

Université de Montréal

**Recherche de biomarqueurs d'activité ostéoclastique
pour prévenir les fractures de stress chez les chevaux
de course**

Par

Gwladys Malek

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

Juillet 2021

© Gwladys Malek, 2021

Université de Montréal

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Recherche de biomarqueurs d'activité ostéoclastique
pour prévenir les fractures de stress chez les chevaux
de course**

Présenté par

Gwladys Malek

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Mila Freire

Présidente-rapporteuse

Sheila Laverty

Directrice de recherche

Guillaume St-Jean

Membre du jury

Résumé

Chaque année, des chevaux de course décèdent de fractures complètes lors d'entraînement ou de course. A l'exercice, les charges supra-physiologiques cycliques entraînent des microfissures indiscernables par les techniques d'imagerie *in vivo* actuelles. Les ostéoclastes recrutés aux sites lésés induisent localement une lyse osseuse et une ostéopénie par résorption excessive, créant une concentration de contrainte à l'origine de fracture complète. Cependant, le rôle biologique des ostéoclastes dans les fractures de stress n'est à ce jour pas clairement identifié. Les objectifs de cette étude ont été d'établir des cultures *in vitro* d'ostéoclastes équins, corrélérer le nombre d'ostéoclastes avec l'isoforme 5b de l'enzyme phosphatase acide tartrate-résistante (TRACP-5b), corrélérer la résorption osseuse avec la TRACP-5b et le télopeptide C-terminal du collagène de type I (CTX-I) et étudier les effets de facteurs d'inflammation sur l'activité ostéoclastique.

Après aspiration de moelle osseuse sternale, les cellules souches hématopoïétiques ont été isolées, conservées dans une banque cellulaire, décongelées, différenciées en ostéoclastes, avec ou sans os équin, et stimulées par des facteurs inflammatoires (IL-1 β ou LPS). CTX-I et TRACP-5b ont été dosés par ELISA. Le nombre d'ostéoclastes colorés à la phosphatase acide tartrate-résistante et les aires de résorption osseuse colorées au bleu de toluidine ont été évalués. Dans les cultures d'ostéoclastes, la TRACP-5b augmentait ($p < 0,0001$) avec le temps et était corrélée ($r = 0,63$, $p < 0,001$) avec le nombre d'ostéoclastes. Dans les cultures d'ostéoclastes sur os, le CTX-I ($p = 0,0018$) et la TRACP-5b ($p = 0,02$) augmentaient avec le temps, étaient corrélés ensemble ($r = 0,64$, $p < 0,002$) et étaient tous deux corrélés avec la résorption osseuse (respectivement, $r = 0,85$, $p < 0,001$ et $r = 0,82$, $p < 0,001$). La stimulation inflammatoire n'a eu aucun effet significatif.

Ostéoclastes équins et résorption osseuse ont été obtenus avec succès sur os équin à partir d'aspiration de moelle osseuse sternale. Pour la première fois, CTX-I et TRACP-5b ont été mesurés dans des cultures d'ostéoclastes équins. *In vitro*, CTX-I est un biomarqueur de résorption osseuse équine et TRACP-5b un biomarqueur du nombre d'ostéoclastes et de résorption osseuse équins. Des recherches ultérieures sont nécessaires afin d'évaluer si la TRACP-5b sérique permet la détection de toute résorption osseuse excessive chez les chevaux de course.

Mots-clés : Ostéoclaste, cheval, cheval de course, fracture de stress, résorption osseuse, biomarqueur osseux, CTX-I, TRACP-5b

Abstract

Every year racehorses die from complete catastrophic fractures in training and racing. Supra-physiological cyclic loads during exercise cause bone microcracks not discernible with current imaging *in vivo*. Osteoclasts recruited to the sites of the damage induce focal bone lysis and osteopenia by excessive resorption, creating a stress riser area susceptible to complete fracture. However, the biological impact of osteoclasts in stress fractures is not entirely understood. Our objectives were to establish *in vitro* cultures of equine osteoclasts, to correlate osteoclast numbers with the tartrate-resistant acid phosphatase 5b isoform (TRACP-5b), to correlate bone resorption with the TRACP-5b and the C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I), as well as to investigate the effects of inflammatory factors on osteoclast activity.

Following equine sternal bone marrow aspirations, hematopoietic stem cells were isolated, stored in a cell bank, thawed, differentiated into osteoclasts, with or without equine bone slices, and they finally underwent inflammatory stimulation (IL-1 β or LPS). CTX-I and TRACP-5b were assayed by ELISAs. Osteoclasts stained with tartrate resistant acid phosphatase were counted and bone resorption areas stained with toluidine blue were measured. In the osteoclast cultures, the TRACP-5b increased ($p < 0.0001$) with time and correlated ($r = 0.63$, $p < 0.001$) with osteoclast number. In the osteoclast-bone cultures, both CTX-I ($p = 0.0018$) and TRACP-5b ($p = 0.02$) increased with time, correlated with each other ($r = 0.64$, $p < 0.002$) and both correlated with bone resorption ($r = 0.85$, $p < 0.001$ and $r = 0.82$, $p < 0.001$, respectively). The inflammatory stimuli had no significant effects.

Equine osteoclasts and bone resorption were successfully induced on equine bone from sternal bone marrow aspiration. For the first time CTX-I and TRACP-5b were measured in equine osteoclast cultures. *In vitro*, CTX-I is a biomarker of equine bone resorption and TRACP-5b a biomarker of equine osteoclast number and bone resorption. Further investigations are required to measure the serum TRACP-5b capacity to detect excessive skeletal resorption in racehorses.

Keywords: Osteoclast, horse, racehorse, stress fracture, bone resorption, bone biomarker, CTX-I, TRACP-5b

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Table des matières	5
Liste des tableaux	8
Liste des figures	9
Liste des sigles et des abréviations	11
Remerciements	14
INTRODUCTION	17
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTERATURE	21
1. Généralités anatomo-histologiques, physiologiques et remodelage du tissu osseux	22
1.1. Structure, fonction et organisation générale du tissu osseux	22
1.1.1. Organisation structurelle du tissu osseux	22
1.1.2. La matrice extracellulaire osseuse.....	24
1.1.3. Les cellules osseuses	25
1.1.3.1. Les cellules ostéoprogénitrices.....	25
1.1.3.2. Les ostéoblastes.....	25
1.1.3.3. Les ostéocytes	26
1.1.3.4. Les cellules bordantes	26
1.2. L'ostéoclaste, acteur central de la résorption osseuse.....	27
1.2.1. Morphologie d'un ostéoclaste	27
1.2.1.1. La bordure en brosse	28
1.2.1.2. La zone d'attachement	28
1.2.1.3. Le pôle basolatéral	28
1.2.2. Fonction des ostéoclastes	28
1.2.3. Ostéoclastogénèse	29
1.2.4. Mécanismes de régulation de l'activation des ostéoclastes	31
1.3. Le remodelage osseux, l'équilibre entre la résorption ostéoclastique et la formation ostéoblastique	33
1.3.1. De la loi de Wolff au remodelage osseux	34
1.3.2. Les trois étapes du cycle du remodelage osseux	34
1.3.3. Les ostéocytes, acteurs majeurs de la régulation du remodelage osseux	35
1.3.4. Le rôle de l'inflammation au sein du remodelage osseux	36
2. Les fractures de stress chez les chevaux de course	37
2.1. Etio-pathogénie des fractures de stress chez les chevaux de course	37

2.1.1.	Épidémiologie	37
2.1.2.	Sites anatomiques privilégiés	38
2.1.3.	Impacts médico-socio-économiques	39
2.2.	Physiopathologie d'apparition des fractures de stress chez les chevaux de course	40
2.2.1.	Remodelage de stress de l'os sous-chondral	41
2.2.1.1.	À l'exercice, épaissement de l'os sous-chondral et modelage osseux	41
2.2.1.2.	À l'exercice, apparition de microfissures fatigue matérielle de l'os et phénomène de « stress riser »	42
2.2.1.3.	À l'exercice, déséquilibre du remodelage osseux associé à une résorption ostéoclastique excessive	43
2.2.1.4.	Au repos, stimulation du remodelage osseux ainsi que de la résorption ostéoclastique excessive	45
2.2.2.	Conséquences cliniques	46
2.2.2.1.	Les fractures complètes	46
2.2.2.2.	Maladie ostéochondrale palmaire du boulet et du carpe	47
2.3.	Outils diagnostiques d'évaluation des fractures de stress	48
2.3.1.	Signes cliniques	48
2.3.2.	Radiographie	48
2.3.3.	Échographie	50
2.3.4.	Imagerie par résonance magnétique	51
2.3.5.	Tomodensitométrie	52
2.3.6.	Scintigraphie	53
2.3.7.	Tomographie par émission de positrons	54
3.	Biomarqueurs sanguins, nouvel espoir de détection précoce de lésions osseuses.....	56
3.1.	Notion de biomarqueur	56
3.2.	Les biomarqueurs sanguins de la résorption osseuse ostéoclastique	57
3.2.1.	Le CTX-I, produit issu de la dégradation du collagène osseux de type I	58
3.2.2.	Les isoenzymes TRACP-5a et TRACP-5b	58
3.3.	Les biomarqueurs sanguins du remodelage osseux dans la détection précoce des lésions osseuses sous-chondrales équinés	59
4.	Culture <i>in vitro</i> d'ostéoclastes	61
4.1.	Prélèvements d'ostéoclastes matures ou de cellules souches hématopoïétiques	61
4.1.1.	Prélèvement des ostéoclastes matures	61
4.1.2.	Prélèvement des cellules souches hématopoïétiques	62
4.1.2.1.	Prélèvement de moelle osseuse	62
4.1.2.2.	Prélèvement de sang périphérique	63
4.1.2.3.	Autres méthodes de prélèvement	63
4.2.	Isolement des cellules souches hématopoïétiques	64
4.2.1.	Les gradients de densité	64
4.2.2.	Les marqueurs de surface	64
4.2.3.	La lyse érythrocytaire	65
4.2.4.	L'adhérence au plastique	65

4.3.	Cryoconservation des cellules souches hématopoïétiques	65
4.4.	Ensemencement des cellules souches hématopoïétiques	66
4.5.	Différenciation en ostéoclastes.....	66
4.6.	Caractérisation des ostéoclastes	66
4.6.1.	Comptage des ostéoclastes	66
4.6.2.	Quantification de la résorption osseuse ostéoclastique	67
HYPOTHESES ET OBJECTIFS		69
CHAPITRE 2 ARTICLE.....		71
CHAPITRE 3 DISCUSSION GENERALE.....		100
CONCLUSION.....		110
Références bibliographiques		113

Liste des tableaux

Tableau I : Principaux facteurs ostéoclastogéniques.....	31
Tableau II : Effet de différentes cytokines sur la résorption osseuse.....	33
Tableau III : Facteurs de risque pour les fractures chez les chevaux de course.....	38
Tableau IV : Répartition des fractures fatales selon leur localisation chez les Thoroughbred de course.	39
Tableau V : Incidences rapportées de blessures fatales chez les chevaux de course entre 1987 et 2011.....	40
Tableau VI : Les différents biomarqueurs sanguins de la résorption osseuse dans la détection précoce des lésions osseuses sous-chondrales chez les chevaux à l'exercice.....	60
Tableau VII : Critères spécifiques ou associés aux ostéoclastes.....	68

Liste des figures

Figure 1 : Organisation structurale d'un os long.....	23
Figure 2 : Schéma d'une section d'os compact d'un os long mettant en évidence le système de Havers.....	24
Figure 3 : Schéma de l'organisation structurale et fonctionnelle d'un ostéoclaste.....	27
Figure 4 : Schéma de l'ostéoclastogénèse.....	30
Figure 5 : Schéma des différents mécanismes de régulation de l'ostéoclastogénèse.....	32
Figure 6 : Schéma du cycle du remodelage osseux.....	35
Figure 7 : Os sous-chondral du condyle métacarpien palmaire distal observé au micro-CT.....	42
Figure 8 : Adaptation physiologique de l'os sous-chondral aux cycles de charge successifs.	42
Figure 9 : Développement de microfractures au sein de l'os sous-chondral.	44
Figure 10 : Schéma physiopathologique du développement d'une fracture de stress chez un cheval de course.....	45
Figure 11 : Fracture de stress aboutissant à une fracture complète du condyle palmaire métacarpien distal.	46
Figure 12 : Fractures condyliques de l'os métacarpien III.	47
Figure 13 : Suivi radiographique dorso–palmaire d'une fracture condylienne métacarpienne latérale dans le plan sagittale.	49
Figure 14 : Vue radiographique latero–médiale d'un condyle métacarpien palmaire distal atteint de maladie ostéochondrale palmaire du boulet.	50
Figure 15 : Images échographiques transverses de la portion distale d'une épine scapulaire saine et de l'épine controlatérale avec une fracture de stress sur un cheval de course.	50
Figure 16 : Imagerie par résonance magnétique de l'articulation métacarpo-phalangienne gauche d'un cheval avec une fracture condylienne précoce incomplète.	51
Figure 17 : Tomodensitométrie transverse d'un os métacarpien III distal d'un cheval avec une fracture condylienne sévère.	53
Figure 18 : Scintigraphie bilatérale de membres distaux thoraciques compatible avec un remodelage de stress.....	53

Figure 19 : PET-scan d'un condyle métacarpien palmaire distal dans un plan sagittal, transverse et dorsal.	54
Figure 20 : Représentation schématique des biomarqueurs sanguins de la résorption osseuse.	57
Figure 21 : Synthèse des biomarqueurs TRACP-5b, cathepsine K, CTX-I, NTX-I et DPD selon le stade de différenciation ostéoclastique.	59
Figure 22 : Ostéoclastes mis en évidence par coloration TRAP.	67
Figure 23 : Travées de résorption osseuse mises en évidence par coloration bleu de toluidine. ...	68

Liste des sigles et des abréviations

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BAP : *bone alkaline phosphatase*, phosphatase alcaline osseuse

BMPs : *bone morphogenetic proteins*, protéines morphogénétiques osseuses

BS : *bone surface*, surface osseuse

CFU-GM : *colony forming unit – granulocyte / macrophage*, unité de formation des colonies de granulocytes et macrophages

cm : centimètres

CT-scan : *computed tomography scan*, tomodensitométrie

CTR : *calcitonin receptor*, récepteur à la calcitonine

CTX-I : *C-terminal telopeptide of type I collagen*, télopeptide C-terminal du collagène de type I

d : *day*, jour

DPD : déoxyypyridinoline

EDTA : *ethylenediaminetetraacetic acid*, acide éthylène diamine tétra-acétique

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

ES : *eroded surface*, surface érodée

Ex : exemple

FACS : *fluorescence activated cell sorting*, tri cellulaire activé par fluorescence

GMP : *granulocyte / macrophage progenitor cells*, cellules progénitrices des macrophages / granulocytes

GTPase : guanosine triphosphatase

ICTP : *cross-linked carboxyterminal telopeptide region of type I collagen*, télopeptide carboxy-terminal du collagène de type I

IL : interleukine

IRM : imagerie par résonance magnétique

j : jour

LIF : *leukemia inhibitor factor*, facteur inhibiteur de leucémie

LPS : lipopolysaccharide

m : mètre

M-CSF : *macrophage-colony stimulating factor*, facteur stimulant des colonies de macrophages

MACS : *magnetic activated cell sorting*, tri cellulaire activé par magnétisation

min : minutes

mL : millilitres

MMPs : métalloprotéases matricielles

NF- κ B : *nuclear factor kappa B*, facteur nucléaire kappa B

NFATc1 : *nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1*, facteur nucléaire des cellules T activées cytoplasmique 1

ng : nanogrammes

NTX-I : *N-terminal telopeptide of type I collagen*, télopeptide N-terminal du collagène de type I

OPG : ostéoprotégérine

PBS : *phosphate buffered saline*, tampon phosphate salin

PCR : *polymerase chain reaction*, réaction en chaîne de la polymérase

PDGF : *platelet-derived growth factor*, facteur de croissance dérivé des plaquettes

PET-scan : *positron emission tomography*, tomographie par émission de positrons

PGE₂ : prostaglandine E2

PICP : *carboxyterminal propeptide of type I procollagen*, propeptide C-terminal du procollagène de type I

POCT : *point-of-care-testing*

PTH : *parathyroid hormone*, hormone parathyroïdienne (aussi appelée parathormone)

PTrH : *parathyroid hormone-related protein*, protéine liée à l'hormone parathyroïdienne

RANK : *receptor activator of nuclear factor kappa B*, récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B

RANKL : *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*, ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B

RER : réticulum endoplasmique rugueux

SD : *standard deviation*, écart-type

sec : secondes

TGF- β : *transforming growth factor-beta*, facteur de croissance transformant-bêta

TNF : *tumor necrosis factor*, facteur de nécrose tumorale

TRACP-5a : *tartrate-resistant acid phosphatase 5a*, isoforme 5a de l'enzyme phosphatase acide tartrate-résistante

TRACP-5b : *tartrate-resistant acid phosphatase 5b*, isoforme 5b de l'enzyme phosphatase acide tartrate-résistante

TRAP : *tartrate-resistant acid phosphatase*, phosphatase acide tartrate-résistante

UFC-GM : *colony forming unit – granulocyte / macrophage*, unité de formation des colonies de granulocytes et macrophages

µm : micromètres

Remerciements

A Dre Lavery, directrice de recherche

Pour la confiance accordée dans la réalisation de ce projet. Merci de m'avoir offert cette Maîtrise, proposé cette étude et fait découvrir le monde fascinant de l'ostéoclaste. Vous avez su développer en moi une véritable passion pour la recherche et surtout pour ce sujet qui, désormais, me tient beaucoup à cœur. Désormais, je ne verrai plus jamais les cracks dans un mur de la même façon !

Merci pour votre enthousiasme quotidien, votre bonne humeur contagieuse, votre pédagogie extrême et votre positivisme à toute épreuve. Merci également pour m'avoir permis de développer ma rigueur, ma persévérance et mon esprit critique, pour m'avoir transmis votre éthique de travail, m'avoir appris à être positive même dans les moments les plus difficiles, pour constamment nous aider à nous dépasser, même au-delà de ce que nous pensons être capable d'accomplir. Vous m'avez fait prendre conscience que tout était possible, que les seules limites qui existent sont celles que l'on s'impose.

Je ne vous remercierai jamais assez pour toute l'attention que vous m'avez portée, pour votre dévouement sans limite, votre générosité débordante et votre grande disponibilité, pour tout ce que vous m'avez enseigné, mais également apporté d'un point de vue personnel. Merci pour votre Humanité, pour le modèle que vous représentez, pour les discussions et conseils de vie, pour tout simplement savoir prendre le temps de regarder le monde qui vous entoure et de savoir considérer les personnes autour de vous. Merci également de croire en moi quoiqu'il advienne et de tout faire pour m'aider à réaliser mes rêves. Vous avez fait de moi une meilleure vétérinaire, un meilleur chercheur et une meilleure personne. J'espère sincèrement avoir la chance de pouvoir poursuivre notre travail sur ce projet dont il reste encore tant de pistes à explorer et qui sait, peut-être un jour pouvoir trinquer autour d'une Guinness en Irlande. Lâche pas ton os...téoclaste !

A Hélène Richard, « maman » du laboratoire,

Pour cette initiation au domaine de la culture cellulaire (je suis partie de zéro !) et tous les « trucs et astuces » du milieu de la recherche transmis. Merci pour ta disponibilité quotidienne, ton investissement et ton dévouement sans faille dans chacun de nos projets aussi fous soient-ils. Merci pour ta bonne humeur et ton dynamisme, les conseils sur les lieux de cueillette de pommes et de cucurbitacées, merci également de toujours savoir prendre le temps d'être à l'écoute, ainsi que d'être d'un grand soutien moral dans les moments plus difficiles. Merci d'être le petit rayon de soleil du labo.

A Gulzhakhan Sadvakassova,

Pour son aide précieuse dans la compréhension de cette complexe cellule qu'est l'ostéoclaste et pour tous les conseils afin de parvenir à maîtriser ces cultures capricieuses.

A Guy Beauchamp,

Pour le temps précieux accordé à l'analyse statistique des données de ce projet, pour tous les conseils et explications.

A Dre Mathilde Leclère,

Pour avoir accepté d'être membre du comité conseil de ce programme, pour votre encadrement, pour vos conseils toujours très pertinents et pour m'avoir transmis la passion de la recherche.

A Dre Cyrielle Finck,

Pour avoir accepté d'être membre du comité conseil de ce programme, pour ta pédagogie et tous les conseils avisés et pour m'avoir fait découvrir, puis transmis la passion de la recherche.

A Dre Mila Freire, président-rapporteur,

Pour avoir accepté de présider le jury d'évaluation de ce mémoire.

A Dr Guillaume St-Jean, membre du jury,

Pour avoir accepté de participer au jury d'évaluation de ce mémoire.

A Estelle, ma patate,

Pour nos longues discussions et nos restos entre patates, pour les délires, le chou-fleur et pour toujours garder la frite. Merci pour tout ce que tu m'as enseigné, pour les nombreux conseils sur le monde de la recherche, merci de toujours avoir été à mes côtés et à l'écoute dans les pires moments, mais surtout dans les meilleurs. Potatoes for life !

Aux Moldoss, Marice ou Maurine,

Pour tout le temps passé ensemble, pour les soirées jeux même sur zoom, pour aimer autant la bouffe que nous, pour les barbeuk et les raclettes, pour les randos et l'apéro. Merci pour tout ce que l'on a pu partager, merci également pour votre grand soutien et pour vos conseils toujours pertinents. Merci d'être de parfaits tonton-tata pour Madame Kaka, excepté les ordres peu conventionnels et l'extrême quantité de Doritos ingérés.

A Mamour, à Baboune,

Pour m'avoir permis d'accomplir mon rêve de devenir vétérinaire et de toujours respecter mes choix, même s'ils se sont trouvés être à des milliers de kilomètres de vous. Merci de constamment avoir une pensée pour moi, de croire en moi, d'essayer de comprendre mes ambitions et de me soutenir quoiqu'il advienne. Merci de toujours vouloir mon Bonheur, même si malheureusement cela implique d'être loin de vous. Merci pour votre Amour sans limite.

A Benoît,

Pour ton soutien indéfectible, ta présence et tout ton Amour au quotidien. Merci d'avoir voulu vivre l'aventure de découvrir le Québec à dos de Husky tout gris. Merci pour tout ce que tu donnes sans même en avoir conscience, les sacrifices et le Bonheur que tu m'apportes. Merci de m'aider à faire les bons choix et de toujours croire en moi. Merci pour ce magnifique sapin d'un certain 19 décembre 2020. Merci d'être la belle personne que tu es, de toujours être prêt à me suivre pour pouvoir réaliser mes rêves, même à l'autre bout du monde.

INTRODUCTION

Chaque année, un nombre inacceptable de Thoroughbreds de course décèdent de fractures complètes imprévisibles aux conséquences médicales, économiques et sociales majeures pour le monde des courses. Lors du dernier rapport annuel du Jockey Club (*Equine Injury Database*TM), 6 908 blessures mortelles de Thoroughbreds de course ont été rapportées en Amérique du Nord entre 2009 et 2020, soit un taux de blessures fatales de 1,76 pour 1 000 départs.¹ Les blessures de l'appareil musculosquelettique, essentiellement composées de fractures, représentent 83 % des blessures mortelles répertoriées lors des courses ou des entraînements.² La majorité des fractures mortelles de membres distaux (environ 75 %) se produisent spontanément lors d'une course ou d'un entraînement et ont pour origine des fractures de stress préexistantes, sans aucun traumatisme externe associé.³ Le terme « *catastrophic stress fractures* » est couramment utilisé pour qualifier ce type de blessure, puisqu'un grand nombre de chevaux affecté par ces lésions sont euthanasiés pour des raisons humanitaires.²⁻¹⁸ De plus, les jockeys peuvent également être blessés lorsque la fracture se produit ; aux États-Unis, de 2007 à 2011, 51 % des chutes de jockeys ont fait l'objet d'une blessure.¹⁹ Ces chiffres dramatiques attestent de l'urgente nécessité clinique d'identifier précocement et avec précision la présence de fractures de stress chez les chevaux de course afin de pouvoir prévenir ces fractures mortelles améliorant ainsi la sécurité des chevaux, mais également des jockeys, ainsi que de restaurer la réputation du monde des courses.

Le squelette des chevaux de course est soumis à de nombreuses charges cycliques supra-physiologiques répétées à haute vitesse, que ce soit lors des courses ou lors des entraînements. En réponse à cette accumulation de charges, l'os cortical – comprenant le cortex des os longs ainsi que la plaque osseuse sous-chondrale articulaire – et l'os sous-chondral trabéculaire développent une adaptation physiologique au cours de laquelle une apposition osseuse est effectuée par les ostéoblastes, aboutissant par la suite à une sclérose de l'os sous-chondral.^{7,20-24} Ce tissu néoformé s'accumule et épaissit la surface osseuse, mais il possède néanmoins des propriétés différentes de l'os initial, à savoir une fragilité augmentée.^{7,18,25} Suite à l'accumulation des cycles de charge, des microfissures structurelles peuvent s'y développer.^{17,26-28} Les microfissures entraînent une morphologie atypique ou encore l'apoptose des ostéocytes du tissu osseux,²⁹⁻³¹ ce qui augmente localement la production du ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANKL), cytokine ostéoclastogénique permettant la différenciation de cellules souches hématopoïétiques en ostéoclastes matures lors du remodelage osseux,³²⁻³⁴ afin de favoriser la cicatrisation osseuse. De plus, les ostéoclastes en milieu *in vitro* semblent être attirés par des

surfaces irrégulières,³⁵ ce qui pourrait s'apparenter aux microfissures *in vivo* précédemment décrites. Finalement, une résorption osseuse excessive se produit localement autour de ces microfissures sous l'action des ostéoclastes différenciés.^{26,27} En outre, les ostéoclastes dégradent l'os sous-chondral plus rapidement que les ostéoblastes produisent le nouveau tissu osseux sain.^{13,14,25,36} Sous l'action de l'exercice intense répété, les microfractures s'accumulent en raison d'une cicatrisation inadaptée associée à une résorption osseuse excessive.^{17,27-29,37} Les sites d'ostéopénie de résorption sont de plus en plus reconnus comme des facteurs favorisant la concentration locale de contrainte (« *stress riser* ») responsable de l'apparition de lignes de fracture, voire de fractures complètes, même lors de charges physiologiques.^{13,14,25}

Plusieurs techniques d'imagerie avancée peuvent détecter des fractures de stress précoces, à savoir l'imagerie par résonance magnétique,^{38,39} la tomодensitométrie,^{40,41} la scintigraphie⁴² et plus récemment la tomographie par émission de positrons.⁴³ Cependant, ces outils diagnostiques sont onéreux, encombrants et rarement facilement accessibles dans le contexte actuellement nécessaire de dépistage régulier dans les centres d'entraînement. Ainsi, un test simple et économique est nécessaire pour évaluer l'appareil squelettique et son activité de résorption dans un objectif de surveillance ou de diagnostic. La mesure de biomarqueurs sanguins afin d'identifier les fractures de stress ou l'établissement d'une valeur seuil indiquant une blessure osseuse suite au surentraînement constitueraient un outil précieux de dépistage des chevaux de course à risque, permettant ainsi d'adapter l'entraînement de cet athlète et donc éviter les blessures mortelles. Cette stratégie a été explorée par le passé et plusieurs auteurs sont encore en train d'investiguer cet outil diagnostique prometteur.^{44,45}

L'ostéoclaste, acteur central de la résorption osseuse, semble jouer un rôle primordial dans l'apparition et le développement des fractures de stress, c'est pourquoi un biomarqueur spécifique de la présence et de l'activité d'ostéoclastes équins semble être le candidat idéal. De plus, la durée de vie de l'ostéoclaste étant de 16 jours,⁴⁶ la mesure d'un biomarqueur ostéoclastique devrait refléter l'activité ostéoclastique en temps réel. De récentes études sériques transcriptomiques renforcent cette hypothèse en montrant que l'une des voies homéostatiques osseuses les plus dérégulées chez les chevaux de course est celle de l'ostéoclastogénèse, notamment celle du gène *CTSK*^{47,48} responsable de la synthèse de la cathepsine K.⁴⁹ En effet, les ostéoclastes produisent des enzymes telles que la cathepsine K et les métalloprotéases matricielles⁵⁰ qui clivent le collagène de

type I de la matrice osseuse à des sites spécifiques, libérant ainsi des produits de dégradation osseuse tels que le télépeptide C-terminal du collagène de type I (*C-terminal telopeptide of type I collagen*, CTX-I).^{51,52} Ces produits de dégradation primaire sont ensuite endocytés par les ostéoclastes, puis digérés une nouvelle fois par les dérivés réactifs de l'oxygène produits par l'isoforme 5b de l'enzyme phosphatase acide tartrate-résistante (*tartrate-resistant acid phosphatase 5b*, TRACP-5b) activée par la cathepsine K.^{53,54} Finalement, CTX-I et TRACP-5b sont libérés à proximité des vaisseaux sanguins^{53,55} et peuvent être mesurés dans le sérum à l'aide d'une prise de sang.

Des kits utilisant la technique d'immunoabsorption par enzyme liée (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) ont été développés pour mesurer les biomarqueurs de résorption en espèce humaine, notamment le CTX-I – un biomarqueur de résorption osseuse^{52,56-58} – et plus récemment la TRACP-5b – un biomarqueur du nombre d'ostéoclastes^{53,59-64} et de résorption osseuse.^{61,62,65-67} Chez les chevaux, le CTX-I a été analysé sur des échantillons de sérum par plusieurs auteurs,^{45,68-75} mais seulement une étude est parvenue à démontrer une véritable association entre le CTX-I et les fractures.⁷⁰ Bien qu'une étude ait exploré la capacité de biomarqueur l'enzyme phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP),⁷⁶ l'isoforme TRACP-5b spécifique des ostéoclastes^{62,77} n'a jamais été étudiée chez le cheval.

