dans le but de mieux comprendre le potentiel rôle des ostéoclastes dans le développement et la progression des KSC, il est important de comprendre le rôle de ces cellules dans des situations osseuses inflammatoires déjà bien étudiées dans la littérature scientifique. Les situations inflammatoires liées aux ostéoclastes et à notre sujet ont été séparées subséquemment en inflammations osseuses aiguë et chronique.

3.4.1. L'activité ostéoclastique en situation inflammatoire aiguë

Les ostéoclastes sont présents dans des situations inflammatoires aiguës telles que la cicatrisation de fractures et l'ostéomyélite.

3.4.1.1. La cicatrisation de fracture

La cicatrisation de fracture est un processus complexe. Elle est séparée en deux formes : directe (primaire) et indirecte (secondaire). La cicatrisation de fracture directe correspond à l'ossification intramembranaire qui consiste en une différenciation directe des MSC en ostéoblastes. Pour se produire, cette cicatrisation nécessite une réduction anatomique, c'est-à-dire lorsqu'il n'y a aucun espace entre les fragments osseux. Lors de la cicatrisation indirecte, il y a formation d'un cal osseux cartilagineux qui est par la suite transformé en os par ossification endochondrale, comme il se produit dans le cartilage de croissance des jeunes animaux (voir section 2.5.1). La cicatrisation indirecte se divise en trois phases : inflammatoire, formation osseuse et remodelage (Bahney et al., 2019).

La phase inflammatoire

Dès que la fracture se produit, un hématome se crée et stimule la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, TNF- α et IL-6 et de facteurs de croissance qui sollicitent les cellules inflammatoires au site de fracture (El-Jawhari et al., 2016). Les neutrophiles activés et les ostéoclastes nettoient les cellules endommagées et les fragments osseux endommagés. À la fin de la phase inflammatoire, un tissu de granulation riche en fibrine pauvrement organisé relie les fragments osseux (Lopez, 2019).

La phase de formation osseuse

Lors de la phase de formation osseuse ou phase de réparation, les MSC entourant l'hématome se différencient en chondrocytes. Le recrutement des MSC est nécessaire à la formation d'un cal osseux mou qui rejoint les fragments osseux, encercle le site de fracture et stabilise le site. Ces cellules s'hypertrophient et sécrètent une matrice extracellulaire calcifiée (Lopez, 2019). Cette matrice est alors résorbée par les ostéoclastes et remplacée par de l'os trabéculaire immature (Baht et al., 2018).

La phase de remodelage

Lors de la phase de remodelage, l'os trabéculaire immature est remplacé par de l'os lamellaire mature, plus solide. Cette phase, décrite comme une balance entre la formation osseuse par les ostéoblastes et la résorption osseuse par les ostéoclastes, est médiée par IL-1 et TNF- α (Marsell and Einhorn, 2011). Le remodelage osseux dépend de la répartition du poids du cheval (Lopez, 2019) et peut prendre de quelques mois à quelques années pour reconstruire une structure osseuse à son état initial (Marsell and Einhorn, 2011).

3.4.1.2. L'ostéomyélite

L'ostéomyélite est une inflammation de l'os et de la moelle osseuse. Elle est généralement causée par *Staphylococcus aureus* et caractérisée par une destruction progressive, une dévascularisation et une nécrose de l'os atteint, formant des séquestres osseux (Hofstee et al., 2020). Cette bactérie peut infecter les ostéoblastes intracellulairement, ce qui stimule l'apposition de nouveau tissu osseux et la production de cytokines pro-inflammatoires telles que RANKL, TNF- α , IL-1 et IL-6, favorisant l'ostéoclastogénèse et l'ostéolyse (Hofstee et al., 2020). La paroi de *Staphylococcus aureus* produit aussi la protéine A qui stimule la capacité de résorption osseuse ostéoclastique et la production de RANKL par les ostéoblastes et diminue la formation de matrice osseuse par les ostéoblastes (Hofstee et al., 2020). Un des facteurs importants d'ostéolyse chronique dans l'ostéomyélite est le maintien d'un environnement inflammatoire chronique. Une infection intracellulaire des ostéoclastes par *Staphylococcus aureus* a été démontrée chez des souris *in vitro*, ce qui indiquerait la découverte d'un réservoir pour la prolifération bactérienne à l'abri du système immunitaire (Krauss et al., 2019).

3.4.2. L'activité ostéoclastique en situation inflammatoire chronique

Les ostéoclastes sont impliqués aussi dans le descellement aseptique des prothèses totales de la hanche chez l'humain, c'est-à-dire la perte du contact d'une prothèse articulaire avec l'os, caractérisé par une prothèse de plus en plus lâche dans une articulation (Goodman and Gallo, 2019). Le descellement aseptique est la cause primaire de complication à long terme de la mise en place d'une prothèse totale de la hanche chez l'humain. Ce phénomène peut être le résultat d'une perte mécanique acquise au fil du

temps, mais surtout d'une perte biologique de la fixation due à l'ostéolyse périprothétique, une destruction du tissu osseux réalisée par les ostéoclastes autour d'une prothèse dans l'articulation, induite par des débris d'usure (Goodman and Gallo, 2019). Les débris d'usure sont des produits présents à l'interface implant-os résistants à la dégradation enzymatique, ce qui stimule la production d'un microenvironnement inflammatoire, engendre une ostéolyse périprothétique agressive et contribue à la persistance de la maladie (Pajarinen et al., 2017).

L'espace périprothétique contient des macrophages, des fibroblastes, des ostéoblastes et des ostéoclastes qui participent à l'ostéolyse (Goodman and Gallo, 2019). Lorsque phagocytes et macrophages reconnaissent les débris d'usure de prothèse, des médiateurs inflammatoires comme TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, RANKL et PGE₂ sont sécrétés ; ils recrutent et stimulent la résorption osseuse par les ostéoclastes (Abu-Amer et al., 2007). L'expression de RANKL jumelée à la suppression de la production de l'OPG augmente le ratio RANKL/OPG et stimule l'ostéoclastogénèse à l'interface prothèse-os (Pajarinen et al., 2017). De plus, les débris d'usure et l'environnement inflammatoire inhibent la formation osseuse par les ostéoblastes, diminuent leur viabilité et perturbent les MSCs dans leur différenciation en ostéoblastes (Pajarinen et al., 2017).

3.5. Les particularités des ostéoclastes équins

Bien qu'il soit connu que les ostéoclastes ont un rôle important dans le développement, l'homéostasie, l'adaptation et les maladies squelettiques équines, étonnamment, peu d'études *in vivo*, *in situ* ou *in vitro* portent sur ces cellules spécifiques chez les chevaux. Leurs rôles généraux dans le squelette, s'appliquant à plusieurs espèces, tels que l'ossification endochondrale (voir section 2.5.1), la cicatrisation de fracture et l'ostéomyélite (voir section 3.4) et l'homéostasie osseuse (voir section 3.5.2) ont été décrits précédemment. Les études portant sur les ostéoclastes dans le squelette équin seront discutées ci-dessous.

3.5.1. Le développement squelettique physiologique équin

Dans une étude immunohistochimique sur le développement du métacarpe principal de poulains, *yearlings* et chevaux adultes âgés de 0-84 mois, il a été démontré

que les ostéoclastes sont augmentés dans la plaque osseuse sous-chondrale par rapport à l'os sous-chondral trabéculaire dans tous les groupes d'âge (Gilday et al., 2020). La densité ostéoclastique dans la plaque osseuse sous-chondrale des chevaux juvéniles (poulains et *yearlings*) est augmentée comparativement aux adultes (Gilday et al., 2020). Cette étude est l'une des premières études *ex vivo* qui suggère que les ostéoclastes sont activement présents dans le développement normal des articulations des jeunes chevaux.

L'adaptation osseuse, c'est-à-dire l'adaptation de l'os aux différentes charges appliquées, est démontrée dans une étude sur le métacarpe de chevaux de course. En comparant histologiquement les nouveau-nés et les chevaux de course *ex vivo*, il est démontré une diminution de l'espace intertrabéculaire, une augmentation de l'épaisseur trabéculaire avec l'âge et l'entraînement ainsi qu'une différente orientation trabéculaire de radial à sagittal (Anne-Archard et al., 2019). La microarchitecture de l'os trabéculaire est grandement variable entre le sillon parasagittal latéral et le condyle métacarpien latéral en très bas âge (1-2 mois). Ces résultats démontrent indirectement la présence d'activité ostéoclastique dans l'adaptation osseuse, mais aussi chez les jeunes chevaux tel que démontré par le remodelage rapporté (Anne-Archard et al., 2019). Ceci est en relation directe avec les résultats de Gilday et al. 2020 puisque ces études démontrent que les ostéoclastes sont présents et actifs chez les jeunes chevaux.

3.5.2. Le débalancement de l'homéostasie osseuse équine

L'homéostasie squelettique est définie dans la section précédente 3.5.2. Plusieurs situations peuvent déséquilibrer l'homéostasie osseuse équine et modifier l'équilibre entre la résorption osseuse par les ostéoclastes et la formation osseuse par les ostéoblastes.

Chez les chevaux, les articulations subissant les plus grandes charges au galop sont le carpe et le boulet (Harrison et al., 2010). Lorsque les capacités de déformation élastique de l'os sont excédées, les forces appliquées peuvent engendrer des dommages osseux, appelés microdommages (Currey, 2003). Si ces forces persistent, une diminution du remodelage osseux, caractérisé par une diminution de la porosité osseuse, déterminé par tomographie à haute résolution, se produit localement (Whitton et al., 2010), alors que le remodelage osseux augmente afin de s'adapter aux forces persistantes et crée une densification osseuse visible radiographiquement comme de la sclérose (révisé par Martig

et al., 2014). Lorsque la formation des microdommages excède les capacités de remodelage osseux, les microdommages s'accumulent dans l'os sclérotique et deviennent des microcraques qui peuvent éventuellement mener à des fractures de stress, potentiellement catastrophiques (Whitton et al., 2018).

Les microcraques ont aussi été identifiées dans le cartilage calcifié et l'os sous-chondral de chevaux atteints d'ostéoarthrose post-traumatique, causées par un traumatisme direct au cartilage articulaire initiant une cascade d'événements, incluant le développement de microcraques du cartilage calcifié (Norrdin and Stover, 2006). Les ostéoclastes ont été identifiés par microscopie électronique dans les fosses de résorption des microcraques de cartilage calcifié de l'aspect distal du métacarpe chez des chevaux atteints d'ostéoarthrose et quantifiés chez des chevaux atteints d'ostéoarthrose du carpe afin de mieux comprendre la pathophysiologie du développement de la maladie (Bertuglia et al., 2016; Lacourt et al., 2012). La présence de ces cellules rappelle l'intérêt d'utiliser des facteurs thérapeutiques dans le but de prévenir le développement de maladies articulaires équinnes.

3.5.3. Les facteurs thérapeutiques ostéoclastiques

3.5.3.1. Le développement thérapeutique *in vitro*

Avant 1998, personne n'avait étudié le développement ni la biologie des ostéoclastes équinnes. L'étude de la méthodologie de différenciation des précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures a démontré des similarités entre les caractéristiques des ostéoclastes produits *in vitro* et des ostéoclastes matures isolés *in vivo*, permettant l'étude sur la biologie des ostéoclastes à plus grande échelle, à partir d'ostéoclastes produits *in vitro* (Gray et al., 1998, 2000). Ces études ont éventuellement mené à l'étude de molécules modulant l'activité ostéoclastique excessive comme les biphosphonates et l'inhibiteur de la Cathepsine K (Gray et al., 2002a; Hussein et al., 2014).

3.5.3.2. Le développement thérapeutique *in vivo*

Un inhibiteur de la Cathepsine K étudié *in vivo* chez des chevaux adultes sains à l'exercice démontre, entre autres, une diminution la concentration du biomarqueur sanguin CTX-1, un produit de dégradation du collagène de type 1 et un des biomarqueurs de

résorption osseuse les plus fréquemment mesurés chez les chevaux (Hussein et al., 2017b; Hussein et al., 2014). Chez l'humain, il supprime potentiellement la production de cytokines pro-inflammatoires (Asagiri et al., 2008). Ces avantages pourraient être bénéfiques dans le traitement de maladies osseuses inflammatoires, mais ce médicament n'est pas disponible commercialement (Dai et al., 2020). L'utilisation d'inhibiteurs ostéoclastiques est toutefois controversée dû au rôle important des ostéoclastes dans le développement des articulations, le remodelage osseux et la guérison des fractures.

3.5.4. Les autres situations impliquant les ostéoclastes

La silicose pulmonaire chronique est une maladie pulmonaire fibrotique associée à l'inhalation de poussière de silice (Ziskind et al., 1976) et est souvent concomitante chez les chevaux avec l'ostéoporose, une maladie systémique qui diminue la densité osseuse et fragilise les os (Arens et al., 2011). La cause de cette ostéolyse demeure encore inconnue, mais les lésions ostéolytiques sont excessives et le remodelage osseux est anormal (Zavodovskaya et al., 2018). Histologiquement, une hypertrophie, une hyperplasie et une augmentation du nombre de noyaux des ostéoclastes étaient présentes (Zavodovskaya et al., 2018) traduisant une activité ostéoclastique excessive similaire à la maladie de Paget chez l'humain (Seitz et al., 2009). Les ostéoclastes peuvent aussi être inactifs ou complètement absents. L'ostéopétrose, défini comme une augmentation de la densité osseuse comparable à la maladie d'Albers-Schönberg chez les humains, a été rapporté chez un ânon. Une heure après sa naissance, l'ânon était atteint d'une fracture complète du tibia et après l'euthanasie, les os se coupaient facilement au couteau (Williamson et al., 2016). À l'histologie, aucun ostéoclaste n'était visible, ce qui rappelle l'importance physiologique des ostéoclastes et les problèmes causés par leur absence ou leur abondance.

3.5.5. Les ostéoclastes équins et les kystes sous-chondraux

Les KSC sont caractérisés radiographiquement par une zone de radiotransparence dans le CFM ou, en d'autres mots, une zone de résorption ou de lyse osseuse. Les ostéoclastes sont les seules cellules ayant la capacité de résorber la matrice osseuse et conséquemment, il est justifié de penser qu'ils sont responsables l'initiation ou la

progression de ces lésions. Cependant, très peu d'études se sont actuellement penchées sur le sujet.

En 1983, les premières évidences histologiques de remodelage et de résorption osseuse dans une petite lésion sous-chondrale du CFM équine étaient rapportées dans la littérature, sans toutefois visualiser d'ostéoclaste (Jeffcott et al., 1983). La présence d'ostéoclastes était subséquemment rapportée aux marges de lésions kystiques sous-chondrales créées chirurgicalement (Kold et al., 1986) et causées naturellement (Figure 8) (Olstad et al., 2015b). À ce jour, une seule chercheuse a ciblé les ostéoclastes dans ses études sur les KSC et ces études sont mentionnées dans la section 2.5.3. En résumé, le matériel fibreux kystique présent au centre des KSC de chevaux adultes, prélevé en arthroscopie ou en post mortem, comportait des médiateurs inflammatoires ayant le potentiel de stimuler l'activité ostéoclastique. Ce matériel avait aussi la capacité de recruter et d'activer les ostéoclastes *in vitro*, ce qui laisse présager qu'il stimule la résorption osseuse péri-kystique et favorise le développement des KSC (von Rechenberg et al., 2000). Néanmoins, à ce jour, aucune étude n'a quantifié le nombre d'ostéoclastes dans l'os en périphérie de la lésion pour déterminer s'il y avait réellement une résorption osseuse ostéoclastique excessive.

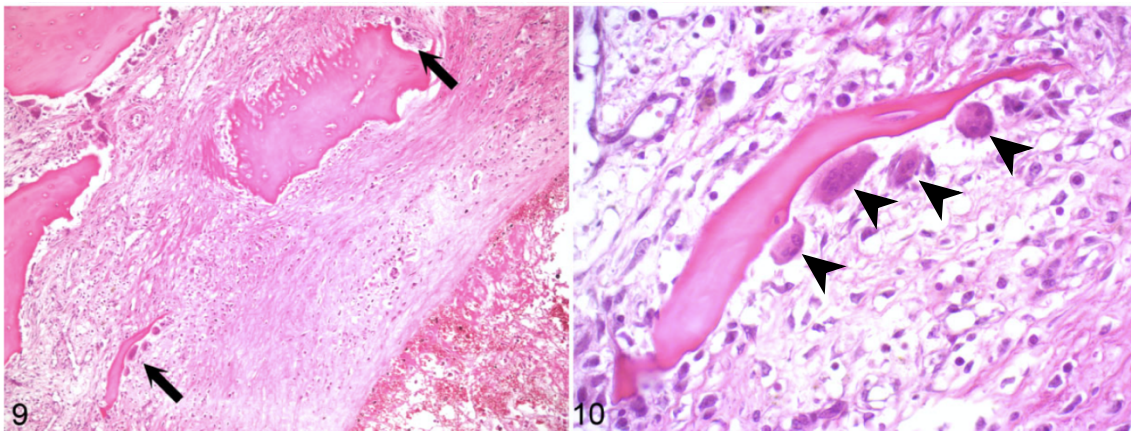


Figure 8. Présence histologique d'ostéoclastes dans un kyste sous-chondral d'un cheval de 4 ans (selon Olstad et al. 2015). Les microfractures trabéculaires sont pointées par les flèches noires sur l'image 9. L'image 10 représente une magnification d'une microfracture trabéculaire de l'image 9 où des ostéoclastes sont pointés par des têtes de flèche.