Davantage d'investigations sur ces potentiels biomarqueurs sont nécessaires, notamment des études *in vitro* sur les ostéoclastes équins pour en premier lieu déterminer si le CTX-I et la TRACP-5b équins sont de bons biomarqueurs de la résorption osseuse ostéoclastique. Quelques rares auteurs ont réalisé des cultures *in vitro* d'ostéoclastes équins à partir de moelle osseuse fémorale,⁷⁸⁻⁸¹ et une étude a différencié des cellules souches hématopoïétiques en ostéoclastes matures à partir d'aspiration de moelle osseuse sternale à l'aide d'une technique non invasive sur cheval debout.⁸² En outre, aucune étude de culture d'ostéoclastes équins sur des sections d'os équin n'a été rapportée.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTERATURE

1. Généralités anatomo-histologiques, physiologiques et remodelage du tissu osseux

Chez le cheval, **l'organisation anatomo-histologique du tissu osseux, ainsi que son fonctionnement physiologique associé à sa réponse aux forces répétées lors de l'exercice, expliquent le développement et la progression des affections ostéo-cartilagineuses telles que les fractures de stress.** Afin de mieux comprendre leur mécanisme d'apparition, nous allons étudier l'organisation structurelle et fonctionnelle du tissu osseux, et plus particulièrement une cellule osseuse majeure impliquée dans le remodelage osseux : l'ostéoclaste.

1.1. Structure, fonction et organisation générale du tissu osseux

1.1.1. Organisation structurelle du tissu osseux

L'os, tissu conjonctif de soutien hautement spécialisé, constitue avec le cartilage le squelette du sous-embranchement des Vertébrés. Il est constitué du tissu osseux, de la moelle osseuse, d'espaces conjonctivo-vasculaires, de nerfs, du cartilage articulaire, du périoste et de l'endoste. Selon leur forme, les os sont classifiés en os longs (ex : le fémur), courts (ex : les os du carpe), plats (ex : les côtes) ou irréguliers (ex : l'ethmoïde).⁸³

Au niveau macroscopique, les os longs sont organisés en un corps cylindrique allongé, appelé diaphyse, qui se termine à ses deux extrémités en une épiphyse ; ces deux parties sont reliées entre elles par la métaphyse (Figure 1). Le cartilage articulaire recouvre l'épiphyse ; le reste de l'os est recouvert par le périoste – membrane fibreuse vascularisée – au niveau de sa surface externe et par l'endoste au niveau de sa surface interne.⁸⁴ Le tissu osseux se distingue en deux types d'organisation structurelle : l'os compact (couche dense également appelée os cortical) qui délimite les os longs et l'os trabéculaire (réseau tridimensionnel poreux également appelé os spongieux) constituant le centre de l'os.⁸³ Ainsi, directement sous le cartilage articulaire, l'épiphyse est délimitée par une fine couche d'os compact (localement appelée os sous-chondral) associée en son centre à un maillage d'os trabéculaire. La diaphyse est constituée d'os compact – très rarement d'os trabéculaire – délimitant la cavité médullaire dans laquelle se loge la moelle osseuse jaune riche en tissu adipeux et la moelle osseuse rouge responsable de l'hématopoïèse.⁸⁴ Enfin, l'os sous-chondral est une zone osseuse particulièrement soumise aux charges lors de l'exercice ; il se divise

en deux zones, de la plus superficielle à la plus profonde : la plaque osseuse sous-chondrale formée d'os cortical compact et dense, puis l'os trabéculaire sous-chondral assurant élasticité, amortissement des contraintes et résistance à la compression.⁸⁵

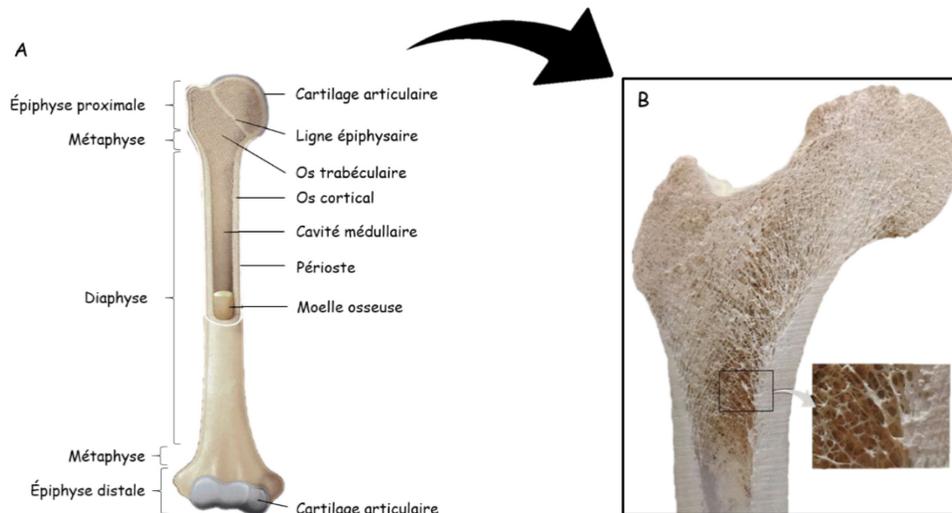


Figure 1 : Organisation structurale d'un os long.

A : Schéma de la structure anatomique typique d'un os long. B : Observation macroscopique de l'os trabéculaire et de l'os cortical d'un os long. D'après⁸³

À l'échelle microscopique, l'os compact est un tissu osseux lamellaire haversien organisé en ostéons ou systèmes de Havers (Figure 2). Ces cylindres de 100 à 250 μm de diamètre sont constitués de plusieurs lamelles ostéonales concentriques (20 à 25) séparées entre elles par des lacunes dans lesquelles se logent des ostéocytes capables de communiquer entre eux par jonctions gap à travers des petits tunnels appelés canalicules.^{83,86} L'ostéon est délimité par la ligne cémentante et renferme en son centre le canal central ou canal de Havers (environ 50 μm de diamètre) composé de fibres nerveuses non myélinisées, de vaisseaux lymphatiques et de capillaires parallèles à la cavité médullaire. Les vaisseaux des ostéons communiquent entre eux par des canaux perforants transverses aussi appelés canaux de Volkmann non recouverts de lamelles concentriques.^{84,86} Finalement, l'os compact est délimité par un système fondamental externe ou lamelles osseuses circonférentielles externes et un système fondamental interne ou lamelles circonférentielles internes bordant la cavité médullaire.⁸⁴ L'os trabéculaire quant à lui est qualifié de tissu osseux lamellaire non-haversien. Réseau lamellaire tridimensionnel organisé en spicules ou trabécules, il est également constitué d'espaces intercommunicants renfermant moelle osseuse et vaisseaux.⁸³

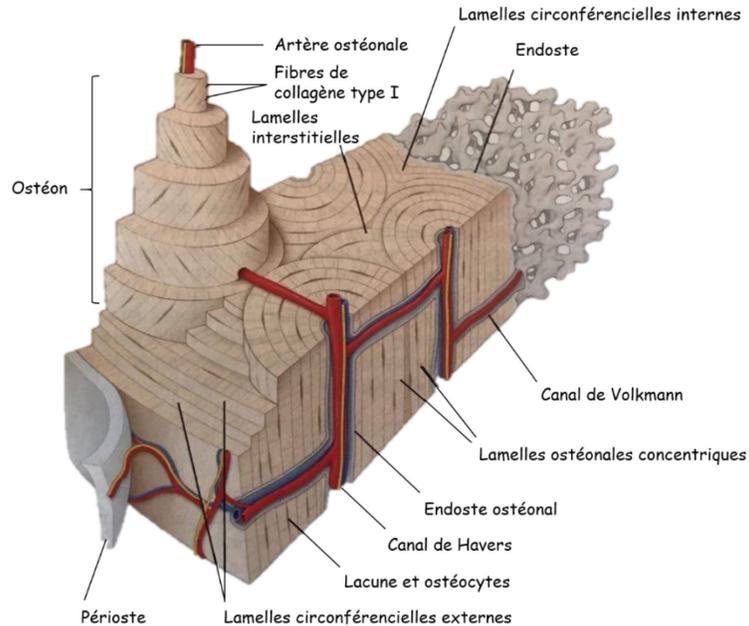


Figure 2 : Schéma d'une section d'os compact d'un os long mettant en évidence le système de Havers.

D'après⁸³

Ce tissu à la fois vascularisé et innervé – contrairement au cartilage – possède une importante activité métabolique répondant à des stimuli à la fois physiologiques et pathologiques.⁸⁵ Ses propriétés mécaniques – à savoir dureté, légèreté, résistance à la traction⁸⁷ – lui confère de nombreuses fonctions spécifiques : croissance de l'organisme, soutien mécanique pour l'insertion des muscles permettant la locomotion, protection des organes, site essentiel pour l'hématopoïèse, maintien de l'homéostasie du calcium sérique, ainsi que régulation du métabolisme du phosphore et du glucose.^{84,88}

1.1.2. La matrice extracellulaire osseuse

La matrice extracellulaire osseuse est composée d'une substance inorganique ou minérale et d'une substance organique ou ostéoïde.⁸⁴

La particularité de l'os par rapport aux autres tissus conjonctifs est la minéralisation de sa matrice. En effet, les cristaux d'hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ déposés au sein de l'ostéoïde rendent le tissu osseux extrêmement dur, lui permettent ainsi de protéger les organes internes et d'être un véritable support pour les muscles.⁸³ De plus, ces cristaux constituent un véritable réservoir de calcium et de phosphore afin de répondre aux besoins de l'organisme.⁸⁴

La substance fondamentale organique de la matrice est majoritairement constituée de collagène (90 % du poids de la matrice protéique),⁸³ une protéine hélicoïdale rigide composée de trois chaînes polypeptidiques α assemblées en une triple hélice. Les molécules de collagène s'assemblent ensuite en fibrilles, puis en fibres de collagène⁸⁹ dont l'organisation structurale confère une véritable résistance à l'os.⁸⁴ Ces fibres de collagène sont essentiellement de type I et quelques-unes sont de type V ; des traces de type III, XI et XIII sont également présentes au sein de la matrice.⁸³ D'autres protéines non-collagéniques – impliquées dans la croissance, le développement, la cicatrisation et le remodelage osseux – constituent la substance fondamentale de l'os (10 % du poids de la matrice protéique). Ces protéines se divisent en quatre groupes, soit les macromolécules protéoglycanes, les glycoprotéines multi-adhésives (ex : ostéonectine, podoplanine, protéine matricielle de dentine et ostéopontine), protéines osseuses spécifiques (ex : ostéocalcine, protéine S et protéine matricielle Gla) et les facteurs de croissance ou cytokines (ex : protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) et les interleukines IL-1, IL-6).⁸³

1.1.3. Les cellules osseuses

Associé à cette matrice extracellulaire, il existe cinq types de cellules, à savoir, les cellules ostéoprogénitrices, les ostéoblastes (> 5 %), les ostéocytes (environ 95 %), les cellules bordantes et les ostéoclastes (< 1 %).⁸³ Les ostéoclastes seront traités dans la *section 1.2*.

1.1.3.1. Les cellules ostéoprogénitrices

Les cellules ostéoprogénitrices sont des cellules au repos provenant de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses et pouvant elles-mêmes se différencier en ostéoblastes, mais également en fibroblastes, adipocytes, chondrocytes et myoblastes. Ces cellules sont de forme aplatie et ressemblent morphologiquement aux cellules bordantes. Elles se situent au niveau des surfaces interne et externe de l'os, mais également de la microvascularisation osseuse.⁸³

1.1.3.2. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules issues de la différenciation des cellules ostéoprogénitrices dont le rôle est de synthétiser les composants organiques du tissu osseux non minéralisé – appelé

ostéoïde –, puis de le minéraliser en matrice extracellulaire osseuse. En effet, les ostéoblastes produisent le collagène de type I, ainsi que les protéines non-collagéniques, et calcifient la matrice osseuse à l'aide de vésicules matricielles riches en phosphatase alcaline, en Ca^{2+} et en PO_4 . Ces vésicules sont responsables de la cristallisation de CaPO_4 , puis de la formation de cristaux d'hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$.^{33,90} Morphologiquement, les ostéoblastes sont des cellules cuboïdes ou polygonales avec un seul noyau rond nucléolé. De plus, ils sont disposés en une monocouche en surface du tissu osseux dans les zones où se produit l'apposition osseuse. Seulement 10 à 20 % des ostéoblastes deviennent des ostéocytes ; les autres seront mis au repos sous forme de cellules bordantes, ou bien, pour la plupart, entreront dans le processus de mort cellulaire par apoptose.^{33,83,90,91} Leur durée de vie est d'environ trois mois.^{46,91,92}

1.1.3.3. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des cellules issues de la différenciation des ostéoblastes⁹³ – environ 10 à 20 % d'entre eux⁹⁴ – dont le rôle est de réguler le remodelage osseux, de maintenir la matrice osseuse, de réguler les échanges ioniques et de maintenir un équilibre phospho-calcique.⁹⁵ Morphologiquement, un ostéocyte est une cellule mononucléée de forme étoilée en raison de ses nombreux prolongements cytoplasmiques (cinquante en moyenne) et de petite taille (réduction du volume cellulaire d'environ 70 % par rapport à l'ostéoblaste). Les ostéocytes sont reliés entre eux par des canalicules et sont logés dans des lacunes au sein de la matrice minéralisée.^{33,90,95} Au cours du remodelage osseux, ces cellules peuvent être sous trois formes : le stade de quiescence, le stade de synthèse et le stade de résorption (ostéolyse ostéocytaire).⁸³ Les ostéocytes ne sont pas soumis aux divisions cellulaires, mais ont une durée de vie moyenne comprise entre quelques années et quelques décennies.^{46,95} En espèce humaine, la mort cellulaire augmenterait avec l'âge, concernant ainsi 1 % d'ostéocytes à la naissance contre 75 % après quatre-vingts ans.⁸³

1.1.3.4. Les cellules bordantes

Les cellules bordantes sont issues de la différenciation d'ostéoblastes. Elles forment une couche de cellules à la surface du tissu osseux qui n'est pas en cours de remodelage. Suivant leur localisation, elles constituent l'endoste ou le périoste (respectivement, cellules situées en surface interne ou externe). Ces cellules au repos sont morphologiquement aplaties et s'apparentent à des

ostéoblastes en quiescence.^{33,83} Les cellules bordantes initient la résorption osseuse puisque, en se détachant de la surface osseuse, elles libèrent un espace permettant l'adhérence des ostéoclastes ; de même, elles limitent toute interaction inappropriée entre les ostéoclastes et la matrice osseuse.³³ Leur durée de vie s'apparente à celle des ostéocytes ;⁴⁶ elles peuvent également redevenir des ostéoblastes actifs.⁹⁶

1.2. L'ostéoclaste, acteur central de la résorption osseuse

L'ostéoclaste est une cellule osseuse particulièrement intéressante puisqu'il s'agit de la principale cellule de l'organisme capable de résorber la matrice minéralisée de l'os.

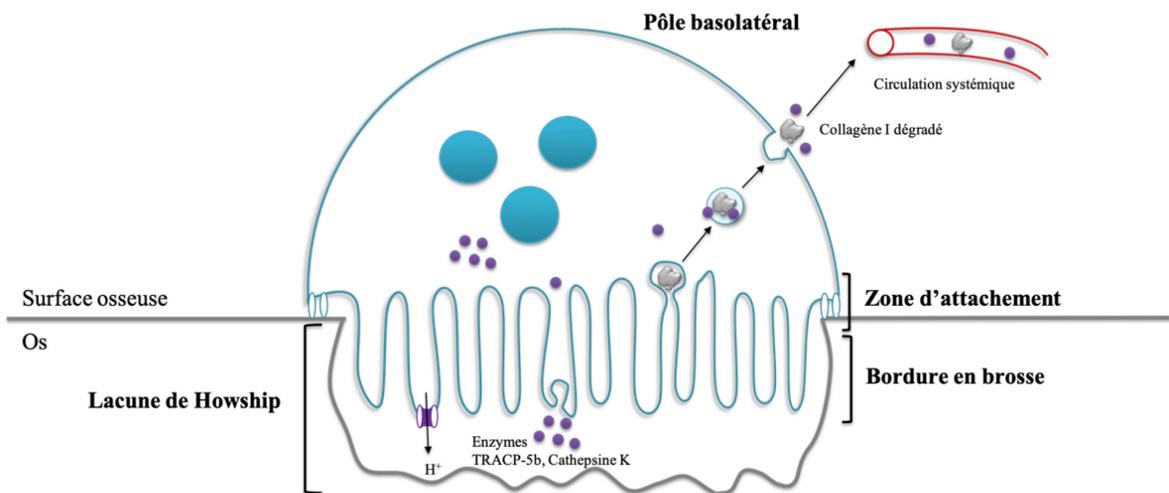


Figure 3 : Schéma de l'organisation structurelle et fonctionnelle d'un ostéoclaste.

1.2.1. Morphologie d'un ostéoclaste

L'ostéoclaste est une grande cellule (40-100 μm de diamètre) multinucléée (jusqu'à 30 noyaux par cellule) située à la surface osseuse des zones de résorption. Son cytoplasme acidophile contient de nombreuses vésicules avec des enzymes lysosomiales, des mitochondries, des ribosomes et un appareil de Golgi important.⁸⁴ L'ostéoclaste mature se divise en trois zones spécialisées, à savoir le pôle apical – aussi appelé bordure en brosse –, la zone d'attachement et le pôle basolatéral (Figure 3).^{83,97,98}

1.2.1.1. La bordure en brosse

La bordure en brosse tient son nom de sa membrane formant de nombreuses microvillosités afin d'augmenter sa surface ; cette membrane résulte de l'équilibre entre l'exocytose et l'endocytose des vésicules de transport, respectivement responsables de la résorption osseuse et du traitement des produits de cette dégradation.⁹⁷ Une fois l'os en contact résorbé, un espace – appelé lacune de Howship – se crée entre la bordure en brosse et la surface osseuse restante (Figure 3).^{84,99}

1.2.1.2. La zone d'attachement

La zone d'attachement est située en périphérie de la bordure en brosse et délimite la zone à résorber (Figure 3). Elle correspond à un anneau riche en filaments d'actine délimités par des protéines de liaison.^{83,100} De plus, cette zone adhère solidement à la surface osseuse à l'aide de récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines.^{83,97}

1.2.1.3. Le pôle basolatéral

Le pôle basolatéral, situé à l'opposé de la bordure en brosse (Figure 3), est le siège de l'exocytose des vésicules de transport contenant le matériel osseux dégradé et précédemment endocyté au niveau du pôle apical. Ces débris, ainsi que certaines enzymes de dégradation, sont alors relargués à proximité de vaisseaux sanguins présents en grand nombre dans cette zone.^{83,98}

1.2.2. Fonction des ostéoclastes

Les ostéoclastes sont les acteurs de la résorption osseuse physiologique et nécessaire à la croissance des os, à la cicatrisation des fractures, à la poussée dentaire, ainsi qu'à l'homéostasie de la calcémie.¹⁰¹ Pour parfaire cette fonction, ils possèdent différentes caractéristiques fonctionnelles, à savoir adhérence et migration cellulaires, polarisation, hydrolyse enzymatique et dégradation organique, acidification et dissolution minérale, ainsi que l'absorption des produits de dégradation de la matrice osseuse.^{97,100}

Les ostéoclastes sont capables d'adhérer fortement à la matrice osseuse et de se déplacer jusqu'au site à résorber. Dans un premier temps, la matrice est décalcifiée par dissolution de sa composante minérale. En effet, suite à l'action de l'anhydrase carbonique II, une pompe à protons

permet le transport d'ions hydroxydes H^+ à travers la bordure en brosse, acidifiant ainsi localement le milieu extracellulaire délimité par l'anneau d'actine sous l'ostéoclaste (pH entre 4 et 5). Cette acidification initie la dissolution de l'hydroxyapatite de la matrice osseuse en ions, phosphates inorganiques solubles et en eau.^{50,83,90,100} Les ostéoclastes contiennent également de nombreux lysosomes capables de sécréter des enzymes protéolytiques – à savoir les protéases à cystéine lysosomales (ex : cathepsine K), l'enzyme phosphatase acide tartrate-résistante (TRAP) – plus précisément son isoforme 5b (TRACP-5b) – et des MMPs (ex : MMP-9 ou gelatinase B).^{50,53,90,100,101} Ces enzymes agissent alors à l'extérieur de la cellule pour dégrader le collagène et d'autres protéines constitutives de la matrice osseuse organique.^{83,98}

Les produits de dégradation de la matrice (fragments de collagène osseux de type I, phosphate et calcium solubles)⁹⁹ sont par la suite endocytés par l'ostéoclaste au niveau de la bordure en brosse, puis lors de leur transcytose, ces vésicules fusionnent avec d'autres vésicules contenant la TRACP-5b⁵³⁻⁵⁵ et des lysosomes secondaires avant d'être exocytés au pôle basolatéral à proximité des vaisseaux sanguins (Figure 3).^{53,55,90,97,98} Ces produits de dégradation, ainsi que la TRACP-5b rejoignent alors la circulation sanguine où ils peuvent alors servir de biomarqueurs.⁵³ Finalement, les ostéoclastes meurent par apoptose après deux-trois semaines^{91,92} ou retournent à leur état quiescent.¹⁰¹

1.2.3. Ostéoclastogénèse

L'ostéoclaste naît de la différenciation et de la fusion de cellules souches hématopoïétiques mononucléées appartenant à la lignée des granulocytes et des monocytes, appelées cellules progénitrices des macrophages / granulocytes (GMP, *granulocyte / macrophage progenitor cells*) ou unité de formation des colonies de granulocytes et macrophages (CFU-GM, *colony forming unit – granulocyte / macrophage*). Après différenciation, ces cellules deviennent des ostéoclastes précurseurs (Figure 4).^{83,90,102}

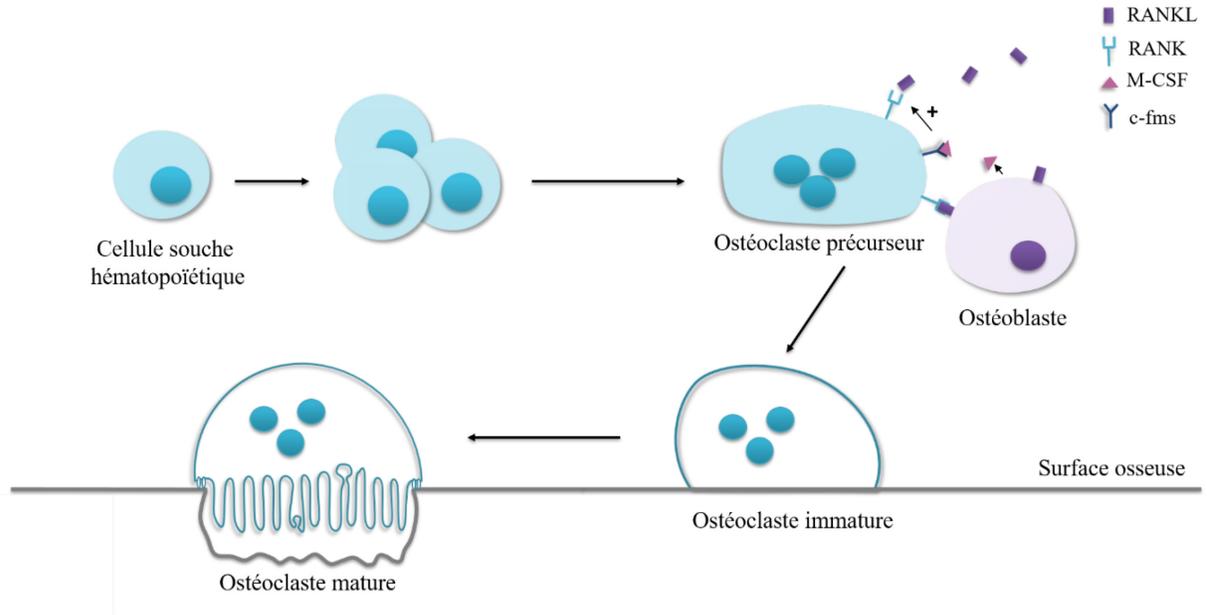


Figure 4 : Schéma de l'ostéoclastogénèse.

L'ostéoclaste mature est issu de la fusion de cellules souches hématopoïétiques, puis de la différenciation des ostéoclastes précurseurs.

Dans la moelle osseuse, la stimulation de la différenciation des ostéoclastes précurseurs en ostéoclastes matures est réalisée par des cytokines telles que le facteur stimulant des colonies de macrophages (M-CSF, *macrophage-colony stimulating factor*), le ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANKL, *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*), le facteur de nécrose tumorale (TNF, *tumor necrosis factor*), certaines interleukines, mais également par des facteurs de transcription nucléaires tels que les facteurs nucléaires kappa B (NF- κ B, *nuclear factor kappa B*) et c-fos (Tableau I).

En se fixant à son récepteur membranaire c-fms situé sur les ostéoclastes précurseurs, le M-CSF stimule l'expression du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANK, *receptor activator of nuclear factor kappa B*). L'interaction du récepteur RANK avec son ligand RANKL est une étape essentielle dans la différenciation ostéoclastique (Figure 4). Ainsi, sous l'action du M-CSF, de la fixation du récepteur RANK sur son ligand RANKL, du TNF, des interleukines et des facteurs de transcription, les ostéoclastes précurseurs fusionnent et se différencient en ostéoclastes activés, capables de résorber la surface osseuse.^{50,99,103} L'ensemble de cette différenciation ostéoclastique s'appelle l'ostéoclastogénèse (Figure 4).

Tableau I : Principaux facteurs ostéoclastogéniques.

Acronyme des facteurs ostéoclastogéniques	Nom des facteurs ostéoclastogéniques	Cellule produisant le facteur	Récepteur du facteur	Référence
M-CSF	Facteur stimulant des colonies de macrophages	Cellules stromales Ostéoblastes	Récepteur membranaire c-fms des ostéoclastes précurseurs	83,99,103
RANKL	Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B	Cellules stromales Ostéoblastes Ostéocytes Cellules dendritiques Fibroblastes synoviaux Précurseurs hématopoïétiques Lymphocytes T activés	Récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B (RANK) des ostéoclastes précurseurs (activé par M-CSF)	34,50,99,103
TNF	Facteur de nécrose tumorale	Cellules stromales Ostéoblastes	X	50,83,99
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B	Ostéoclastes précurseurs	X	50,83,99
c-Fos	Facteur nucléaire c-fos	Ostéoclastes précurseurs	X	50,83,99
IL (IL-1, IL-6, IL-11 et IL-17)	Interleukines	Cellules stromales Ostéoblastes	X	50,83,99

1.2.4. Mécanismes de régulation de l'activation des ostéoclastes

La principale voie de régulation de l'activation des ostéoclastes est celle de RANK/RANKL/OPG (ostéoprotégérine), mais de nombreuses autres molécules interviennent (Figure 5). Le ligand RANKL est exprimé à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse, mais également des ostéoblastes, des ostéocytes, des cellules dendritiques, des fibroblastes synoviaux, des précurseurs hématopoïétiques et des lymphocytes T activés.^{99,103} Sa synthèse est stimulée par de nombreux facteurs cataboliques permettant de favoriser l'ostéoclastogénèse et donc la résorption osseuse (Tableau II).

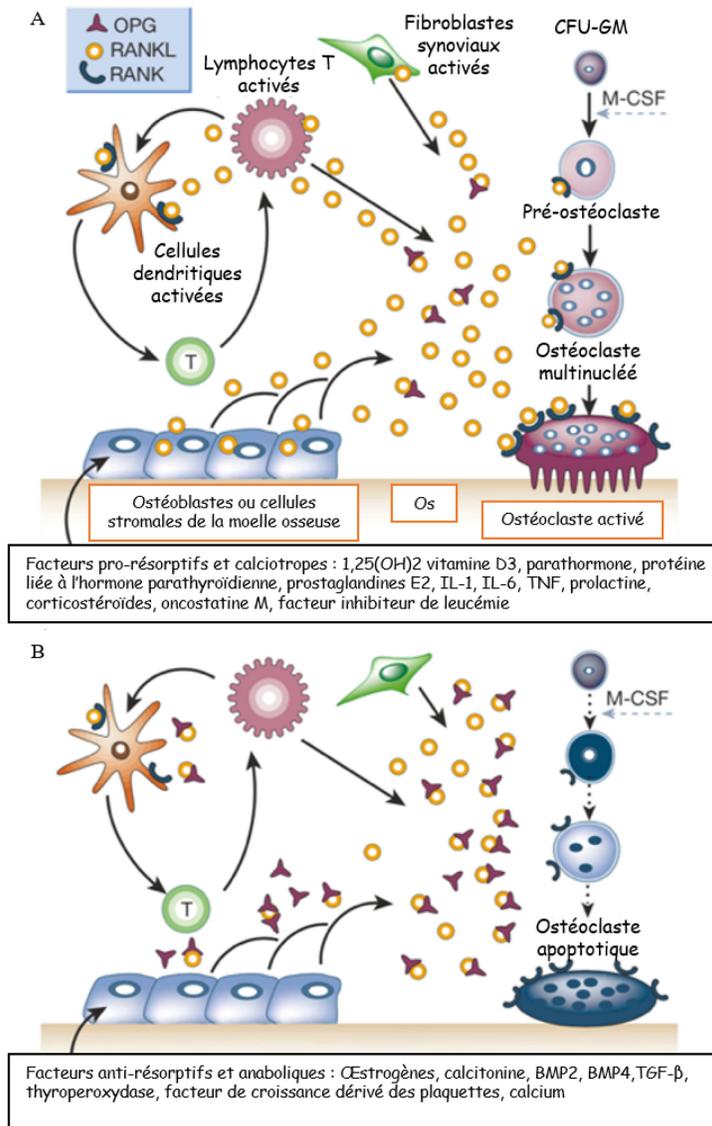


Figure 5 : Schéma des différents mécanismes de régulation de l'ostéoclastogénèse.

Régulation positive (A) et négative (B) de la résorption osseuse. D'après⁹⁹

En outre, l'interaction RANK/RANKL est contrôlée par un autre récepteur à RANKL : l'ostéoprotégérine (OPG). En effet, alors que la fixation du ligand RANKL sur son récepteur RANK stimule la résorption osseuse en activant les ostéoclastes locaux, l'OPG agit quant à elle comme un récepteur inhibiteur de maturation ostéoclastique en fixant RANKL, le rendant alors indisponible pour se fixer à RANK, ce qui régule ainsi négativement la résorption osseuse.^{99,104} L'OPG, protéine soluble, est localement produite par les ostéoblastes dans les zones de formation osseuse et sa synthèse est contrôlée par de nombreux facteurs anaboliques (Tableau II).

Tableau II : Effet de différentes cytokines sur la résorption osseuse.

RANKL = ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B ; OPG = ostéoprotégérine.