Chapitre 2 : Hypothèse et objectifs

Notre hypothèse est que le nombre d'ostéoclastes est augmenté dans la région en périphérie de kystes sous-chondraux précoces juvéniles et contribue à leurs développement et progression.

Le premier objectif de cette étude est de mesurer et comparer la densité ostéoclastique de l'os sous-chondral du condyle fémoral médial de chevaux Pur-sang de moins de 1 an normaux et atteints de lésions kystiques précoces causées spontanément.

Le deuxième objectif de cette étude est de mesurer et comparer la densité ostéoclastique à différentes profondeurs dans l'os sous-chondral du condyle fémoral médial.

Le troisième objectif de cette étude est de mesurer et comparer le ratio des chondroclastes, des ostéoclastes en contact direct avec le cartilage de croissance, dans la portion superficielle de l'os sous-chondral du condyle fémoral médial.

Chapitre 3 : Article

Osteoclast density is not increased in bone adjacent to radiolucencies (cysts) in juvenile equine femoral condyles

R. Fortin-Trahan¹, T. Lemirre¹, E. M. Santschi², J. Janes³, H. Richard¹, U. Fogarty⁴, G. Beauchamp¹, C. Girard¹, S. Lavery^{1*}

¹*Comparative Orthopaedic Research Laboratory, Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada*

²*Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, Kansas*

³*Department of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington, KY, United States*

⁴*Irish Equine Centre, Johnstown, Co Kildare, Ireland*

* **Corresponding author's email** : sheila.lavery@umontreal.ca

Funding information : This study was supported by grants from Fonds en santé équine de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal and Zoetis. Sheila Lavery's laboratory is currently funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by the Quebec Cell, Tissue and Gene Therapy Network –ThéCell (a thematic network supported by the Fonds de recherche du Québec–Santé).

Authors' declarations of interests

No competing interests have been declared

Ethical animal research: Specimens were collected from the University of Kentucky Veterinary Diagnostic Laboratory post-mortem rooms. Explicit owner informed consent for participation in this study was not stated but general permission for post-mortem examination and retention of tissues were given.

Acknowledgements: We remain grateful for Dr John Mort's (RIP) gift of Cathepsin K antibodies to our laboratory. We would also like to extend thanks to the technical staff at the University of Kentucky and Kansas State University for their assistance with sample collection.

Disclosure of interest: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Introduction

A variety of terms have been employed in the veterinary literature in the past for subchondral bone radiolucent lesions (SR) in the equine medial femoral condyle (MFC) such as subchondral cystic lesions (Ortved et al., 2012), subchondral lucencies (Santschi et al., 2015) and osseous cyst-like lesions (Stewart and Reid, 1982). From a pathology perspective, a cyst has a lining epithelium, which is not the case for SRs, so the “cyst” terminology is inexact (Zachary, 2017).

SRs are most frequently located in the cranial MFC (Lemirre et al., 2021; Santschi et al., 2019; von Rechenberg et al., 1998). Survey radiographs prior to selection for the yearling sales, have revealed a radiographic prevalence of 3.4 – 7.8% of Thoroughbred weanlings and yearlings afflicted with MFC SRs (Jackson et al., 2009; Santschi et al., 2019; Scott et al., 2005). MFC SRs are important for the equine industry for economical (yearlings not sold or at a lower price or have later reduced performance) and welfare (cause lameness and may lead to euthanasia in severe cases) reasons (Whitman et al., 2006).

The exact etiology of spontaneous MFC SRs in juvenile horses remains unknown and the two principal hypotheses for their occurrence are: they are a form of osteochondrosis (OC) (Rejno and Stromberg, 1978) or they arise secondary to a traumatic event (Kold et al., 1986; Ray et al., 1996).

OC is characterized by a focal failure of endochondral ossification secondary to ischemic chondronecrosis (chondrocyte death) of the epiphyseal vascular growth cartilage (Carlson et al., 1991), but the underlying cause of the ischemia has yet to be clearly elucidated. OC has been postulated to lead to MFC SRs as they have many features in common: they arise at a young age, frequently affect horses bilaterally and have focal failure of endochondral ossification with chondronecrosis on histological sections (Jackson et al., 2009; Olstad et al., 2015b).

It has recently been observed that SRs in foals aged 6 months or less are first located axially in the MFC (Lemirre et al., 2021; Santschi et al., 2019). To our knowledge, the youngest foal reported in the literature with histology of a naturally occurring axial MFC SR is a 5 weeks of age (Lemirre et al., 2021). This study also reported that some SRs in juvenile specimens did not have any histologic evidence of chondronecrosis, a pathognomonic sign of OC (Lemirre et al., 2021). Furthermore, some SRs either heal or develop after the end of endochondral ossification that occurs at 6 months of age in the equine MFC (Lemirre et al., 2019; Perez-Nogues et al., 2020; Santschi et al., 2019). Combined, the findings of these studies would

suggest that OC, as currently defined based on histological analysis, does not cause or is not the only cause of MFC SR development.

Two past experimental studies employing surgical trauma have reported that SRs will develop following a focal insult to the MFC (Kold et al., 1986; Ray et al., 1996). Furthermore, in a recent histological study of naturally occurring SRs, osteochondral separations between the cartilage and the subchondral bone at the osteochondral junction in juvenile specimens contained fibrin (evidence of a recent microbleed) in the majority of the lesions (Lemirre et al., 2021). It could not be established if this was caused by a primary or secondary traumatic event such as instability and movement within the lesion (Lemirre et al., 2021).

A central aspect of MFC SR genesis and progression should necessarily implicate bone resorption by osteoclasts considering the characteristic radiographic bone loss observed (Boyle et al., 2003), but has never been studied *in situ* in tissues from specimens with spontaneous disease. Histological examination of naturally occurring SR may provide clues as to the pathophysiology.

Researchers identified pro-inflammatory mediators (PGE₂, IL-1 β and IL-6) in the tissue extracted from the interior of cyst lesions from mature horses at arthroscopic surgery (von Rechenberg et al., 2000; von Rechenberg et al., 2001). Unfortunately, only material from one MFC was included in this study of cysts from various sites. They demonstrated that this tissue could recruit osteoclasts and activate their bone resorption activity *in vitro* (von Rechenberg et al., 2000). However, osteoclasts have never been quantified in the MFC bone contiguous to SRs *in situ* and *ex vivo*.

The first objective of the study was to quantify osteoclast density in the subchondral bone of juvenile (<1 year) Thoroughbred MFCs at varying depths from the articular surface in both healthy MFCs and those with early naturally occurring SR. The second objective was to measure the percentage of the osteoclasts in contact with the growth cartilage, also called chondroclasts (Odgren et al., 2016), to understand their role at the osteochondral junction in physiologic and pathologic juvenile MFC. This information may enlighten the equine industry as to the cause and management of these important and poorly understood juvenile joint developmental lesions. We hypothesize that osteoclasts are the key effectors of MFC SR formation and progression and that an increase in osteoclast density surrounding early MFC SRs is responsible for the characteristic bone loss observed.

Materials and methods

Specimens

The samples investigated in this study were selected from archived stifle specimens in a tissue bank at the Comparative Orthopaedic Research Laboratory at the Université de Montréal. The specimens have, in part, also been studied in another investigation (Lemirre et al., 2021). Briefly, femurs of Thoroughbred juvenile horses were presented to the Veterinary Diagnostic Laboratory, University of Kentucky for post-mortem examination for reasons unrelated to this study and were collected and dissected free of soft tissues. The femurs were cut proximal to the trochlea, frozen at -20°C and transported on ice to the College of Veterinary Medicine, Kansas State University.

Computed tomography screen

Computed tomographic examination of the frozen MFC specimens was performed to screen for lesions of focal disturbance in endochondral ossification at the weight bearing articular surface of the MFC (**Fig. 1; B**) as described previously (Lemirre et al., 2019; Lemirre et al., 2021). The MFCs were imaged with a third-generation, 16-slice axial CT scanner (Healthcare Brightspeed, GE Yokogawa systems, Ltd, Tokyo, Japan) using a bone algorithm. The protocol was: 120 kVp 13 mAs, DFOV 44.5mm, slice thickness – 1.25 mm, no slice interval, tube rotation time 0.5 sec, matrix 512 x 512. The specimens were then transported on dry ice to the Comparative Orthopaedic Research Laboratory at the Université de Montréal.

Histology

Inclusion criteria for this study was a CT subchondral bone radiolucent lesion in at least one MFC. The CT images were employed to guide sectioning for MFC SR osteochondral slabs to capture the lesion (L) including the articular communication if present. Healthy internal control (IC) osteochondral slabs (1 x 1.5 x 0.5 cm) were also cut from the lesional condyle, in a sagittal plane, immediately caudal to the lesion (**Fig. 1; C**). Contralateral control osteochondral slabs were cut in the opposite healthy MFC in structurally normal appearing bone on CT, guided by the site of L occurrence in opposite limb. This then provided three groups of slabs for further study: Lesion (L), Internal Control (IC) and Contralateral Control (CC). The harvested osteochondral slabs were decalcified in 14% EDTA, placed in 70% alcohol and embedded in paraffin as described previously (Lemirre et al., 2019). Five µm thick sections were cut on a microtome (Thermo Fisher Scientific HM 355S Automatic Microtome), stained

with hematoxylin, eosin, phloxin and saffron (HEPS) and safranin O fast green (SOFG) (**Fig. 1; D**) and digitalized (Leica DM 4000 B with a camera Prosilica GT and Panoptiq software – magnification: 2.5X) as described previously (Lemirre et al., 2019; Lemirre et al., 2021). Histological examination was performed by two blinded observers (TL and CG) as part of a previous study (Lemirre et al., 2021) for the following parameters: focal thickening of cartilage, chondronecrosis and irregularity of the osteochondral junction compatible with a focal disturbance in endochondral ossification at the cranial weight bearing articular surface of the MFC. The data for the specimens selected in the study herein was extracted from the laboratory logs.

Cathepsin K immunohistochemistry to identify osteoclasts

Immunohistochemistry (IHC) was performed on all sections to identify osteoclasts (Cathepsin K positive cells) to facilitate counting as described previously (Bertuglia et al., 2016; Gilday et al., 2020). All sections were manually stained in the same batch and a control section was included with all batches to validate the consistency of the staining technique between batches. The primary antibody consisted of rabbit anti-serum against Cathepsin K (gifted by Dr. John Mort, Shriners' Hospital for Children, Montréal, Québec). Positive controls consisted of histological sections from the distal physis of the radius of a foal 6 days of age. Negative controls were sections treated with the same dilution of rabbit serum with PBS-BSA, omitting the primary antibody (**Fig. S1**, Supplementary information online). The detailed protocol is provided in Supplementary **Item S1**. All stained sections were captured as digital images at 10X magnification for future analysis.

Regions of interest

As it has been recently reported that osteoclast density decreases with distance from the osteochondral junction into the subchondral bone, an analysis at different depths was performed, as described, previously with minor modifications (Bertuglia et al., 2016; Gilday et al., 2020). The digitalized images of the IHC sections were analyzed using ImageJ[®] software. Three regions of interest (ROI) were created in each section: ROI₁ - 1 mm depth from the osteochondral junction; ROI₂ - an adjacent 2 mm depth and ROI₃ - 3 mm deeper into the subchondral bone from ROI₂ (**Fig. 1; D**). The width of the ROI was determined by the length of the osteochondral interface of the largest L specimen (10 mm length). A perpendicular line to the osteochondral junction was manually traced as abaxial borders in the control ROIs (**Fig. S2**, Supplementary information online). For the L ROIs, the abaxial borders were the intersecting

point of the focal disturbance of endochondral ossification and normal cartilage of each ROI (**Fig. S3**, Supplementary information online).

Osteoclast counts

Osteoclasts were defined as cells with a Cathepsin K immunopositive cytoplasmic stain, an elongated appearance (long axis length approximately twice that of short axis) or with at least 2 nuclei counterstained with hematoxylin (**Fig. 2**), as previously described with minor modifications (Gilday et al., 2020). The osteoclasts were manually counted in each ROI on the digitalized Cathepsin K immunostained images employing the “Multi-Point Tool” in the ImageJ[®] software (**Fig. 1; E**). The analysis was performed at 150% zoom. An initial training was performed between the readers (RFT and HR) for osteoclast counts. An intraclass correlation coefficient (ICC) was employed to assess inter-rater and intra-rater reliability for osteoclast quantification. For the inter-rater agreement, counts were subsequently performed by the blinded independent evaluators on 10 randomly drawn sections (five controls and five lesions). The same sections were also re-evaluated within a week (RFT) to measure intra-rater agreement.

Subchondral bone histomorphometry: bone area (BA)

The SOFG sections were scanned under polarized light microscopy at 2.5X magnification. This technique enhances the contrast between the soft tissues in the bone marrow spaces and the subchondral bone permitting measurements of the bone area (BA) (Anne-Archard et al., 2019). The ImageJ[®] software used for 2-D bone histomorphometry analysis was employed to calculate BA (**Fig. 1; G**) (Anne-Archard et al., 2019; Gilday et al., 2020). Briefly, each section was converted into 8-bit greyscale and manually adjusted to maximize the accuracy of the thresholded BA and binarized (Schindelin et al., 2012). The digitalized images were separated into ROIs, identical to the IHC stained sections, and the BA was calculated for each. The osteoclast counts were normalized to the BA to provide the osteoclast density (Bertuglia et al., 2016; Gilday et al., 2020).

Proportion of osteoclasts in contact with MFC epiphyseal growth cartilage (chondroclasts)

Additional Cathepsin K immunostained sections were employed to measure the proportion of osteoclasts in direct contact with cartilage. These cells have also been termed chondroclasts or septoclasts but many believe they are osteoclasts (Knowles et al., 2012;

Odgren et al., 2016). Following the Cathepsin K IHC staining step, the sections were then counterstained with safranin O to provide an intense cartilage stain (red), thereby permitting enhanced visualization of the osteoclasts in direct contact with the growth cartilage (**Fig. 3**). The chondroclasts were counted in ROI₁ alone. To obtain a chondroclast proportion, the chondroclast count was divided by the sum of chondroclasts and osteoclasts.

Statistical analyses

A linear mixed model was employed with ROIs (ROI₁, ROI₂ and ROI₃) and groups (L, IC and CC) as fixed effects and specimens as a random effect to compare osteoclast densities. A priori contrasts were performed to compare pairs of means, and the alpha level was adjusted downward with the Benjamin-Hochberg sequential procedure. A linear mixed model was used with groups (L, IC and CC) as a fixed effect and specimens as a random effect to compare chondroclast proportions between groups. Statistical analysis was performed using SAS v.9.4 (Cary, N.C.) and Graphpad Prism v6.0 (Graphpad Software Inc. USA). Data are presented as means (SD). The level of statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Specimens

Information on specimen selection is provided in the flowchart (**Fig. 4**) and details of the specimens are provided in **Table 1**. A total of 42 distal femur specimens from 23 foals/yearlings underwent a CT scan screen. From these, 10 MFCs were identified with a SR and 8 healthy opposite MFC were available. Histological examination was performed on these 18 specimens to confirm the presence of a lesion suspected on CT screen.

Two lesions previously identified on CT examination were excluded from the study considering the absence of histological finding, which subsequently excluded their associated healthy CC. Six horses had unilateral CT and histological lesions and one horse was affected bilaterally. In respect to the latter case, the lesion included in this study was randomly determined by drawing lots and the contralateral lesion was excluded. One lesion specimen and its controls were excluded because of inadequate Cathepsin K staining.

The final groups analyzed included L (n=6), IC (n=6) and CC (n=5) from six Thoroughbreds, four males and two females, aged 3-8 months old (mean = 5.8 months) and three were affected on the left limb and three on the right limb. Cartilage thickening and focal disturbance in endochondral ossification (n=6), chondronecrosis (n=5) and osteochondral

separation (n=4) were observed in the L group. A representative image from an 8-month-old foal is provided in **Fig. 5**.

Osteoclast counts

The inter-rater reliability for osteoclast counts was excellent in ROI₁ (ICC: 0.93), good in ROI₂ (ICC: 0.84), but was moderate in ROI₃ (ICC: 0.54). The intra-rater reliability followed a similar pattern to the former, decreasing with increasing depth into the bone (ICC ROI₁-0.87, ROI₂-0.74 and ROI₃-0.60). The values of one observer (RFT) were used for all subsequent statistical analyses. The osteoclast counts are presented in Supplementary **Table S1**.

Subchondral bone histomorphometry- bone area (BA)

The bone area calculations are presented in Supplementary **Table S1**. In two sections, fibrous tissue was present surrounding subchondral bone radiolucent lesions and was confirmed by an ACVP-certified pathologist (CG). This tissue was manually removed from the bone area calculations employing site-matched comparisons.

Osteoclast density

The osteoclast density data for groups and ROIs are presented in **Table 2**. The comparisons between groups and ROIs are illustrated in **Fig. 6**. A significantly higher osteoclast density was measured between ROI₁ and ROI₃ within all groups: L (35.46 ± 26.51 vs 2.13 ± 1.80 , $p < 0.0001$), IC (20.83 ± 20.85 vs 4.26 ± 5.43 , $p = 0.0007$) and CC (16.68 ± 10.01 vs 3.92 ± 3.06 , $p = 0.0002$). However no significant difference was detected for other ROI comparisons within groups.

Although higher OC density values were recorded and there was visible pattern difference (greater variability) in the plots of osteoclast density in L ROI₁ (35.46 ± 26.51) when compared with CC ROI₁ (16.68 ± 10.01) and IC ROI₁ (20.83 ± 20.85), no statistically significant difference in osteoclast density was detected when the ROIs were compared between the three groups (**Fig. 6**).