Effet sur la résorption osseuse	Cellule synthétisant la cytokine	Cytokine	Référence	
Stimulation résorption osseuse = Stimulation synthèse RANKL	Ostéoblaste	IL-1, IL-6, IL-11 et IL-17	98,99,104	
		Facteur de nécrose tumorale (TNF, <i>tumor necrosis factor</i>)		
		Parathormone (PTH)		
		Protéine liée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP)		
		1,25(OH) ₂ vitamine D ₃ (1,25-dihydroxyvitamine D ₃ ou calcitriol)		
		Corticostéroïdes		
		Prolactine		
		Facteur inhibiteur de leucémie (LIF, <i>leukemia inhibitor factor</i>)		
		Oncostatine M		
		Ostéocyte		Prostaglandines E2 (PGE ₂)
Lymphocyte T	X	83		
Inhibition résorption osseuse = Stimulation synthèse OPG	Ostéoblaste	Œstrogènes	98,99,104	
		Calcitonine		
		IL-4, IL-13, IL-12 et IL-18		
		Interférons IFN-β et IFN-γ		
		BMP2 et BMP4		
		Facteur de croissance transformant-bêta (TGF-β)		
		Thyroperoxydase,		99
		Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, <i>platelet-derived growth factor</i>)		
Calcium				

D'autre part, M-CSF et la liaison RANK-RANKL stimulent l'expression de gènes responsables de la survie des ostéoclastes, de leur motilité, du réarrangement de leur cytosquelette, mais également de la synthèse des enzymes TRACP-5b et cathepsine K, du récepteur à la calcitonine (CTR) et des intégrines β₃ – molécules favorisant l'activation ostéoclastique. Selon certaines études, environ 24 gènes interviendraient dans la régulation de l'activation des oséoclastes.⁹⁹

1.3. Le remodelage osseux, l'équilibre entre la résorption ostéoclastique et la formation ostéoblastique

Véritable tissu vivant, l'os est en renouvellement permanent afin de s'adapter aux charges biomécaniques imposées ; il subit ce que l'on nomme le remodelage osseux, équilibre

homéostatique entre la production et la dégradation de la matrice osseuse, respectivement opérées par les ostéoblastes et les ostéoclastes.^{90,105}

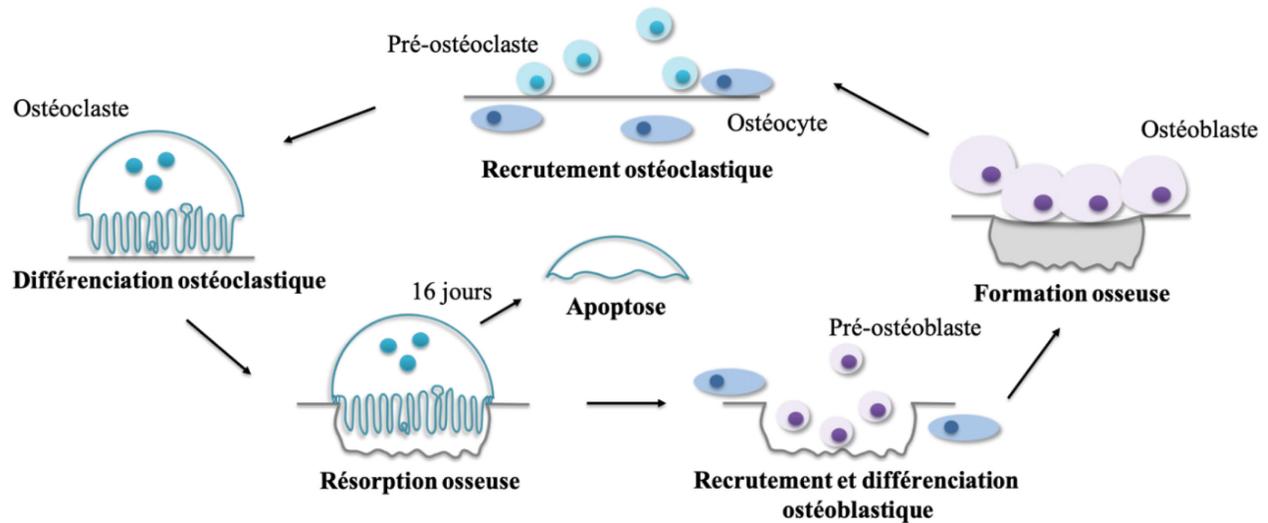
1.3.1. De la loi de Wolff au remodelage osseux

A la fin du XIX^e siècle, le médecin allemand Julius Wolff énonce la loi portant son nom selon laquelle l'os serait capable d'adapter sa structure selon la charge mécanique à laquelle il est soumis ; l'os compact du cortex et de la plaque osseuse sous-chondrale des os longs subit un épaissement au même titre que l'os trabéculaire de l'épiphyse et de la métaphyse.¹⁰⁶ En 1990, l'auteur Frost redéfinit ce concept et le nomme « remodelage osseux ».¹⁰⁷ Les ostéoclastes et les ostéoblastes constituent une unité multicellulaire de base¹⁰⁷ dont l'organisation structurale diffère selon le type d'os. Dans l'os cortical, les ostéoclastes creusent un canal cylindrique d'environ 2 000 µm de long par 150 à 200 µm de large¹⁰⁵ et dans lequel ils résorbent la matrice osseuse sans tenir compte des limites des ostéons, formant ainsi le cône de coupe ; une zone d'inversion composée de nombreux ostéoblastes procède à la formation d'une nouvelle matrice.⁸⁴ Dans la dernière zone appelée cône de fermeture, les ostéoblastes obstruent le nouvel ostéon formé par déposition centripète de lamelles osseuses.⁸⁴ Dans l'os trabéculaire, les ostéoclastes dégradent la matrice sur la surface endostéale des trabécules ; les ostéoblastes produisent un nouveau tissu osseux à l'endroit-même de la résorption ou sur la surface opposée changeant ainsi la direction du trabécule.⁸⁴ Les ostéoclastes ont une vitesse de résorption comprise entre 20 et 40 µm/jour et le remodelage de l'os trabéculaire est plus rapide que celui de l'os cortical en raison de son ration surface sur volume plus important.¹⁰⁵

1.3.2. Les trois étapes du cycle du remodelage osseux

Le cycle du remodelage se divise en trois étapes, à savoir la résorption pendant environ deux semaines, la phase d'inversion pendant environ quatre à cinq semaines et la formation qui peut durer jusqu'à seize semaines.¹⁰⁵ Au début du cycle, des pré-ostéoclastes mononucléés migrent jusqu'à la zone à résorber, puis se différencient en ostéoclastes multinucléés actifs ; après la dégradation de la matrice, les ostéoclastes meurent par apoptose. Au cours de la phase d'inversion, des cellules mononucléées de type macrophages préparent la surface et induisent des signaux nécessaires à la différenciation et à la migration des ostéoblastes qui combleront l'espace créé par

un nouveau tissu osseux ; les ostéoblastes meurent par apoptose ou deviennent des cellules bordantes, voire des ostéocytes emmurés dans la matrice. A la fin du cycle, la surface osseuse est recouverte de cellules bordantes et une période de quiescence débute jusqu'au prochain cycle de remodelage (Figure 6).^{90,105}



*Figure 6 : Schéma du cycle du remodelage osseux.
Couplage entre la résorption ostéoclastique et la formation ostéoblastique.*

1.3.3. Les ostéocytes, acteurs majeurs de la régulation du remodelage osseux

Les ostéocytes interviennent dans la régulation du remodelage osseux. En effet, l'ostéocyte possède des mécanorécepteurs capables de détecter et de transmettre aux ostéoblastes et aux ostéocytes adjacents – via leurs jonctions gap – des variations de contraintes biomécaniques. Ainsi, une diminution des stimuli mécaniques telle qu'une immobilisation ou une faiblesse musculaire entraîne une résorption osseuse, alors qu'une augmentation des stimuli mécaniques telle que l'exercice physique produit une formation osseuse. Ce remodelage osseux ostéocytaire est réversible en région péricanaliculaire et périlacunaire.^{83,95,108} En effet, lors d'une stimulation mécanique, l'os subit une compression localisée au niveau de laquelle s'échappe des canalicules et des lacunes un flux de liquide interstitiel produisant un potentiel électrique transitoire – les cils primaires des ostéocytes seraient capables de détecter ce flux, puis de stimuler la différenciation des cellules ostéoprogénitrices en ostéoblastes.⁹⁵ Ainsi, plus une région osseuse sera soumise à un stress mécanique (ex : chevaux de course à l'entraînement), plus l'os s'épaissira. En cas de

diminution de stimulation mécanique, les ostéocytes sécrètent des MMPs qui dégradent la matrice osseuse autour de ces cellules (ostéolyse ostéocytaire).⁸³

D'autres auteurs suggèrent que les ostéocytes régulent négativement la résorption ostéoclastique par inhibition de la fonction des ostéoclastes, alors que leur apoptose lève cette inhibition, permettant ainsi la résorption osseuse.¹⁰⁹ En effet, leur mort cellulaire, à la suite de microfissures osseuses dues à l'exercice (voir *section 2.2.*), stimule l'ostéoclastogénèse (l'apoptose favoriserait localement la libération du TNF- α par les ostéoclastes précurseurs, ainsi que de l'ATP qui stimule l'expression du RANKL)^{32,110} et lève l'inhibition des ostéocytes sur les ostéoclastes.¹⁰⁹

1.3.4. Le rôle de l'inflammation au sein du remodelage osseux

Lors de l'exercice physique, une réponse inflammatoire locale se produit en raison des charges et des traumatismes appliquées sur l'os, ainsi que des microlésions qui en résultent aussi bien chez les athlètes humains¹¹¹⁻¹¹³ que chez les athlètes équins.¹¹⁴⁻¹²⁰ Des études *in vitro* sur les ostéoclastes humains ou murins ont démontré que des facteurs inflammatoires tels que le lipopolysaccharide (LPS) et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-1 α , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-17 ou le TNF- α sont à l'origine d'une stimulation de l'ostéoclastogénèse¹²¹⁻¹²⁴ et de la résorption osseuse.^{122,123}

L'os est un tissu hautement spécialisé qui, à l'état physiologique, est le siège d'un véritable **équilibre entre résorption et formation osseuse**. Ostéoclastes, ostéoblastes et ostéocytes œuvrent ensemble au cours du **remodelage osseux** pour permettre une cicatrisation et un renouvellement optimal de l'os. L'**ostéoclaste** semble jouer un rôle particulièrement important lors de la **phase de résorption**.

2. Les fractures de stress chez les chevaux de course

Lors des entraînements et des courses, les chevaux subissent des contraintes biomécaniques intenses et répétées à l'origine de **microfissures qui se développent en microfractures ou « fractures de stress » et qui peuvent aboutir à une fracture spontanée complète fatale** pour le cheval, ou bien, sur le long terme, au développement **d'ostéoarthrose traumatique**. En 2020, le « Jockey Club » a recensé 333 chevaux décédés de blessures sur les champs de course en Amérique du Nord ; selon une étude de Parkin et al. de 2006, plus de 75 % des fractures fatales du membre distal sont spontanées, sans aucun traumatisme externe associé.³

L'amélioration des connaissances relatives à l'étiopathogénie et à la physiopathologie de ces lésions osseuses sont essentielles afin de pouvoir **les prévenir, les diagnostiquer et les traiter** avant une issue fatale pour le cheval.

2.1. Etiopathogénie des fractures de stress chez les chevaux de course

2.1.1. Épidémiologie

En 2020, le « Jockey Club » rapporte d'après la base de données des blessures équines (*Equine Injury Database*TM) un taux de blessure mortelle évalué à 1,41/1000 départs (soit 0,14 % des départs) ; ce chiffre a diminué de 29,5 % depuis 2009. Les blessures mortelles des chevaux de course se produisent majoritairement pendant les courses (42 %), mais aussi lors des entraînements (39 %), plus rarement lorsque le cheval n'est pas à l'exercice (12 %) ou lors d'un accident (7 %).² De plus, les affections musculo-squelettiques représentent 83 % de ces blessures fatales pour les Thoroughbred et 80 % pour les Quarter Horse face aux affections métaboliques.²

Plusieurs facteurs de risque sont rapportés. Les blessures mortelles augmentent avec l'âge^{125,126} et semblent plus fréquentes chez les chevaux âgés de 4 ans et plus ;¹³ notamment, des études de 1996 et de 1998 montrent qu'il y a deux fois plus de blessures chez les chevaux de 4 ans par rapport aux chevaux de 3 ans et chez les chevaux de 2 à 5 ans par rapport aux plus jeunes (Tableau III).^{5,127} Cependant certains auteurs rapportent une diminution avec l'âge.¹²⁸ Ces événements catastrophiques sont deux fois plus rapportés chez les mâles que chez les femelles (Tableau III).^{5,13,126,127} De plus, les fractures osseuses soudaines représentent 85 % des affections musculo-squelettiques mortelles.²

Il existe de nombreux facteurs de risque relatifs au cheval, à son exercice, à ses performances, ou bien à la course en elle-même ; un des facteurs majeurs est l'exercice intense, répété à haute vitesse (Tableau III).

Tableau III : Facteurs de risque pour les fractures chez les chevaux de course.

Facteurs de risque		Références
Signalement	≥ 4 ans	5,13,127
	Mâles	5,13,126,127
Appareil musculo-squelettique	Lésions locomotrices préexistantes	8,13,126
	Conformation de sabot avec des angles faibles en talons	13
	Paturon allongé	8
	Fers avec une grappe en pince	13
Exercice	Exercice intense, répété et à haute vitesse	8,13,127,129
	Grande distance cumulative parcourue	8,13,125,126,129
	> 6 000 m de galop par mois	130,131
	Première année de course	9,125
	Nombre total de courses	8,126,132
Repos	Nombre de courses par année	132
	Nombre de saisons courues	13
	Période de repos de 30 à 60 jours	13
Traitement	Administration médicamenteuse préalable à la course	126
Modalités de course	Pistes en terre battue	125,128,132
	Course de plat ou course d'obstacles	8,129
	Saison de l'année (été)	8,132
	Heure de la journée (tôt le matin)	132
	Nombre élevé de participants	9
	Nombre de tours	8
	Premiers 1,2 km	128
	Position occupée au départ	8
	Position occupée lors du dernier virage	9
	Jockey amateur	125
Performances	Porter des œillères pour la première fois	8,13,125
	Évolution positive ou négative dans le classement	13
	Chevaux gagnants plus de 1500 \$ par course	3
	Chevaux réticents au départ	3
	Importante progression pendant la course	3
Stimulation importante du cheval (dernières 10 sec précédant la fracture)	3	

2.1.2. Sites anatomiques privilégiés

Les fractures spontanées fatales des chevaux de course affectent préférentiellement les membres thoraciques (78 à 90 %).^{2,8,11,16,128,129,132} Certains auteurs rapportent que le membre thoracique gauche est plus souvent affecté que le droit (60 à 62 % contre 38 à 40 %).^{11,13,16,127,128}

En effet, il semblerait que les contraintes soient plus importantes pour le membre thoracique sur lequel le cheval galope, à savoir le membre thoracique gauche lors des virages puisque les pistes sont en sens anti-horaire (bien qu'il semblerait qu'en ligne droite les chevaux galopent sur le pied droit).^{11,13} Néanmoins, d'autres auteurs constatent l'effet inverse,¹³³ ou bien ne montrent aucune différence significative.^{2,13}

Les zones distales des membres sont les plus affectées.¹³ Les sites présentant le plus de fractures spontanées fatales sont l'os sésamoïde proximal et le condyle distal du métacarpe III (Tableau IV) ; souvent ces deux fractures se produisent ensemble sur le même membre.²

Tableau IV : Répartition des fractures fatales selon leur localisation chez les Thoroughbred de course.

Os fracturé	Pourcentage des fractures fatales
Os sésamoïde proximal	71 %, ¹⁶ 50 % (lors de course), ² 34 %, 30 %, ¹⁵ (lors de l'entraînement), ² 8 % ¹²⁸
Os métacarpien III	46 %, ¹²⁸ 30 % (lors de course), ² 26 % (lors de l'entraînement), ² 19 %, ¹⁵ 7 % ¹³⁴
Humérus	42 %, ¹³⁴ 20 % (lors de l'entraînement), ² 9 %, ¹⁵ 6 % ¹⁶
Tibia	27 %, ¹³⁴ 2 % ¹⁵
Carpe	17 %, ¹²⁸ 8 % (lors de course), ² 7 %, ¹⁵ 6 % ¹⁶
Phalange proximale	9 % (lors de l'entraînement), ² 4 %, ¹⁵ 3 % ¹⁶
Phalange distale	10 % ¹²⁸
Scapula	9 %, ¹⁶ 6 %, ¹³⁴ 2 % ¹⁵
Os métatarsien III	6 %, ¹⁶ 4 % ¹⁵
Radius	7 % ¹³⁴
Pelvis	7 %, ¹³⁴ 3 % ¹⁵
Fémur	3 % ¹³⁴
Vertèbre	2 % ¹⁵

2.1.3. Impacts médico-socio-économiques

L'impact médical des fractures des chevaux de course est conséquent, puisque ces blessures catastrophiques conduisent au décès du cheval avec une incidence rapportée entre 0,6 et 3,2/1000 départs de course (Tableau V). En se fracturant un membre, le cheval entraîne dans sa chute son jockey. Hitchens et al. rapportent en Californie, lors des courses de Thoroughbred entre 2007 et 2011, une prévalence de chute de 0,20 % avec 184 jockey blessés en tombant, soit une incidence de blessures par chute de 51 %. De 1940 à 2012, aux États-Unis, au Canada et à Mexico, ils recensent 152 jockeys décédés lors d'entraînement, de courses de plat ou de courses d'obstacles.¹⁹ A titre de comparaison, l'incidence de blessures par chute rapportées est de 27 % en Australie de 2002 à 2006,¹³⁵ 34 à 44 % en Europe de 1991 à 2006¹³⁶⁻¹³⁸ et environ 50 % au Japon de 1998 à

2000.¹³⁹ Lorsque le cheval décède lors d'une course, son jockey a 162 fois plus de chances de tomber et 171 fois plus de probabilité d'être blessé.¹⁴⁰ De plus, les chutes de jockey lors de course de Thoroughbreds sont plus fréquentes lorsque le cheval se blesse au niveau du boulet.¹⁴⁰ En outre, ces événements sont toujours choquants pour le grand public qui assiste en direct à la chute, à la blessure, voire au décès du cheval et/ou de son cavalier.

Tableau V : Incidences rapportées de blessures fatales chez les chevaux de course entre 1987 et 2011.

Incidences (/1000 départs de course)	Localisation	Dates	Références
3,2	Japon	1985 à 1994	8
1,7	USA, Californie	1991 à 1992	5,127
1,4	USA, Kentucky	1992 à 1993	11
1,2	USA, Floride	1995 à 1998	6
0,6	Australie	1988 à 1995	141
0,6	Chine, Hong Kong	2004 à 2011	16

La fracture spontanée d'un cheval de course présente un impact économique important,¹³⁴ puisqu'aux frais vétérinaires nécessaires pour diagnostiquer, tenter de traiter, voire pour euthanasier le cheval, s'ajoute la perte financière liée à la mise au repos de l'animal, ainsi qu'à la perte économique du cheval lui-même qui, pour certains, valent plusieurs millions de dollars. Notons que l'industrie équine – incluant le monde des courses – génère à elle seule à l'économie canadienne 19 milliards de dollars par an.¹⁴²

2.2. Physiopathologie d'apparition des fractures de stress chez les chevaux de course

Les chevaux de course, suite au volume conséquent d'entraînements et de courses à haute vitesse,¹³¹ sont soumis à des contraintes biomécaniques intenses et répétées sur des sites spécifiques se traduisant par une résorption excessive de l'os sous-chondral, voire des fractures complètes ou de l'ostéoarthrose post-traumatique.^{14,27}

2.2.1. Remodelage de stress de l'os sous-chondral

Le nombre préoccupant de « fractures pathologiques » se produisant chez les chevaux de course a orienté les chercheurs vers l'étude de l'os cortical des os longs affectés, puis de l'os sous-chondral ; d'après les travaux de Dre Susan Stover, un grand nombre de fractures est directement associé à un remodelage de stress de l'os sous-chondral.¹⁴ Différentes théories ont été émises pour expliquer ce phénomène, à savoir : épaissement de l'os sous-chondral, fatigue matérielle / « stress riser » et résorption ostéoclastique excessive.

2.2.1.1. *À l'exercice, épaissement de l'os sous-chondral et modelage osseux*

Les chevaux de course ne viennent pas au monde muni d'un appareil musculo-squelettique d'athlète : ils l'acquièrent avec un entraînement adapté et progressif. En effet, lors de l'entraînement et des courses, l'os sous-chondral est soumis à des charges biomécaniques auxquelles il répond en adaptant sa structure : ce phénomène est appelé le modelage osseux.^{107,143} En effet, un cheval à l'exercice subit un certain nombre de cycles de charge détectés par les mécanorécepteurs des ostéocytes de la matrice osseuse qui stimulent les ostéoblastes à produire de l'os.⁸³ Ainsi, ces cellules entraînent un épaissement de l'os cortical de la plaque osseuse sous-chondrale^{7,20-24} ainsi que des trabécules de l'os spongieux ;^{7,20,21,24,144,145} l'os adapte sa structure lui permettant ainsi d'augmenter le nombre de cycles de charge compressifs pouvant être supportés sans qu'il n'y ait de dommages.¹⁴⁶ Ce modelage de l'os sous-chondral s'observe essentiellement au niveau des zones où les contraintes sont maximales^{7,20} et se traduit par une sclérose sous-chondrale (Figure 7) (notamment trabéculaire).^{13,14,29,146,147}

Si le cheval n'est pas suffisamment mis au repos, ce tissu osseux néoformé s'accumule (puisque non dégradé par les ostéoclastes) par apposition osseuse et fragilise l'os :^{7,25} l'épaissement de l'os sous-chondral a pour objectif de réduire localement le stress appliqué, mais ne parvient pas à compenser la fragilité osseuse qui en résulte.¹⁸

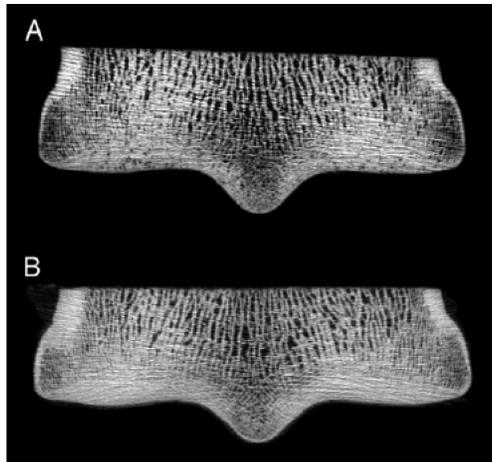


Figure 7 : Os sous-chondral du condyle métacarpien palmaire distal observé au micro-CT.

A : Porosité de l'os sous-chondral (cheval au repos depuis 9 semaines) ; B : Épaississement et sclérose de l'os sous-chondral après adaptation de l'os en réponse aux charges physiologiques (cheval de course à l'exercice). D'après¹⁸

2.2.1.2. À l'exercice, apparition de microfissures fatigue matérielle de l'os et phénomène de « stress riser »

D'après une étude récente de Cresswell et al., les deux paramètres permettant de prédire le risque de fracture sont l'augmentation de la fraction volumique osseuse et une faible largeur de l'os.¹⁴⁸ En effet, après un certain nombre de cycles de charge, l'adaptation est insuffisante (Figure 8), l'os épaissi et affaibli se brise et forme des microfissures mécaniques – décrites à moins de 1 à 3 mm du cartilage calcifié des condyles de l'os métacarpien III²⁸ – à l'origine d'une fatigue matérielle de l'os.²⁵

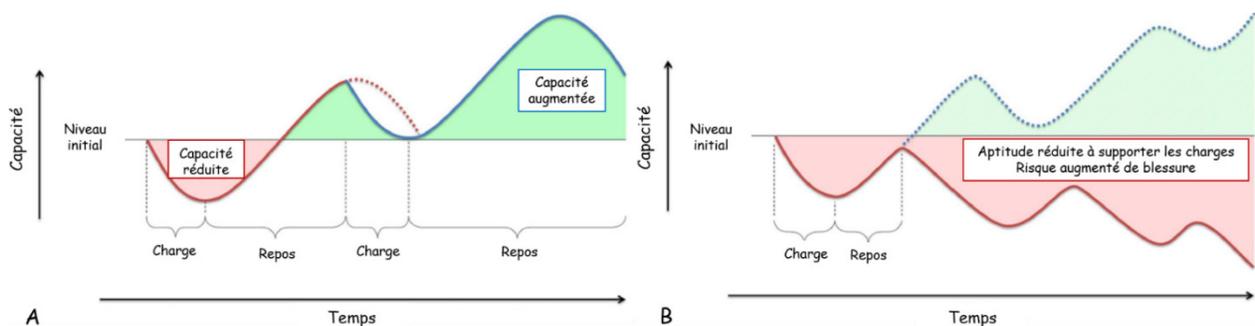


Figure 8 : Adaptation physiologique de l'os sous-chondral aux cycles de charge successifs.

A : Adaptation efficace à la suite de charges physiologiques espacées ; B : Adaptation insuffisante à la suite de charges supra-physiologiques excessives aboutissant à la fragilisation de l'os et au développement de microfractures. D'après¹⁴⁹ adapté de¹⁵⁰

Le nombre de cycles supportés avant l'apparition de microfissures osseuses est inversement proportionnel à l'intensité de la charge soumise par cycle ainsi qu'à la différence entre l'angle

d'application effective de la charge et l'angle physiologique.^{25,151} Or, l'intensité de la charge augmente avec la vitesse²⁵ – lors des courses, celle-ci peut atteindre jusqu'à 75 km/h¹⁵² – et les membres des chevaux de course sont soumis à une hyperextension maximale – plus particulièrement le boulet dont l'amplitude articulaire peut atteindre jusqu'à 240°. ¹⁵³ La haute vitesse et l'hyperextension prédisposent donc particulièrement les chevaux de course à l'apparition et à l'accumulation pathologique de ces microfissures.^{25,147,154}

Par la suite, ces microfissures fusionnent pour former des microfractures qui elles-mêmes s'associent pour constituer de véritables lacunes observées par de nombreux auteurs.^{17,25,27,28,37,155,156} Ces zones focales osseuses structurellement affaiblies (ou ostéopénie) sont à l'origine du phénomène de « stress riser » (ou concentration de contrainte) qui accentue cette fragilité et initie le développement de fractures de stress, voire de fractures complètes.^{13,14,25}

2.2.1.3. À l'exercice, déséquilibre du remodelage osseux associé à une résorption ostéoclastique excessive

Une autre hypothèse a été soulevée pour expliquer le développement de ces microlésions, à savoir la résorption ostéoclastique excessive. En conditions physiologiques, l'apparition de quelques microfractures est normale, mais elles sont par la suite comblées par la formation d'os sain ; en effet, il existe un équilibre entre la résorption ostéoclastique et la formation ostéoblastique appelé remodelage osseux – à l'inverse du modelage osseux énoncé ci-dessus au cours duquel il n'existe pas de couplage entre les ostéoclastes et les ostéoblastes qui agissent indépendamment.¹⁴³ Cependant, lors de charges supra-physiologiques répétées, certains auteurs pensent que les microlésions précédemment décrites à la *section 2.2.1.2.* entraîneraient une morphologie atypique ou encore l'apoptose des ostéocytes^{29-31,95} menant à une augmentation de la concentration en RANKL et donc à une stimulation de l'ostéoclastogénèse³²⁻³⁴ sur ce site déjà lésé ; de plus, des études ont montré *in vitro* que les ostéoclastes sont attirés par les surfaces irrégulières³⁵ et potentiellement les sites de lésions osseuses. Ainsi, si l'exercice intense se poursuit, les microfractures s'accumulent^{14,36} plus rapidement qu'elles ne sont réparées^{14,25} et il existe alors un remodelage osseux déficient, puisque les ostéoclastes dégradent le tissu osseux en quelques jours à deux semaines, alors que les ostéoblastes ont besoin de plusieurs mois pour produire un os sain¹³ (voir *section 1.3.2.* : 4 mois pour les humains ; donnée inconnue pour l'espèce équine).

Les courses et les entraînements intensifs entraînent donc également une activité ostéoclastique excessive qui forme une ostéopénie transitoire focale, rendant ainsi l'os poreux, donc d'autant plus fragile,^{14,25-27,157} et sujet aux microfractures par le phénomène de « stress riser » associé. Cette hypothèse est soutenue par l'observation de zones de résorption ostéoclastique au sein de ces microfractures,^{17,27-29,37} ainsi que par l'identification d'ostéoclastes préférentiellement localisés dans la plaque osseuse sous-chondrale des zones soumises à un stress traumatique.^{26,27} Les zones focales d'ostéopénie sont souvent observées au niveau de l'os sous-chondral des fractures articulaires, ainsi qu'à la surface des fractures de l'os cortical.^{14,157} Ainsi, la résorption ostéoclastique fragiliserait localement le tissu osseux en formant elle aussi des microfractures ou en étant responsable de la propagation de ces microfissures (Figure 9).

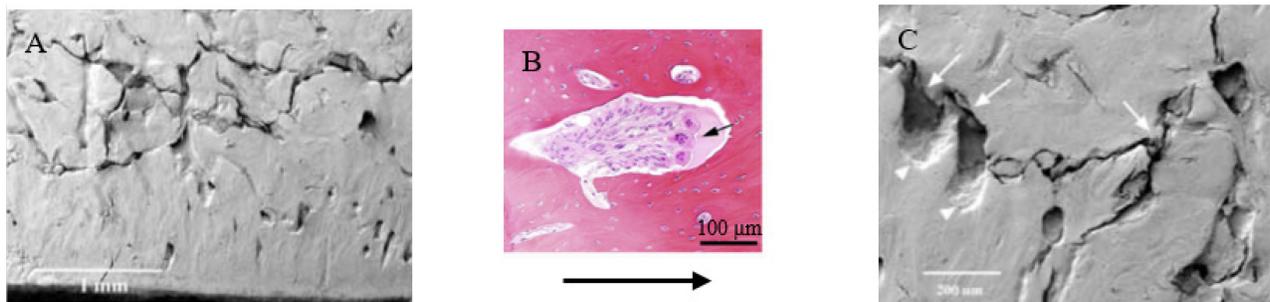


Figure 9 : Développement de microfractures au sein de l'os sous-chondral.