Chondroclast proportion

The proportion of chondroclasts identified on the ROI₁ control (CC and IC) osteochondral sections ranged from 13-37%. However, although the proportion of chondroclasts close to the osteochondral junction was lower in the L sections when compared with the IC ($13 \pm 15\%$ vs $33 \pm 16\%$) or between CC and IC ($37 \pm 15\%$ vs $33 \pm 16\%$), no significant difference was

detected.

Discussion

There are a number of interesting and unexpected findings in this study. First, we confirm previous observations that osteoclast density is higher in the superficial subchondral bone when compared to deeper regions in juvenile equine healthy joints (Gilday et al., 2020), but in a different anatomical site (MFC versus metacarpal condyle previously) and population. Second, we extend knowledge on the osteoclast's role in joint surface development as we identified that approximately a third of the osteoclasts at the osteochondral junction in foals aged 3-8 months are juxtaposed and digesting the growth cartilage of the articular epiphyseal cartilage complex (AECC) and therefore could also be termed chondroclasts. Third, although we hypothesized that there is a focal increase in osteoclast density in the bone surrounding early MFC SRs, this could not be supported as no statistically significant differences were detected between the lesion and control specimens investigated.

Osteoclasts are multinucleated cells that differentiate from bone marrow precursors, adhere to the bone surface, creating a sealed space, into which a variety of molecules are secreted to resorb the bone matrix (Zachary, 2017). H^+ is secreted to dissolve bone mineral and enzymes, including Cathepsin K, to digest the unmineralized bone matrix composed primarily of type 1 collagen (Zachary, 2017). Osteoclasts play an important role in both bone development and pathology. In epiphyseal development, they have a dual role in both subchondral trabecular bone remodeling and at the epiphyseal growth cartilage/bone junction in juvenile joints. In healthy juvenile specimens, osteoclasts remodel the subchondral bony trabeculae, in conjunction with osteoblastic bone formation in the growing bone to align them to the principal forces, and thereby enhance strength (Boyde and Firth, 2005; Huiskes et al., 2000). In addition, in the superficial subchondral bone of the epiphysis, they have an important role in a critical step of endochondral ossification and growth (Gilday et al., 2020). The growth cartilage chondrocytes proliferate and hypertrophy at this site (Lemirre et al., 2019) and produce a calcified cartilage matrix that is subsequently resorbed by osteoclasts to permit blood vessel invasion and osteogenesis (Zachary, 2017). Osteoclasts in contact with growth cartilage have also been called chondroclasts and resorb the mineralized cartilage. No specific marker is currently available to distinguish between osteoclasts and chondroclasts which are considered very similar cell types (Odgren et al., 2016). Although we have recently reported an increased osteoclast density in the subchondral plate in juvenile equine metacarpi (Gilday et al., 2020), we did not investigate how many had a potential cartilage resorption function in that study. We

now demonstrate and quantify this important cartilage digesting role of the osteoclasts in equine maturing subchondral bone in the femoral condyle here for the first time. The findings of this study suggest that approximately one third of osteoclasts are “chondroclasts” and have an active role in endochondral ossification of the AECC of the equine distal femur in foals up to 8 months of age by digesting the growth cartilage to pave the way for osteogenesis. We postulate that a proportion of these cells could resorb cartilage in the normal MFC. It is possible that a decreased chondroclast ratio at the osteochondral junction in the developing epiphysis could explain an interruption in endochondral ossification. The mineralized cartilage would not be resorbed, hindering subsequent steps, and favouring a thickened cartilage, and potentially chondronecrosis focally, but this hypothesis requires further investigation. We believe that the fibrous nature at the osteochondral separation decreases the chondroclast ratio at the osteochondral junction, inhibiting contact between cells and growth cartilage.

No evidence to support enhanced osteoclastic activity within the bone surrounding the radiolucent lesions was found in this study. In contrast, fibrous tissue harvested at surgery from the center of adult equine subchondral bone radiolucent lesions secreted pro-inflammatory cytokines and had the capacity to recruit and activate osteoclasts *in vitro* (von Rechenberg et al., 2000; von Rechenberg et al., 2001). Our data reveals no difference in osteoclast density or chondroclast proportion between lesion and control sites in situ in the bone perimeter around the MFC radiolucent lesions. The discrepancy between our findings and previous work (von Rechenberg et al., 2000; von Rechenberg et al., 2001) has a variety of explanations. The sample tissue, age, site and conditions under which they were studied were very different. Von Rechenberg et al. studied the fibrous tissue harvested from the centre of mature subchondral bone cystic lesions (n=3) *in vitro* and only one of these cysts was in the MFC. In the study herein, early lesions were targeted in very young animals to attempt to elucidate clues to the pathophysiology of these radiolucent lesions. All samples were collected from one predetermined site and osteoclast counts were performed in the tissue samples in situ and *ex vivo*.

There are a number of possible explanations as to why differences in osteoclast density between lesion and control specimens were not detected in this study. The osteoclast density in the healthy juvenile specimens is higher than that reported in adults in this subchondral bone plate zone. In the cortical subchondral plate, an OC density of <1 osteoclast/mm was reported by Bertuglia et al. (2016) in healthy adult horses whereas we have observed in healthy juvenile horses an osteoclast density of 10-20 osteoclasts/mm and 12-24 osteoclasts/mm in the metacarpus (Gilday et al., 2020), 10-25 fold higher than in adults. The enhanced quantity of

these powerful cells in the healthy juvenile specimens may have masked minor differences associated with the lesions.

It is also possible that even though no difference in osteoclast density was observed, an increased osteoclastic activity was present surrounding lesions. Larger osteoclasts, with greater numbers of nuclei, have a higher bone resorptive activity than smaller osteoclasts *in vitro* (Lees and Heersche, 1999; Piper et al., 1992). There may have been variations in osteoclast phenotypes within the lesion specimens that we have not identified. It is a challenge to study osteoclast phenotype accurately, based on morphology *in situ* employing two-dimensional histomorphometry techniques as they are very large cells with a variety of shapes and more complicated stereological methods to obtain three-dimensional information would be required to do it accurately (Brown, 2017). We have previously identified subjective differences in morphology of the osteoclasts between the cortical and trabecular bone plate in foals where subchondral cortical bone plate osteoclasts were larger than deeper in the bone (Gilday et al., 2020). We speculate that there could be some phenotypic variation in the osteoclasts in the L versus C specimens, but this was not studied and would be difficult to achieve *in situ*.

An additional factor that needs to be taken into consideration when interpreting our findings is the reported short half-life of 14 days of osteoclasts in tissues (Parfitt, 1994). Because of this, as only one time point was investigated, significant early or later events with an increased osteoclast density that could contribute to the progression of a radiolucent lesion could be missed. The well-studied behavior of osteoclasts in experimental fracture healing events can guide the interpretation of our findings. Following fracture, osteoclasts are recruited in two phases: first in the inflammatory phase to resorb small necrotic bone fragments and again later at the end of the fracture healing to remodel the newly formed hard callus (reviewed by (Bahney et al., 2019)). We speculate that osteoclast dynamics may vary with radiolucent lesion progression and, because of their short half-life, it may be difficult to capture. The specimens were analyzed in a fixed period in time and it was unknown when the lesions initially developed or their dynamics.

To this day, the initiating factors, trajectory and dynamics of MFC SRs are unknown but new knowledge is emerging. It is now recognized that many of these early MFC axial SRs can heal (30-67%) between 6 and 18 months of age (Perez-Nogues et al., 2020; Santschi et al., 2019). The status of the lesions, either healing or progressing, was unknown. We speculate that lesions on a healing pathway might have a lower osteoclast density than progressive lesions and this could be an additional confounding factor within the lesion group, but this requires further study. Although no significant difference was detected between SRs and controls, the

data plots revealed that there was greater variability of osteoclast density within the lesions compared with the controls in the bone immediately below the cartilage. This variability may be a reflection of the lesion trajectory, but needs more study.

The intraclass correlation coefficient is an index of rater reliability reflecting the degree of correlation and agreement between measurements. In the current study, a moderate to excellent count was reported indicating a good osteoclast count reliability, particularly in the most superficial aspect of the subchondral bone. Furthermore, intriguing interrater and intrarater ICC decreases were observed for osteoclast counts from the superficial to deep subchondral bone ROIs. We postulate that the lower number of osteoclasts and the different cell morphology in the deeper zone decreases the ICC as compared to larger and more numerous osteoclasts in ROI₁ that may have therefore facilitated counting.

This study has some limitations. The sample size was limited. In addition there is inherent variation in naturally occurring MFC SR lesions that includes their extent, their duration and progressive or healing status.

In conclusion, osteoclasts are important actors in MFC epiphyseal development, particularly in the superficial subchondral bone and approximately one third are chondroclasts and digest growth cartilage in normal development to pave the way for osteogenesis. However, our data shows no difference in osteoclast density or chondroclast proportion between radiolucent lesion and control sites in situ in the bone perimeter around the MFC SRs. Our observations suggest that the pathophysiology of early MFC SCL cannot be explained solely by an increased osteoclastic presence in the peripheral subchondral bone.

Tables

| Horse | Reason for euthanasia | Age (mos) | Gender | Side | *Histology | | | | |
|-------|---------------------------------|-----------|--------|-------|------------------|--------|--------------|---------------------------|--------------------|
| | | | | | Chondro-necrosis | Fibrin | Fibro-plasia | Osteo-chondral separation | Lesion length (mm) |
| 1 | Sphenoid osteomyelitis | 3 | M | R | + | - | - | - | 4.52 |
| 2 | Hit by lightning | 4 | M | L | + | - | + | +/- | 8.47 |
| 3 | Cervical vertebral malformation | 5 | M | L | + | - | - | - | 2.09 |
| 4 | Salmonella | 7 | F | R | + | + | + | + | 8.95 |
| 5 | Gastric rupture | 8 | F | R | - | + | + | + | 7.51 |
| 6 | Pelvic fracture | 8 | M | L (R) | + | + | + | + | 8.98 |

Table 1. Details of the specimens included in the study

Key: M = male; F = female; L = left; R= right; mos= months; mm= millimeters.

| | LESION | INTERNAL CONTROL | CONTRALATERAL CONTROL |
|---|----------------------|-------------------------|------------------------------|
| | n=6 | n=6 | n=5 |
| | Mean (\pm SD) | Mean (\pm SD) | Mean (\pm SD) |
| ROI₁ (0-1 mm) | 35.46 (\pm 26.51) | 20.83 (\pm 20.85) | 16.68 (\pm 10.01) |
| ROI₂ (1-3 mm) | 8.04 (\pm 4.28) | 8.72 (\pm 10.91) | 6.42 (\pm 4.43) |
| ROI₃ (3-6 mm) | 2.13 (\pm 1.81) | 4.27 (\pm 5.43) | 3.92 (\pm 3.06) |

Table 2. Osteoclast density (osteoclast count/bone area; mm²)

Key: ROI = region of interest; SD = standard deviation.

Figures

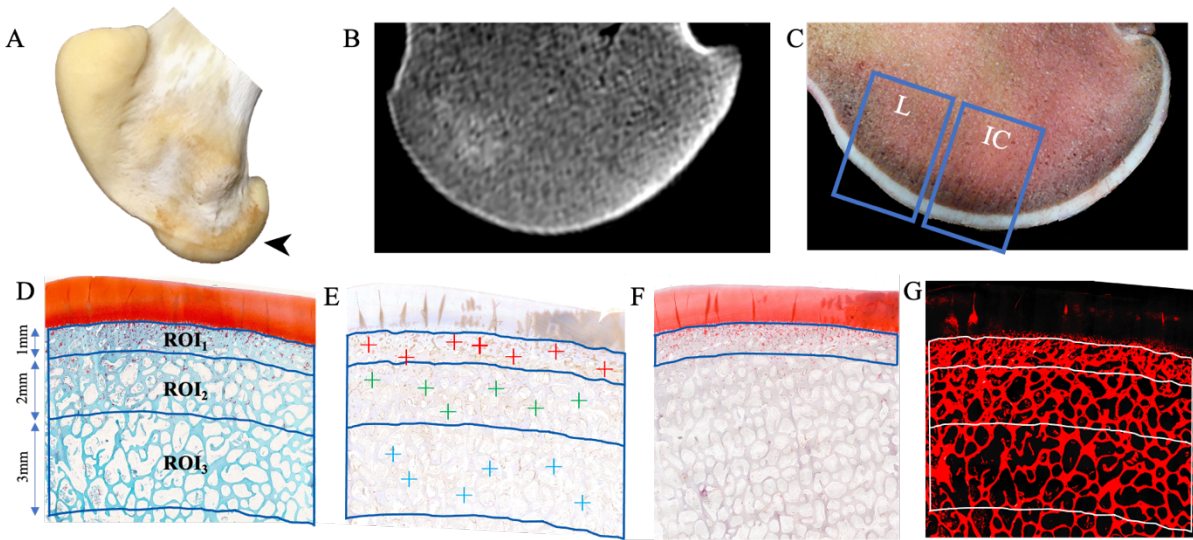


Figure 1. Study design. A. Medial view of the distal femur showing the MFC (arrowhead). B. Sagittal CT image of a weanling MFC. CT triage allowed identification of subchondral radiolucencies. C. Sagittal section of MFC illustrating sites where osteochondral slabs were harvested. The rectangle on the left is the lesion location (L) in the cranial condyle, or contralateral site to lesion (CC), and the adjacent internal control site (IC) immediately caudal to the lesion location. D. SOFG stained control section. Cartilage is red and bone is blue. The three ROIs, at different depths in the bone (1, 2 & 3 mm), illustrate where osteoclasts were counted. E. Cathepsin K antibody immunostained section illustrating manual osteoclast counting employing ImageJ® software. F. Cathepsin K immunostained section counterstained with safranin O to enhance visualization of cartilage. Osteoclasts in contact with cartilage (also called chondroclasts) were counted in ROI₁ in these sections. G. Polarized light microscopy image of a SOFG stained section. This technique provides enhanced contrast between the soft tissues in the bone marrow spaces and the subchondral bone to permit measurement of the bone area. Bone area was calculated by 2-D bone histomorphometry analysis with ImageJ® software.

Key: MFC = medial femoral condyle; CT = computed tomography; SOFG = safranin O fast green; ROI = region of interest.

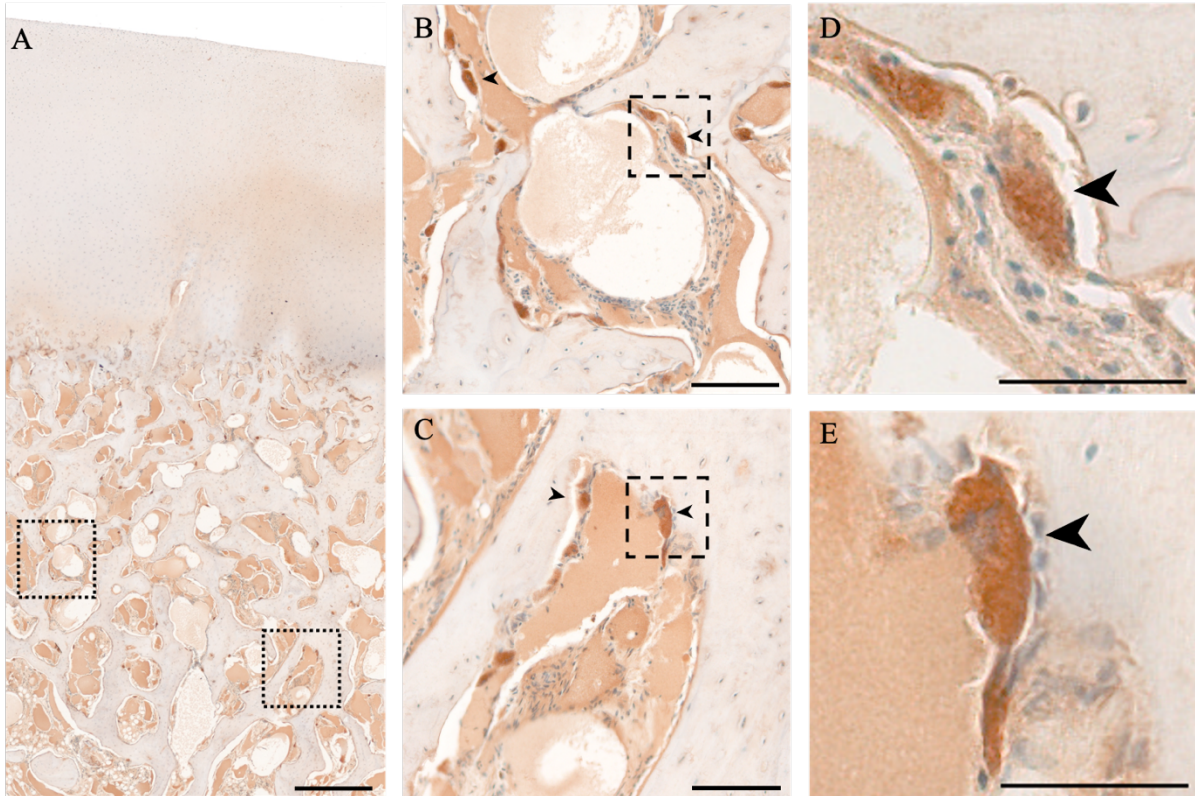


Figure 2. Osteoclast Cathepsin K immunohistochemical stained control section. A. Representative Cathepsin K immunohistochemical stained MFC osteochondral section from a 3-month-old foal (horse 1) revealing normal hyaline cartilage (Scale bar = 500 μm). B&C. Magnified inserts of interrupted dotted squares in A. Osteoclast presence revealed by intense brown Cathepsin K immunostaining of cytoplasm cells. Hematoxylin was also employed as a nuclear counterstain (blue). Osteoclasts in direct contact with bone (arrowheads) are present and Howship's lacunae are observed in the adjacent bone confirming sites of bone resorption. The soft tissue of the bone marrow also takes up the stain, but not intensely (Scale bar = 100 μm). D&E. Magnified inserts of interrupted dotted squares in B. and C. respectively (Scale bar = 50 μm).