A : Microfissures observées au microscope électronique à balayage ; B : Ostéoclaste (flèche noire) observé au microscope optique ; C : Microfractures (flèches blanches) et zones de résorption ostéoclastiques (têtes de flèches blanches) observées au microscope électronique à balayage. D'après^{26,28}

L'exercice demandé aux chevaux de course est intense et engendre des fractures dites « de stress » à la fois par la stimulation focale du modelage osseux responsable de l'accumulation rapide de microfractures et par l'altération du remodelage osseux ne pouvant plus compenser la formation de ces lésions. L'analyse de Hitchens et al. de 2019 conclue sur deux types de mécanisme d'accumulation de lésions osseuses : une période d'entraînement intense sur un os bien adapté, ou des entraînements de faible intensité sur un os inadapté (Figure 10).¹²⁶

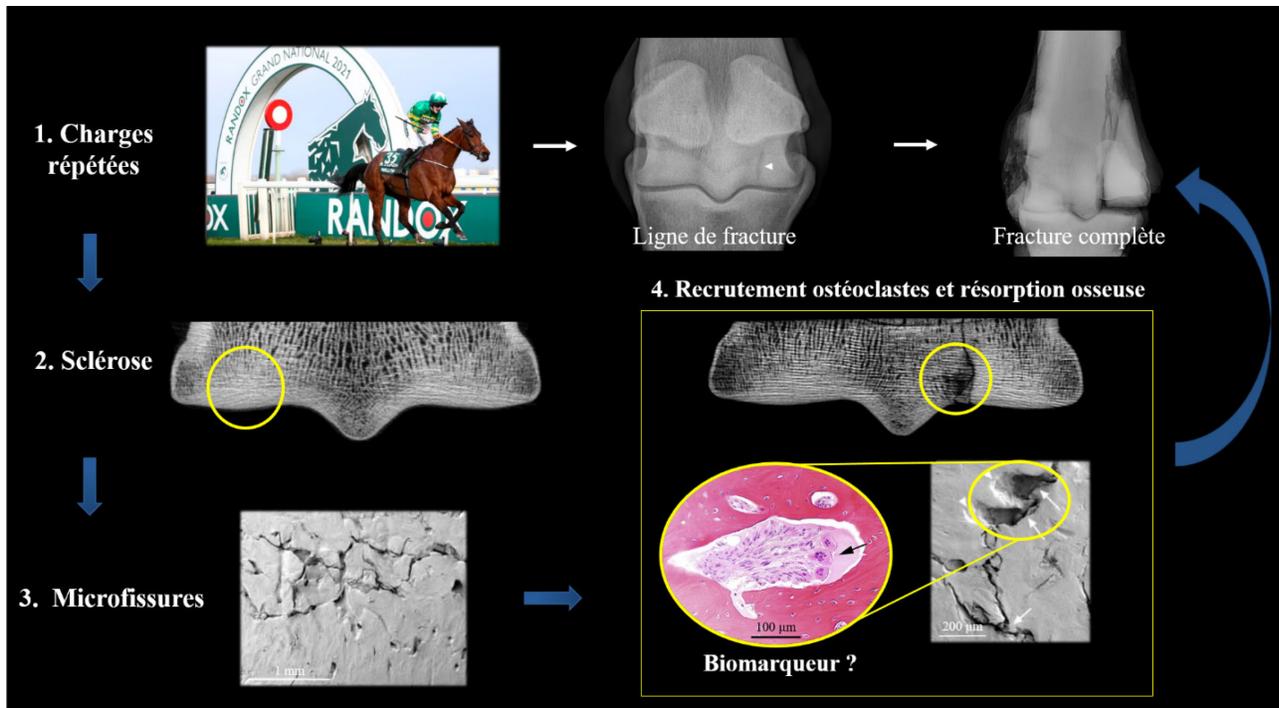


Figure 10 : Schéma physiopathologique du développement d'une fracture de stress chez un cheval de course.

Les charges intenses répétées de l'exercice s'accumulent au niveau de l'os sous-chondral qui s'adapte par épaissement (sclérose) aboutissant à des microfissures mécaniques qui attirent les ostéoclastes dont la résorption osseuse excessive entraîne l'apparition de ligne de fracture, voire de fracture complète. D'après^{7,18,20,23,26,28,39}

2.2.1.4. Au repos, stimulation du remodelage osseux ainsi que de la résorption ostéoclastique excessive

Contrairement à l'exercice où c'est le modelage osseux qui est favorisé, au repos, c'est le remodelage osseux qui est stimulé avec une forte activité ostéoclastique. Plusieurs études sur des chevaux à l'entraînement, et donc avec une accumulation de microlésions, ont mis en évidence une résorption ostéoclastique excessive qui fragilise l'os en le rendant poreux en regard des sites où la charge est maximale.^{7,17,25} Si le cheval est remis à l'exercice sans que la durée de repos ne soit suffisamment longue pour que la formation osseuse ostéoblastique n'ait eu le temps de se produire, l'os fragilisé est alors prédisposé aux fractures.^{7,25} Il est donc primordial d'adapter le programme d'entraînement des chevaux de course en limitant l'intensité et la durée de l'exercice à haute vitesse avec des durées de repos appropriées.^{17,25}

2.2.2. Conséquences cliniques

Des études post-mortem sur les chevaux de course ont montré que le remodelage de stress de l'os sous-chondral était associé à 74 % des fractures ;¹⁴ de plus, la prévalence d'ostéoarthrose post-traumatique est estimée entre 58 et 67 % des articulations métacarpo/tarso-phalangiennes des chevaux de course.^{155,158}

2.2.2.1. Les fractures complètes

Les contraintes mécaniques répétées lors de l'entraînement ou des courses, ainsi que l'accumulation des microfractures de l'os sous-chondral associées à la résorption ostéoclastique excessive fragilisent l'os et peuvent aboutir à des fractures macroscopiques complètes spontanées,^{18,36,37,159,160} sans association à un quelconque traumatisme. Parmi les fractures spontanées fréquemment rapportées et décrites, on rencontre celles du condyle palmaire distal de l'os métacarpien/tarsien III^{129,161} et celles de l'os carpal III.¹⁶²

Chez les Thoroughbred, les fractures condyliques de l'os métacarpien/tarsien III se produisent essentiellement sur les membres thoraciques (entre 59,8 et 81 %)^{10,39,163,164} et s'orientent verticalement dans le plan sagittal.¹⁶¹ Environ 85 % des fractures condyliques se produisent au niveau du condyle latéral,¹⁶³⁻¹⁶⁵ plus précisément au niveau du sillon parasagittal palmaire/plantaire (Figure 11).^{17,18,159-161,166} Les fractures condyliques médiales sont plus susceptibles d'être spiralées ou bien centrales à la diaphyse que les fractures condyliques latérales.¹⁶¹

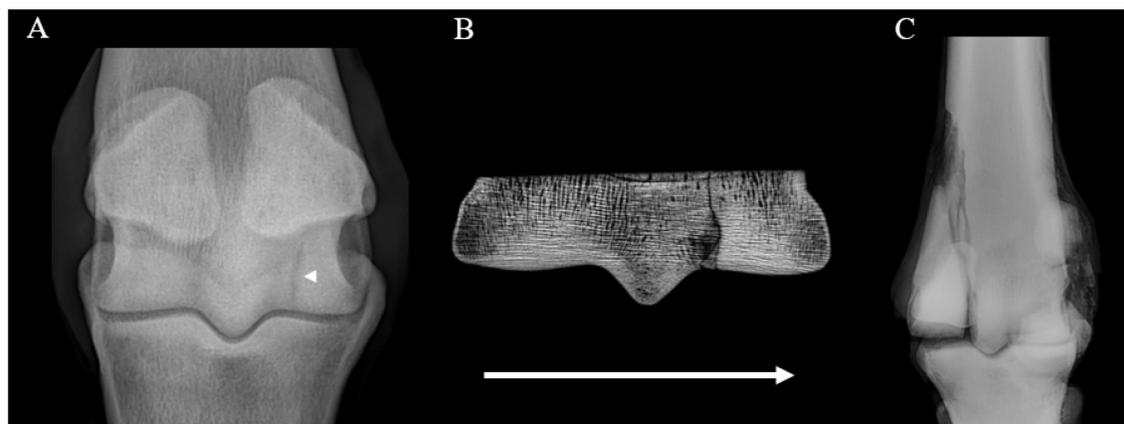


Figure 11 : Fracture de stress aboutissant à une fracture complète du condyle palmaire métacarpien distal. A : Ligne de fracture et lyse osseuse observées par radiographie, vue plantaro-dorsale en flexion ; B : ligne de fracture parasagittale observée au micro-CT ; C : fracture condylienne complète observée par radiographie, vue dorso-palmar. D'après^{18,39}

Le remodelage osseux inadapté et la fatigue osseuse entraînés par l'hyperextension carpale lors de l'exercice fragilisent l'os sous-chondral de l'os carpal III ; une sclérose de la face radiale se développe associée à une dégénérescence du cartilage de croissance. Ce phénomène peut aboutir à une fracture complète appelée *slab fractures*,¹⁶² préférentiellement à l'aspect dorso-médial de l'os carpal III (87 %).^{167,168} Les fractures les plus communes se produisent dans le plan frontal, plus rarement dans le plan sagittal,¹⁶⁹ et peuvent être bi-articulaires.¹⁶⁸

2.2.2.2. *Maladie ostéochondrale palmaire du boulet et du carpe*

Si les microfractures développées à force d'entraînements intensifs répétés n'aboutissent pas à la formation d'une fracture complète, de l'ostéoarthrose peut se développer progressivement. Sa localisation la plus décrite est celle de la région palmaire/plantaire des condyles métacarpiens/tarsiens. Autrefois considérée comme de l'ostéochondrite disséquante,¹⁷⁰ puis comme de l'ostéochondrose post-traumatique,¹⁷¹ cette dégénérescence articulaire chronique est désormais connue sous le nom de maladie ostéochondrale palmaire du boulet, ou *palmar osteochondral disease*.¹⁷²

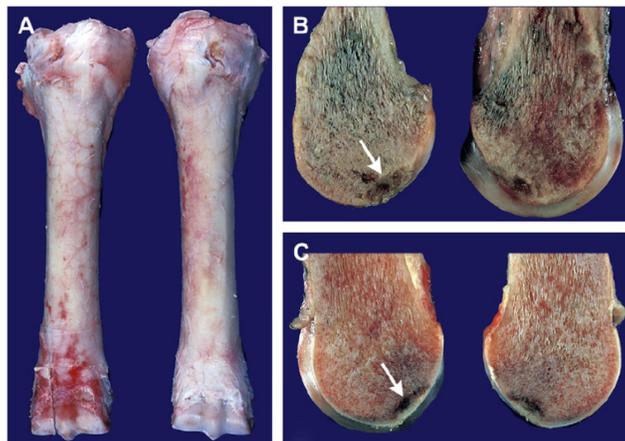


Figure 12 : Fractures condyliennes de l'os métacarpien III.

Vue dorsale d'une fracture condylienne latérale et son membre controlatéral intact (A). Coupes sagittales du condyle latéral distal fracturé (B) et du membre controlatéral non fracturé (C) associée à de la lyse et de la sclérose de l'os sous-chondral. D'après¹⁵

A la suite des contraintes biomécaniques répétées – notamment l'hyperextension du boulet et du carpe lors de la phase d'appui –, de l'ostéoarthrose de surcharge traumatique se forme secondairement.^{29,158} En effet, dans le cas de la maladie ostéochondrale palmaire du boulet, les os sésamoïdes proximaux sont repoussés contre l'os métacarpien/tarsien III par l'appareil suspenseur

du boulet,¹⁷³ produisant une compression et un cisaillement, expliquant ainsi les lésions fréquemment observées sur zones de contact entre les condyles métacarpiens/tarsiens et les os sésamoïdes proximaux.²⁹ Le cartilage articulaire est donc fragilisé et progressivement érodé par les impacts traumatiques répétés, les microfractures non comblées et la sclérose de l'os sous-chondral (Figure 12).^{29,155,174}

2.3. Outils diagnostiques d'évaluation des fractures de stress

Plusieurs outils diagnostiques sont à la disposition du vétérinaire afin d'évaluer les fractures de stress des chevaux de course, à savoir la clinique, la radiographie, l'échographie, la scintigraphie, la tomodensitométrie et l'imagerie par résonance magnétique. Cependant, ces examens parviennent difficilement à mettre en évidence les lésions précoces avant que celles-ci ne soient fatales.

2.3.1. Signes cliniques

Classiquement, lorsque les lésions sont précoces, la boiterie observée reste légère et lors de fractures non complètes, la boiterie peut être plus difficilement discernable.¹⁶¹ Néanmoins, en cas de fracture complète plus ou moins déplacée, la boiterie est aigüe et sévère, allant jusqu'à la suppression d'appui, typiquement après une course ou un entraînement intensif¹⁶¹ et les diagnostics clinique et radiographique peuvent être évidents. L'étude de Hitchens et al. de 2018 rapportent une tendance au développement d'une boiterie dans les 3 mois précédents la blessure fatale.¹⁷⁵ En cas de fracture condyloïde affectant les deux membres thoraciques, l'allure est raccourcie et saccadée.¹⁶¹

Dans le cadre de la maladie ostéochondrale palmaire du boulet, les signes cliniques sont semblables ; la boiterie possiblement bilatérale peut être intermittente, légère à modérée pour les lésions précoces, puis devenir plus évidente dans les stades les plus sévères.¹⁷²

2.3.2. Radiographie

Les signes radiographiques recherchés sont une ligne de fracture complète ou unicorticale (Figure 13), un déplacement palmaire de l'extrémité distale de l'os rudimentaire associé en cas de

lésion de l'os métacarpien III, mais surtout une zone de sclérose (épaississement trabéculaire se manifestant par une radio-opacité) et de lyse (perte osseuse se manifestant par une radio-transparence) de l'os sous-chondral ; ces deux derniers éléments traduisent le phénomène de fatigue osseuse.^{14,176-180} La sévérité de la sclérose et de la radio-transparence de l'os sous-chondral de l'os carpal III sont positivement associées au degré de boiterie.^{181,182} Les cals osseux des os longs, lorsqu'ils sont suffisamment minéralisés (environ quatre semaines après la fracture) peuvent être visualisés.^{14,183} Le membre controlatéral doit toujours être radiographié, puisque ces lésions de fatigue osseuse sont souvent bilatérales.^{14,147,162,176} La superposition des os sésamoïdiens proximaux avec les condyles métacarpiens/tarsiens peut masquer l'observation de lésions ostéochondrales et de fractures condyliques unicorticales ; il est alors préférable de réaliser plusieurs vues, notamment pour les fractures comminutives.^{161,172,176,178,184}

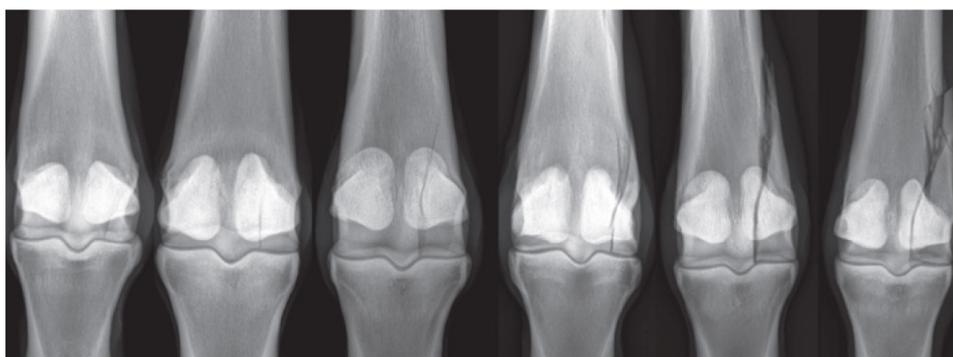


Figure 13 : Suivi radiographique dorso-palmar d'une fracture condylienne métacarpienne latérale dans le plan sagittale. La fracture évolue d'une courte ligne de fracture en une fracture complète déplacée comminutive. D'après¹⁶¹

Concernant la maladie ostéochondrale palmaire du boulet, la radiographie est peu sensible pour détecter les stades précoces. En effet, l'étude de Davis et al. de 2017 rapporte de faibles sensibilité et spécificité respectivement de 37 % et 75 %.¹⁷⁹ En plus de la lyse et de la sclérose de l'os sous-chondral (Figure 14), des signes d'ostéoarthrose secondaire sont également visibles à la radiographie tels qu'un aplatissement du condyle palmaire/plantaire, des ostéophytes apicaux sur les os sésamoïdiens proximaux, des enthésophytes, une diminution de l'espace articulaire, une distension articulaire et une cavité à la surface dorso-distale du métacarpe/métatarses.^{172,179} Plusieurs vues sont nécessaires afin d'améliorer la détection des lésions.



Figure 14 : Vue radiographique latero-médiale d'un condyle métacarpien palmaire distal atteint de maladie ostéocondrale palmaire du boulet.

Mise en évidence d'une importante zone de lyse osseuse entourée de sclérose sous-chondrale (flèches). D'après¹⁷²

2.3.3. Échographie

L'échographie peut être utilisée pour observer des proliférations osseuses ou diagnostiquer certaines fractures et suivre leur cicatrisation, notamment pour les zones difficiles à radiographier telles que la scapula, l'humérus ou le pelvis, ou encore celles qui sont articulaires.^{183,185-188} Certaines fractures de stress impliquent en effet l'articulation, alors que d'autres sont extra-articulaires et peuvent être associées à une réaction périostée détectable par échographie (Figure 15).

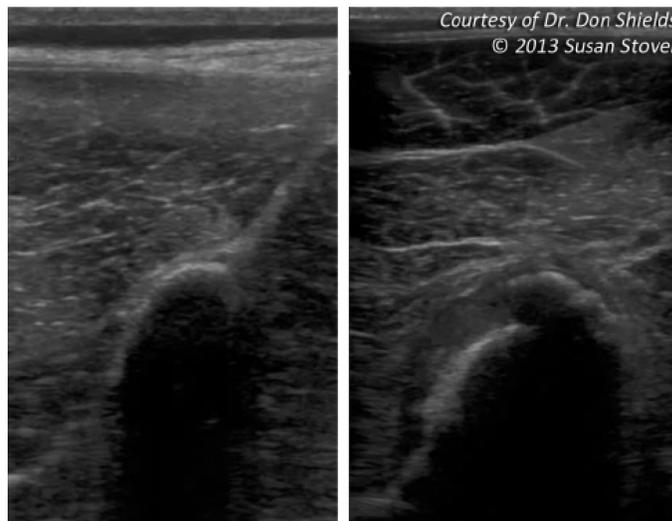


Figure 15 : Images échographiques transverses de la portion distale d'une épine scapulaire saine et de l'épine controlatérale avec une fracture de stress sur un cheval de course.

L'épine scapulaire gauche (saine) est fine, symétrique, avec une surface lisse et délimitée, alors que celle de droite (fracture de stress) est épaissie avec une surface irrégulière compatible avec un cal périosté. D'après¹⁸⁸

2.3.4. Imagerie par résonance magnétique

Les fractures incomplètes, courtes (quelques centimètres), unicorticales, condyliques et non déplacées, ainsi que la maladie ostéocondrale palmaire du boulet, peuvent constituer un réel défi diagnostique pour le vétérinaire¹⁶¹ et la radiographie n'est pas toujours suffisante ; l'imagerie par résonance magnétique (IRM) semble plus sensible que la radiographie. En effet, l'étude de 2012 de Powell révèle que 35,8 % des fractures en regard de l'articulation métacarpo/tarso-phalangienne diagnostiquées par l'IRM bas champ (Figure 16) sous sédation debout n'étaient pas identifiables par radiographie.³⁸ Dans l'étude de Ramzan et al. de 2015, 22,2 % des fractures unicorticales ne sont pas diagnostiquées par radiographie, mais le sont par IRM.³⁹ Dans l'étude de Zubrod et al. de 2004, toutes les lésions de l'os sous-chondral identifiables par IRM ne l'étaient pas par radiographie.¹⁸⁹ L'IRM haut champ (1,5 Tesla) permet une bonne évaluation du cartilage articulaire – son épaisseur et son érosion¹⁹⁰ – et des structures non cartilagineuses afin de diagnostiquer une lyse, une sclérose de l'os sous-chondral, des ostéophytes et de l'effusion synoviale.¹⁹¹ Cependant, un cheval avec suspicion de fracture de stress ne devrait pas subir une anesthésie générale sous peine de développer une fracture complète lors du réveil ; ainsi, les techniques diagnostiques sur cheval debout sont les seules qui devraient être considérées.

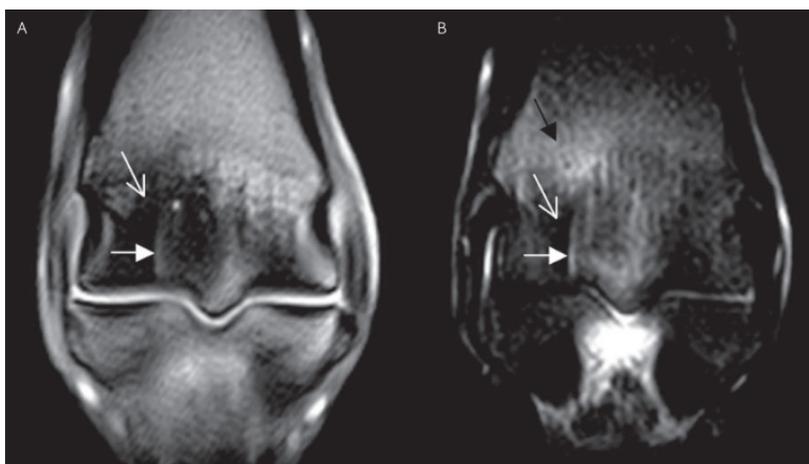


Figure 16 : Imagerie par résonance magnétique de l'articulation métacarpo-phalangienne gauche d'un cheval avec une fracture condylienne précoce incomplète.

Séquences T1 GRE (A) et STIR FSE (B) en coupe dorsale montrant une ligne hyperintense linéaire s'étendant proximale à partir du sillon parasagittal médial (flèche pleine) entourée par un signal hypointense de l'os trabéculaire présentant une densité minérale augmentée (flèche ouverte). Signal hyperintense (B) de l'os spongieux de la portion distale de l'os métacarpien III, essentiellement au niveau du condyle médial (flèche noire). D'après³⁸

Pour la maladie ostéochondrale palmaire du boulet, l'IRM et la tomodensitométrie restent des techniques de choix pour évaluer les stades précoces.^{161,192}

L'IRM debout semble être un bon outil diagnostique lorsque les autres modalités d'imagerie ne sont pas capables d'identifier l'origine de la boiterie.¹⁸⁹

2.3.5. Tomodensitométrie

Au même titre que l'IRM, la tomodensitométrie (CT-scan, *computerized tomography*) peut être complémentaire de la radiographie en détectant davantage les lésions précoces¹⁶¹ et aide à la compréhension de la configuration de la fracture,¹⁸³ notamment en pré-opératoire ; celle-ci image davantage les structures osseuses que l'IRM qui, elle, diagnostique mieux les lésions cartilagineuses et celles des tissus mous.¹⁸³ Par l'analyse de l'intensité du signal émis (faible ou élevé), le CT-scan permet notamment la détection de fractures, de microfissures (Figure 17), de lyse ou de sclérose de l'os sous-chondral. De plus, un autre avantage de cette technique est qu'elle peut se réaliser sur cheval debout. L'étude de Morgan et al. de 2006 montre que, comparée à la radiographie, la tomodensitométrie détecte mieux les fissures proximales de l'os métacarpien/tarsien III, les diminutions de densité des condyles, les fractures comminutives articulaires, ainsi que les fractures des os sésamoïdiens proximaux ; la radiographie, elle, semble mieux diagnostiquer les fractures dorso-proximales de la phalange proximale.⁴⁰ Ces résultats ne sont pas surprenants étant donné que le CT-scan supprime l'effet de superposition, problématique en radiographie. Cependant, cette technique d'imagerie présente aussi ses propres limites dans la détection des chevaux à risque de fractures condyliques.⁴¹

Dans le cas de la maladie ostéochondrale palmaire du boulet, l'étude de 2008 de Rubio-Martinez et al. a mis en évidence que l'existence de sclérose uniquement au niveau de la plaque osseuse sous-chondrale correspondait à de légères lésions de l'os sous-chondrale, alors que l'observation de sclérose également présente en regard de l'os trabéculaire était associée à des stades plus sévères.¹⁹³

A l'heure actuelle, le CT-scan pour cheval debout se développe de plus en plus. Une étude comparant la sensibilité et la spécificité du CT-scan et de l'IRM pour la détection des fractures de stress est désormais nécessaire.



Figure 17 : Tomodensitométrie transverse d'un os métacarpien III distal d'un cheval avec une fracture condylière sévère. Mise en évidence d'une discrète fissure du sillon parasagittal latéral (flèche). D'après⁴⁰

2.3.6. Scintigraphie

Contrairement à l'imagerie par résonance magnétique (haut champ) et à la tomodensitométrie, la scintigraphie ne nécessite pas d'anesthésie générale, permet de visualiser l'ensemble du squelette et détecte plus sensiblement (Figure 18) que la radiographie les lésions précoces (fractures de stress et dépôt osseux à l'origine de sclérose sur les condyles palmaires/plantaires et la face radiale de l'os carpal III).^{42,161,162,172,176,183} Cependant, cette technique est peu spécifique et consiste davantage en une déduction de la présence d'une fracture de stress lors d'une absorption radiopharmaceutique visible sur un site couramment affecté plutôt qu'à une réelle observation de la lésion. De plus, cette médecine nucléaire à base de technétium radioactif doit mettre en œuvre une certaine radioprotection réglementée, ne la rendant ainsi pas accessible à toutes les infrastructures.