Key: MFC = medial femoral condyle.

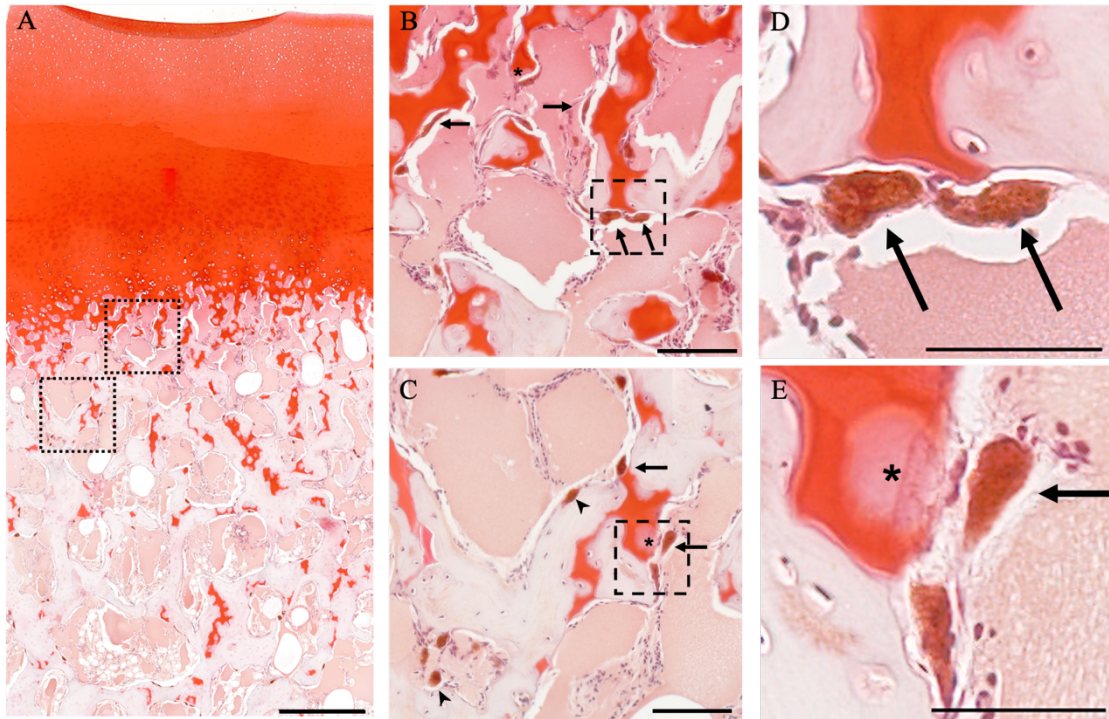


Figure 3. Chondroclasts in juvenile MFC subchondral bone control specimen of a 3-month-old foal (horse 1). A. Representative Cathepsin K immunostained control section that has been counterstained with Safranin-O to provide cartilage contrast (red stain). Islands of cartilage, which have not yet been completely resorbed, are identified in the superficial subchondral bone of foals (Scale bar = 500 μ m). B & C. Magnified inserts of interrupted dotted squares in A. Brown immunostained cells are positive staining osteoclasts adjacent to the growth cartilage near the osteochondral junction in ROI₁. Osteoclasts in direct contact with bone (arrow in B.) and chondroclasts in direct contact with the cartilage (black arrows) are present. The discolored cartilage (asterisk) with a scalloped appearance is hypothesized to be the result of chondroclast resorption activity (Scale bar = 100 μ m). D&E. Magnified inserts of interrupted dotted squares in B. and C. respectively (Scale bar = 50 μ m).

Key: MFC = medial femoral condyle.

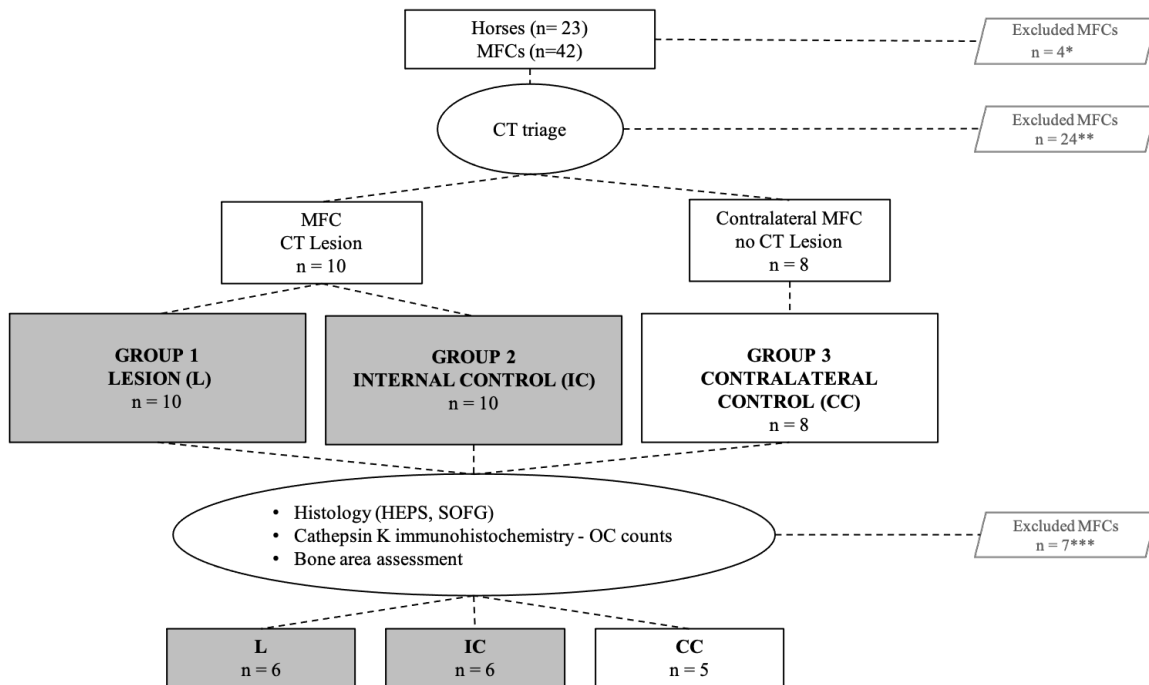


Figure 4. Flowchart for specimen selection.

* Samples were not shipped.

** MFC Specimen had no CT lesion and was not a contralateral control.

*** Not a lesion on histological evaluation (n=2 L, subsequent n=2 IC and n= 2 CC), horse affected bilaterally (n=1 L, subsequent n=1 IC), no Cathepsin K immunostaining (n=1 CC, n= 1L, subsequent n=1 IC).

The gray zones represent one MFC: the IC was on the same condyle as the L. When a lesion was excluded, an internal control was excluded by default.

Key: MFC = medial femoral condyle; CT = computed tomography; L = lesion; IC = internal control; CC = contralateral control; HEPS = hematoxylin, eosin, phloxin and saffron; SOFG = safranin O fast green; OC = osteoclast.

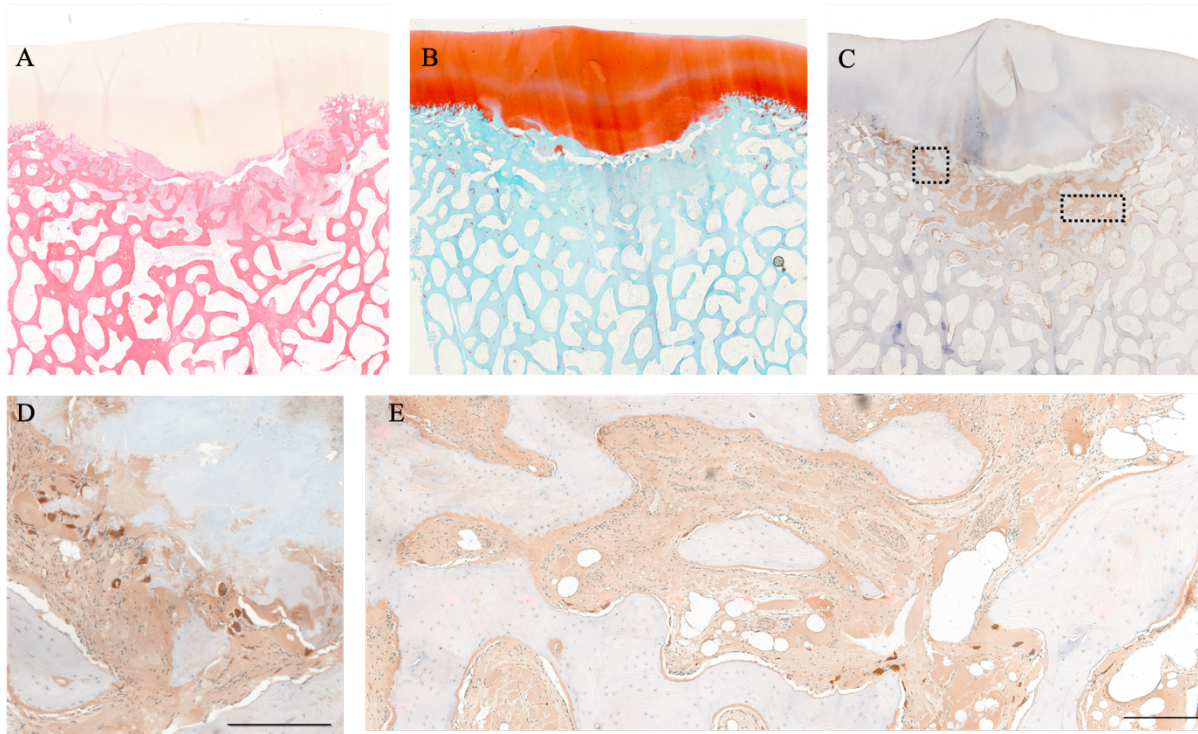


Figure 5. Subchondral radiolucency stained sections in the medial femoral condyle of an 8-month-old foal (horse 6). A. HEPS stained section revealing thickened hyaline cartilage, a separation at the osteochondral junction and increased fibrous tissue in the bone marrow spaces. B. SOFG stained lesion section. The cartilage staining in red reveals abnormal thickening of the hyaline cartilage, an abnormal osteochondral junction with a split in its depth and loss of its characteristics structure visible at either side of the lesion. C. Cathepsin K immunohistochemical stained lesion counterstained with hematoxylin to reveal cell nuclei. There is enhanced matrix uptake of the stain in the soft tissues of the bone marrow adjacent to the lesion. D. & E. Magnified inserts of interrupted dotted squares in C. revealing enhanced staining of the multinucleated cells, frequently attached to the bone. Brown cells indicate positive staining osteoclasts (Scale bar = 250 μm).

Key: HEPS = hematoxylin, eosin, phloxin and saffron; SOFG = safranin O fast green.

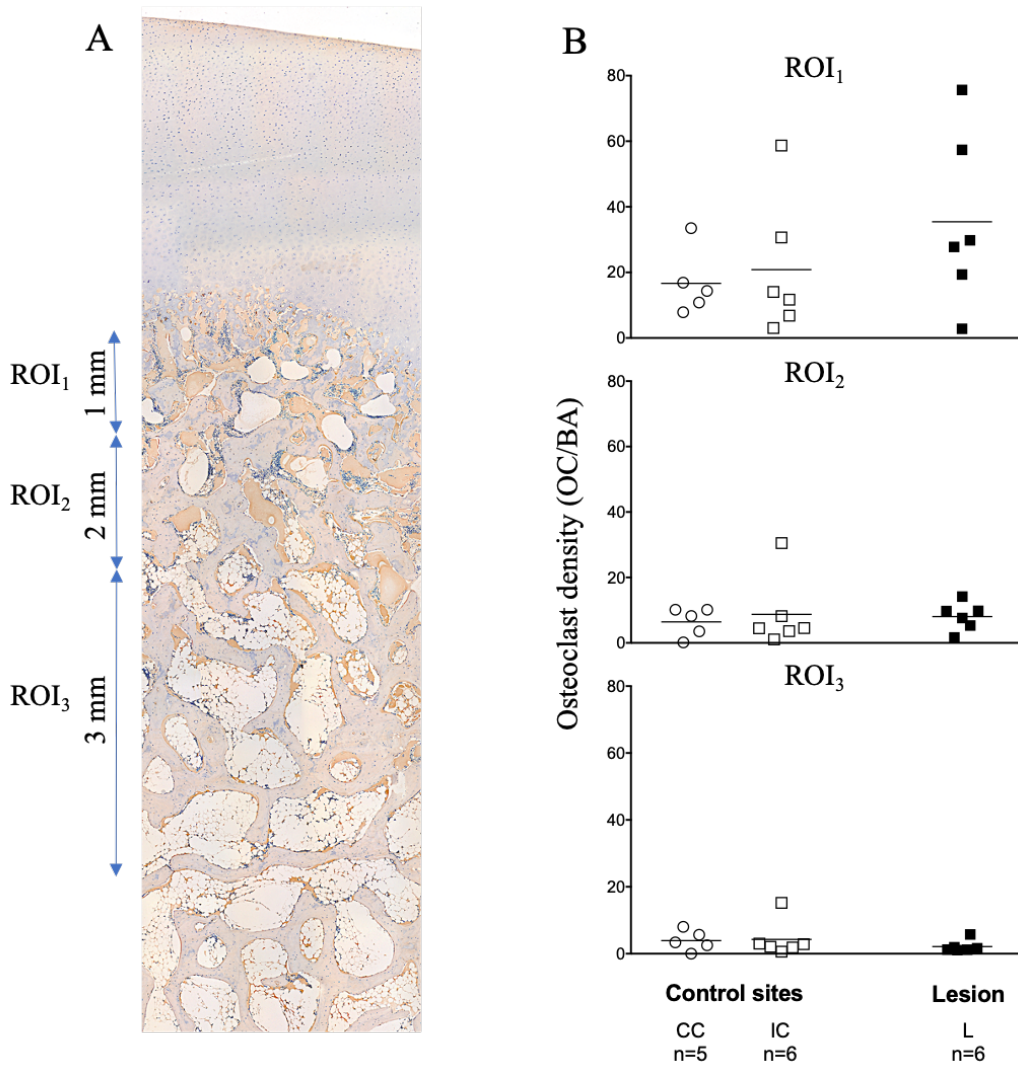


Figure 6. Osteoclast density and distribution in the subchondral bone of the MFC in foals aged 3-8 months. A. Representative Cathepsin K immunohistochemical stained MFC osteochondral section of a 4-month-old foal (horse 2). B. OC density at three different depths in the subchondral bone from the osteochondral junction (ROI₁ 0-1mm; ROI₂ 1-3mm and ROI₃ 3-6mm) in control (CC and IC) and L specimens. A significant decrease in OC density with advancing depth into the subchondral bone was observed in all specimens. Also, a greater variability was observed in the OC density in ROI₁ in the lesions when compared to the control sites. However this was not statistically significant (Scale bar = 500 μ m).

Key: OC = osteoclast; BA = bone area; L = lesion; IC = internal control; CC = contralateral control; ROI = region of interest; MFC = medial femoral condyle.

Supplementary Information Online

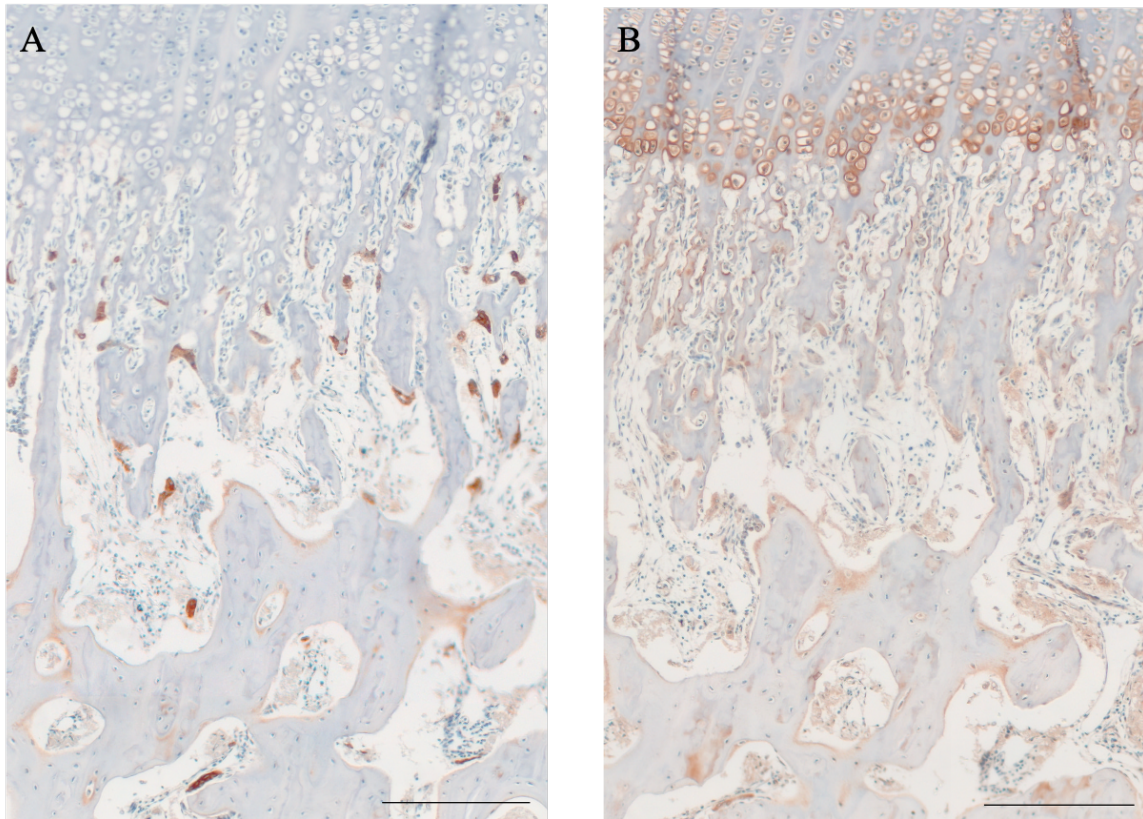


Figure S1. Cathepsin K immunohistochemical stained controls. A. Positive control Cathepsin K immunostained section, counterstained with hematoxylin, from the distal radius growth plate of a 6-day-old foal. Abundant brown staining osteoclasts are clearly visible at the osteochondral junction. B. Negative controls were sections treated with the same dilution of rabbit serum with PBS BSA without the primary antibody. The primary antibody had been produced in rabbits. No immunostained cells are visible when compared with A. There is an enhanced non-specific uptake in the matrix and lacunae of the hypertrophic cellular region of the physis (Scale bar = 250 μm).