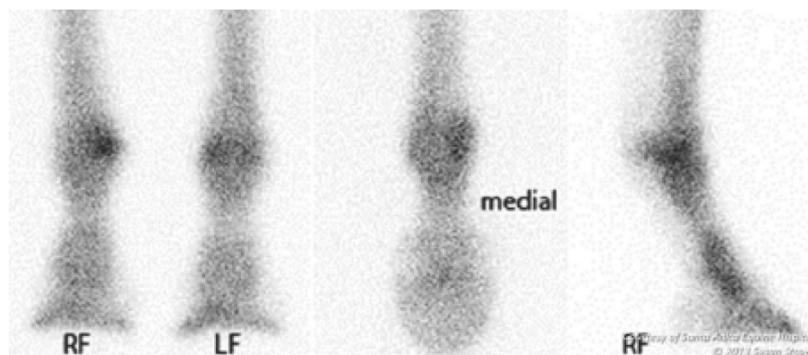


Figure 18 : Scintigraphie bilatérale de membres distaux thoraciques compatible avec un remodelage de stress. Absorption radiopharmaceutique augmentée au niveau du sésamoïde proximal médial. D'après¹⁸⁸

Pour la maladie ostéochondrale palmaire du boulet, la scintigraphie, bien que sensible, est peu spécifique. En effet, il existe de nombreux faux positifs en raison du remodelage osseux stimulé par l'exercice des chevaux de course et de la superposition des os sésamoïdiens proximaux ; des images latérales en flexion sont nécessaires pour limiter ces artefacts de superposition.¹⁷²

2.3.7. Tomographie par émission de positrons

La tomographie par émission de positrons (PET-scan, *positron emission tomography*) est une nouvelle technique d'imagerie médicale réalisée à l'aide de l'injection d'un agent radioactif dont le signal émis peut être localisé en trois dimensions.¹⁹⁴ Les images en coupe obtenues présentent une meilleure sensibilité, une meilleure résolution spatiale et une meilleure quantification des lésions par rapport à la scintigraphie.¹⁹⁴ Le PET-scan détecte à l'échelle moléculaire les altérations métaboliques physiologiques ou fonctionnelles en distinguant les lésions actives des inactives,^{194,195} alors que le CT-scan et l'IRM mettent en évidence de modifications anatomiques et structurelles de forme et de taille.¹⁹⁴

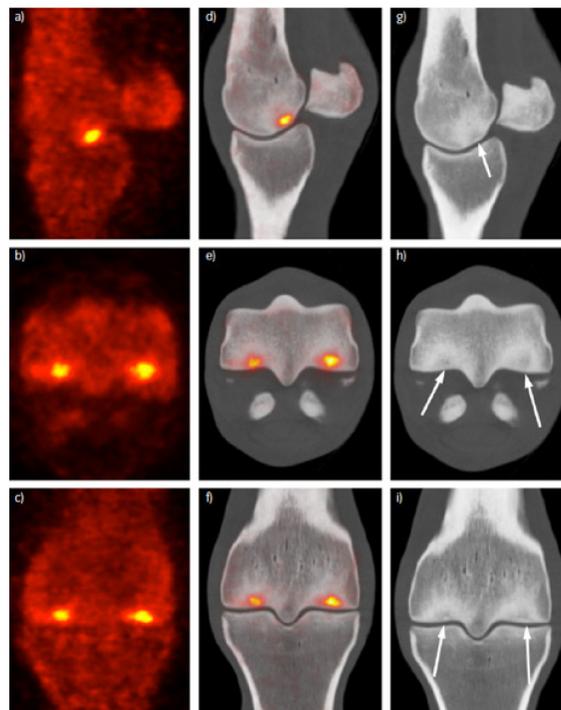


Figure 19 : PET-scan d'un condyle métacarpien palmaire distal dans un plan sagittal, transverse et dorsal. a), b), c) : images de PET-scan ¹⁸F-sodium fluoride ; d), e), f) : images de PET et CT-scan assemblées ; g), h), i) : images de CT-scan. Correspondance entre les zones de sclérose (flèches) observées au CT-scan et les zones de signal intense observées au PET-scan. D'après⁴³

Deux biomarqueurs radioactifs ont été testés chez le cheval, à savoir le ^{18}F -fluorodeoxyglucose¹⁹⁶ – marqueur inflammatoire et tumoral en humaine – et le ^{18}F -sodium fluoride^{43,195} – excellent marqueur du remodelage osseux.¹⁹⁴ Dans l'étude de 2019 de Spriet et al. sur des Thoroughbred de course, le PET-scan et son marqueur radioactif ^{18}F -sodium fluoride révélait un signal histologiquement associé à des zones focales de résorption osseuse avec une augmentation de la vascularisation et de l'activité ostéoblastique – ces zones ont également été mises en évidence au micro-CT par de la sclérose, une diminution de la densité osseuse et des cavités de résorption (Figure 19) ; de plus, ces lésions n'ont pas été détectées par le CT-scan, l'IRM et la scintigraphie.⁴³ **Le PET-scan pourrait alors représenter un outil diagnostique innovant dans la détection précoce du remodelage osseux de stress chez les chevaux de course.**

Les limites de cette technique d'imagerie restent la gestion d'un produit radioactif et l'exposition du personnel.¹⁹⁴ Néanmoins, un nouveau modèle avec un anneau ouvrable, et donc utilisable sur cheval debout, a été développé et est désormais utilisé quotidiennement depuis le 12 décembre 2019 sur les champs de course de Santa Anita Park en Californie, USA et permettant ainsi de directement évaluer avant la course si le cheval présente un risque élevé de fracture.¹⁹⁷

Le traitement des fractures de stress, qu'il soit **conservateur** ou **chirurgical**, dépend de leur localisation, de leur configuration et de leur aspect complet ou non.¹⁶¹ Par exemple, au stade de fracture incomplète de l'os métacarpien III, le pronostic de retour à l'exercice semble très bon, puisque 76 % des Thoroughbreds de course retournent à l'entraînement complet avec une médiane de 83 jours avant la reprise de l'exercice.¹⁸⁰ Le traitement des fractures de stress ne sera pas abordé dans ce manuscrit, puisque ce sujet ne relève pas de notre domaine d'étude. Une revue des différents traitements a été récemment révisé dans « *Equine Fracture Repair* ». ¹⁹⁸

Il est nécessaire de poursuivre l'**amélioration de nos connaissances sur la physiopathologie** de ce phénomène complexe que sont les **fractures de stress** afin de pouvoir **les détecter et les traiter le plus précocement possible**. Dre Susan Stover fait par ailleurs référence à la nécessité d'éduquer les propriétaires, cavaliers, entraîneurs et vétérinaires dans la description et le rapport des fractures et de leurs lésions préexistantes dans le but de les prévenir.¹⁴

3. Biomarqueurs sanguins, nouvel espoir de détection précoce de lésions osseuses

Les signes cliniques précoces des fractures de stress chez les chevaux de course sont imperceptibles par les entraîneurs et les lésions de fatigue osseuse ne sont visualisables par imagerie que lors de stades déjà avancés,¹⁹⁹ les microlésions débutantes ne pouvant être diagnostiquées par les outils d'imagerie conventionnellement utilisés par le vétérinaire en raison de leur taille microscopique.^{41,179} Il est donc **nécessaire d'établir un outil diagnostique de détection précoce** de ces lésions afin de **prévenir leur progression** aboutissant à des **blessures catastrophiques** pour les chevaux de course. **Les biomarqueurs sanguins de résorption osseuse excessive représentent ce nouvel espoir diagnostique.** En effet, en raison de la courte durée de vie des ostéoclastes – 16 jours⁴⁶ – la mesure d'un biomarqueur d'activité ostéoclastique semble idéale pour refléter la résorption en temps réel. **En mesurant régulièrement ce biomarqueur,** il serait possible d'**adapter précocement l'entraînement des chevaux de course** et ainsi **éviter l'apparition d'une fracture fatale.**

3.1. Notion de biomarqueur

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, un biomarqueur se définit comme « toute substance, structure, processus ou bien les produits de celui-ci pouvant être mesuré(s) dans le corps, et pouvant influencer ou prédire l'incidence d'une maladie ou de son issue ».²⁰⁰

Les biomarqueurs peuvent se classifier en différentes catégories, à savoir anatomique, physiologique, biochimique ou moléculaire ; leur détection peut se faire par plusieurs méthodes telles que l'examen clinique, l'imagerie ou les analyses de laboratoire.¹⁹⁹ Il est également possible de les distinguer en « *dry biomarker* », c'est-à-dire en éléments observés par imagerie, ou en « *wet biomarker* », c'est-à-dire en éléments génétique ou biochimiques solubles et mesurables dans les tissus, ainsi que dans les fluides biologiques tels que les urines, le liquide synovial, le sérum et le sang.^{199,201} Un groupe de travail sur les biomarqueurs propose également différentes définitions selon le rôle du biomarqueur, à savoir les biomarqueurs diagnostiques, de suivi, pharmacodynamiques, prédictifs, pronostics, de sécurité et de risque.²⁰²

Les biomarqueurs sanguins présentent l'avantage d'être facilement prélevables chez le cheval (simple prise de sang) et constituent un nouvel espoir de détection précoce des lésions

osseuses sous-chondrales là où d'autres biomarqueurs – notamment les biomarqueurs anatomiques évalués par imagerie – ont échoué.

3.2. Les biomarqueurs sanguins de la résorption osseuse ostéoclastique

En espèce humaine, plusieurs biomarqueurs sanguins du remodelage osseux ont été identifiés. Les biomarqueurs de formation osseuse sont l'ostéocalcine, le propeptide C-terminal du procollagène de type I (PICP) et l'enzyme phosphatase alcaline osseuse (BAP).^{203,204} Notre étude se concentre sur les biomarqueurs sanguins de la résorption osseuse ostéoclastique qui sont représentés par les enzymes sécrétées par l'ostéoclaste, telles que la cathepsine K ou la TRACP-5b, ainsi que par les produits issus de la dégradation du collagène osseux de type I suite à l'action de ces enzymes, à savoir le télopeptide carboxy-terminal du collagène de type I (ICTP), le télopeptide C-terminal du collagène de type I (CTX-I), le télopeptide N-terminal du collagène de type I (NTX-I), la déoxypyridinoline (DPD) et la pyridinoline (PYD) (Figure 20).^{203,204}

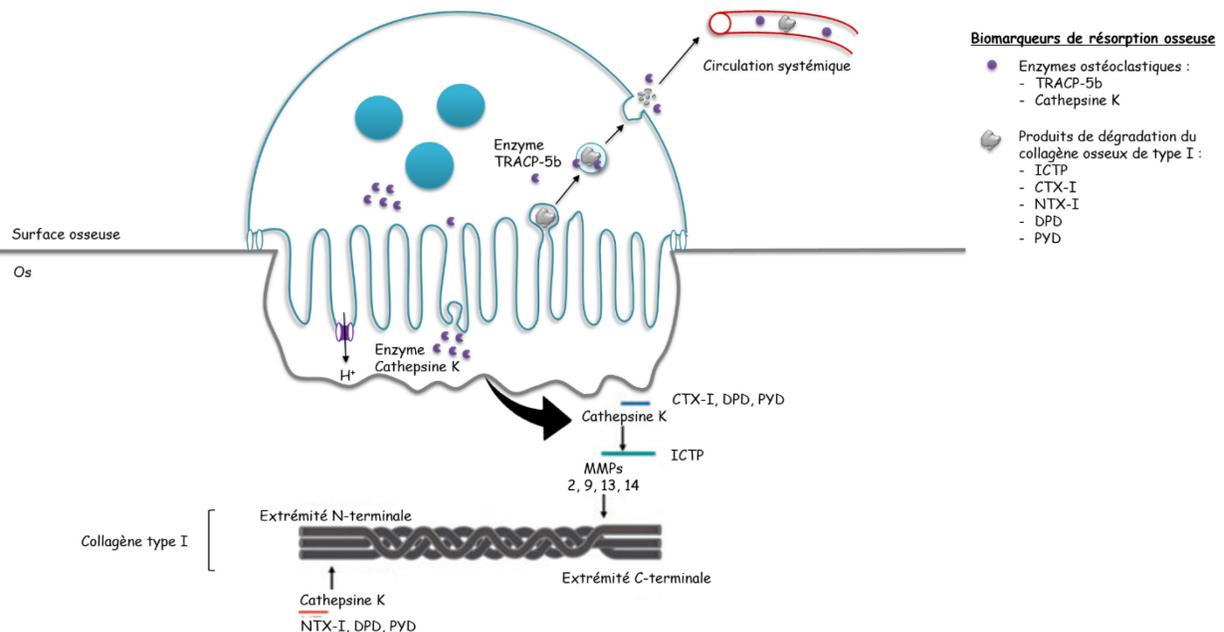


Figure 20 : Représentation schématique des biomarqueurs sanguins de la résorption osseuse.

La TRACP-5b et la cathepsine K dégradent la matrice osseuse organique alors que les ions H^+ altèrent la matrice inorganique. La cathepsine K clive l'extrémité N-terminale du collagène de type I et génère ainsi le NTX-I, le DPD et le PYD. Les MMPs clivent l'extrémité C-terminale du collagène de type I, libérant ainsi l'ICTP qui est ensuite clivé par la cathepsine K générant à son tour le CTX-I, le DPD et le PYD. D'après²⁰³⁻²⁰⁵

3.2.1. Le CTX-I, produit issu de la dégradation du collagène osseux de type I

Le CTX-I est synthétisé suite à l'action de la cathepsine K, enzyme principalement exprimée par les ostéoclastes²⁰⁶⁻²⁰⁸ et appartenant à la famille des cystéines protéases.^{51,209} Des études d'immunohistochimie réalisées chez des chevaux et poneys ont révélé que la cathepsine K est exprimée par les ostéoclastes^{26,80,82,210} et par les cellules mononuclées précurseurs d'ostéoclastes,⁸⁰ mais également, dans une moindre mesure, par les ostéoblastes.⁸² Cette enzyme est un marqueur du nombre d'ostéoclastes²¹¹ et de résorption osseuse^{51,212-214} qui clive en effet le collagène de type I de l'os au niveau de différents sites des extrémités C-terminale et N-terminale.⁵¹ Elle libère alors deux biomarqueurs de dégradation du collagène retrouvés dans le plasma et l'urine : le CTX-I⁵² et le NTX-I²¹⁵ (Figure 20).

En espèce humaine, des kits ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, *enzyme-linked immunosorbent assay*) sur sérum ou urines ont récemment été développés pour mesurer l'enzyme cathepsine K^{216,217} ou bien les produits issus du clivage qu'elle réalise – à savoir le CTX-I,^{51,52,58,218-220} le NTX-I,^{51,215} la DPD²²¹ et la PYD ;²²² l'ICTP peut être évalué par dosage radio-immunologique.^{52,223} Certains kits ELISA semblent avoir été validés en espèce équine pour le dosage du CTX-I^{69,73} et plusieurs études ont ensuite utilisé ces kits pour leurs études sur des chevaux (Tableau VI).^{68,71,224}

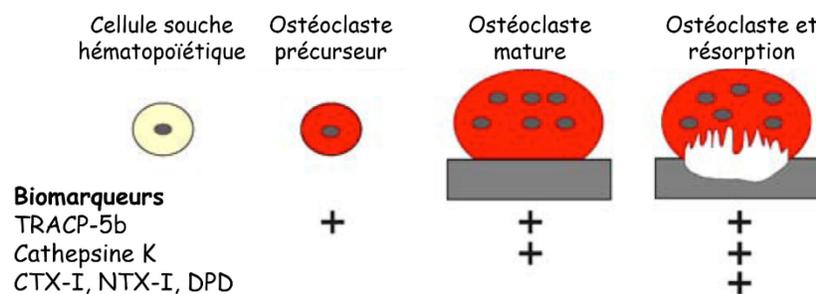
3.2.2. Les isoenzymes TRACP-5a et TRACP-5b

L'enzyme TRAP existe sous deux isoformes : l'enzyme TRACP-5a et l'enzyme TRACP-5b. L'enzyme TRACP-5b est uniquement sécrétée par les ostéoclastes, alors que l'enzyme TRACP-5a est exprimée par les cellules de la lignée myéloïde (notamment les macrophages et les cellules dendritiques) et est un biomarqueur d'inflammation.^{62,77} Une étude récente employant des ELISA sur sérum a montré que ces deux isoformes étaient corrélées entre elles et au marqueur de résorption CTX-I chez des hommes en bonne santé et que les ostéoclastes ont la capacité de sécréter les deux isoformes.²²⁵

L'enzyme TRACP-5b est considérée comme un biomarqueur de résorption osseuse^{61,62,65-67} et du nombre d'ostéoclastes,^{53,59-63} puisqu'elle dégrade davantage les produits issus de la résorption.^{53,55}

En espèce humaine, des kits ELISA mesurant spécifiquement l'enzyme TRACP-5b à partir de sérum ont été développés afin de mesurer la sévérité de résorption osseuse dans les affections articulaires.^{59,60,216,223,225-232} De plus, un kit ELISA pour la TRACP-5b équin est désormais disponible sur le marché, mais son utilisation clinique n'a pas encore été validée.²³³ À ce jour, aucune étude de culture d'ostéoclastes équins n'a mesuré la TRACP-5b, mais une étude a analysé l'enzyme non spécifique TRAP dans le sérum de chevaux et a mis en évidence une augmentation durant les premiers mois de vie de poulains à l'exercice ou au repos au box par rapport aux poulains laissés aux paddocks.⁷⁶

Si les enzymes TRACP-5b et cathepsine K sont deux biomarqueurs de résorption ostéoclastique, ils n'interviennent pas au même stade (Figure 21) : la TRACP-5b est essentiellement exprimée au début de la différenciation de l'ostéoclaste, alors que la cathepsine K agit principalement lorsque l'ostéoclaste est différencié. Les biomarqueurs NTX-I, CTX-I et DPD, eux, sont détectables uniquement lorsque la résorption est active.²¹¹



*Figure 21 : Synthèse des biomarqueurs TRACP-5b, cathepsine K, CTX-I, NTX-I et DPD selon le stade de différenciation ostéoclastique.
D'après²¹¹*

3.3. Les biomarqueurs sanguins du remodelage osseux dans la détection précoce des lésions osseuses sous-chondrales équines

Plusieurs auteurs ont étudié certains de ces biomarqueurs humains chez les chevaux avec différents objectifs, à savoir l'effet de l'exercice sur la croissance, la détection de lésions ostéochondrales, de lésions articulaires, de fractures de stress ou de fractures complètes. Dans l'étude de Billinghamurst et al. de 2003, le CTX-I présentait une augmentation à 1 mois et 2 mois d'âge pour les poulains à l'exercice contrairement à ceux qui étaient au repos, soulignant ainsi l'effet négatif de l'exercice sur le remodelage osseux chez de jeunes chevaux en croissance.⁶⁸ Dans la suite de ce manuscrit, nous nous concentrerons sur les études évaluant la détection de lésions

osseuses sous-chondrales chez des chevaux à l'exercice (Tableau VI). Si certaines analyses montrent des résultats prometteurs – notamment pour le CTX-I,^{45,70} l'ostéocalcine,^{70,234} l'ICTP²³⁴ – ces conclusions restent controversées.⁷² Bien que mesurables dans le sang, à ce jour, ces biomarqueurs ne présentent pas de corrélation assez évidente pour constituer un outil diagnostique ou pronostique fiable des lésions osseuses sous-chondrales équinées.

Tableau VI : Les différents biomarqueurs sanguins de la résorption osseuse dans la détection précoce des lésions osseuses sous-chondrales chez les chevaux à l'exercice.

Biomarqueur	Biomarqueur significatif	Maladie orthopédique	Référence
CTX-I	Non	Fracture	72
	Oui (pic 6 mois avant blessure)	Fracture de stress (tibia)	70
	Oui (pic 3-4 mois et 7 mois avant blessure)	Maladie dorsale métacarpienne	70
	Oui (concentration plus élevée pour le groupe avec lésions que pour les contrôles)	Fracture, maladie dorsale métacarpienne, lésion articulaire, tendinite	45
ICTP	Non	Fracture	72
	Oui (début entraînement)	Maladie dorsale métacarpienne	234

De plus, en 2018 et 2019, Stefanuik-Szmukier et al. ont réalisé des études transcriptomiques (profils de séquençage de l'acide ribonucléique (ARN)) à partir de prises de sang de chevaux de course ; l'une des voies homéostatiques osseuses les plus dérégées était celle de la différenciation ostéoclastique, notamment le gène *CTSK* codant pour la cathepsine K.⁴⁹ Cette enzyme pourrait donc être partiellement responsable du déséquilibre du remodelage osseux,⁴⁸ d'autant plus que l'expression de ces gènes impliqués dans la résorption osseuse était augmentée lors d'exercice particulièrement intense en début de carrière.⁴⁷ Ces études soulignent l'implication des ostéoclastes – et plus particulièrement de la cathepsine K – dans l'apparition des fractures de stress chez les chevaux de course renforcent l'idée que la cathepsine K présente un potentiel intéressant en tant que biomarqueur de la détection précoce de ces lésions. De plus, le développement de nouvelles techniques telles que la protéomique (étude de l'ensemble des protéines en présence à un instant donné) pourrait dans le futur permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs de la résorption ostéoclastique excessive en analysant le surnageant de cultures *in vitro* d'ostéoclastes.

Ainsi, les **enzymes de résorption de la matière organique osseuse** telles que l'enzyme **TRACP-5b** et les **produits de dégradation du collagène osseux de type I** tels que le **CTX-I** pourraient constituer des biomarqueurs de l'activité ostéoclastique permettant de refléter le stade de dégradation actuel de l'os sous-chondral.

4. Culture *in vitro* d'ostéoclastes

Comme précédemment exposé en *section 2.* de ce manuscrit, les outils d'imagerie actuels mis à disposition du vétérinaire ne lui permettent pas de diagnostiquer précocement les fractures de stress chez les chevaux. Notre intérêt s'est alors tourné vers les ostéoclastes, cellule de l'organisme essentielle à la résorption de la matrice osseuse. En effet, la **culture d'ostéoclastes est une première étape à la fois vers l'amélioration de nos connaissances sur l'implication de cette cellule dans la physiopathologie des microfractures**, mais aussi vers l'espoir que **l'ostéoclaste pourrait être à l'origine de biomarqueurs d'une résorption osseuse en temps réel** et ainsi constituer un **outil diagnostique précoce**. Ainsi, après prélèvement et isolement d'ostéoclastes précurseurs, ensemencement et différenciation en ostéoclastes actifs, les cultures *in vitro* d'ostéoclastes permettent l'étude de leur fonction en les comptabilisant, en mesurant leur résorption osseuse sur des sections de dentine ou d'os, en analysant leurs biomarqueurs présents dans le surnageant de culture à l'aide de tests ELISA, ainsi qu'en employant d'autres techniques non développées dans ce manuscrit puisque non utilisées dans notre étude, telles que l'analyse protéomique ou l'étude de l'expression de protéines, d'ARN ou d'ADN, notamment par immunohistochimie, PCR, électrophorèse, Western blot, Northern blot ou Southern blot.

Plusieurs études se sont déjà intéressées à la culture *in vitro* d'ostéoclastes équins.⁷⁸⁻⁸² Certains ont également cultivé des ostéoclastes humains²³² ou de volailles²³⁵ sur des os équins, mais, à la connaissance des auteurs, aucun protocole n'est rapporté concernant la culture d'ostéoclastes équins *in vitro* sur des sections osseuses équines.

4.1. Prélèvements d'ostéoclastes matures ou de cellules souches hématopoïétiques

4.1.1. Prélèvement des ostéoclastes matures

Depuis les premières études de Boyde et al. en 1984,²³⁶ la culture d'ostéoclastes *in vitro* a beaucoup évolué au cours des quarante dernières années. Initialement directement isolés de l'os à leur stade de cellule mature, les ostéoclastes sont désormais différenciés *in vitro* après prélèvement et isolation des précurseurs ostéoclastiques.¹⁰³

Historiquement, les ostéoclastes matures étaient isolés par fragmentation d'os longs de rats nouveau-nés, puis curetage de leur surface endostéale.^{103,237} Une autre technique consistait à donner à de jeunes poulets une alimentation pauvre en calcium pendant sept jours afin de stimuler l'ostéoclastogénèse, puis de prélever par fragmentation d'os longs des cultures primaires d'ostéoclastes différenciés *in vivo*.^{103,238} Des ostéoclastes matures étaient également obtenus après isolement à partir d'os longs de lapins nouveau-nés et purification à l'aide de lavages au tampon phosphate salin (PBS, *phosphate-buffered saline*) ou d'une solution pronase-EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique), fournissant ainsi des cultures d'ostéoclastes pures à plus de 95 %.^{103,237}

Cependant, il est difficile d'obtenir avec ces méthodes une culture pure d'ostéoclastes en grand nombre⁷⁹ et les prélèvements nécessitent l'euthanasie de nombreux animaux ; c'est pourquoi de nouvelles techniques ont été développées à partir de précurseurs ostéoclastiques. Désormais, après récolte de moelle osseuse, il est nécessaire d'isoler les cellules souches hématopoïétiques avant de les congeler et/ou de les ensemercer pour obtenir des ostéoclastes après différenciation.

4.1.2. Prélèvement des cellules souches hématopoïétiques

La moelle osseuse et le sang périphérique renferment des ostéoclastes précurseurs – soient les cellules souches hématopoïétiques – qui, mis en culture, ont la capacité de se différencier en ostéoclastes. Ces précurseurs se situent majoritairement dans la moelle osseuse rouge qui est spécifiquement localisée, chez les adultes, au niveau de l'os trabéculaire du sternum et de la crête iliaque, faisant de ces os le lieu privilégié de récolte de moelle osseuse pour la culture d'ostéoclastes *in vitro*. Une étude de 2000 de Gray et al. sur des fémurs équins s'est assurée de la similitude de certaines caractéristiques entre les ostéoclastes matures et ceux obtenus à partir de précurseurs de moelle osseuse, notamment la multinucléation, l'expression de l'enzyme TRAP et du récepteur à la vitronectine, ainsi que leurs capacités de résorption osseuse sur des sections de dentine.⁷⁹

4.1.2.1. Prélèvement de moelle osseuse

Les prélèvements de moelle osseuse équine pour ses cellules souches hématopoïétiques sont rares dans la littérature. Gray et al. décrivent en premier lieu une technique de fragmentation de fémurs de jeunes chevaux euthanasiés suivi d'un curetage de la surface interne de la cavité médullaire.⁷⁸⁻⁸¹ Cette méthode complexe a plus récemment été remplacée par une aspiration de

moelle osseuse de sternums équins adultes sous sédation.^{82,239} Cette technique peu invasive est décrite dans de nombreux articles,²⁴⁰⁻²⁴³ elle semble mieux adaptée puisqu'elle présente l'avantage d'être réalisable sur cheval vivant et d'être facilement répétable.

4.1.2.2. Prélèvement de sang périphérique

Si la moelle osseuse représente ce que les scientifiques nomment « la niche principale » des cellules souches hématopoïétiques, quelques-unes de ces cellules circulent à travers le corps et ont été localisées au niveau du sang périphérique lors d'un processus appelé « mobilisation ».²⁴⁴⁻²⁴⁷ La culture d'ostéoclastes à partir de sang périphérique présente certains avantages, à savoir que le prélèvement sanguin s'obtient facilement et que l'étude des effets d'autres types cellulaires présents dans le sang (ex : granulocytes, lymphocytes T) ou de facteurs humoraux est possible. Néanmoins, il semblerait que la quantité de précurseurs d'ostéoclastes soit moindre comparativement à celle de la moelle osseuse, impliquant ainsi un nombre de patients, un volume de prélèvements (classiquement 40 à 50 mL de sang total), ainsi qu'une durée de culture supérieurs (trois semaines contre une à deux semaines).^{248,249} À ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur le sang périphérique de chevaux.

4.1.2.3. Autres méthodes de prélèvement

D'autres techniques de culture *in vitro* utilisent une lignée cellulaire pré-ostéoclastique de macrophages murins (RAW 264.7) capables de répondre à la stimulation du M-CSF et du RANKL et donc de se différencier en ostéoclastes. Ces cellules ont l'avantage d'être très facilement accessibles (commercialisées par de nombreuses compagnies), d'être très homogènes en termes de type de précurseurs dans le but d'obtenir exclusivement des ostéoclastes (ex : absence de cellules stromales, d'ostéoblastes ou de lymphocytes), d'exprimer le récepteur c-fms du M-CSF et le M-CSF lui-même stimulant ainsi l'expression de RANK en grande quantité, de produire rapidement et en grand nombre des ostéoclastes sous l'action de RANKL, ainsi que de posséder une grande capacité de résorption osseuse.^{103,250} En 2016, Boraschi et Komarova ont montré que les ostéoclastes pouvaient également s'obtenir à partir de précurseurs spléniques de souris.²⁵¹

4.2. Isolement des cellules souches hématopoïétiques

Une fois la moelle osseuse prélevée, il est nécessaire d'isoler les cellules souches hématopoïétiques. Pour ce faire, il existe de nombreuses techniques et à ce jour, aucun consensus n'existe concernant un protocole optimal permettant d'isoler le maximum de précurseurs. Le protocole d'isolation est primordial puisque la fonctionnalité des cellules souches hématopoïétique peut être altérée²⁵² à la suite d'une contamination érythrocytaire ou par des cellules apoptotiques, une vitesse de centrifugation ou des lavages inappropriés.²⁵³

4.2.1. Les gradients de densité

L'isolement par gradient de densité est l'une des méthodes les plus couramment utilisées. La moelle osseuse est déposée sur un gradient de densité – classiquement du Ficoll® ou du Percoll® – qui est une solution de haute densité, de faible viscosité et de faible osmolarité. Après centrifugation, cette solution sépare les cellules en trois couches. Les érythrocytes sédimentent au fond du tube sous le gradient de densité, alors que le plasma reste en haut. Les cellules mononuclées sont alors maintenues entre le plasma et le gradient de densité ; elles sont composées de cellules matures telles que les lymphocytes T et B et les monocytes, mais aussi de rares progéniteurs, à savoir les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules progénitrices endothéliales et les très petites cellules de type embryonnaires.²⁵³⁻²⁵⁵ Une autre technique consiste à utiliser du Lymphoprep®, un mélange de métrizoate de sodium et de Ficoll®.^{252,255,256}

4.2.2. Les marqueurs de surface

Les antigènes ou marqueurs de surface présents sur les cellules souches hématopoïétiques peuvent servir à les isoler. Les antigènes principaux seraient CD1a, CD11b, CD11c, CD14, CD18, CD31, CD34, CD45, CD117 et CD133,^{244,253,257-260} même si une grande hétérogénéité de ces cellules est rapportée²⁶¹ et que leur spécificité est encore controversée. De plus, le phénotype des ostéoclastes évolue selon s'ils sont au stade de précurseurs, inactivés, ou bien matures.²⁴⁴ Les techniques d'isolement immunologiques sont le tri cellulaire activé par fluorescence (FACS, *fluorescence activated cell sorting*)^{257,262-264} et le tri cellulaire activé par magnétisation (MACS, *magnetic activated cell sorting*).^{257,265-267}

4.2.3. La lyse érythrocytaire

Une autre technique d'isolation consiste à ajouter au prélèvement de moelle osseuse une solution de lyse de globules rouges à base de chlorure d'ammonium habituellement utilisée pour isoler les globules blancs lors d'une analyse sanguine.²⁶⁸ Les études sur la moelle osseuse humaine de Horn et al. en 2008 et de Genuardi et al. en 2018 ont montré que la lyse érythrocytaire permettait d'isoler un nombre plus important de cellules mononuclées par rapport au Ficoll® ; de plus, ce protocole présente l'avantage d'être plus rapide et plus répétable.^{268,269} Si cette méthode entraîne la lyse de 90 % des cellules érythrocytaires de moelle osseuse de rats, elle entraîne également la perte de 35 % de cellules CD45+, marqueur des leucocytes – notamment des cellules souches hématopoïétiques ; de plus, sur de la moelle osseuse humaine, cette même étude montre une diminution significative des érythrocytes avec la lyse, mais néanmoins significativement moins importante qu'avec la technique immuno-magnétique.²⁵³

4.2.4. L'adhérence au plastique

Les cellules souches hématopoïétiques se distinguent des cellules souches mésenchymateuses (précurseurs entre autres des lignées ostéogénique, chondrogénique et adipocytaire) par leur incapacité à adhérer au plastique.^{270,271} Ainsi, après centrifugation de la moelle osseuse, certains protocoles mettent la suspension cellulaire obtenue en pré-culture dans des flasques de 75 cm² pendant quatre à six heures ou bien pendant toute une nuit, puis récoltent et ensemencent le surnageant composé de cellules non-adhérentes mononuclées.^{78-82,251} Les études rapportées de cultures d'ostéoclastes équins *in vitro* ont utilisé la méthode d'adhérence cellulaire⁷⁸⁻⁸² ou bien un système de séparateur gravitationnel^{239,272} pour isoler les cellules souches hématopoïétiques.

4.3. Cryoconservation des cellules souches hématopoïétiques

Une fois isolées, les précurseurs ostéoclastiques peuvent être soit immédiatement ensemencés, soit être conservés dans une banque de cellules. En 2016, une étude de Boraschi-Diaz et Komarova a développé un protocole de cryoconservation des cellules mononuclées qui, après décongélation, présentent une perte cellulaire de 70 à 80 % après une semaine de conservation, puis de 2 à 5 % supplémentaire par semaine de congélation additionnelle ; après ensemencement,

ce protocole a permis d'obtenir des ostéoclastes jusqu'à cinq semaines après le début de la congélation.²⁵¹

4.4. Ensemencement des cellules souches hématopoïétiques

Selon les publications, les précurseurs ostéoclastiques sont ensemencés à différentes densités variant entre 4 et 5×10^4 cellules/cm².^{103,251} D'autres auteurs travaillant sur la moelle osseuse équine ont procédé à l'ensemencement de 2,25 à $2,5 \times 10^6$ cellules/cm².⁷⁸⁻⁸² Des sections osseuses ou de dentine sont parfois ajoutés dans le milieu de culture afin d'évaluer la résorption osseuse ostéoclastique.^{78,79,81,232,235}

4.5. Différenciation en ostéoclastes

La découverte des cytokines M-CSF et RANKL responsables de la différenciation des précurseurs ostéoclastiques a révolutionné la culture *in vitro* des ostéoclastes. Ainsi, le milieu de culture ajouté aux cellules souches hématopoïétiques est désormais systématiquement additionné de M-CSF et de RANKL provenant d'humains ou de souris avec pour concentrations respectives 25 à 50 ng/mL et 10 à 120 ng/mL ; des antibiotiques sont également ajoutés (0,1 % de pénicilline et streptomycine), ainsi que du sérum foetal bovin (10 %).¹⁰³ Les cellules sont incubées à 5 % de CO₂ et à 37°C pendant quatre à quatorze jours et le milieu de culture est renouvelé aux deux jours ou deux fois par semaine selon les auteurs.^{79-82,103,239,244,251,273} En 2016, Boraschi-Diaz et Komarova ont défini les conditions optimales pour la culture *in vitro* d'ostéoclastes issus de moelle osseuse de souris : le milieu de culture est additionné de 50 ng/mL de M-CSF et de 50 ng/mL de RANKL, puis changé tous les deux à trois jours et la culture arrêtée après cinq jours.²⁵¹

4.6. Caractérisation des ostéoclastes

4.6.1. Comptage des ostéoclastes

Pour pouvoir identifier et compter les ostéoclastes, des techniques d'histoenzymologie et d'immunohistochimie sont disponibles. La coloration TRAP est une technique d'histoenzymologie mettant en évidence l'enzyme du même nom dans le cytoplasme des ostéoclastes.^{78-82,103,251} Les cellules sont TRAP-positives lorsqu'elles se colorent en rose-violet (Figure 22).

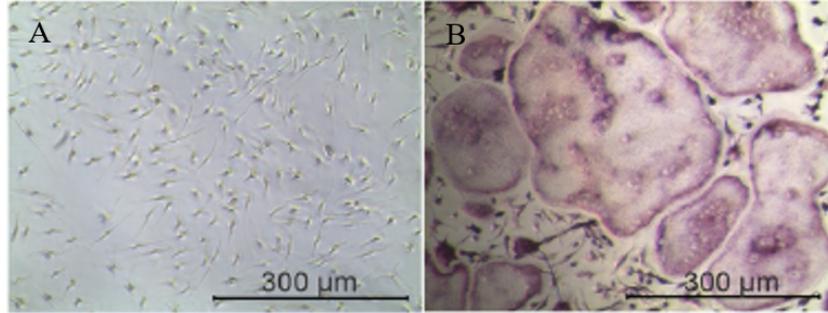


Figure 22 : Ostéoclastes mis en évidence par coloration TRAP.

Culture in vitro de précurseurs ostéoclastiques issus de moelle osseuse de souris avec (A) ou sans (B) RANKL (50 ng/mL) pendant 3 à 9 jours. Les ostéoclastes (B) deviennent roses-violet après coloration au TRAP, contrairement aux précurseurs (A). D'après²⁵¹

Cette coloration n'est cependant pas exclusive aux ostéoclastes matures (Tableau VII) ; néanmoins, ces autres types cellulaires sont souvent associées à des affections hématologiques ou à un processus néoplasique malin.²⁷⁴ Les cellules TRAP-positives et présentant au moins trois noyaux (mis en évidence par contre-coloration à l'hématoxyline) sont alors considérées comme des ostéoclastes matures.^{78,81,82,103,251,273}

Plusieurs immunohistochimies sont également décrites pour mettre en évidence d'autres protéines associées aux ostéoclastes, à savoir l'immunohistochimie anti-RANK²⁷⁵, anti-CTR^{275,276} et anti-Cathepsine K.^{26,80,82}

4.6.2. Quantification de la résorption osseuse ostéoclastique

Si les ostéoclastes partagent avec les monocytes et macrophages – plus particulièrement avec les macrophages polycaryoniques issus de leur fusion lors de réactions inflammatoires – de nombreuses caractéristiques structurales (cellule géante multinuclée, bordure en brosse, zone d'attachement), fonctionnelles (synthèse d'enzymes similaires) et immunophénotypiques (antigènes similaires à leur surface), ils sont néanmoins les seuls à pouvoir résorber l'os, constituant ainsi un type cellulaire phagocytaire unique et hautement spécialisé (Tableau VII).²⁷⁷

Ainsi, après retrait des cellules adhérentes à l'aide d'un coton-tige, d'un papier absorbant, de javel 50 %¹⁰³ ou d'ultrasonication,²⁷⁸ les lacunes osseuses peuvent être mises en évidence par le bleu de toluidine (Figure 23) ;^{78,79,81,103,278} il est ensuite possible de quantifier la résorption en analysant le nombre de lacunes ou l'aire de résorption par microscope optique^{103,232,278} ou par microscope électronique à balayage.^{279,280}

Tableau VII : Critères spécifiques ou associés aux ostéoclastes.

D'après ²⁷⁷

Critères	Spécifique aux ostéoclastes	Associé aux ostéoclastes mais non spécifique
Morphologie	X	- Multinucléation, localisation au niveau de zones de résorption (microscope optique) - Bordure en brosse, zone d'attachement (microscope électronique à transmission)
Histochimie enzymatique	X	- TRAP - Phosphatase trinuéotides tartrate-résistante - Anhydrase carbonique II - Cathepsine K
Immuno-histochimie	- CTR (récepteur à la calcitonine)	- Gamme restreinte d'antigènes associés aux leucocytes/macrophages (ex : positif pour CD13, CD15, CD45, CD68, CD51, VNR et négatif pour CD11/18, CD14, HLA-DR, Fc, C3b)
Fonction	- Anneau d'actine F - Réponse/liaison à la calcitonine - Lacunes de résorption osseuse	X

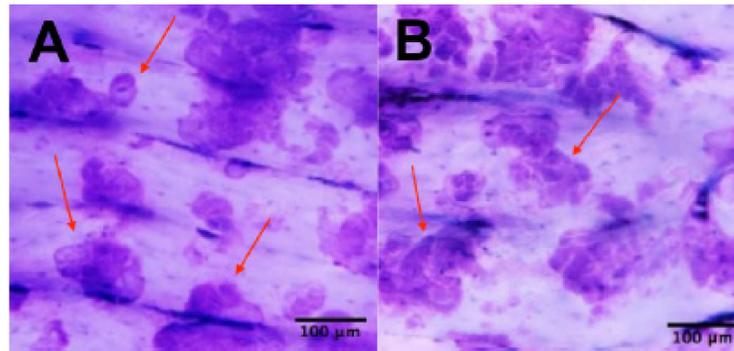


Figure 23 : Travées de résorption osseuse mises en évidence par coloration bleu de toluidine.

Culture *in vitro* de précurseurs ostéoclastiques sur des sections de dentine pendant 10 jours. Les travées de résorption deviennent bleues foncées après coloration au bleu de toluidine (A et B). D'après²⁷⁸ adapté de²⁸¹

Les cultures d'ostéoclastes *in vitro* représentent un réel défi en raison de la complexité et de la singularité de ces cellules, ainsi que de l'hétérogénéité des cellules souches hématopoïétiques et de leurs nombreux sous-types cellulaires.²⁶¹ Il est à ce jour primordial de standardiser et d'optimiser au mieux les protocoles de culture cellulaire afin de limiter toute variabilité.

HYPOTHESES

ET

OBJECTIFS

L'objectif de notre travail sur le long terme est d'identifier puis de développer une méthode de mesure *in vivo* de biomarqueur(s) sanguin(s) spécifique(s) afin de détecter précocement la résorption osseuse ostéoclastique excessive, adapter l'entraînement des chevaux de course, et ainsi éviter ces fractures de stress.

L'objectif de cette première étude se focalise sur l'établissement d'un protocole de culture *in vitro* d'ostéoclastes équins, avec ou sans os équin, afin d'investiguer l'activité ostéoclastique équine et ses biomarqueurs spécifiques. Plus précisément, les objectifs seront de 1) différencier des cellules souches hématopoïétiques issues d'aspiration de moelle osseuse sternale de chevaux debout en ostéoclastes à l'aide d'une technique de lyse érythrocytaire, 2) corrélérer le nombre d'ostéoclastes avec le biomarqueur TRACP-5b issus de puits de culture, 3) mesurer le pourcentage de résorption osseuse des ostéoclastes mis en cultures sur des os équins et de le corrélérer avec les biomarqueurs CTX-I et TRACP-5b libérés dans le milieu de culture et 4) analyser les effets de facteurs inflammatoires sur l'activité ostéoclastique lors de cultures d'ostéoclastes.

Notre hypothèse est que les cultures *in vitro* d'ostéoclastes équins permettent l'étude de l'activité ostéoclastique à l'aide de la mesure du nombre d'ostéoclastes et du pourcentage de résorption osseuse, permettant ainsi de mettre en évidence que le CTX-I et la TRACP-5b sont des biomarqueurs fiables de la biologie ostéoclastique équine. De plus, nous émettons également l'hypothèse que l'inflammation *in vitro* stimule l'activité ostéoclastique.

CHAPITRE 2

ARTICLE

Development of an *in vitro* assay to validate existing and novel equine osteoclastic activity biomarkers for catastrophic fracture prevention in racehorses

Gwladys Malek¹, Hélène Richard¹, Guy Beauchamp¹, Sheila Laverty¹

¹Comparative Orthopedic Research laboratory, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada

Correspondence: Sheila Laverty, MVB, DACVS, DECVS, FIOR, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, QC, J2S 2M2, Canada.

Email: sheila.laverty@umontreal.ca

Keywords: Osteoclast, horse, racehorse, stress fracture, bone resorption, bone biomarker, CTX-I, TRACP-5b

Acknowledgement: The authors are grateful to Dr Svetlana V. Komarova and Gulzhakhan Sadvakassova, Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal, for their advice for the development of the osteoclast cultures. The authors also thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Quebec Cell, Tissue and Gene Therapy Network (Th  Cell, a thematic network supported by the Fonds de recherche du Québec-Santé) for their financial support.

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interest.

Author contributions: G. Malek, S. Laverty and H. Richard contributed to the study design. The specimen collection was conducted by G. Malek and H. Richard. The analysis and interpretation were done by G. Malek, S. Laverty and H. Richard, statistics were performed by G. Beauchamp and G. Malek. The manuscript was prepared by G. Malek, S. Laverty and H. Richard. The final manuscript was approved by all authors.

Owner informed consent: Most of horses employed in the study were from a research herd. Some client horses were also employed following consent.

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Ethical animal research: The investigation was approved by the Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal (protocol #20-Rech-1968).

Previous presentation or publication disclosure: This study has not been submitted for any previous presentation or publication.

ABSTRACT

Background: Every year racehorses die from complete catastrophic fractures in training and racing. Supra-physiological cyclic loads during exercise cause bone microcracks not discernible with current imaging *in vivo*. Osteoclasts recruited induce focal bone lysis and osteopenia by excessive resorption, creating a stress riser area susceptible to complete fracture. However, the biological impact of osteoclasts in stress fractures is not entirely understood.

Objectives: Our objectives were to 1) establish equine osteoclast *in vitro* cultures, 2) correlate the osteoclast number with the tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP-5b) and the bone resorption with C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I) and TRACP-5b and 3) study the effects of inflammatory factors on osteoclast activity.

Study design: *In vitro* experimental study.

Methods: Following standing equine sternal bone marrow aspirations, hematopoietic stem cells were isolated, stored in a cell bank, thawed and differentiated into osteoclasts with or without equine bone slices and underwent inflammatory stimulation (IL-1 β or LPS). CTX-I and TRACP-5b were assayed in the supernatants by ELISAs. Tartrate-resistant acid phosphatase stained osteoclast numbers and toluidine blue stained bone resorption areas were assessed.

Results: In the osteoclast cultures, the TRACP-5b significantly increased ($p < 0.0001$) with time and correlated positively ($r = 0.63$, $p < 0.001$) with osteoclast number. In the osteoclast-bone cultures, both CTX-I ($p = 0.0018$) and TRACP-5b ($p = 0.02$) increased with time and correlated positively with each other ($r = 0.64$, $p < 0.002$); both also correlated positively with bone resorption ($r = 0.85$, $p < 0.001$ and $r = 0.82$, $p < 0.001$, respectively). The inflammatory stimuli had no significant effects on any of the outcome parameters measured.

Main limitations: The number of specimens available for study was restricted.

Conclusions: Mature equine osteoclasts and bone resorption were successfully induced from standing equine sternal bone marrow aspiration on equine bone slices. For the first time CTX-I and TRACP-5b concentrations were measured in equine osteoclast-bone cultures. *In vitro*, CTX-I is a biomarker of equine bone resorption and TRACP-5b is a biomarker of equine osteoclast number and bone resorption. Further investigations are required to measure the novel biomarker TRACP-5b in equine serum and its capacity to detect excessive skeletal resorption in racehorses. Moreover, the osteoclast *in vitro* culture protocol established in this study represents an interesting model for subsequent research of effects on bone and osteoclastic activity of drugs currently used in clinics.

1. INTRODUCTION

The Equine Injury Database™ from The Jockey Club in North America reported 6,908 fatal injuries during Thoroughbred flat racing (2009 to 2020) with a fatal injury rate of 1.76 per 1,000 starts.¹ Of these, musculoskeletal injuries, principally fractures, were most common (83%).² Most fatal distal limb fractures (75%) are spontaneous, arising from pre-existing stress fractures and not due to external trauma.³ The term catastrophic stress fractures is currently employed to describe them because most of horses affected are euthanized on human grounds.^{2-10,12,14-18,282,283} In addition, jockeys may also be injured; 51% of fracture related to jockey falls has resulted in jockey injuries in the USA from 2007 to 2011.¹⁹ Combined these data underpins the great unmet clinical need to accurately identify the presence of stress fractures in racehorses at an early stage to prevent catastrophic fractures, thereby promoting both equine and jockey health and ameliorating the racing industry's reputation.

The racehorse skeleton undergoes repeated supra-physiological cyclic loads at high rates, in training and racing. This results in a physiological adaptation of the cortical bone (cortices of long bones and subchondral plate of joints) and trabecular subchondral bone. It is well known that the bone deposition occurs on the subchondral bone trabeculae by osteoblasts and results in sclerosis of the subchondral bone.^{7,20-24} This new bone tissue accumulates and is more brittle; with continued cyclic loading structural microcracks may arise within it.^{17,26-28} The microcracks cause atypical morphology or apoptosis of osteocytes in bone.²⁹⁻³¹ This factor differentiates hematopoietic stem cells into mature osteoclasts for healing purposes. In addition, it has been described that osteoclasts are attracted by irregular surfaces *in vitro*.³⁵ The end result is excessive focal bone resorption around the microcracks by differentiated osteoclasts.^{26,27} Osteoclasts degrade subchondral bone more rapidly than osteoblasts are able to produce new healthy bone.^{14,25,36,282} With continued cyclic loading, microfracture accumulation occurs due to inadequate repair combined with excessive osteoclastic resorption.^{17,27-29,37} The resorptive osteopenic sites are increasingly recognized to be focal stress risers leading to development of fracture lines or complete fractures, even with physiological loads.^{14,25,282}

Several advanced imaging techniques can detect stress fractures early, including magnetic resonance imaging,^{38,39} computed tomography,^{40,41} scintigraphy⁴² and more recently positron emission tomography.⁴³ However, these diagnostic tools are expensive, cumbersome and not always easily accessible in the context of regular screening required at a training center. There is a

need for a simple, economic test to assess skeletal status in respect to resorption for monitoring or diagnostic purposes. The measurement of serum biomarkers to identify stress fractures or a threshold of skeletal injury of over-training/racing would be a valuable screening tool to detect racehorses at risk, inform tailored exercise programs and thus avoid fatal injuries. This strategy has been explored in the past and several groups are still investigating it as a promising avenue.^{44,45}

Considering that the equine osteoclast is the key bone resorbing cell likely precipitating catastrophic stress fractures, a specific biomarker of enhanced equine osteoclast presence and activity would be a potential candidate. Moreover, the average osteoclast lifespan in the bone is around 16 days,⁴⁶ thereby osteoclast biomarker measures should reflect the current osteoclastic activity. Furthermore, results of serum transcriptomic studies have underpinned the major role of the osteoclasts in unbalanced remodeling by revealing that osteoclastic differentiation genes are significantly upregulated in racehorses in addition to other bone homeostatic pathways, in particular the CTSK gene^{47,48} responsible for the cathepsin K production.⁴⁹

Osteoclasts produce enzymes, such as cathepsin K and matrix metalloproteinases,⁵⁰ that cleave bone matrix type I collagen at specific sites and thus release bone resorption products such as the C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-I).^{51,52} Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits have been developed for the measure of human bone resorption biomarkers, including the CTX-I, a biomarker of bone resorption,^{52,56-58} and more recently, the enzyme tartrate resistant acid phosphatase isoform 5b (TRACP-5b), a specific biomarker of both osteoclast number^{53,59-64} and bone resorption.^{61,62,65-67} CTX-I has been measured in equine serum samples,^{45,68-75} but only one study demonstrated an association between CTX-I levels and fractures.⁷⁰ Although one study explored a non-specific tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) enzyme in equine serum,⁷⁶ but TRACP-5b, a specific isoenzyme of osteoclasts,^{62,77} has never been studied to date.

Additional investigations on these potential biomarkers are needed to determine if CTX-I and TRACP-5b are reliable biomarkers of equine osteoclastic resorption *in vitro*. Few laboratories have cultured equine osteoclasts to date: some studies used femoral bone marrow harvested post mortem⁷⁸⁻⁸¹ and another more recent research differentiated hematopoietic stem cells into mature osteoclasts from a standing equine sternal bone marrow aspiration.⁸² However, no study has investigated equine osteoclast growth on equine bone slices, their natural substrate.

The long term objective of our studies are to identify and develop *in vivo* assays to measure specific osteoclast activity in racehorses. Our short term objective is to first develop an *in vitro*

assay system to investigate equine osteoclast activity and osteoclastic specific biomarkers. Specific aims were to 1) differentiate equine hematopoietic stem cells from sternal bone marrow aspirates into osteoclasts employing a red blood cell lysis technique, 2) correlate the number of osteoclasts with the biomarker TRACP-5b in culture wells, 3) measure bone resorption percentage by osteoclasts grown on equine bone slices and correlate it with biomarkers CTX-I and TRACP-5b release into media and 4) study the effects of inflammatory stimuli on osteoclast activity in osteoclast cultures.

We hypothesized that the *in vitro* equine osteoclast cultures would permit the study of osteoclast activity employing outcome measures of osteoclast number and bone resorption percentage and that CTX-I and TRACP-5b are reliable biomarkers of equine osteoclastic biology. We also hypothesized that *in vitro* inflammation stimulates osteoclastic activity.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Equine sternal bone marrow aspiration

The investigation was approved by the Animal Care and Use Committee of the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal (protocol #20-Rech-1968). Sternal bone marrow was aspirated in standing, sedated adult horses (n = 5; *Supplementary information* Table S1, #1-5) (Figure 1.1.) to establish a hematopoietic stem cell bank for subsequent osteoclast culture experiments. Antibiotics (5 mg/kg – 25 mg/kg trimethoprim-sulfadiazine PO; Neogen Vet Lexington, KY, USA) and sedative analgesia (0.008 mg/kg detomidine IV; Orion Pharma, Espoo, Finland); 0.008 – 0.012 mg/kg butorphanol IV; Intervet Canada Corp. Merck & Co. Inc. Kirkland, CA) were administered prior to the intervention. All horses were vaccinated against tetanus. The site of sternal aspiration (5th sternebra) was identified and prepared as we described previously for bone biopsies.²⁴⁰ Briefly, a Jamshidi needle (11 gauge, 10.2 cm; Covidien Inc., Mansfield, MA, USA) was inserted through a small incision (#15 blade), into the 5th sternebra, identified by ultrasonography, following local anesthesia (2% lidocaine; Vetoquinol N.-A. Inc., CA) and aseptic preparation of the site. Following contact with the midline of the ventral sternebra, the Jamshidi needle was then introduced an additional 2 cm, and 18 mL of bone marrow was aspirated with two 10 ml syringes containing 1 mL of heparin (1,000 UI/mL; Sandoz Inc., Boucherville, CA). The bone marrow aspirate was immediately transferred into a sterile 15 mL conical tube on ice. The same protocol was repeated at another site in the 5th sternebra and another 18 mL of bone marrow

was obtained. Povidone-iodine solution (Rougier TEVA, Toronto, CA) was applied to the incisions.

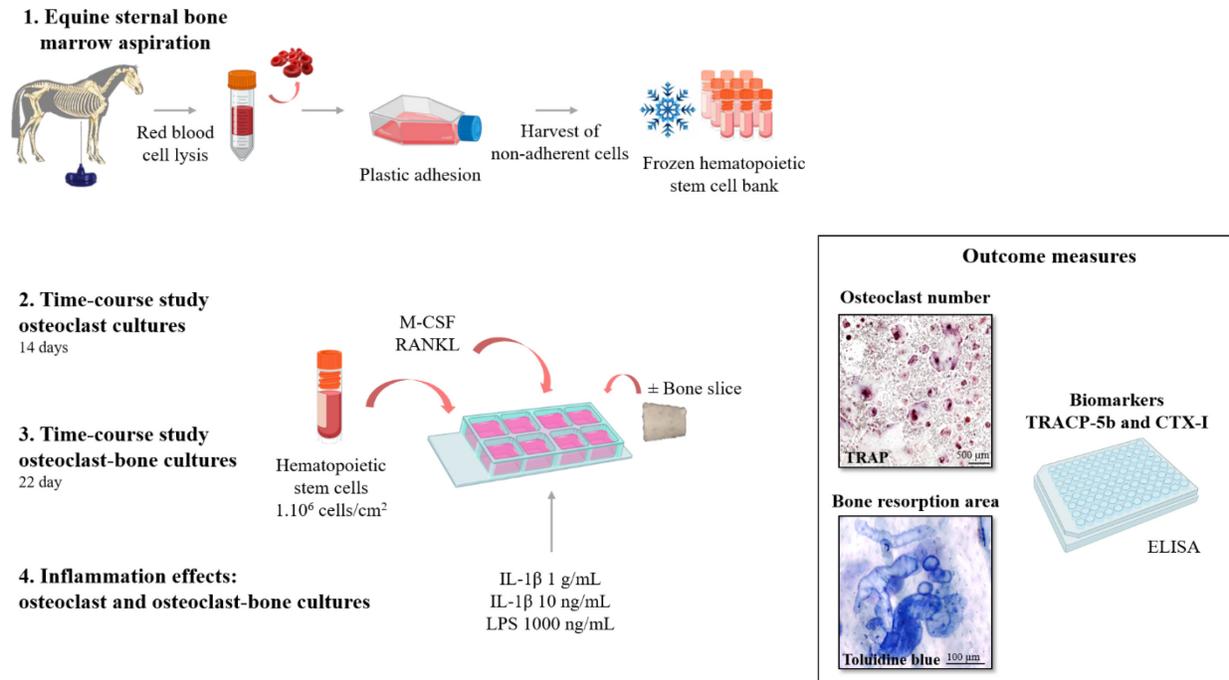


FIGURE 1 Protocol of osteoclast and osteoclast-bone cultures. After an equine sternal bone marrow aspiration, hematopoietic stem cells were isolated, frozen and stored in a cell bank (1). After thawing, hematopoietic stem cells were plated and differentiated in mature osteoclasts without (2) or with (3) bone slices, without (2 and 3) or with (4) inflammation. Osteoclast number, bone resorption area, TRACP-5b and CTX-I concentrations per well were assessed.

2.2. Hematopoietic stem cell isolation and viability

Each 5 mL of bone marrow was suspended in 5 mL of α MEM (Gibco, Life Technologies Carlsbad CA, USA) culture medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, CA) and 1% of penicillin - streptomycin (Gibco, Life Technologies Grand Island, NY, USA) at 37°C. The bone marrow suspension was centrifuged (1,500 rpm for 5 min) and the cell pellet obtained was mixed with 10 mL of red blood cell lysis buffer (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Figure 1.1.) to remove red blood cells.²⁵¹ Following 15 min of incubation on ice and centrifugation (1,500 rpm for 5 min), the cell pellet was resuspended in 5 mL of the same culture medium. After the bone marrow suspension was centrifuged a third time (1,500 rpm for 5 min), the remaining cell pellet was again resuspended in 10 mL of culture medium. Macrophage-colony

stimulating factor (M-CSF) (25 ng/mL; Peprotech Inc., NJ, USA) was then added and the suspension was incubated overnight at 37°C and 5% CO₂ in a 75 cm² flask (Figure 1.1.).

The following day, the supernatant with non-adherent cells, containing the hematopoietic stem cells, was collected (Figure 1.1.) and centrifuged once more (1,500 rpm for 5 min). The cell pellet obtained was then resuspended in the same culture medium at room temperature. Viable cells were counted with an automatic cell counter (Cell analytic AlphaMetrix Biotech GmbH, Carl-Zeiss-Rödermark, Germany) based on a fluorescent microscopy technique employing a propidium iodide staining method for dead-cell staining.

2.3. Hematopoietic stem cell cryopreservation: an osteoclast precursor bank

After an additional centrifugation (1,500 rpm for 5 min), the cell pellet was resuspended by adding, dropwise, a freezing solution at room temperature containing 50% fetal bovine serum, 40% α MEM and 10% dimethylsulfoxide (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) to achieve a concentration of $5 \cdot 10^6$ cells/mL. One mL of this cell solution was added to each cryotube (Cryofreeze® Cryogenic Storage Tubes, UltiDent Scientific, St-Laurent, CA). The cryotubes were placed in a Styrofoam box at -20°C for 1 h and then at -80°C for 24 h, or directly into a Mr. Frosty freezing container (cooling rate of 1°C/min; Nalgene, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) at -80°C for 24 h. The cryotubes were then stored in vapour phase liquid nitrogen for later experiments (Figure 1.1.).

2.4. Time-course study of osteoclast cultures

2.4.1. Osteoclast differentiation and culture

A timeline of procedures is provided in Figure 2A. The cryotubes were rapidly transferred from liquid nitrogen to a 37°C water bath. After 1 min, when 75% of the hematopoietic stem cells were thawed, the cell solution was transferred to a 50 mL tube and culture medium was added dropwise at 37°C. After centrifugation (1,500 rpm for 5 min), the cell pellet was resuspended again with culture medium at 37°C and viable cells were counted with the automatic cell counter. The viable hematopoietic stem cells, in their culture medium, were supplemented with the osteoclastogenic cytokines M-CSF (50 ng/mL) and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) (50 ng/mL; Enzo Life sciences Inc., Farmingdale, NY, USA) and plated at a concentration of $1 \cdot 10^6$ cells/cm² in 12 wells (Nunc® Lab-Tek® II Chamber Slides™; 8 wells (0.7

cm²/well), glass slide; Thermo Fisher Scientific Inc., Rochester, NY, USA) (Figure 1.2.), previously incubated with 5% CO₂ with culture medium at 37°C for a minimum of 1 h. The wells were then incubated overnight at 37°C and 5% CO₂. The culture medium was changed the following day with 300 μL of culture medium at 37°C supplemented with M-CSF (50 ng/mL) and RANKL (50 ng/mL), and then every 3 days until day (d) 13. The supernatant was harvested at each change of culture medium and stored in 1.5 mL tubes (Simport Graduated Microwtubes with O-Ring Caps, UltiDent Scientific, St-Laurent, CA) at -80°C for the osteoclast biomarker (TRACP-5b) assay.

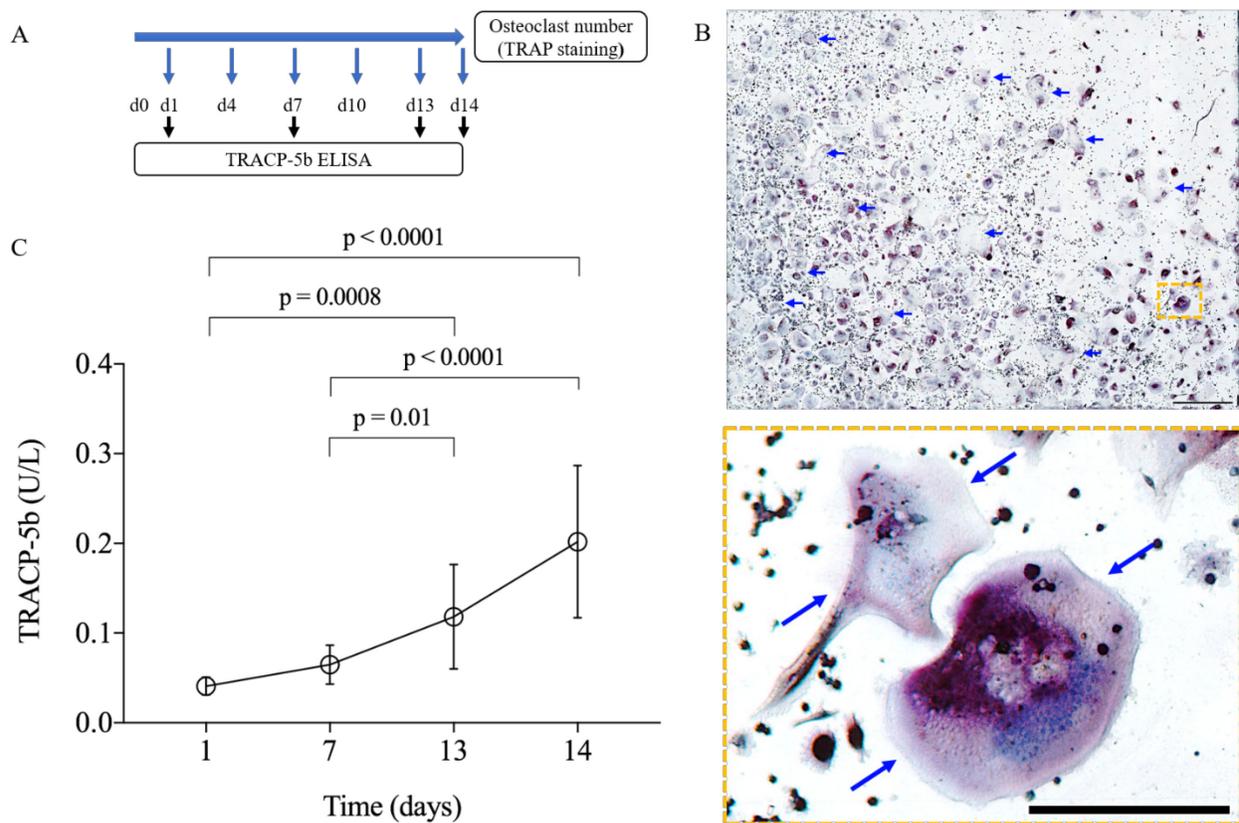


FIGURE 2 Osteoclasts and TRACP-5b biomarker release into media from osteoclast cultures. A) Timeline of osteoclast cultures (n = 12 wells). B) Representative digitalized optical light microscope image for osteoclast counting. Well was stained with TRAP and hematoxylin staining (for nuclei). A TRAP positive cell (pink/purple) with three or more nuclei (blue) was considered to be an osteoclast. The well had 450 osteoclasts (with IL-1 β 1 ng/mL; d14). Scale bar in the principal window represents 1 mm and scale bar in the magnified window represents 250 μ m. C) Time-course release of TRACP-5b in osteoclast cultures. TRACP-5b concentration in the culture supernatant significantly increased with time (p < 0.0001) up to an approximate 5 fold increase from d1 to d14. Means and standard deviations at each time point are represented.