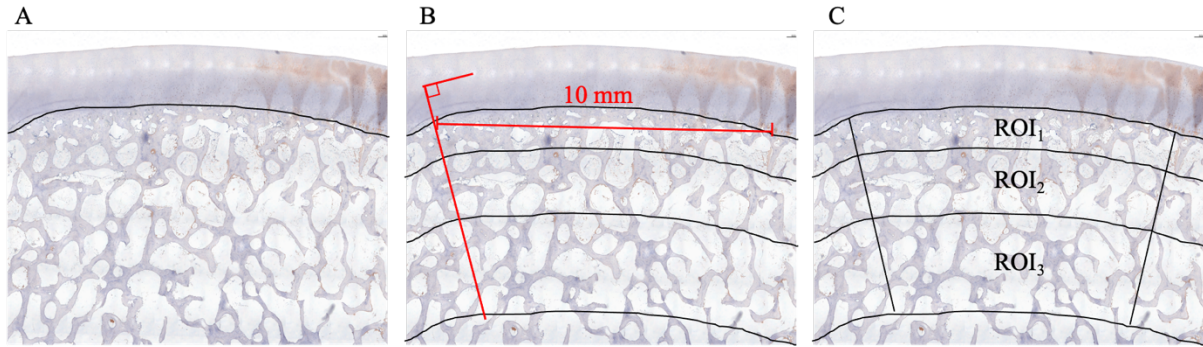


Figure S2. Methodology to delineate the ROIs in the subchondral bone for osteoclast counts in control specimens. A-C. Cathepsin K immunostained control sections illustrating ROI delineation employing ImageJ® software. A. The osteochondral junction was first traced manually. B. This line was then employed to identify 1, 3 and 6 mm depths into the subchondral bone, parallel to osteochondral junction. A perpendicular line to the osteochondral junction was traced to determine an abaxial border of the ROIs. C. A 10 mm length was measured in the junction between the osteochondral junction and the abaxial border of the ROIs to determine the position of the second abaxial border. D. A perpendicular line to the osteochondral junction was traced to determine the second abaxial border of the ROIs.

Key: ROI = region of interest.

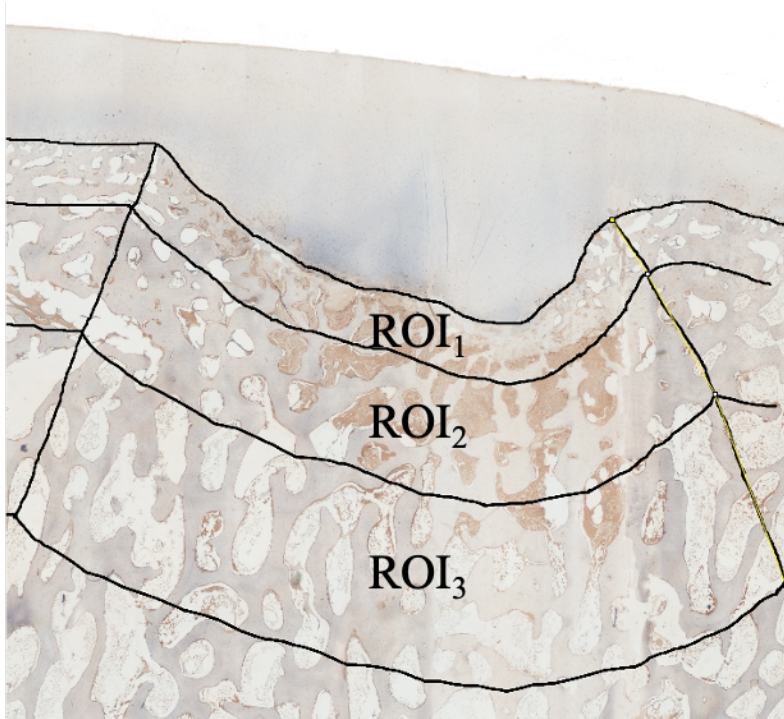


Figure S3. Methodology to delineate the ROIs in the subchondral bone for osteoclast counts in lesion specimens. The same methods were employed similarly as outlined in Fig. S2. The osteochondral junction was first traced manually. This line was then employed to identify 1, 3 and 6mm depths into the subchondral bone, parallel to osteochondral junction. The junction between the healthy osteochondral junction and the lesion was connected at every depth in the subchondral bone to create the abaxial borders of the ROIs. The length used to count osteoclasts in lesion specimens was determined by the lesion length.

Key: ROI = region of interest.

Item S1. Cathepsin K immunostaining protocol description

The permeability of the cartilage matrix of the paraffin sections was enhanced by treating with 1% hyaluronidase (type 1-S from bovine testes; Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) in PBS for 30 minutes at 37°C to remove glycosaminoglycans. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation of the sections with freshly prepared 3% v/v H₂O₂ in absolute methanol for 5 minutes followed by washing in PBS 3 × 2.5 minutes. Unreactive aldehyde groups were blocked with 20% normal goat serum in PBS, 1% w/v BSA for 30 minutes. The sections were then incubated 1 h with rabbit antiserum raised to Cathepsin K (a kind gift from Dr John Mort, Shriners Hospital for Children, Montréal, Québec) diluted 1:250 in PBS and 1% w/v BSA. The secondary antibody consisted of a biotinylated goat anti-rabbit (1.4 mg/ml diluted 1:100 in PBS 1% w/v BSA; Thermo scientific, Illinois, USA). After 1 h incubation with the secondary antibody, the sections were washed 3 × 2.5 minutes in PBS and further incubated for 60 minutes with the avidin-biotin complex labelled with peroxidase (Vector Laboratories, California, USA). The peroxidase reaction was terminated by an 8 minute incubation with a chromogenic substrate, 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories, California, USA). After washing, the tissue sections were counterstained with Harris Hematoxylin (Fisher Scientific Company, Kalamazoo, USA) for 2 minutes, differentiated in 1% acid alcohol for 4 seconds, washed in running tap water for 1 minute, bluing in saturated lithium carbonate solution for 20 seconds, washed again in running tap water for 5 minutes and mounted with VectaMount mounting medium (Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada).

Table S1. Osteoclast density (osteoclast count/bone area; mm²)

| | Osteoclast count | | | | Bone area (mm ²) | | | Osteoclast density | | |
|-----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|
| | Horse | ROI ₁ | ROI ₂ | ROI ₃ | ROI ₁ | ROI ₂ | ROI ₃ | ROI ₁ | ROI ₂ | ROI ₃ |
| Lesion | 1 | 84 | 48 | 38 | 2.82 | 4.93 | 6.6 | 29.79 | 9.74 | 5.76 |
| | 2 | 146 | 81 | 16 | 1.93 | 5.73 | 9.89 | 75.65 | 14.14 | 1.62 |
| | 3 | 54 | 10 | 11 | 2.79 | 6.04 | 10.41 | 19.35 | 1.66 | 1.06 |
| | 4 | 19 | 40 | 37 | 6.79 | 7.55 | 19.24 | 2.8 | 5.3 | 1.92 |
| | 5 | 148 | 90 | 21 | 5.33 | 11.84 | 17.58 | 27.77 | 7.6 | 1.19 |
| | 6 | 381 | 124 | 20 | 6.64 | 12.64 | 16.15 | 57.38 | 9.81 | 1.24 |
| Internal control | 1 | 216 | 201 | 113 | 3.68 | 6.59 | 7.43 | 58.7 | 30.5 | 15.21 |
| | 2 | 50 | 40 | 18 | 4.28 | 8.93 | 9.61 | 11.68 | 4.48 | 1.87 |
| | 3 | 61 | 31 | 8 | 4.34 | 8.65 | 13.4 | 14.06 | 3.58 | 0.6 |
| | 4 | 28 | 35 | 32 | 4.12 | 7.72 | 10.6 | 6.8 | 4.53 | 3.02 |
| | 5 | 17 | 9 | 21 | 5.6 | 8.5 | 10.24 | 3.04 | 1.06 | 2.05 |
| | 6 | 200 | 73 | 31 | 6.52 | 8.94 | 10.91 | 30.67 | 8.17 | 2.84 |
| Contralateral control | 1 | 133 | 61 | 64 | 3.97 | 6.03 | 7.97 | 33.5 | 10.12 | 8.03 |
| | 2 | 57 | 56 | 31 | 3.38 | 6.81 | 9.19 | 16.86 | 8.22 | 3.37 |
| | 3 | 59 | 33 | 24 | 5.45 | 9.41 | 9.47 | 10.83 | 3.51 | 2.53 |
| | 4 | 52 | 73 | 55 | 3.62 | 7.21 | 9.73 | 14.36 | 10.12 | 5.65 |
| | 5 | 28 | 1 | 0 | 3.57 | 6.9 | 7.78 | 7.84 | 0.14 | 0 |

References

- [1] Anne-Archard, N., Martel, G., Fogarty, U., Richard, H., Beauchamp, G., Laverty, S., 2019. Differences in third metacarpal trabecular microarchitecture between the parasagittal groove and condyle at birth and in adult racehorses. *Equine Vet J* 51, 115-122.
- [2] Bahney, C.S., Zondervan, R.L., Allison, P., Theologis, A., Ashley, J.W., Ahn, J., Mclau, T., Marcucio, R.S., Hankenson, K.D., 2019. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res* 37, 35-50.
- [3] Bertuglia, A., Lacourt, M., Girard, C., Beauchamp, G., Richard, H., Laverty, S., 2016. Osteoclasts are recruited to the subchondral bone in naturally occurring post-traumatic equine carpal osteoarthritis and may contribute to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 555-566.
- [4] Boyde, A., Firth, E.C., 2005. Musculoskeletal responses of 2-year-old Thoroughbred horses to early training. 8. Quantitative back-scattered electron scanning electron microscopy and confocal fluorescence microscopy of the epiphysis of the third metacarpal bone. *N Z Vet J* 53, 123-132.
- [5] Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- [6] Brown, D.L., 2017. Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. *J Toxicol Pathol* 30, 183-191.
- [7] Butler, J.A., Colles, C.M., Dyson, S.J., Kold, S.E., Poulos, P.W., 2016. *Clinical radiology of the horse*, Fourth edition. ed. John Wiley & Sons Inc., Chichester, West Sussex, UK ; Ames, Iowa.
- [8] Carlson, C.S., Meuten, D.J., Richardson, D.C., 1991. Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res* 9, 317-329.
- [9] Gilday, R., Richard, H., Beauchamp, G., Fogarty, U., Laverty, S., 2020. Abundant osteoclasts in the subchondral bone of the juvenile Thoroughbred metacarpus suggest an important role in joint maturation. *Equine Vet J*.
- [10] Huiskes, R., Ruimerman, R., van Lenthe, G.H., Janssen, J.D., 2000. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 405, 704-706.

- [11] Jackson, M., Vizard, A., Anderson, G., Clarke, A., Mattoon, J., Lavelle, R., Lester, N., Smithenson, T., Whitton, C., 2009. A prospective study of presale radiographs of Thoroughbred yearlings.
- [12] Knowles, H.J., Moskovsky, L., Thompson, M.S., Grunhen, J., Cheng, X., Kashima, T.G., Athanasou, N.A., 2012. Chondroclasts are mature osteoclasts which are capable of cartilage matrix resorption. *Virchows Arch* 461, 205-210.
- [13] Kold, S.E., Hickman, J., Melsen, F., 1986. An experimental study of the healing process of equine chondral and osteochondral defects. *Equine Vet J* 18, 18-24.
- [14] Lees, R.L., Heersche, J.N., 1999. Macrophage colony stimulating factor increases bone resorption in dispersed osteoclast cultures by increasing osteoclast size. *J Bone Miner Res* 14, 937-945.
- [15] Lemirre, T., Santschi, E., Girard, C., Fogarty, U., Chapuis, L., Richard, H., Laverty, S., 2019. Maturation of the medial femoral condyle epiphyseal growth plate and osteochondral junction. *Osteoarthritis and Cartilage* 27, S165.
- [16] Lemirre, T., Santschi, E., Girard, C., Fogarty, U., Janes, L.J., Richard, H., Laverty, S., 2021. Subchondral radiolucencies of the medial femoral condyle of juvenile horses may arise from focal trauma to the osteochondral junction. Manuscript submitted for publication.
- [17] Odgren, P.R., Witwicka, H., Reyes-Gutierrez, P., 2016. The cast of clasts: catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septoclasts. *Connect Tissue Res* 57, 161-174.
- [18] Olstad, K., Ostevik, L., Carlson, C.S., Ekman, S., 2015b. Osteochondrosis Can Lead to Formation of Pseudocysts and True Cysts in the Subchondral Bone of Horses. *Vet Pathol* 52, 862-872.
- [19] Ortved, K.F., Nixon, A.J., Mohammed, H.O., Fortier, L.A., 2012. Treatment of subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle of mature horses with growth factor enhanced chondrocyte grafts: a retrospective study of 49 cases. *Equine Vet J* 44, 606-613.
- [20] Parfitt, A.M., 1994. Osteonal and Hemi-Osteonal Remodeling - the Spatial and Temporal Framework for Signal Traffic in Adult Human Bone. *J Cell Biochem* 55, 273-286.

- [21] Perez-Nogues, M., Derham, A., Marmion, J., True Baker, W., 2020. Progression of shallow medial femoral condyle radiographic lucencies in Thoroughbred repository radiographs and their influence on future racing careers. *Equine Vet J*.
- [22] Piper, K., Boyde, A., Jones, S.J., 1992. The Relationship between the Number of Nuclei of an Osteoclast and Its Resorptive Capability *In vitro*. *Anat Embryol* 186, 291-299.
- [23] Ray, C.S., Baxter, G.M., Mc, I.C., Trotter, G.W., Powers, B.E., Park, R.D., Steyn, P.F., 1996. Development of subchondral cystic lesions after articular cartilage and subchondral bone damage in young horses. *Equine Vet J* 28, 225-232.
- [24] Rejno, S., Stromberg, B., 1978. Osteochondrosis in the Horse .2. Pathology. *Acta Radiol Diagn*, 153-178.
- [25] Santschi, E.M., Prichard, M.A., Whitman, J.L., Batten, C.A., Strathman, T.A., Canada, N.C., Morehead, J.P., 2019. Stifle radiography in Thoroughbreds from 6 to 18 months of age. *Equine Veterinary Education* n/a.
- [26] Santschi, E.M., Williams, J.M., Morgan, J.W., Johnson, C.R., Bertone, A.L., Juzwiak, J.S., 2015. Preliminary investigation of the treatment of equine medial femoral condylar subchondral cystic lesions with a transcondylar screw. *Vet Surg* 44, 281-288.
- [27] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682.
- [28] Scott, N., Hance, S., Todhunter, P., Adams, P., Adkins, A., 2005. Incidence of radiographic changes in Thoroughbred yearlings. 755 cases. *Advances in equine nutrition III* 347.
- [29] Stewart, B., Reid, C.F., 1982. Osseous cyst-like lesions of the medial femoral condyle in the horse. *J Am Vet Med Assoc* 180, 254-257.
- [30] Textor, J.A., Nixon, A.J., Lumsden, J., Ducharme, N.G., 2001. Subchondral cystic lesions of the proximal extremity of the tibia in horses: 12 cases (1983-2000). *J Am Vet Med Assoc* 218, 408-413.
- [31] von Rechenberg, B., Guenther, H., McIlwraith, C.W., Leutenegger, C., Frisbie, D.D., Akens, M.K., Auer, J.A., 2000. Fibrous tissue of subchondral cystic lesions

- in horses produce local mediators and neutral metalloproteinases and cause bone resorption in vitro. *Vet Surg* 29, 420-429.
- [32] von Rechenberg, B., Leutenegger, C., Zlinsky, K., McIlwraith, C.W., Akens, M.K., Auer, J.A., 2001. Upregulation of mRNA of interleukin-1 and -6 in subchondral cystic lesions of four horses. *Equine Vet J* 33, 143-149.
- [33] Whitman, J.L., Morehead, J.P., Prichard, M.A., Hance, S.J., Keuler, N.S., Santschi, E.M., 2006. Radiographic lucencies in the medial femoral condyle of Thoroughbred sale yearlings: a preliminary investigation of the effect on race records, In: *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*, pp. 416-419.
- [34] Zachary, J.F., 2017. *Pathologic basis of veterinary disease*, Sixth edition. ed. Elsevier, St. Louis, Missouri.