Abbreviation: d: day.

2.4.2. Quantification of osteoclast numbers

On d14 at the end of the experiment (Figures 1.2. and 2A), the wells were washed in phosphate buffered saline (PBS) (Gibco Life Technologies Carlsbad CA, USA) and fixed with 10% formalin at pH 7.4 for 10 min at room temperature. The osteoclast cultures were stained with TRAP (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Following 45 min incubation in the dark at 37°C, the wells were washed with deionized water and the remaining culture chamber slides were digitalized using an optical light microscope (Leica DM4000B Leica Microsystems Inc., Ontario, CA) equipped with a camera (Prosilica GT1920C Allied Vision Technologies, WA, USA) and Panoptic software (Meyer Instruments Inc., Houston, TX, USA). The culture slides were then counterstained with hematoxylin for 1.5 min and washed with tap water for an additional 5 min to reveal cell nuclei prior to a second digital scan. Osteoclasts were defined as TRAP positive cells with three or more nuclei (Figure 2B). Osteoclasts were then counted in each well using 2-D software (Fiji, a distribution of ImageJ2).^{284,285}

2.4.3. TRACP-5b immunoassay – A measure of osteoclast number

2.4.3.1. TRACP-5b ELISA validation

TRACP-5b concentrations were immunoassayed in the harvested culture supernatants employing the Bone TRAP® Assay ELISA (Immunodiagnostic Systems Holdings PLC (IDS), Tyne and Wear, UK). During preliminary experiments, several culture supernatant samples were inferior to the detection limit threshold of 0.5 U/L. The standard curve was then extended up to 0.05 U/L as follows: three additional standards (0.05, 0.1 and 0.2 U/L) were created in addition to those provided with the kit (ranged from 0.4 to 10.1 U/L) using the same procedure as provided in the manufacturer’s instructions for the standard dilution. Consequently, the TRACP-5b concentration results were more accurate compared to a simple extrapolation of the standard curve. The coefficient of determination of the new standard curve (R^2) was systematically superior to 0.99. In addition, in order to validate that the detection of lowest values was accurate, controls provided with the kit were diluted to the same values as the new standards (0.05, 0.1 and 0.2 U/L); results were all in the detection threshold range with a mean coefficient of variation of 2.86%. The final detection threshold range was 0.05 to 10 U/L. The performance of the kit was also verified in our culture media: the concentrations studied were 0.25 and 0.5 U/L being representative of sample concentrations in the study and the mean coefficient of variation was 3.08%. Also each

concentration of the standard curve was diluted in culture media. Results revealed that culture media did not influence the detection of TRACP-5b. A duplicate analysis was performed for each sample. Those with intra-assay coefficients of variation superior or equal to 20.0% were excluded from the analyses.

2.4.3.2. Quantification of TRACP-5b release from osteoclast cultures

The stored harvested supernatants from the time-course osteoclast culture study were immunoassayed at time points d1, d7, d13 and d14 (n = 12 wells per day; Figures 1.2. and 2A) to measure TRACP-5b release as the osteoclasts differentiated.

2.5. Time-course study of osteoclast-bone cultures

2.5.1. Preparation of equine bone slices for bone resorption assay

Bone slices were prepared from a young horse (*Supplementary information* Table S1, #6) euthanized at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal for other reasons. Bone slices (4.5 mm x 3.5 mm x 60 µm) were cut with a low speed diamond saw (Isomet Buehler, Lake Bluff, IL, USA) from the distal third metacarpal bone cortex.²⁷⁸ The slices were washed with 70% ethanol for 12 min and then with PBS for 3.5 min three times. Bone slices were stored at -20°C in tubes of 1.5 mL until culture. A bone slice was observed with an optical light microscope prior to osteoclast-bone culture for identification of normal anatomical features prior to culture and resorption (*Supplementary information* Figure S1).

2.5.2. Osteoclast differentiation and culture with bone

A timeline of procedures is provided in Figure 3A. Hematopoietic stem cells were prepared as described in the *Osteoclast cultures* section. Bone slices were thawed for 5 min, washed with 70% ethanol for 12 min and then with PBS for 3.5 min three times. One bone slice was added to each well containing hematopoietic stem cells (Figure 1.3.), and the cells were differentiated into osteoclasts as described in the *Time-course study of osteoclast cultures* section in 6 wells. At d13, the CO₂ level was raised to 10% until d22.^{56,286} The supernatant was harvested at each change of culture medium and stored at -80°C for the osteoclast biomarker (CTX-I and TRACP-5b) assays.

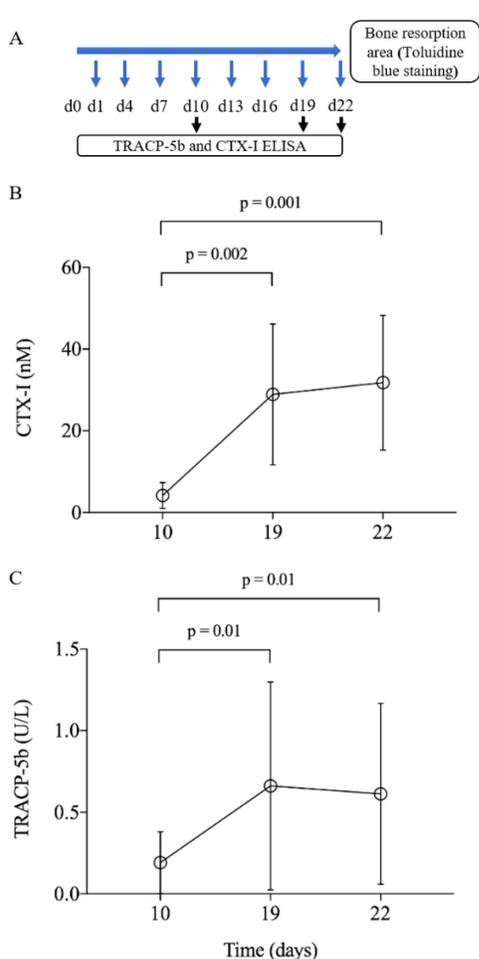


FIGURE 3 CTX-I and TRACP-5b biomarkers release into media from osteoclast-bone cultures. A) Timeline of osteoclast-bone cultures (n = 6 wells). B) Time-course release of CTX-I in osteoclast-bone cultures. CTX-I concentration in the culture supernatant significantly increased with time (p = 0.0018) up to an approximate 8 fold increase from d10 to d22. C) Time-course release of TRACP-5b in osteoclast-bone cultures. TRACP-5b concentration in the culture supernatant significantly increased with time (p = 0.02) up to an approximate 3 fold increase from d10 to d22. Means and standard deviations at each time point are represented. Abbreviation: d: day.

2.5.3. Quantification of bone resorption on bone slices

On d22 at the end of the experiment (Figures 1.3. and 3A), the bone slices were washed in PBS and then fixed with 10% formalin at pH 7.4 for 10 min and washed in PBS. They were then incubated in 1.44% sodium hypochlorite for a further 10 min. Following this step, the slices were then washed in PBS and dipped in 0.02 M/L monobasic sodium phosphate (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) at pH 4 for 1 min and subsequently stained with toluidine blue (Biopharm, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA; 0.1% in 0.02 M/L monobasic sodium phosphate) for 5 min to illustrate osteoclast bone resorption trenches and pits in blue/purple, then rinsed in 0.02 M/L sodium phosphate monobasic for 1 min and four times in PBS. Both sides of each bone slice were digitalized as described earlier (Figure 4A1, A2 and A3). Total bone surface area and bone resorption area of both sides of each bone slice were delineated and measured with Fiji software. The two sides of each bone slice were then summed to provide two measures: total bone surface

area (BS) and total eroded surface area (ES). The percentage of bone resorption per bone slice ($ES \cdot 100 / BS$) was calculated.

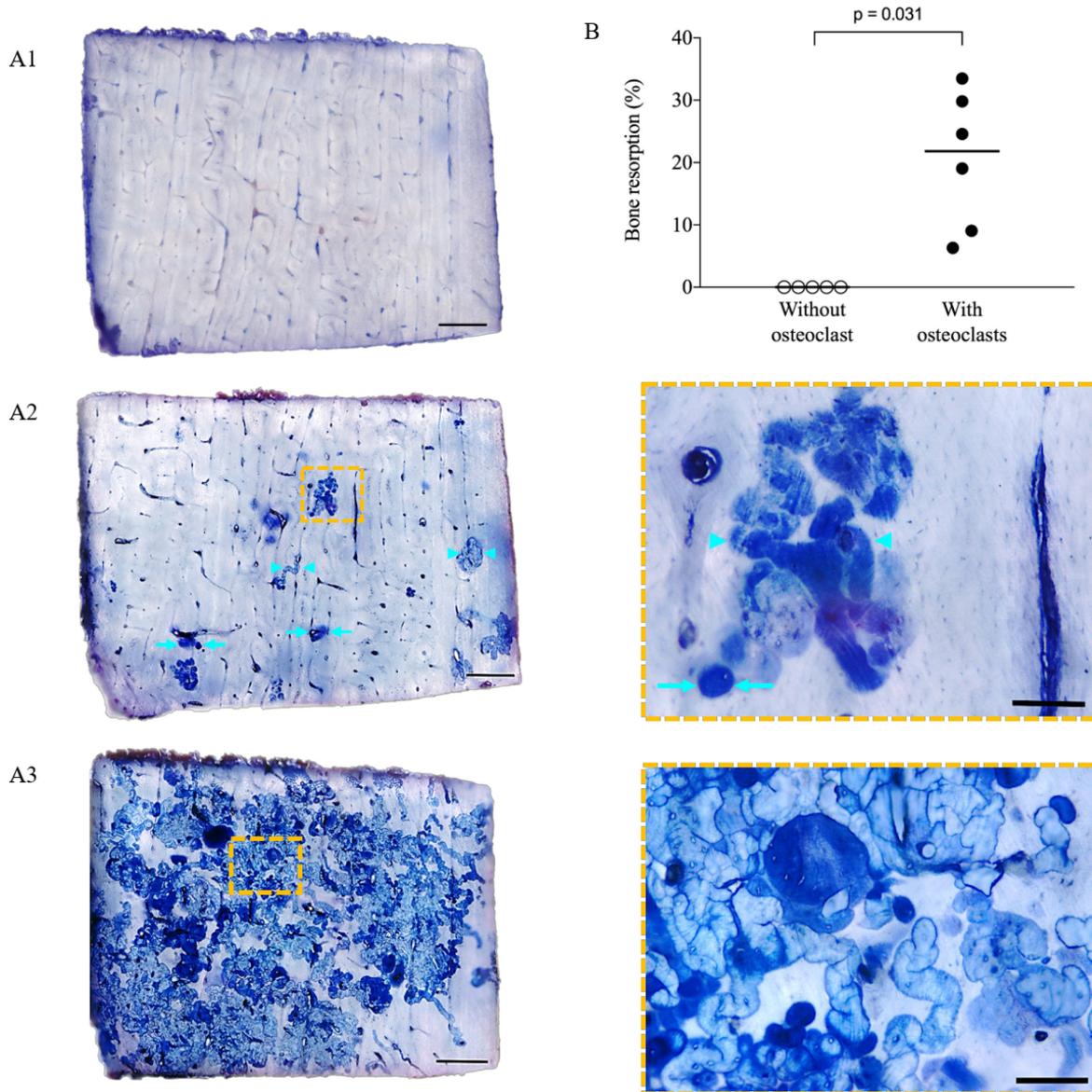


FIGURE 4 Bone resorption on bone slices from osteoclast-bone cultures. A1) Control bone slice stained with toluidine blue with no blue osteoclast resorptive pits or trenches visible. A2) Bone slice with 6% bone surface area resorbed. Osteoclast resorptive pits (arrows) and trenches (arrowheads) can be observed as they have a more intense blue stain and distinct appearance. A3) Bone slice with 30% bone surface area resorbed. B) Initial trial cultures of wells with (n = 6 wells; day 22) and without (n = 5 wells; day 21) hematopoietic stem cells seeded on the bone slices and differentiated into osteoclasts to detect bone resorption. Percentage of bone resorption was significantly higher when hematopoietic stem cells (with osteoclasts) were plated in wells when compared to controls with no cells (without osteoclast) ($p = 0.031$). No bone resorption was visible with latter. Each circle represents a bone slice. Means for each group are represented. Scale bar in images in left panel represents 500 μm and in right magnified windows represents 100 μm .

2.5.4. CTX-I and TRACP-5b immunoassays – Measures of bone resorption

2.5.4.1. CTX-I ELISA validation

CTX-I concentrations in the harvested culture supernatants were immunoassayed employing the CrossLaps® for Culture ELISA (Immunodiagnostic Systems Holdings PLC (IDS), Tyne and Wear, UK), which is already validated for cell culture supernatant. The detection threshold range was 0.44 to 112.7 nM. A 1:5 dilution and duplicated analysis were performed for each sample according to the manufacturer's instructions. Samples with intra-assay coefficients of variation superior or equal to 20.0% were excluded from analyses.

2.5.4.2. Quantification of CTX-I and TRACP-5b release from osteoclast-bone cultures

The stored harvested supernatants at time points d10, d19 and d22 (n = 6 wells per day; Figures 1.3. and 3A) from the time-course osteoclast-bone study were analyzed to measure and compare both CTX-I and TRACP-5b release as the osteoclasts differentiated on bone.

2.6. Inflammation effects on osteoclast or osteoclast-bone cultures

2.6.1. Inflammation effects on osteoclast number and TRACP-5b release of osteoclast cultures

To simulate inflammatory stimuli encountered *in vivo* in joint disease, interleukin 1- β (IL-1 β) (1 and 10 ng/mL; Kingfisher Biotech, Inc., St. Paul, MN, USA) or lipopolysaccharide (LPS) (1,000 ng/mL; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added to the culture wells (Figure 1.4.). The final protocol and concentrations were selected based on preliminary experiments (data not published) and informed by prior investigations.^{122-124,223,239,287-289} A timeline of procedures is provided in Figure 5A1. On d13, the inflammatory factors (1 or 10 ng/mL of IL-1 β or 1,000 ng/mL of LPS) were added to the culture medium (n = 6 wells for each condition, with M-CSF) for 24h.^{121,122} The osteoclast cultures were terminated on d14. The supernatant was harvested at each change of culture medium every 3 days and stored at -80°C for the osteoclast biomarker (TRACP-5b) assay at time points d13 and d14 (Figure 1.4.); supernatants on d13 (pre-inflammation) served as controls and were compared to the supernatant of the same well on d14 (post-inflammation). The osteoclasts were also counted in TRAP stained culture wells at the

termination of the experiment on d14 (Figure 1.4.) and, for this analysis, cultures without inflammation served as controls (n = 12 wells, with M-CSF and RANKL).

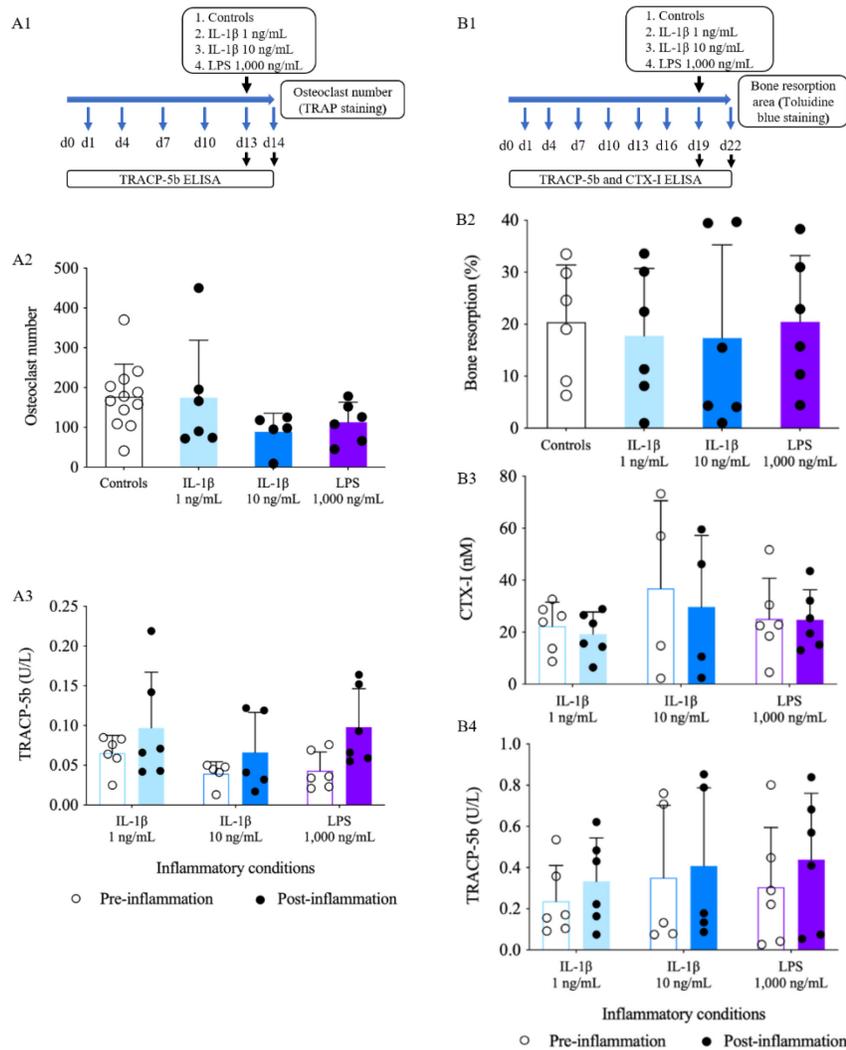


FIGURE 5 Effects of inflammatory stimulation of osteoclast and osteoclast-bone cultures. A1) Timeline of osteoclast cultures with inflammatory stimulation. A2) Effect of inflammatory stimulation on osteoclast number in osteoclast cultures. The inflammatory stimuli did not modify the osteoclast counts at d14 compared with unstimulated controls ($p = 0.21$). A3) Effect of inflammatory stimulation on TRACP-5b concentration in osteoclast cultures. Inflammatory stimulation (i.e. post-inflammation at d14) did not alter the concentration of TRACP-5b into the supernatant compared with unstimulated controls (i.e. pre-inflammation at d13) ($p = 0.20$ for IL-1 β 1 ng/mL, $p = 0.32$ for IL-1 β 10 ng/mL, $p = 0.03$ for LPS 1,000 ng/mL). B1) Timeline of osteoclast-bone cultures with inflammatory stimulation. B2) Effect of inflammatory stimulation on bone resorption in osteoclast-bone cultures. The inflammatory stimuli did not modify the percentage of bone resorption at d22 compared with unstimulated controls ($p = 0.76$). B3) & B4) Effect of inflammatory stimulation on CTX-I and TRACP-5b concentrations in osteoclast-bone cultures. Inflammatory stimulation (i.e. post-inflammation at d22) did not alter the concentrations of CTX-I and TRACP-5b into the supernatant compared with unstimulated controls (i.e. pre-inflammation at d19). Inflammation effect was similar in each groups for the CTX-I ($p = 0.96$) and the TRACP-5b ($p = 0.55$) concentrations. Each circle represents a well/bone slice. Means and standard deviations are represented.

Abbreviation: d: day.

2.6.2. Inflammation effects on bone resorption, CTX-I and TRACP-5b release of osteoclast-bone cultures

A timeline of procedures is provided in Figure 5B1. On d19, the inflammatory factors (1 or 10 ng/mL of IL-1 β or 1,000 ng/mL of LPS) were added to the culture medium (n = 6 wells for each condition, with M-CSF) for 72h. The osteoclast-bone cultures were terminated on d22. The supernatant was harvested at each change of culture medium every 3 days and stored at -80°C for the osteoclast biomarker (CTX-I and TRACP-5b) assays at time points d19 and d22 (Figure 1.4.); supernatants on d19 (pre-inflammation) served as controls and were compared to the supernatant of the same well on d22 (post-inflammation). The bone slices were also stained with toluidine blue to measure bone resorption at the termination of the experiment on d22 (Figure 1.4.) and, for this analysis, cultures without inflammation served as controls (n = 6 wells, with M-CSF and RANKL).

2.7. Statistical analysis

A mixed linear model with horse and culture well as random variables, with time and inflammatory condition as fixed variables and with a sequential Benjamini-Hochberg adjustment was employed to analyze: 1) differences between days for the release of CTX-I and TRACP-5b into media and 2) effects of inflammatory stimulation on osteoclast number, bone resorption area and release of CTX-I and TRACP-5b. A Wilcoxon test was performed to assess the effect of osteoclasts on bone resorption (and without inflammation): 5 and 6 bone slices respectively cultured without any cell and with hematopoietic stem cells and respectively stained on d21 and d22. A Spearman correlation was employed to assess the correlation of 1) TRACP-5b release with osteoclast number and bone resorption, 2) CTX-I release with bone resorption, and 3) TRACP-5b with CTX-I, all inflammatory conditions combined.

A statistician performed the statistical analysis. Data were recorded in Microsoft Excel® and analyzed using a statistical software (R v. 4.0.3). Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Source of cells for hematopoietic stem cell bank

Data on the origin of the hematopoietic stem cells employed in the current study are provided in *Supplementary information* Table S1. Bone marrow aspirates from adult horses (n =

5) with a median age of 3 years (range from 3 to 14 years; two geldings and three females) were processed to isolate the hematopoietic stem cells. The mean \pm SD viability of the isolated cells immediately prior to freezing and storage was $73.4 \pm 9.0\%$. Following storage in liquid nitrogen and a thaw, the viability was $54.9 \pm 10.9\%$.

3.2. ELISA validation

3.2.1. TRACP-5b ELISA validation

Mean \pm SD intra-assay coefficients of variation were $2.70 \pm 3.13\%$. The inter-assay coefficient of variation was $11.01 \pm 0.03\%$. Initially, 137 samples were inferior to the detection limit threshold of 0.5 U/L. Following adjustments of the standard curve that yielded an R^2 of 0.99 for each ELISA, 32 samples remained below the detection limit of 0.05 U/L. One sample from osteoclast-bone cultures with 10 ng/mL of IL-1 β at d22 was excluded from the analyses because of an intra-assay coefficient of variation superior or equal to 20.0%.

3.2.2. CTX-I ELISA validation

Mean \pm SD intra-assay coefficients of variation were $4.23 \pm 4.14\%$. The inter-assay coefficient of variation was $4.30 \pm 0.01\%$. Three samples were inferior to the detection limit threshold of 0.44 nM with a negative value; a concentration of 0 nM was assigned to them. Two samples from osteoclast-bone cultures with 10 ng/mL of IL-1 β at d22 were excluded from the analyses because of an intra-assay coefficient of variation superior or equal to 20.0%.

3.3. Time-course study of osteoclast cultures

3.3.1. Quantification of osteoclast number and inter-rater reliability

On d7, the first mature osteoclasts were observed employing a transmitted-light digital inverted imaging system (EVOS XL Core Imaging System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Osteoclasts had dense pink to purple granules in their cytoplasm following TRAP staining and three or more blue-colored nuclei with the hematoxylin counterstain (Figure 2B). The TRAP stain frequently appeared more intense in the area surrounding the nuclei. The size and shape of the osteoclasts was variable but they were consistently much larger than undifferentiated cells and had cytoplasmic extensions with many vesicles/granules compared to the round shape of undifferentiated cells or the elongated shape of some fibroblasts. The osteoclast counts at the

terminal time point of the osteoclast culture (d14) experiment are provided in Table 1. The mean \pm SD osteoclast number per well was 177.00 ± 82.06 .

TABLE 1 Osteoclast number and TRACP-5b concentration per well for osteoclast cultures with or without inflammation.

The osteoclast number was assessed at day 14 for controls (unstimulated cultures), IL-1 β 1 ng/mL, IL-1 β 10 ng/mL and LPS 1,000 ng/mL groups. The inflammatory stimuli did not modify the osteoclast counts compared with unstimulated control cultures ($p = 0.21$). The TRACP-5b concentration was measured at day 13 (unstimulated control wells, i.e. pre-inflammation) and day 14 (stimulated wells, i.e. post-inflammation) for IL-1 β 1 ng/mL, IL-1 β 10 ng/mL and LPS 1,000 ng/mL groups. Inflammatory stimulation did not alter the concentration of TRACP-5b into the supernatant compared with unstimulated control wells ($p = 0.20$ for IL-1 β 1 ng/mL, $p = 0.32$ for IL-1 β 10 ng/mL and $p = 0.03$ for LPS 1,000 ng/mL).

Number of wells	Inflammatory condition (ng/mL)	Osteoclast number/well Mean \pm SD	TRACP-5b concentration/well Mean \pm SD (U/L)	
			Pre-inflammation	Post-inflammation
12	Controls	177.00 ± 82.06	-	-
6	IL-1 β (1)	174.50 ± 144.32	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.07
5	IL-1 β (10)	89.00 ± 46.51	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.05
6	LPS (1,000)	112.50 ± 50.54	0.04 ± 0.02	0.10 ± 0.05

Abbreviations: SD: standard deviation.

3.3.2. Quantification of TRACP-5b release from osteoclast cultures

TRACP-5b concentrations, immunoassayed at various time points from osteoclast cultures, are provided in Figure 2C. TRACP-5b concentrations in the culture supernatant significantly increased ($p < 0.0001$) with time from a mean \pm SD concentration of 0.04 ± 0.01 U/L per well on d1 to 0.20 ± 0.08 U/L on d14 (an approximate 5 fold increase). A pairwise comparison of well mean TRACP-5b concentrations indicated that there was no significant difference between d1 and d7 ($p = 0.27$) and that the means on d13 ($p = 0.0008$) and d14 ($p < 0.0001$) were significantly higher than on d1, higher on d13 ($p = 0.01$) and d14 ($p < 0.0001$) than on d7, higher on d14 ($p = 0.0003$) than on d13. In addition, there was also a positive correlation ($r = 0.63$; $p < 0.001$) between the concentration of TRACP-5b and the osteoclast numbers counted in the wells on d14 (Figure 6A).

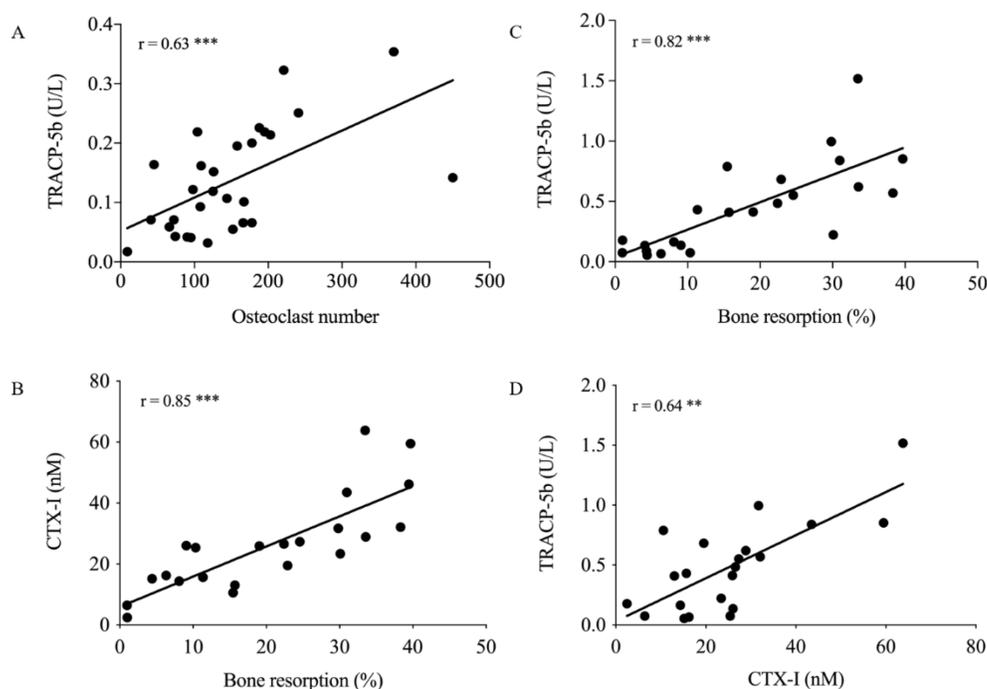


FIGURE 6 Correlations between biomarkers and osteoclast number (osteoclast cultures), bone resorption and each other (osteoclast-bone cultures). A) TRACP-5b concentration and osteoclast number per well were analyzed on day 14 (all inflammatory conditions combined). Each circle represents a well or a bone slice. There was a moderate positive correlation between TRACP-5b concentration and osteoclast number ($r = 0.63$; $p < 0.001$). B) to D) CTX-I and TRACP-5b concentrations per well and bone resorption per corresponding bone slice were analyzed on day 22 (all inflammatory conditions combined). Each circle represent a well/bone slice. B) & C) There was a strong positive correlation between CTX-I and TRACP-5b concentration with bone resorption (respectively, $r = 0.85$; $p < 0.001$ and $r = 0.82$; $p < 0.001$). D) There was also a moderate positive correlation between the concentration of CTX-I and the concentration of TRACP-5b ($r = 0.64$; $p < 0.002$). Abbreviations: r: Spearman correlation coefficient; **: $p < 0.002$; ***: $p < 0.001$.

3.4. Time-course study of osteoclast-bone cultures

3.4.1. Quantification of bone resorption

As expected, bone resorption was significantly higher ($p = 0.031$) when hematopoietic stem cells that were differentiated into osteoclasts were plated in wells when compared to control wells with no cells (no bone resorption) (Figure 4B). The percentage of bone area resorbed at the terminal time point of the osteoclast-bone cultures (d22) are reported in Table 2. The mean \pm SD bone resorption percentage per bone slice was $20.38 \pm 11.01\%$.