Chapitre 4 : Discussion

Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur le développement épiphysaire du CFM. Premièrement, comme rapporté dans le développement du métacarpe principal chez les jeunes chevaux, les ostéoclastes sont présents en plus grand nombre dans la portion superficielle de l'os sous-chondral du CFM comparativement aux portions plus profondes. Deuxièmement, plus du tiers des ostéoclastes présents à la jonction ostéochondrale, les chondroclastes, sont en contact direct avec le cartilage de croissance du AECC. Nous avons émis comme hypothèse que le nombre d'ostéoclastes serait augmenté dans l'os sous-chondral en périphérie des KSC, mais avons réfuté notre hypothèse puisqu'il n'y a aucune différence significative entre les spécimens lésionnels et les contrôles étudiés.

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées qui se différencient des précurseurs de la moelle osseuse, adhèrent à la surface osseuse et créent un espace scellé entre l'os et l'ostéoclaste dans lequel une variété de molécules sont sécrétées pour résorber la matrice osseuse (Zachary, 2017). L'ion H^+ est sécrété dans cet espace et crée un environnement acide qui dissout le minéral présent dans l'os alors que l'enzyme Cathepsine K est sécrétée pour digérer la matrice osseuse déminéralisée, composée majoritairement de collagène de type I (Zachary, 2017). Les ostéoclastes ont un rôle important dans la physiologie du développement osseux et dans la pathophysiologie osseuse. Dans le développement épiphysaire, ils ont un double rôle : le remodelage osseux trabéculaire sous-chondral et la croissance épiphysaire de la jonction cartilage/os dans les articulations juvéniles. Chez les jeunes chevaux, les ostéoclastes effectuent le remodelage des trabécules de l'os sous-chondral en collaboration avec la formation osseuse ostéoblastique afin d'aligner les os en croissance avec les forces principales agissant sur ces os et augmenter leur résistance (Boyde and Firth, 2005; Huiskes et al., 2000). Les ostéoclastes situés dans la portion superficielle de l'os sous-chondral ont aussi un rôle important dans une étape critique de l'ossification endochondrale et la croissance osseuse (Gilday et al., 2020). Les chondrocytes du cartilage de croissance prolifèrent et s'hypertrophient à cet endroit (Lemirre et al., 2019) et produisent une matrice de cartilage calcifié qui est subséquemment résorbée par les ostéoclastes afin de permettre l'envahissement de vaisseaux sanguins et l'ostéogenèse (Zachary, 2017). Les ostéoclastes en contact avec le cartilage de croissance, aussi appelés chondroclastes, résorbent le cartilage minéralisé. Il n'existe actuellement

aucun marqueur spécifique pour distinguer un ostéoclaste d'un chondroclaste (Odgren et al., 2016). Nous avons récemment rapporté une augmentation de la densité ostéoclastique dans la plaque osseuse corticale sous-chondrale dans le métacarpe juvénile équin (Gilday et al., 2020), mais n'avons pas investigué le nombre de cellules ayant un potentiel de résorption cartilagineuse dans cette étude. Nous démontrons désormais et quantifions ce rôle important de digestion du cartilage dans l'os sous-chondral du condyle fémoral équin en maturation dans notre étude pour la première fois.

Les conclusions de l'étude démontrent qu'environ le tiers des ostéoclastes représentent des chondroclastes. Ils ont un rôle actif dans l'ossification endochondrale du AECC de l'aspect distal du fémur équin chez des poulains d'au plus 8 mois en digérant le cartilage de croissance et en faisant place à l'ostéogenèse. Il est possible qu'un ratio diminué de chondroclastes à la jonction ostéochondrale dans l'épiphyse en développement pourrait potentiellement expliquer une interruption de l'ossification endochondrale. Lorsque cette situation prévaudrait, le cartilage minéralisé ne serait donc pas résorbé, entravant subséquemment les étapes normales du développement épiphysaire telles que décrites précédemment, favorisant un épaississement du cartilage et potentiellement une chondronécrose localisée. Cette explication demeure une hypothèse qui requière des études supplémentaires pour être confirmée ou réfutée. Néanmoins, nous croyons que le tissu fibreux présent au centre des lésions à la jonction ostéochondrale, tel que décrit à l'histologie, pourrait inhiber le contact entre les chondroclastes et le cartilage de croissance, contribuant au faible ratio de chondroclastes observé dans les spécimens lésionnels.

Les ostéoclastes humains, identifiés par immunohistochimie, ont été reconnus comme résorbant le cartilage articulaire chez des patients atteints d'ostéoarthrose, d'arthrite rhumatoïde et d'arthrite septique (Knowles et al., 2012). Parallèlement, une augmentation de la densité ostéoclastique a aussi été démontrée chez des chevaux atteints d'ostéoarthrose (Bertuglia et al., 2016), mais la résorption cartilagineuse n'était pas évaluée dans cette étude. Compte tenu des résultats démontrés par Knowles et al. (2012), il aurait été intéressant de quantifier les chondroclastes dans l'étude sur l'ostéoarthrose du carpe équin.

À l'inverse de nos résultats, le tissu fibreux prélevé chirurgicalement au centre de KSC chez des chevaux adultes avait la capacité de recruter et d'activer des ostéoclastes *in*

vitro (von Rechenberg et al., 2000; von Rechenberg et al., 2001). Notre étude ne révèle aucune évidence appuyant une augmentation d'activité ostéoclastique dans l'os situé en périphérie des KSC. Nos données ne démontrent aucune différence entre la densité ostéoclastique et la proportion de chondroclastes entre les lésions et les contrôles in situ dans la périphérie osseuse des KSC du CFM. La contradiction entre nos résultats et ce qui a été proposé comme pathophysiologie de ces lésions (von Rechenberg et al., 2000; von Rechenberg et al., 2001) soulève un éventail d'explications possibles. L'âge des chevaux, le site étudié, l'échantillon de tissu et les conditions dans lesquelles les tissus ont été étudiés étaient hautement différents. Von Rechenberg et al. ont étudié le tissu fibreux prélevé dans le centre de lésions kystiques sous-chondrales matures (n=3) *in vitro* et une seule lésion provenait du CFM. Dans la présente étude, les lésions précoces étaient ciblées chez de très jeunes animaux dans le but d'identifier des pistes pour élucider les mécanismes pathophysiologiques des KSC. Tous les échantillons étaient prélevés d'un site prédéterminé et le comptage d'ostéoclastes effectué dans le tissu osseux d'échantillons in situ et *ex vivo*.

Une différence significative de densité ostéoclastique entre les spécimens lésionnels et les contrôles n'a pas été détectée dans notre étude. Ce résultat négatif peut être expliqué par plusieurs possibilités. La densité ostéoclastique de spécimens juvéniles sains est augmentée par rapport aux données rapportées chez les adultes dans la plaque osseuse corticale sous-chondrale, de <1 ostéoclaste/mm dans le carpe adulte sain (Bertuglia et al., 2016) comparativement à 12-24 ostéoclastes/mm dans l'aspect distal du métacarpe juvénile (Gilday et al., 2020) et 10-20 ostéoclastes/mm dans notre étude dans les CFM juvéniles sains, ce qui représente environ 10-25 fois plus que chez les adultes. L'importante augmentation de la densité de ces cellules puissantes dans les spécimens juvéniles sains pourrait avoir masqué des différences mineures associées aux KSC.

C'est aussi possible qu'outre l'absence de différence entre la densité ostéoclastique des lésions et des contrôles, il y ait peut-être une augmentation de l'activité ostéoclastique au pourtour des lésions. Les ostéoclastes plus larges, avec un nombre plus élevé de noyaux, ont une activité de résorption osseuse supérieure aux ostéoclastes plus petits *in vitro* (Lees and Heersche, 1999; Piper et al., 1992). Cependant, des variations phénotypiques dans les ostéoclastes des spécimens lésionnels n'étaient pas identifiées au cours de l'étude. C'est

un défi d'étudier adéquatement les phénotypes ostéoclastiques par histomorphométrie en deux dimensions en se basant uniquement sur la forme in situ puisque ce sont des cellules larges et complexes avec une variété de formes possibles. Des techniques histomorphométriques en trois dimensions comme des méthodes stéréologiques plus complexes seraient nécessaires pour obtenir des informations adéquates et précises (Brown, 2017). Nous avons précédemment identifié des différences morphologiques ostéoclastiques subjectives entre la plaque osseuse corticale sous-chondrale, où les ostéoclastes étaient plus larges, et l'os trabéculaire sous-chondral (Gilday et al., 2020). Nous croyons qu'il pourrait y avoir une variation phénotypique des ostéoclastes dans l'os en périphérie des KSC comparativement aux spécimens contrôles, mais ceci n'a pas été étudié dans notre étude et serait difficile à atteindre in situ. Une étude sur les kystes sous-chondraux associés à l'ostéoarthrose chez l'humain rapporte que les macrophages isolés au pourtour du kyste ont la capacité de se différencier en ostéoclastes (Sabokbar et al., 2000). Ceci n'a pas été étudié chez les chevaux, mais les ostéoclastes différenciés de macrophages pourraient peut-être générer des ostéoclastes plus actifs.

Un facteur additionnel devant être pris en considération dans l'interprétation des résultats présentés ci-dessous est la courte demi-vie de 14 jours des ostéoclastes dans les tissus (Parfitt, 1994). Puisqu'un seul point dans le temps était investigué, des événements significatifs précédents ou ultérieurs au moment étudié, pouvant contribuer à la progression de KSC, auraient pu être manqués. Le comportement bien connu des ostéoclastes dans l'étude de la guérison de fractures expérimentales peut nous informer sur l'interprétation de nos résultats. Suite à une fracture, les ostéoclastes sont recrutés en deux phases : à la phase inflammatoire pour résorber les fragments osseux nécrotiques et à la fin de la guérison de fracture pour remodeler le cal osseux nouvellement formé (révisé par Bahney et al., 2019). Nous croyons que la dynamique ostéoclastique peut varier avec la progression des KSC et, dû à leur courte demi-vie, il pourrait être difficile de saisir cette variation. Les spécimens étaient analysés à une période fixe dans le temps et le moment où les lésions se sont développées initialement ainsi que leurs dynamiques étaient inconnus.

Compte tenu de nos résultats, il est possible que la progression des KSC ne soit pas causée par une augmentation de l'activité ostéoclastique, mais plutôt par une instabilité biomécanique qui préviendrait la guérison osseuse, similairement à ce qui est observé dans

les fractures de non-union alors que le mouvement présent au site de la fracture inhibe la transformation du tissu fibreux en tissu osseux (Stewart, 2019). Cette explication est en accord avec l'hypothèse selon laquelle la mise en place d'une vis transcondylienne dans les KSC stabilise le condyle atteint, minimisant les forces au site de la lésion et favorisant la guérison osseuse (Frazer et al., 2019b).

Dans un même ordre d'idées, le tissu fibreux présent au centre d'un KSC a précédemment été décrit comme du tissu de granulation (Olstad et al., 2015b). Bien qu'il ait été observé dans notre étude, nous n'avons pas tenté d'identifier si ce tissu fibreux représentait du tissu de granulation. Comme les chevaux ont une grande tendance à développer du tissu de granulation exubérant dans leurs plaies et que celui-ci nuit parfois significativement à la guérison de cette plaie (Provost, 2019), il est intéressant de penser que le tissu fibreux qui se développe initialement dans les lésions pourrait agir comme du tissu de granulation exubérant empêchant la guérison de cette lésion. Cette hypothèse pourrait potentiellement expliquer la progression des KSC, en déséquilibrant le remodelage osseux, ayant une résorption osseuse physiologique, mais empêchant la guérison osseuse par déposition de matrice osseuse. Cette hypothèse n'explique cependant pas la pathophysiologie du développement de ces lésions.

À ce jour, les facteurs qui initient et modifient la trajectoire des KSC, et les dynamiques de ces lésions sont inconnus. Or, la littérature offre de nouvelles pistes à explorer dans ce domaine. Il est maintenant connu que plusieurs KSC axiaux précoces du CFM peuvent guérir (6 et 67%) chez les chevaux de course âgés de 6-18 mois (Perez-Nogues et al., 2020; Santschi et al., 2019). Le statut des lésions de notre étude était inconnu, c'est-à-dire, qu'il n'était pas possible de déterminer si elles étaient en voie de guérison ou de développement. Nous croyons que les lésions en voie de guérison avaient une densité ostéoclastique inférieure aux lésions en progression, pouvant ajouter un facteur additionnel de confusion dans le groupe lésionnel. Nous ne pouvons par contre confirmer cette hypothèse sans recherches plus approfondies. Malgré qu'aucune différence significative n'ait été détectée entre les KSC et les contrôles, la densité ostéoclastique démontre clairement une variabilité entre les lésions comparativement aux contrôles dans l'os immédiatement sous le cartilage où la densité ostéoclastique est supérieure dans les lésions.

Cette variabilité pourrait être une réflexion de la trajectoire lésionnelle, mais cela requiert plus d'études.

Le coefficient de corrélation intraclasse est un index de fiabilité de l'évaluateur reflétant le degré de corrélation et d'accord entre des mesures. Dans notre étude, une fiabilité qualifiée de modérée à excellente est rapportée, ce qui indique un bon accord du comptage d'ostéoclastes entre les évaluateurs, particulièrement dans la portion plus superficielle de l'os sous-chondral. De plus, une intrigante diminution du coefficient de corrélation intraclasse interévaluateurs et intraévaluateur était observée dans le comptage ostéoclastique de la portion plus superficielle vers la portion plus profonde de l'os sous-chondral étudié. Nous soutenons que le faible nombre d'ostéoclastes présents et la morphologie cellulaire différente dans cette région de l'os sous-chondral diminuent le coefficient de corrélation intraclasse en comparaison à la portion superficielle de l'os sous-chondral où les ostéoclastes sont plus larges et plus nombreux et donc plus facilement identifiables (Gilday et al., 2020).

Une analyse d'efficacité statistique a été effectuée après la récolte de nos résultats préliminaires. Ce test a pour but de connaître la taille de l'échantillon requise pour détecter la différence significative désirée, ici l'augmentation de la densité ostéoclastique dans les lésions comparativement aux contrôles. Ce nombre s'élevait à plus de 150 spécimens ce qui indique une possible puissance statistique insuffisante dans notre étude. Afin d'étudier la pathophysiologie du développement des KSC par histologie, les spécimens doivent nécessairement provenir d'un animal âgé de moins de 1 an et décédé. Malheureusement, éthiquement, cela aurait été difficile d'inclure au début de l'étude 150 poulains, où l'euthanasie doit être exécutée afin de prélever des pièces anatomiques en post mortem.

Cette étude possède quelques limitations. La taille de l'échantillon était limitée. De plus, il y a des variations fondamentales dans les KSC causés spontanément et cela inclut leur étendue, leur durée et leur statut en guérison ou en progression.

Conclusion

En conclusion, les ostéoclastes sont des acteurs importants dans le développement épiphysaire normal du CFM. Particulièrement dans l'os sous-chondral superficiel, approximativement un tiers des ostéoclastes digèrent le cartilage de croissance pour permettre l'invasion de vaisseaux sanguins et l'ostéogenèse. Cependant, nos résultats ne démontrent aucune différence dans la densité ostéoclastique ou dans la proportion de chondroclastes dans l'os du CFM entre les KSC et les sites contrôles in situ. Nos observations suggèrent que la pathophysiologie des KSC précoces ne peut pas être uniquement expliquée par une augmentation de la présence ostéoclastique dans la périphérie de l'os sous-chondral.

Bibliographie

- [1] Abu-Amer, Y., Darwech, I., Clohisy, J.C., 2007. Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 1, S6.
- [2] Amarasekara, D.S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H., Rho, J., 2018. Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw* 18, e8.
- [3] Anne-Archard, N., Martel, G., Fogarty, U., Richard, H., Beauchamp, G., Laverty, S., 2019. Differences in third metacarpal trabecular microarchitecture between the parasagittal groove and condyle at birth and in adult racehorses. *Equine Vet J* 51, 115-122.
- [4] Arens, A.M., Barr, B., Puchalski, S.M., Poppenga, R., Kulin, R.M., Anderson, J., Stover, S.M., 2011. Osteoporosis associated with pulmonary silicosis in an equine bone fragility syndrome. *Vet Pathol* 48, 593-615.
- [5] Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober, H.J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D.T., Aoki, K., Ohya, K., Imai, Y., Morishita, Y., Miyazono, K., Kato, S., Saftig, P., Takayanagi, H., 2008. Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* 319, 624-627.
- [6] Aslan, D., Andersen, M.D., Gede, L.B., de Franca, T.K., Jorgensen, S.R., Schwarz, P., Jorgensen, N.R., 2012. Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. *Scand J Clin Lab Invest* 72, 14-22.
- [7] Back, W., Schamhardt, H.C., Savelberg, H.H., van den Bogert, A.J., Bruin, G., Hartman, W., Barneveld, A., 1995. How the horse moves: 2. Significance of graphical representations of equine hind limb kinematics. *Equine Vet J* 27, 39-45.
- [8] Bahney, C.S., Zondervan, R.L., Allison, P., Theologis, A., Ashley, J.W., Ahn, J., Miclau, T., Marcucio, R.S., Hankenson, K.D., 2019. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res* 37, 35-50.
- [9] Baht, G.S., Vi, L., Alman, B.A., 2018. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep* 16, 138-145.
- [10] Barone, R., 1986. *Anatomie comparée des mammifères domestiques*, 3e éd. rev. et mise à jour. ed. Vigot, Paris.

- [11] Baxter, G.M., 2020. Adams and Stashak's lameness in horses, Seventh edition. ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
- [12] Baxter, G.M., Stashak, T.S., Adams, O.R., 2011. Adams and Stashak's Lameness in horses, 6th ed. Wiley-Blackwell,, Chichester, West Sussex.
- [13] Bertuglia, A., Lacourt, M., Girard, C., Beauchamp, G., Richard, H., Laverty, S., 2016. Osteoclasts are recruited to the subchondral bone in naturally occurring post-traumatic equine carpal osteoarthritis and may contribute to cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 555-566.
- [14] Blair, H.C., Athanasou, N.A., 2004. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* 19, 189-199.
- [15] Bodo, G., Hangody, L., Modis, L., Hurtig, M., 2004. Autologous osteochondral grafting (mosaic arthroplasty) for treatment of subchondral cystic lesions in the equine stifle and fetlock joints. *Vet Surg* 33, 588-596.
- [16] Bonewald, L.F., 2011. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26, 229-238.
- [17] Bonilla, A.G., Bertone, A.L., Brokken, M.T., Santschi, E.M., 2016. Concurrent or sequential tibial subchondral cystic lesions in 4 horses with medial femoral condyle subchondral cystic lesions. *J Am Vet Med Assoc* 249, 1313-1318.
- [18] Bonilla, A.G., Williams, J.M., Litsky, A.S., Santschi, E.M., 2015. Ex vivo equine medial tibial plateau contact pressure with an intact medial femoral condyle, with a medial femoral condylar defect, and after placement of a transcondylar screw through the condylar defect. *Vet Surg* 44, 289-296.
- [19] Boyde, A., Firth, E.C., 2005. Musculoskeletal responses of 2-year-old Thoroughbred horses to early training. 8. Quantitative back-scattered electron scanning electron microscopy and confocal fluorescence microscopy of the epiphysis of the third metacarpal bone. *N Z Vet J* 53, 123-132.
- [20] Boyle, W.J., Simonet, W.S., Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- [21] Brown, D.L., 2017. Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. *J Toxicol Pathol* 30, 183-191.
- [22] Butler, J.A., Colles, C.M., Dyson, S.J., Kold, S.E., Poulos, P.W., 2016. Clinical radiology of the horse, Fourth edition. ed. John Wiley & Sons Inc., Chichester, West Sussex, UK ; Ames, Iowa.

- [23] Caminoto, E.H., Alves, A.L., Amorim, R.L., Thomassian, A., Hussni, C.A., Nicoletti, J.L., 2005. Ultrastructural and immunocytochemical evaluation of the effects of extracorporeal shock wave treatment in the hind limbs of horses with experimentally induced suspensory ligament desmitis. *Am J Vet Res* 66, 892-896.
- [24] Carlson, C.S., Cullins, L.D., Meuten, D.J., 1995. Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply. *Vet Pathol* 32, 641-647.
- [25] Carlson, C.S., Meuten, D.J., Richardson, D.C., 1991. Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res* 9, 317-329.
- [26] Chen, J.H., Liu, C., You, L., Simmons, C.A., 2010. Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *J Biomech* 43, 108-118.
- [27] Clarke, B., 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3, S131-139.
- [28] Contino, E.K., Park, R.D., McIlwraith, C.W., 2012. Prevalence of radiographic changes in yearling and 2-year-old Quarter Horses intended for cutting. *Equine Vet J* 44, 185-195.
- [29] Crijns, C.P., Gielen, I.M., van Bree, H.J., Bergman, E.H., 2010. The use of CT and CT arthrography in diagnosing equine stifle injury in a Rheinlander gelding. *Equine Vet J* 42, 367-371.
- [30] Currey, J.D., 2003. How well are bones designed to resist fracture? *J Bone Miner Res* 18, 591-598.
- [31] Dai, R., Wu, Z., Chu, H.Y., Lu, J., Lyu, A., Liu, J., Zhang, G., 2020. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Front Cell Dev Biol* 8, 433.
- [32] De Lasalle, J., Alexander, K., Olive, J., Laverty, S., 2016. Comparisons among Radiography, Ultrasonography and Computed Tomography for Ex Vivo Characterization of Stifle Osteoarthritis in the Horse. *Vet Radiol Ultrasound* 57, 489-501.
- [33] Durr, H.D., Martin, H., Pellengahr, C., Schlemmer, M., Maier, M., Jansson, V., 2004. The cause of subchondral bone cysts in osteoarthritis: a finite element analysis. *Acta Orthop Scand* 75, 554-558.

- [34] El-Jawhari, J.J., Jones, E., Giannoudis, P.V., 2016. The roles of immune cells in bone healing; what we know, do not know and future perspectives. *Injury* 47, 2399-2406.
- [35] Ferris, D.J., Frisbie, D.D., Kisiday, J.D., McIlwraith, C.W., Hague, B.A., Major, M.D., Schneider, R.K., Zubrod, C.J., Kawcak, C.E., Goodrich, L.R., 2014. Clinical outcome after intra-articular administration of bone marrow derived mesenchymal stem cells in 33 horses with stifle injury. *Vet Surg* 43, 255-265.
- [36] Fithian, D.C., Kelly, M.A., Mow, V.C., 1990. Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clin Orthop Relat Res*, 19-31.
- [37] Foerner, J.J., Rick, M.C., Juzwiak, J.S., Watt, B.C., Smalley, L., Keuler, N., Santschi, E., 2006. Injection of equine subchondral bone cysts with triamcinolone: 73 horses (1999-2005), In: *Proc. Am. Ass. equine Practnrs*, pp. 412-413.
- [38] Fowlie, J., Arnoczky, S., Lavagnino, M., Maerz, T., Stick, J., 2011. Resection of Grade III cranial horn tears of the equine medial meniscus alter the contact forces on medial tibial condyle at full extension: an in-vitro cadaveric study. *Vet Surg* 40, 957-965.
- [39] Fowlie, J.G., Arnoczky, S.P., Lavagnino, M., Stick, J.A., 2012. Stifle extension results in differential tensile forces developing between abaxial and axial components of the cranial meniscotibial ligament of the equine medial meniscus: a mechanistic explanation for meniscal tear patterns. *Equine Vet J* 44, 554-558.
- [40] Frazer, L.L., Santschi, E.M., Fischer, K.J., 2017. The impact of subchondral bone cysts on local bone stresses in the medial femoral condyle of the equine stifle joint. *Med Eng Phys* 48, 158-167.
- [41] Frazer, L.L., Santschi, E.M., Fischer, K.J., 2019a. Impact of a void in the equine medial femoral condyle on bone stresses and peak contact pressures in a finite element model. *Vet Surg* 48, 237-246.
- [42] Frazer, L.L., Santschi, E.M., Fischer, K.J., 2019b. Stimulation of subchondral bone cyst healing by placement of a transcondylar screw in the equine medial femoral condyle. *Vet Surg* 48, 1194-1203.
- [43] Gilday, R., Richard, H., Beauchamp, G., Fogarty, U., Lavery, S., 2020. Abundant osteoclasts in the subchondral bone of the juvenile Thoroughbred metacarpus suggest an important role in joint maturation. *Equine Vet J*.

- [44] Ginaldi, L., De Martinis, M., 2016. Osteoimmunology and Beyond. *Curr Med Chem* 23, 3754-3774.
- [45] Goodman, S.B., Gallo, J., 2019. Periprosthetic Osteolysis: Mechanisms, Prevention and Treatment. *J Clin Med* 8.
- [46] Gray, A.W., Davies, M.E., Jeffcott, L.B., 1998. In vitro generation of equine osteoclasts from bone marrow cells using a novel culture system. *Res Vet Sci* 65, 155-160.
- [47] Gray, A.W., Davies, M.E., Jeffcott, L.B., 2000. Equine osteoclast-like cells generated in vitro demonstrate similar characteristics to directly isolated mature osteoclasts. *Res Vet Sci* 68, 161-167.
- [48] Gray, A.W., Davies, M.E., Jeffcott, L.B., 2002a. Generation and activity of equine osteoclasts in vitro: effects of the bisphosphonate pamidronate (APD). *Res Vet Sci* 72, 105-113.
- [49] Gray, A.W., Davies, M.E., Jeffcott, L.B., 2002b. Localisation and activity of cathepsins K and B in equine osteoclasts. *Res Vet Sci* 72, 95-103.
- [50] Hadjidakis, D.J., Androulakis, II, 2006. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092, 385-396.
- [51] Halley, S.E., Bey, M.J., Haladik, J.A., Lavagnino, M., Arnoczky, S.P., 2014. Three dimensional, radiostereometric analysis (RSA) of equine stifle kinematics and articular surface contact: a cadaveric study. *Equine Vet J* 46, 364-369.
- [52] Harrison, S.M., Whitton, R.C., Kawcak, C.E., Stover, S.M., Pandy, M.G., 2010. Relationship between muscle forces, joint loading and utilization of elastic strain energy in equine locomotion. *J Exp Biol* 213, 3998-4009.
- [53] Hendrix, S.M., Baxter, G.M., McIlwraith, C.W., Hendrickson, D.A., Goodrich, L.R., Frisbie, D.D., Trotter, G.W., 2010. Concurrent or sequential development of medial meniscal and subchondral cystic lesions within the medial femorotibial joint in horses (1996-2006). *Equine Vet J* 42, 5-9.
- [54] Hodson, E., Clayton, H.M., Lanovaz, J.L., 2001. The hindlimb in walking horses: 1. Kinematics and ground reaction forces. *Equine Vet J* 33, 38-43.
- [55] Hofstee, M.I., Muthukrishnan, G., Atkins, G.J., Riool, M., Thompson, K., Morgenstern, M., Stoddart, M.J., Richards, R.G., Zaat, S.A.J., Moriarty, T.F., 2020.

Current Concepts of Osteomyelitis: From Pathologic Mechanisms to Advanced Research Methods. *Am J Pathol* 190, 1151-1163.

- [56] Howard, R.D., McIlwraith, C.W., Trotter, G.W., 1995. Arthroscopic surgery for subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle in horses: 41 cases (1988-1991). *J Am Vet Med Assoc* 206, 842-850.
- [57] Huiskes, R., Ruimerman, R., van Lenthe, G.H., Janssen, J.D., 2000. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 405, 704-706.
- [58] Hussein, H., Boyaka, P., Dulin, J., Russell, D., Smanik, L., Azab, M., Bertone, A.L., 2017a. Cathepsin K Localizes to Equine Bone In Vivo and Inhibits Bone Marrow Stem and Progenitor Cells Differentiation In Vitro. *J Stem Cells Regen Med* 13, 45-53.
- [59] Hussein, H., Dulin, J., Smanik, L., Drost, W.T., Russell, D., Wellman, M., Bertone, A., 2017b. Repeated oral administration of a cathepsin K inhibitor significantly suppresses bone resorption in exercising horses with evidence of increased bone formation and maintained bone turnover. *J Vet Pharmacol Ther* 40, 327-334.
- [60] Hussein, H., Ishihara, A., Menendez, M., Bertone, A., 2014. Pharmacokinetics and bone resorption evaluation of a novel Cathepsin K inhibitor (VEL-0230) in healthy adult horses. *J Vet Pharmacol Ther* 37, 556-564.
- [61] Jackson, M.A., Fürst, A.E., 2019. Subchondral Cystic Lesions, in: Auer, J.A., Stick, J.A. (Eds), *Equine Surgery*. Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 1528-1542.
- [62] Jackson, M., Vizard, A., Anderson, G., Clarke, A., Mattoon, J., Lavelle, R., Lester, N., Smithenson, T., Whitton, C., 2009. A prospective study of presale radiographs of Thoroughbred yearlings.
- [63] Jackson, M.A., Ohlerth, S., Brink, P., Simon, O., Kummer, M., Fürst, A.E., 2018. Treatment of subchondral cystic lesions (SCLs) with parathyroid hormone peptide (PTH1-34)-enriched fibrin hydrogel in three different concentrations: A dose-blinded, randomised study. *Equine Veterinary Education* n/a.
- [64] Jackson, M.A., Ohlerth, S., Fürst, A.E., 2019. Use of an aiming device and computed tomography for assisted debridement of subchondral cystic lesions in the limbs of horses. *Vet Surg* 48, O15-O24.
- [65] Jackson, M.A., Ohlerth, S., Kummer, M., Bettschart, R., Watson, J., Manera, C.L., von Rechenberg, B., Auer, J., Fürst, A., 2012. Use of a parathyroid hormone peptide

- (PTH1-34)-enriched fibrin hydrogel for the treatment of subchondral cystic lesions in 15 horses. *Pferdeheilkunde* 28, 642-649.
- [66] Jackson, W.A., Stick, J.A., Arnoczky, S.P., Nickels, F.A., 2000. The effect of compacted cancellous bone grafting on the healing of subchondral bone defects of the medial femoral condyle in horses. *Vet Surg* 29, 8-16.
- [67] Jacquet, S., Audigie, F., Denoix, J.M., 2007. Ultrasonographic diagnosis of subchondral bone cysts in the medial femoral condyle in horses. *Equine Veterinary Education* 19, 47-50.
- [68] Jeffcott, L.B., Kold, S.E., 1982a. Clinical and radiological aspects of stifle bone cysts in the horse. *Equine Vet J* 14, 40-46.
- [69] Jeffcott, L.B., Kold, S.E., 1982b. Stifle lameness in the horse: a survey of 86 referred cases. *Equine Vet J* 14, 31-39.
- [70] Jeffcott, L.B., Kold, S.E., Melsen, F., 1983. Aspects of the pathology of stifle bone cysts in the horse. *Equine Vet J* 15, 304-311.
- [71] Kawcak, C.E., 2016. Biomechanics in Joints, in: McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., van Weeren, P.R. (Eds), *Joint Disease in the Horse*. W.B. Saunders, pp. 25-32.
- [72] Knowles, H.J., Moskovsky, L., Thompson, M.S., Grunhen, J., Cheng, X., Kashima, T.G., Athanasou, N.A., 2012. Chondroclasts are mature osteoclasts which are capable of cartilage matrix resorption. *Virchows Arch* 461, 205-210.
- [73] Kold, S.E., Hickman, J., 1984. Results of treatment of subchondral bone cysts in the medial condyle of the equine femur with an autogenous cancellous bone graft. *Equine Vet J* 16, 414-418.
- [74] Kold, S.E., Hickman, J., Melsen, F., 1986. An experimental study of the healing process of equine chondral and osteochondral defects. *Equine Vet J* 18, 18-24.
- [75] Krauss, J.L., Roper, P.M., Ballard, A., Shih, C.C., Fitzpatrick, J.A.J., Cassat, J.E., Ng, P.Y., Pavlos, N.J., Veis, D.J., 2019. *Staphylococcus aureus* Infects Osteoclasts and Replicates Intracellularly. *mBio* 10.
- [76] Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., Robbins, S.L., 2013. *Robbins basic pathology*, 9th ed. Elsevier/Saunders, Philadelphia, PA.

- [77] Lacourt, M., Gao, C., Li, A., Girard, C., Beauchamp, G., Henderson, J.E., Lavery, S., 2012. Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 572-583.
- [78] Lavery, S., Girard, C., 2013. Pathogenesis of epiphyseal osteochondrosis. *Vet J* 197, 3-12.
- [79] Lees, R.L., Heersche, J.N., 1999. Macrophage colony stimulating factor increases bone resorption in dispersed osteoclast cultures by increasing osteoclast size. *J Bone Miner Res* 14, 937-945.
- [80] Lemirre, T., Santschi, E., Girard, C., Fogarty, U., Chapuis, L., Richard, H., Lavery, S., 2019. Maturation of the medial femoral condyle epiphyseal growth plate and osteochondral junction. *Osteoarthritis and Cartilage* 27, S165.
- [81] Lemirre, T., Santschi, E., Girard, C., Fogarty, U., Janes, L.J., Richard, H., Lavery, S., 2021. Subchondral radiolucencies of the medial femoral condyle of juvenile horses may arise from focal trauma to the osteochondral junction. Manuscript submitted for publication.
- [82] Lopez, M.J., 2019. Bone Biology and Fracture Healing, in: Auer, J.A., Stick, J.A. (Eds), *Equine Surgery*. Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 1255-1269.
- [83] Mackie, E.J., Ahmed, Y.A., Tatarczuch, L., Chen, K.S., Mirams, M., 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 46-62.
- [84] Marsell, R., Einhorn, T.A., 2011. The biology of fracture healing. *Injury* 42, 551-555.
- [85] Martel-Pelletier, J., Boileau, C., Pelletier, J.P., Roughley, P.J., 2008. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22, 351-384.
- [86] Martig, S., Chen, W., Lee, P.V., Whitton, R.C., 2014. Bone fatigue and its implications for injuries in racehorses. *Equine Vet J* 46, 408-415.
- [87] Maxie, M.G., Jubb, K.V.F., 2016. *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals*, Sixth edition. ed. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- [88] McCoy, A.M., Smith, R.L., Herrera, S., Kawcak, C.E., McIlwraith, C.W., Goodrich, L.R., 2019. Long-term outcome after stifle arthroscopy in 82 Western performance horses (2003-2010). *Vet Surg* 48, 956-965.

- [89] McIlwraith, C., 1990. Subchondral cystic lesions in the horse-the indications, methods and results of surgery. *Equine Veterinary Education* 2, 75-80.
- [90] McIlwraith, C.W., 1982. Sub-Chondral Cystic Lesions (Osteochondrosis) in the Horse. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 4, S282-&.
- [91] McIlwraith, C.W., 2005. *Diagnostic and surgical arthroscopy in the horse*, 3rd ed. Elsevier Limited, Edinburgh ; New York.
- [92] McIlwraith, C.W., 2010. Management of subchondral cystic lesions of medial femoral condyle-an evolution based on research and clinical evidence. *Pferdeheilkunde* 26, 591-597.
- [93] McIlwraith, C.W., 2016. Subchondral Cystic Lesions, in: McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., van Weeren, P.R. (Eds), *Joint Disease in the Horse*. W.B. Saunders, pp. 85-90.
- [94] Moser, D.K., Schoonover, M.J., Sippel, K.M., Dieterly, A.M., Ritchey, J.W., Wall, C.R., 2017. Catastrophic complication following injection and extracorporeal shock wave therapy of a medial femoral condyle subchondral cystic lesion in a 14 year old Arabian mare. *Open Vet J* 7, 111-116.
- [95] Nixon, A.J., Fortier, L.A., Goodrich, L.R., Ducharme, N.G., 2004. Arthroscopic reattachment of osteochondritis dissecans lesions using resorbable polydioxanone pins. *Equine Vet J* 36, 376-383.
- [96] Norrdin, R.W., Stover, S.M., 2006. Subchondral bone failure in overload arthrosis: a scanning electron microscopic study in horses. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6, 251-257.
- [97] Notarnicola, A., Moretti, B., 2012. The biological effects of extracorporeal shock wave therapy (eswt) on tendon tissue. *Muscles Ligaments Tendons J* 2, 33-37.
- [98] Odgren, P.R., Witwicka, H., Reyes-Gutierrez, P., 2016. The cast of clasts: catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septoclasts. *Connect Tissue Res* 57, 161-174.
- [99] Oliver, L.J., Baird, D.K., Baird, A.N., Moore, G.E., 2008. Prevalence and distribution of radiographically evident lesions on repository films in the hock and stifle joints of yearling Thoroughbred horses in New Zealand. *N Z Vet J* 56, 202-209.

- [100] Olstad, K., Ekman, S., Carlson, C.S., 2015a. An Update on the Pathogenesis of Osteochondrosis. *Vet Pathol* 52, 785-802.
- [101] Olstad, K., Hendrickson, E.H., Carlson, C.S., Ekman, S., Dolvik, N.I., 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.
- [102] Olstad, K., Ostevik, L., Carlson, C.S., Ekman, S., 2015b. Osteochondrosis Can Lead to Formation of Pseudocysts and True Cysts in the Subchondral Bone of Horses. *Vet Pathol* 52, 862-872.
- [103] Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C.S., Dolvik, N.I., 2011. Early lesions of articular osteochondrosis in the distal femur of foals. *Vet Pathol* 48, 1165-1175.
- [104] Ono, T., Hayashi, M., Sasaki, F., Nakashima, T., 2020. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen* 40, 2.
- [105] Ortved, K.F., Nixon, A.J., Mohammed, H.O., Fortier, L.A., 2012. Treatment of subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle of mature horses with growth factor enhanced chondrocyte grafts: a retrospective study of 49 cases. *Equine Vet J* 44, 606-613.
- [106] Pajarinen, J., Lin, T.H., Nabeshima, A., Jamsen, E., Lu, L., Nathan, K., Yao, Z., Goodman, S.B., 2017. Mesenchymal stem cells in the aseptic loosening of total joint replacements. *J Biomed Mater Res A* 105, 1195-1207.
- [107] Parfitt, A.M., 1994. Osteonal and Hemi-Osteonal Remodeling - the Spatial and Temporal Framework for Signal Traffic in Adult Human Bone. *J Cell Biochem* 55, 273-286.
- [108] Perez-Nogues, M., Derham, A., Marmion, J., True Baker, W., 2020. Progression of shallow medial femoral condyle radiographic lucencies in Thoroughbred repository radiographs and their influence on future racing careers. *Equine Vet J*.
- [109] Piper, K., Boyde, A., Jones, S.J., 1992. The Relationship between the Number of Nuclei of an Osteoclast and Its Resorptive Capability *In Vitro*. *Anat Embryol* 186, 291-299.
- [110] Plevin, S., McLellan, J., 2014. How to Perform Ultrasound-Guided Injection of Corticosteroids Into Subchondral Bone Cysts of the Medial Femoral Condyle in the Standing Horse.

- [111] Provost, P. (2019). Wound Healing. *Equine Surgery*. J. A. Auer, J. A. Stick. Kümmerle JM and Prange T. St. Louis, Saunders Elsevier: 53-69.
- [112] Ray, C.S., Baxter, G.M., Mc, I.C., Trotter, G.W., Powers, B.E., Park, R.D., Steyn, P.F., 1996. Development of subchondral cystic lesions after articular cartilage and subchondral bone damage in young horses. *Equine Vet J* 28, 225-232.
- [113] Reeves, M.J., Trotter, G.W., Kainer, R.A., 1991. Anatomical and functional communications between the synovial sacs of the equine stifle joint. *Equine Vet J* 23, 215-218.
- [114] Rejno, S., Stromberg, B., 1978. Osteochondrosis in the Horse .2. Pathology. *Acta Radiol Diagn*, 153-178.
- [115] Repp, F., Kollmannsberger, P., Roschger, A., Kerschnitzki, M., Berzlanovich, A., Gruber, G.M., Roschger, P., Wagermaier, W., Weinkamer, R., 2017. Spatial heterogeneity in the canalicular density of the osteocyte network in human osteons. *Bone Rep* 6, 101-108.
- [116] Rubio-Martinez, L.M., Redding, W.R., Bladon, B., Wilderjans, H., Payne, R.J., Tessier, C., Geffroy, O., Parker, R., Bell, C., Collingwood, F.A., 2018. Fracture of the medial intercondylar eminence of the tibia in horses treated by arthroscopic fragment removal (21 horses). *Equine Vet J* 50, 60-64.
- [117] Sabokbar, A., Crawford, R., Murray, D.W., Athanasou, N.A., 2000. Macrophage-osteoclast differentiation and bone resorption in osteoarthrotic subchondral acetabular cysts. *Acta Orthop Scand* 71, 255-261.
- [118] Sandler, E., Bramlage, L., Embertson, R., Ruggles, A., Frisbie, D., 2002. Correlation of lesion size with racing performance in Thoroughbreds after arthroscopic surgical treatment of subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle: 150 cases (1989–2000), In: *Proceedings*, pp. 255-256.
- [119] Santschi, E.M., Prichard, M.A., Whitman, J.L., Batten, C.A., Strathman, T.A., Canada, N.C., Morehead, J.P., 2019. Stifle radiography in Thoroughbreds from 6 to 18 months of age. *Equine Veterinary Education* n/a.
- [120] Santschi, E.M., Prichard, M.A., Whitman, J.L., Berk, J.T., Peterson, E.S., Canada, N., Morehead, J., 2016. Formation and prevalence of radiographic abnormalities of the medial femoral condyle in Thoroughbred horses from 6 to 20 months of age, In: *Proc. Am. Assoc. Equine Practnrs.*, pp. 407-413.

- [121] Santschi, E.M., Whitman, J.L., Prichard, M.A., Lopes, M.A.F., Pigott, J.H., Brokken, M.T., Jenson, P.W., Johnson, C.R., Morrow, C., Brusie, R.W., Juzwiak, J.S., Morehead, J.P., 2020. Subchondral lucencies of the proximal tibia in 17 horses. *Vet Surg*.
- [122] Santschi, E.M., Williams, J.M., Morgan, J.W., Johnson, C.R., Bertone, A.L., Juzwiak, J.S., 2015. Preliminary investigation of the treatment of equine medial femoral condylar subchondral cystic lesions with a transcondylar screw. *Vet Surg* 44, 281-288.
- [123] Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676-682.
- [124] Schmid, T.M., Linsenmayer, T.F., 1985. Immunohistochemical localization of short chain cartilage collagen (type X) in avian tissues. *J Cell Biol* 100, 598-605.
- [125] Schneider, R.K., Jenson, P., Moore, R.M., 1997. Evaluation of cartilage lesions on the medial femoral condyle as a cause of lameness in horses: 11 cases (1988-1994). *J Am Vet Med Assoc* 210, 1649-1652.
- [126] Scott, G.S., Crawford, W.H., Colahan, P.T., 2004. Arthroscopic findings in horses with subtle radiographic evidence of osteochondral lesions of the medial femoral condyle: 15 cases (1995-2002). *J Am Vet Med Assoc* 224, 1821-1826.
- [127] Scott, N., Hance, S., Todhunter, P., Adams, P., Adkins, A., 2005. Incidence of radiographic changes in Thoroughbred yearlings. 755 cases. *Advances in equine nutrition III* 347.
- [128] Seitz, S., Priemel, M., Zustin, J., Beil, F.T., Semler, J., Minne, H., Schinke, T., Amling, M., 2009. Paget's disease of bone: histologic analysis of 754 patients. *J Bone Miner Res* 24, 62-69.
- [129] Setton, L.A., Elliott, D.M., Mow, V.C., 1999. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 2-14.
- [130] Smith, M.A., Walmsley, J.P., Phillips, T.J., Pinchbeck, G.L., Booth, T.M., Greet, T.R., Richardson, D.W., Ross, M.W., Schramme, M.C., Singer, E.R., Smith, R.K., Clegg, P.D., 2005. Effect of age at presentation on outcome following arthroscopic debridement of subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle: 85 horses (1993--2003). *Equine Vet J* 37, 175-180.

- [131] Sophia Fox, A.J., Bedi, A., Rodeo, S.A., 2009. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1, 461-468.
- [132] Sparks, H.D., Nixon, A.J., Bogenrief, D.S., 2011. Reattachment of the articular cartilage component of type 1 subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle with polydioxanone pins in 3 horses. *J Am Vet Med Assoc* 238, 636-640.
- [133] Squire, K.R.E., Fessler, J.F., Cantwell, H.D., Widmer, W.R., 1992. Enlarging Bilateral Femoral Condylar Bone-Cysts without Scintigraphic Uptake in a Yearling Foal. *Vet Radiol Ultrasound* 33, 109-113.
- [134] Stewart, B., Reid, C.F., 1982. Osseous cyst-like lesions of the medial femoral condyle in the horse. *J Am Vet Med Assoc* 180, 254-257.
- [135] Stewart, H.L., Kawcak, C.E., 2018. The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Front Vet Sci* 5, 178.
- [136] Stewart, S.K., 2019. Fracture Non-Union: A Review of Clinical Challenges and Future Research Needs. *Malays Orthop J* 13, 1-10.
- [137] Teitelbaum, S.L., 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289, 1504-1508.
- [138] Textor, J.A., Nixon, A.J., Lumsden, J., Ducharme, N.G., 2001. Subchondral cystic lesions of the proximal extremity of the tibia in horses: 12 cases (1983-2000). *J Am Vet Med Assoc* 218, 408-413.
- [139] Trotter, G.W., McIlwraith, C.W., 1981. Osteochondritis dissecans and subchondral cystic lesions and their relationship to osteochondrosis in the horse. *J Equine Vet Sci* 1, 157-162.
- [140] Vacek, J.R., Ford, T.S., Honnas, C.M., 1992. Communication between the femoropatellar and medial and lateral femorotibial joints in horses. *Am J Vet Res* 53, 1431-1434.
- [141] van Weeren, P. R. (2016). General Anatomy and Physiology of Joints. *Joint Disease in the Horse*. C. Wayne McIlwraith, David D. Frisbie, Christopher E. Kawcak, P. René van Weeren. W.B. Saunders: 1-24.
- [142] van Weeren, P. R. (2019). Osteochondrosis Dissecans. *Equine Surgery*. J. A. Auer, J. A. Stick. Kümmerle JM and Prange T. St. Louis, Saunders Elsevier: 1509-1528.

- [143] Vekens, E.V., Bergman, E.H., Vanderperren, K., Raes, E.V., Puchalski, S.M., Bree, H.J., Saunders, J.H., 2011. Computed tomographic anatomy of the equine stifle joint. *Am J Vet Res* 72, 512-521.
- [144] Verschooten, F., De Moor, A., 1982. Subchondral cystic and related lesions affecting the equine pedal bone and stifle. *Equine Vet J* 14, 47-54.
- [145] von Rechenberg, B., Guenther, H., McIlwraith, C.W., Leutenegger, C., Frisbie, D.D., Akens, M.K., Auer, J.A., 2000. Fibrous tissue of subchondral cystic lesions in horses produce local mediators and neutral metalloproteinases and cause bone resorption in vitro. *Vet Surg* 29, 420-429.
- [146] von Rechenberg, B., Leutenegger, C., Zlinsky, K., McIlwraith, C.W., Akens, M.K., Auer, J.A., 2001. Upregulation of mRNA of interleukin-1 and -6 in subchondral cystic lesions of four horses. *Equine Vet J* 33, 143-149.
- [147] von Rechenberg, B., McIlwraith, C.W., Auer, J.A., 1998. Cystic bone lesions in horses and humans: A comparative review. *Vet Comp Orthopaed* 11, 13-23.
- [148] Walker, P.S., Arno, S., Bell, C., Salvatore, G., Borukhov, I., Oh, C., 2015. Function of the medial meniscus in force transmission and stability. *J Biomech* 48, 1383-1388.
- [149] Walker, W.T., Silverberg, J.L., Kawcak, C.E., Nelson, B.B., Fortier, L.A., 2016. Morphological characteristics of subchondral bone cysts in medial femoral condyles of adult horses as determined by computed tomography. *Am J Vet Res* 77, 265-274.
- [150] Wallis, T.W., Goodrich, L.R., McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., Hendrickson, D.A., Trotter, G.W., Baxter, G.M., Kawcak, C.E., 2008. Arthroscopic injection of corticosteroids into the fibrous tissue of subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle in horses: a retrospective study of 52 cases (2001-2006). *Equine Vet J* 40, 461-467.
- [151] Walmsley, J.P., 1995. Vertical tears of the cranial horn of the meniscus and its cranial ligament in the equine femorotibial joint: 7 cases and their treatment by arthroscopic surgery. *Equine Vet J* 27, 20-25.
- [152] Walmsley, J.P., 2011. The Stifle, in: Ross M.W., Dyson, S.J. (Eds), *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. W.B. Saunders, pp. 532-549.

- [153] Waselau, M., McKnight, A., Kasparek, A., 2020. Magnetic resonance imaging of equine stifles: Technique and observations in 76 clinical cases. *Equine Veterinary Education* 32, 85-91.
- [154] White, N.A., McIlwraith, C.W., Allen, D., 1988. Curettage of subchondral bone cysts in medial femoral condyles of the horse. *Equine Vet J Suppl*, 120-124.
- [155] Whitman, J.L., Morehead, J.P., Prichard, M.A., Hance, S.J., Keuler, N.S., Santschi, E.M., 2006. Radiographic lucencies in the medial femoral condyle of Thoroughbred sale yearlings: a preliminary investigation of the effect on race records, In: *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*, pp. 416-419.
- [156] Whitton, R.C., Ayodele, B.A., Hitchens, P.L., Mackie, E.J., 2018. Subchondral bone microdamage accumulation in distal metacarpus of Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal* 50, 766-773.
- [157] Whitton, R.C., Trope, G.D., Ghasem-Zadeh, A., Anderson, G.A., Parkin, T.D.H., Mackie, E.J., Seeman, E., 2010. Third metacarpal condylar fatigue fractures in equine athletes occur within previously modelled subchondral bone. *Bone* 47, 826-831.
- [158] Williamson, A.J., Stent, A.W., Milne, M., Walmsley, E.A., 2016. Osteopetrosis in a neonatal donkey. *Aust Vet J* 94, 358-361.
- [159] Wormstrand, B., Ostevik, L., Ekman, S., Olstad, K., 2018. Septic Arthritis/Osteomyelitis May Lead to Osteochondrosis-Like Lesions in Foals. *Vet Pathol* 55, 693-702.
- [160] You, L., Temiyasathit, S., Lee, P., Kim, C.H., Tummala, P., Yao, W., Kingery, W., Malone, A.M., Kwon, R.Y., Jacobs, C.R., 2008. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 42, 172-179.
- [161] Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C.S., Teige, J., Reinholt, F.P., 2004. Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. *Bone* 35, 1294-1306.
- [162] Zachary, J.F., 2017. *Pathologic basis of veterinary disease*, Sixth edition. ed. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- [163] Zavodovskaya, R., Stover, S.M., Murphy, B.G., Katzman, S., Durbin-Johnson, B., Britton, M., Finno, C.J., 2018. Bone formation transcripts dominate the differential

gene expression profile in an equine osteoporotic condition associated with pulmonary silicosis. PLoS One 13, e0197459.

- [164] Zhang, J.M., An, J., 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 45, 27-37.
- [165] Ziskind, M., Jones, R.N., Weill, H., 1976. Silicosis. *Am Rev Respir Dis* 113, 643-665.
- [166] Zupan, J., Jeras, M., Marc, J., 2013. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med (Zagreb)* 23, 43-63.