TABLE 2 Percentage of bone resorption per bone slice, CTX-I and TRACP-5b concentrations per well for osteoclast-bone cultures with or without inflammation. The percentage of bone resorption was assessed at day 22 for controls (unstimulated cultures), IL-1 β 1 ng/mL, IL-1 β 10 ng/mL and LPS 1,000 ng/mL groups. The inflammatory stimuli did not modify the percentage of bone resorption compared with controls ($p = 0.76$). The CTX-I and TRACP-5b concentrations were measured at day 19 (unstimulated control wells, i.e. pre-inflammation) and day 22 (stimulated wells, i.e. post-inflammation) for IL-1 β 1 ng/mL, IL-1 β 10 ng/mL and LPS 1,000 ng/mL groups. Inflammation effect was similar in each groups for the CTX-I concentration ($p = 0.96$) and for the TRACP-5b concentration ($p = 0.55$).

Number of wells	Inflammatory condition (ng/mL)	Bone resorption/bone slice Mean \pm SD (%)	CTX-I concentration/well Mean \pm SD (nM)		TRACP-5b concentration/well Mean \pm SD (U/L)	
			Pre-inflammation	Post-inflammation	Pre-inflammation	Post-inflammation
6	Controls	20.38 \pm 11.01	-	-	-	-
6	IL-1 β (1)	17.75 \pm 12.96	22.32 \pm 9.20	19.21 \pm 8.54	0.24 \pm 0.17	0.33 \pm 0.21
6	IL-1 β (10)	17.34 \pm 17.91	26.51 \pm 30.62	29.66 \pm 27.48	0.50 \pm 0.49	0.41 \pm 0.38
6	LPS (1,000)	20.44 \pm 12.79	25.10 \pm 15.59	24.77 \pm 11.50	0.30 \pm 0.29	0.44 \pm 0.32

Abbreviation: SD: standard deviation.

3.4.2. Quantification of CTX-I and TRACP-5b release from osteoclast-bone cultures

CTX-I and TRACP-5b concentrations immunoassayed at various time points from osteoclast-bone cultures are provided in Figures 3B and 3C. CTX-I concentrations in the culture supernatant significantly increased with time ($p = 0.0018$) from a mean \pm SD concentration of 4.16 \pm 3.15 nM per well on d10 to 31.82 \pm 16.47 nM on d22 (an approximate 8 fold increase). A pairwise comparison of well mean CTX-I concentrations indicated that the means on d19 ($p = 0.002$) and d22 ($p = 0.001$) were significantly higher than on d10 and there was no significant difference between d19 and d22 ($p = 0.67$). There was a strong positive correlation ($r = 0.85$; $p < 0.001$; Figure 6B) between the concentration of CTX-I and the resorption on the bone slices on d22.

TRACP-5b concentrations in the culture supernatant significantly increased with time ($p = 0.02$) from a mean \pm SD concentration of 0.19 \pm 0.19 U/L on d10 to 0.61 \pm 0.55 U/L on d22 (an approximate 3 fold increase). A pairwise comparison of well mean TRACP-5b concentrations indicated that the means on d19 ($p = 0.01$) and d22 ($p = 0.01$) were significantly higher than on d10 and there was no significant difference between d19 and d22 ($p = 0.76$). There was also a strong positive correlation ($r = 0.82$; $p < 0.001$; Figure 6C) between the concentration of TRACP-5b and the resorption on the bone slices on d22. Furthermore, there was a moderate positive correlation ($r = 0.64$; $p < 0.002$; Figure 6D) between the concentration of CTX-I and the concentration of TRACP-5b on d22.

3.5. Inflammation effects on osteoclast and osteoclast-bone cultures

3.5.1. Inflammation effects on osteoclast number and TRACP-5b of osteoclast cultures

One well (stimulated with 10 ng/mL of IL-1 β) was excluded, because there were no cells at the end of the culture. The osteoclast counts and TRACP-5b concentrations in osteoclast cultures stimulated with different inflammatory conditions are reported in Table 1. The mean osteoclast counts when the experiment was terminated (d14) did not differ in wells that received inflammatory stimuli or not ($p = 0.21$) (Figure 5A2). The addition of IL-1 β or LPS (i.e. post-inflammation at d14) did not alter the concentration of TRACP-5b released into the media compared with unstimulated control wells (i.e. pre-inflammation at d13). A pairwise comparison of well mean TRACP-5b concentrations indicated that there was no significant difference before (d13) and after (d14) inflammatory stimulation for IL-1 β 1 ng/mL ($p = 0.20$), IL-1 β 10 ng/mL ($p = 0.32$) and LPS 1,000 ng/mL ($p = 0.03$) (Figure 5A3).

3.5.2. Inflammation effects on bone resorption, CTX-I and TRACP-5b of osteoclast-bone cultures

The percentage of bone resorption, CTX-I and TRACP-5b concentrations in osteoclast-bone cultures stimulated with different inflammatory conditions are reported in Table 2. The mean percentage of bone resorption when the experiment was terminated (d22) did not vary in wells that received inflammatory stimuli or not ($p = 0.76$) (Figure 5B2). The addition of IL-1 β or LPS (i.e. post-inflammation at d22) did not alter the concentrations of CTX-I and TRACP-5b released into the media compared with unstimulated control wells (i.e. pre-inflammation at d19); inflammation effect was similar in each groups for the CTX-I concentration ($p = 0.96$; Figure 5B3) and for the TRACP-5b concentration ($p = 0.55$; Figure 5B4).

4. DISCUSSION

Several novel and interesting findings are reported in the study herein that provide a foundation for future investigations to advance the understanding of equine osteoclast biology and how factors, such as medication, may modulate it. First, equine osteoclast resorption has been successfully quantified employing osteoclasts, differentiated from sternal bone marrow aspirates, and cultured on equine bone slices harvested from the metacarpus by area measurements for the first time.

Second, CTX-I is demonstrated to be a reliable equine osteoclast bone resorption biomarker, accurately correlating to the areas of resorption of the equine bone matrix. Finally, we show that a novel osteoclast-specific biomarker, TRACP-5b, can also be employed *in vitro* to assess both osteoclast number and bone resorption. This equine-specific *in vitro* multireadout assay system paves the way for future studies of equine osteoclasts on their natural substrate, equine bone, to generate knowledge on the important activity of this understudied cell. Furthermore, the *in vitro* assay system may serve as a screening platform of novel equine-specific biomarkers of osteoclast activity for the development of commercial *in vivo* assays to monitor systemic skeletal resorption in equine athletes.

Equine osteoclasts have been studied *in vitro* in a very limited number of studies to date^{78-82,239} despite their important role in bone remodeling events in juveniles and focal subchondral resorption with repetitive exercise that may precipitate fractures in adults.^{26,27,290} Equine osteoclasts differentiated from sternal bone marrow aspirations of hematopoietic stem cells have been evaluated in one prior study.⁸² The equine osteoclast numbers (mean \pm SD of 177.00 ± 82.06 osteoclast/well or 252.86 ± 117.23 osteoclasts/cm²) measured herein were greater than the latter studies also differentiating equine hematopoietic stem cells or osteoclasts directly harvested from the femoral medullary cavity of euthanized horses⁷⁸⁻⁸¹ (mean yield of 82 osteoclasts/cm²).⁸¹

The study herein is the first to identify and quantify the resorption of equine osteoclasts on their natural substrate, equine bone. This strategy was chosen to best mimic the *in vivo* situation. A mean \pm SD resorption area of $20.38 \pm 11.01\%$ (range 6-33%) per bone slice was measured comparing favorably with that reported for human osteoclast cultures, differentiated from peripheral blood mononuclear cells, on bovine bone slices (means of 6-28%^{56,279} and ranges 25-50%).²⁹¹ In the past, equine osteoclast resorption has been studied on dentine slices, a commercial substrate, and although small circular pits were observed; variation in their number and difficulties with the toluidine blue staining technique was mentioned.^{78,79,81} It is interesting to note that equine bone slices have been employed in two earlier studies as a substrate for osteoclast resorption studies employing cells from other species: chick embryo osteoclasts were cultured on equine bone slices, but the resorption measured was very low (mean of 0.0025%)²³⁵ and human osteoclasts were reported to observe equine bone resorption, but it was not measured.²³² Combined, these results

reveal that equine osteoclasts can now be differentiated from sternal bone marrow aspirates in standing horses and cultured on equine bone slices to quantify their function (resorptive response).

Following the establishment of the osteoclast cultures and the quantification of their resorption on bone slices, we explored the measurement of existing commercial biomarkers released into the supernatant to expand the readout measures in the *in vitro* assay. CTX-I was a pertinent bone resorption biomarker^{56,57,63} for this purpose as it has already been measured in the past in equine serum,^{45,68-75} but never actually validated *in vitro* in equine tissues, to our knowledge. CTX-I concentrations significantly increased in the osteoclast-bone cultures with increasing time of culture (mean \pm SD final concentration of 31.82 ± 16.47 nM; range from 16.23 to 63.81 nM), and were significantly correlated with the bone resorption areas measured on the slices. Numerous studies of human osteoclasts cultured on bovine bone slices have described a similar increase in CTX-I concentration in culture media^{56,57,225,291,292} to reach a mean \pm SD final concentration of 2 nM.²⁹² Its validation as an indirect measure of equine bone resorption in the study herein illustrates that CTX-I concentration can serve as a gold standard for future *in vitro* studies and is appealing, as it is easier to perform than the manual resorption areas calculations and it has already been studied *in vivo*.

A positive correlation has already been identified between serum CTX-I levels and the presence of dorsal metacarpal disease or tibial stress fractures in Thoroughbred racehorses, but only at 6 months prior to the fracture with the latter.⁷⁰ Recently, Turlo and al. reported that serum CTX-I levels were significantly higher in injured Polish racing Thoroughbreds compared to healthy horses, but this study included a variety of musculoskeletal injuries including distal limb fractures, dorsal metacarpal disease, joint injuries and tendonitis; also, the duration of the study was too short (4 months) to accurately determine when the CTX-I level significantly increased compared to the fracture time.⁴⁵ Other groups, on the other hand, did not detect any correlation between serum CTX-I and fractures in Thoroughbreds.⁷² The measurement of CTX-I in equine serum to either detect or accurately predict fractures for the prevention of catastrophic fractures has been disappointing to date and underpins a continuing need for research and discovery of more sensitive, consistent and reliable assays or panels of biomarkers for this purpose. Although CTX-I provides some insight into equine osteoclastic activity *in vivo*, better biomarkers are the Holy Grail and needed to measure accurately focal skeletal resorption events. CTX-I, on the other hand, can serve

as a yardstick, against which to measure future biomarker performance *in vitro*, such as TRACP-5b in the study herein.

TRACP-5b is a novel osteoclast-specific biomarker and has not previously been studied in horses, either *in vitro* or in serum. In the first part of the current study, TRACP-5b was measured in the supernatant of equine osteoclast cultures alone and compared with the numbers of cells in the wells at the end of the study. The TRACP-5b significantly increased from baseline to the end of the culture period (mean \pm SD final concentration of 0.20 ± 0.08 U/L; range from 0.071 to 0.35 U/L) and the amount present in the media also correlated with the number of osteoclasts in the wells on the last day of culture, strongly suggesting that it reflects equine osteoclast number. Similar findings were reported with murine (final concentration range from 0 to 0.37 U/L)⁵⁹ or human²²⁵ osteoclast cultures.

The concentration of TRACP-5b did not significantly increase prior to d7 in the osteoclast on bone cultures, as osteoclast differentiation from hematopoietic stem cells was underway due to the supplementation with the osteoclastogenic cytokines M-CSF and RANKL. This is also supported by the observation of the first mature osteoclasts on a transmitted-light digital inverted imaging system at d7, consistent with what has been reported for murine osteoclast cultures by others.²⁵¹

The release of TRACP-5b into the media when the osteoclasts were cultured on bone was progressive with a significant increase with increasing time of culture (mean \pm SD final concentration of 0.61 ± 0.55 U/L; range from 0.066 to 1.52 U/L). When human osteoclasts were cultured on equine bone slices by other investigators, a similar increase was observed (mean \pm SD final concentration of 1.62 ± 0.30 U/L).²³² Moreover, they also compared the TRACP-5b release with that from bovine bone slices and noted that TRACP-5b released from equine bone slices was 1.6 times higher than that from bovine bone slices by human osteoclasts.²³² Other studies of human osteoclasts on bovine bone slices also revealed a significant increase of TRACP-5b with increasing time of culture.²²⁵ Taken together, these studies suggest that TRACP-5b levels are a measure of both osteoclast number^{59,63,64} and bone resorption.⁶⁶

Serum TRAP levels have been measured in foals in the past,⁷⁶ but the TRAP measures two isoforms of the enzyme in the serum: the TRACP-5a isoform and the TRACP-5b isoform. TRACP-5a is produced by osteoclasts but also by many cells including myeloid cells, such as

macrophages and dendritic cells, and is a biomarker of chronic inflammation, whereas TRACP-5b is secreted only by osteoclasts.^{62,77,225} Consequently, the TRAP level is not a specific measure of osteoclasts, whereas the TRACP-5b is. Despite this, the equine serum TRAP concentration increased with exercise or box stall rest during the first months of life compared with foals in paddocks.⁷⁶ Additional investigations are now needed to study whether the specific osteoclast biomarker TRACP-5b can measure osteoclast resorption *in vivo* in equine athletes and potentially predict risk of catastrophic fractures.

This study demonstrated that both the CTX-I bone degradation product and the TRACP-5b enzyme are suitable biomarkers of equine osteoclast activity with a moderate positive correlation for the TRACP-5b with the osteoclast number and a strong positive correlation for both TRACP-5b or the CTX-I with the bone resorption. Moreover, the moderate positive correlation between the two biomarkers is consistent with another study on supernatants from human osteoclast-bone cultures and also human serum.²²⁵ The CTX-I ELISA has been validated in human serum and urine for some time^{58,225,293,294} and TRACP-5b more recently^{60,61,65,66,225,295} to estimate systemic bone remodeling. It is important to point out that a prospective investigation revealed serum TRACP-5b levels predicted fractures, especially vertebral fractures, and other fractures affecting trabecular bone in people.²⁹⁶

Exercise is now known to produce an inflammatory response in bone ascribed to loading trauma and microdamage in both human^{111,112,297} and in equine¹¹⁴⁻¹²⁰ athletes. Both, LPS and pro-inflammatory cytokines including IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-17 or TNF- α increase osteoclast number¹²¹⁻¹²⁴ and bone resorption^{122,123} in *in vitro* studies of murine and human osteoclasts cultured on dentine slices. Some authors speculate that IL-1 β activates osteoclasts and produce excessive bone resorption.¹²³ Proinflammatory stimulation (IL-1 β) or LPS of the equine osteoclast cultures alone or the osteoclast on bone cultures elicited no detectable differences in biomarker levels, osteoclast number or resorption area between the treated and control cultures in the current experiment. The LPS and IL-1 β doses employed were selected because they seemed to have the best potential to increase osteoclast number and bone resorption based on preliminary studies (data not published) and prior studies.^{123,298}

However, a complex interaction between inflammatory cytokines and osteoclast culture conditions has also been reported that could, in part explain our findings. Additional factors could influence the outcome such as the duration of inflammation or the timing of the inflammatory stimulus. For example, Shiratori and al. demonstrated that the addition of IL-1 β only prior to the resorptive phase, produced more bone destruction than during resorption or than controls without IL-1 β .¹²³ Equine osteoclastic biology and their molecular pathways are not yet well understood and further investigations are needed.

It is acknowledged that some challenges were encountered during this study. We observed a variation in the number of osteoclasts that were differentiated similar to other researchers.^{78,261} We speculate that the variation we observed is related to their precursors, the equine hematopoietic stem cells; they are harvested from bone marrow and thereby co-exist with mesenchymal stem cells, where considerable variability has also been observed.^{299,300} In addition, osteoclasts are part of the bone's immune system so we also postulate, because of this important sentinel role, they may also be more sensitive to environmental cues in the culture media. This study is limited in scope and larger studies are now required to study the effects of age. In fact, in humans it has been described that bone turnover is higher in children and adolescents compared to adults.^{113,301,302} Although there is no investigation on the impact of the age on osteoclast differentiation and on bone resorption activity for equine osteoclast culture, a recent study of Gilday and al. revealed that Thoroughbreds younger than two years of age have a greater number of osteoclasts than adults in the subchondral bone of normal third metacarpal bone.²¹⁰ In addition, racehorses of four years old have the higher prevalence of catastrophic stress fractures.^{5,127,282}

5. CONCLUSION

To sum up, we have developed an *in vitro* multiparametric assay system for studying equine osteoclast function, from hematopoietic stem cells harvested from the sternum, that permits the measurement of equine osteoclast resorption on equine bone slices by area measurements, but also by dual biomarker (TRACP-5b and CTX-I) analysis. This *in vitro* model will now allow the investigation of medications that may affect equine osteoclast function such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs,³⁰³⁻³⁰⁶ corticoids²⁹² and bisphosphonates^{81,307,308} and also permit the exploration and identification of better performing equine specific osteoclastic biomarkers in the effort to detect and prevent catastrophic stress fractures in racehorses.

6. SUPPLEMENTARY INFORMATION

TABLE S1 Signalment of horses sampled for osteoclast and osteoclast-bone cultures.

Horse	Age (years)	Sex	Sample type
1	3	Gelding	Sternal bone marrow aspirate
2	5	Gelding	Sternal bone marrow aspirate
3	8	Female	Sternal bone marrow aspirate
4	14	Female	Sternal bone marrow aspirate
5	13	Female	Sternal bone marrow aspirate
6	1.2	Male	Third metacarpal bone cortex

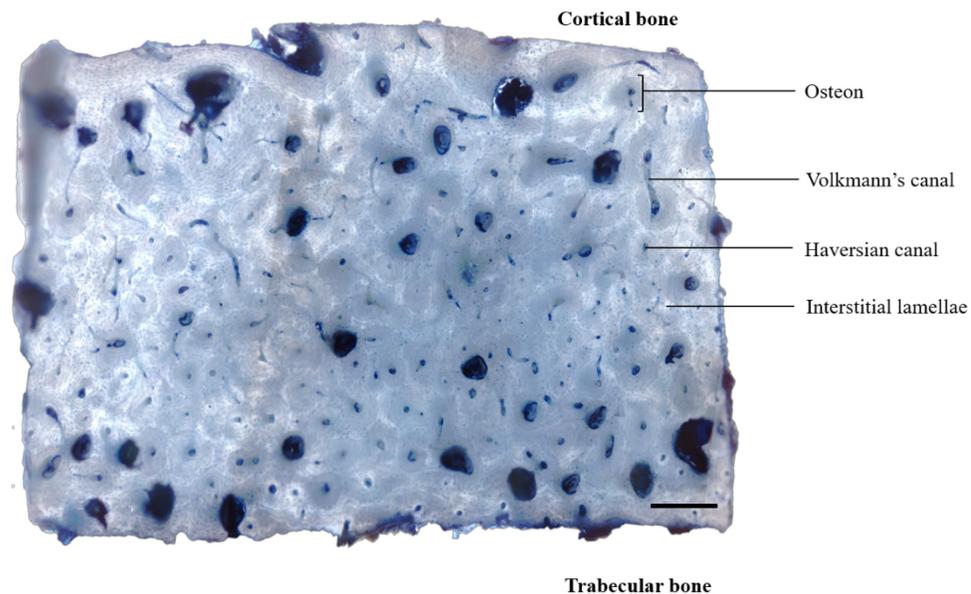


FIGURE S1 Image of a representative harvested bone slice stained with toluidine blue staining. The bone slice was cut from the third metacarpal cortex with a low speed diamond saw and stained with toluidine blue staining and digitalized with an optical light microscope prior to osteoclast-bone culture to illustrate the normal microstructural features of healthy equine bone prior to resorption by osteoclasts. The cortical bone structural organization includes osteons with a central Haversian canal and linking Volkmann's canals. Interstitial lamellae represent the structure between osteons. Scale bar represents 500 μm .

An intraclass correlation coefficient was performed on osteoclast counts of two blinded independent raters (G.M. and H.R.) in 15 TRAP stained wells of osteoclast cultures, with and without inflammation (a mix of available wells at d12 and d14). This intraclass correlation coefficient was 89.4%, confirming an excellent inter-rater reliability.

A Bland-Altman plot analysis for repeated measures was performed to assess inter and intra-rater reliability for bone resorption on bone slices. The bone resorption was assessed by two blinded independent raters (G.M. and H.R.) on 10 bone slices (5 without cell and 5 with cells) from osteoclast-bone cultures without inflammation on d21 or d22. This Bland-Altman plot analysis revealed that neither the regression slope nor the intercept differed significantly from the expected value of zero, therefore no systematic bias was identified between the two observers. Agreement limits were small relative to the bone slice size (Table S1).

TABLE S2 Bland-Altman plot analysis of inter and intra-rater reliability for osteoclast (n = 15 wells, on day 12 or 14) and bone resorption (n = 10 bone slices, on day 21 or 22; measure of eroded and bone surfaces) quantification. For the three parameters, all regression slopes and intercepts did not significantly differ from the expected value of zero. There was no systematic bias between the two observers for the osteoclast counting and the bone resorption quantification, such as with the same observer for the bone resorption quantification. Agreement limits were small to moderate relative to the maximal value of three parameters. Shaded and white areas represent intra-rater and inter-rater reliabilities, respectively.

Parameter	Slope (p-value)	Intercept (p-value)	Agreement limits
Osteoclast number	0.32	0.53	- 48.8; 24.2
Eroded surface	0.31	0.93	- 0.363; 0.272
	0.29	0.83	- 0.270; 0.404
Bone surface	0.92	0.69	- 0.116; 0.284
	0.16	0.78	0.480; 2.158

CHAPITRE 3

DISCUSSION GENERALE

Dans cette étude, plusieurs nouvelles découvertes intéressantes sont rapportées, fournissant ainsi une base pour de futures recherches ayant pour objectif l'amélioration des connaissances de la biologie des ostéoclastes équins, ainsi que de certaines molécules, telles que des médicaments pouvant moduler l'activité ostéoclastique. Dans un premier temps, la résorption osseuse équine a été pour la première fois identifiée et quantifiée avec succès suite à l'action des ostéoclastes équins différenciés à partir d'aspirations de moelle osseuse sternale sur cheval debout et mis en culture sur des sections d'os équin prélevées à partir d'os métacarpien III. Deuxièmement, CTX-I s'est avéré être un biomarqueur fiable de résorption osseuse des ostéoclastes équins étant donné sa forte corrélation avec les aires de résorption du tissu osseux équin. Enfin, nous avons mis en évidence qu'un nouveau biomarqueur spécifique aux ostéoclastes, la TRACP-5b, pouvait également être mesuré *in vitro* afin d'évaluer à la fois le nombre d'ostéoclastes et la résorption osseuse. Ce modèle de culture *in vitro* spécifique aux équidés ouvre la voie à de futures études des ostéoclastes équins sur leur tissu naturel, l'os équin, afin d'accroître nos connaissances sur l'activité importante de cette cellule peu étudiée en espèce équine. En outre, ce modèle *in vitro* pourrait faciliter l'identification de nouveaux biomarqueurs équins de l'activité ostéoclastique dans le but de développer des tests commerciaux *in vivo* et ainsi permettre le contrôle régulier de la résorption squelettique systémique chez les athlètes équins.

L'établissement d'un protocole de culture *in vitro* d'étude des ostéoclastes équins avec ou sans os équin

Jusqu'à ce jour, les ostéoclastes équins n'ont été que très peu étudiés *in vitro*^{78-82,239} malgré leur rôle primordial dans le remodelage osseux chez les jeunes chevaux et la résorption focale de l'os sous-chondrale sous l'action de l'exercice intense répété pouvant engendrer des fractures fatales chez les adultes.^{26,27,290} Les ostéoclastes équins différenciés à partir de cellules souches hématopoïétiques équines obtenus par aspiration de moelle osseuse sternale n'ont été évalués que dans une seule autre étude.⁸² Le nombre d'ostéoclastes équins (moyenne \pm écart type de $177,00 \pm 82,06$ ostéoclastes/puits, soit $252,86 \pm 117,23$ ostéoclastes/cm²) mesuré dans cette étude était supérieur à celui des premières études d'ostéoclastes issus de prélèvements dans la cavité médullaire fémorale de chevaux euthanasiés⁷⁸⁻⁸¹ (moyenne de 82 ostéoclastes/cm²).⁸¹ Ces résultats ne sont pas surprenants étant donné que les aspirations de moelle osseuse sternale fourniraient

jusqu'à 11 fois plus de cellules souches hématopoïétiques après isolation par rapport aux aspirations réalisées au niveau du tuber coxae.³⁰⁹

Notre étude est la première à identifier et quantifier la résorption des ostéoclastes équins sur leur substrat naturel, l'os équin. Cette stratégie a été choisie afin de représenter au mieux les conditions *in vivo*. Une aire de résorption moyenne \pm écart-type de $20,38 \pm 11,01$ % (intervalle entre 6 et 33 %) par section d'os a été mesurée et est comparable à celle rapportée à partir de cultures d'ostéoclastes humains différenciées à partir de cellules mononucléées du sang périphérique, sur des sections d'os bovin (moyenne de 6 à 28 % ;^{56,279} intervalle de 25 à 50 %).²⁹¹ Il y a quelques années, la résorption des ostéoclastes équins a néanmoins été étudiée sur des sections de dentine, un substrat commercial couramment utilisé pour mesurer la résorption osseuse; de petites fosses circulaires ont alors été observées, mais une importante variation de leur nombre ainsi que des difficultés de coloration au bleu de toluidine des zones résorbées ont été rapportées par les auteurs.^{78,79,81} Il est intéressant de noter que les sections d'os équin utilisées comme substrat pour l'étude de la résorption des ostéoclastes ont été rapportés dans deux études précédentes en mettant en culture des cellules issues d'autres espèces : des ostéoclastes issus d'embryon de poulet ont été mis en culture sur des sections d'os équin, mais la résorption mesurée était très faible (moyenne de 0,0025 %)²³⁵ et des ostéoclastes humains ont mis en évidence, après culture, une résorption de l'os équin, mais non mesurée.²³² L'ensemble de ces résultats montre que les ostéoclastes équins peuvent désormais s'obtenir à partir d'une aspiration de moelle osseuse sternale sur cheval debout (procédure facilement réalisable et non invasive)^{240-243,310} et qu'il peuvent être mis en culture sur des sections d'os équin dans le but de quantifier leur fonction (résorption sur l'os) et d'étudier l'effet de molécules, telles que des médicaments, qui pourraient altérer cette fonction.

Le CTX-I, un biomarqueur spécifique de la résorption osseuse ostéoclastique équine

Une fois le protocole de culture d'ostéoclastes établi et la quantification de leur résorption sur des sections d'os possible, nous avons exploré la mesure de l'activité des biomarqueurs commerciaux disponibles et libérés dans le surnageant de nos cultures afin d'obtenir de nouvelles mesures *in vitro*. Le CTX-I est un biomarqueur de résorption osseuse^{56,57,63} pertinent à étudier, puisqu'il a déjà été mesuré par le passé dans le sérum équin,^{45,68-75} mais, à notre connaissance, n'a jamais été réellement validée *in vitro* dans des tissus équins. Les concentrations de CTX-I ont significativement augmenté dans le temps pendant les cultures osseuses d'ostéoclastes

(concentration finale moyenne \pm écart-type de $31,82 \pm 16,47$ nM ; intervalle de 16,23 à 63,81 nM) et étaient significativement corrélées avec les aires de résorption mesurées sur les sections d'os. De nombreuses études sur les ostéoclastes humains en culture sur des sections d'os bovin ont décrit une augmentation similaire de la concentration en CTX-I dans les milieux de culture^{56,57,225,291} atteignant une concentration finale moyenne \pm écart-type de 2 nM.²⁹² Sa validation comme mesure indirecte de la résorption osseuse équine dans la présente étude prouve que la concentration en CTX-I peut servir de valeur-référence pour de futures études *in vitro*, mais présente également de nombreux aspects intéressants par sa praticité et le gain de temps qu'il fournit aux chercheurs en évitant le calcul manuel des aires de résorption et de son étude *in vivo* préalable en espèce équine.

En effet, il a déjà été démontré que le CTX-I sérique augmente jusqu'à l'âge de 1 an chez les poulains sains,⁶⁸ reflétant ainsi le remodelage ostéoclastique osseux observé par notre laboratoire chez les chevaux en croissance.²¹⁰ Le CTX-I sérique augmente également lors de galop à haute vitesse sur courte distance chez des poulains âgés de 5 mois, indiquant ainsi une réponse à l'exercice chez les jeunes animaux.⁶⁸ Étonnamment, le repos au box entraîne également une augmentation de ce biomarqueur chez les Thoroughbreds adultes,⁷³ mais cette découverte est désormais confirmée par une récente étude mettant en évidence une augmentation de la résorption ostéoclastique au repos chez les chevaux de course.¹⁷ Une corrélation positive a déjà été mise en évidence entre le taux sérique de CTX-I et la présence de maladie métacarpienne dorsale ou de fractures de stress tibiales chez des Thoroughbreds de course, mais seulement 6 mois avant la fracture.⁷⁰ Récemment, Turlo et al. ont rapporté que le taux sérique de CTX-I était significativement plus élevé chez Thoroughbreds de course polonais blessés par rapport aux chevaux sains, mais cette étude incluait une diversité de lésions musculosquelettique incluant des fractures des membres distaux, des individus atteints de maladie métacarpienne dorsale, de lésions articulaires et de tendinites ; de plus, la durée de l'étude était trop courte (4 mois) pour déterminer avec précision à quel moment le CTX-I augmentait significativement par rapport au moment de la fracture.⁴⁵ D'autre part, d'autres auteurs n'ont détecté aucune corrélation entre le CTX-I sérique et les fractures chez les Thoroughbreds.⁷² Jusqu'à ce jour, la mesure du CTX-I dans le sérum équin afin de détecter ou prédire avec précision les fractures dans un objectif de prévention de ces fractures de stress mortelles a été décevante et souligne la nécessité actuelle de développer des tests, voire de découvrir de nouveaux biomarqueurs plus sensibles, spécifiques, appropriés et fiables pour satisfaire cet objectif dont l'importance ne fait que s'amplifier. Bien que le CTX-I

donne un aperçu de l'activité ostéoclastique équine *in vivo*, la découverte de nouveaux biomarqueurs plus performants constitue un nouvel espoir et est nécessaire afin de mesurer avec précision la résorption squelettique locale. En outre, le CTX-I peut désormais servir de référence afin de mesurer *in vitro* les performances de potentiels biomarqueurs futures tels que la TRACP-5b de notre étude.

La TRACP-5b, un biomarqueur spécifique du nombre d'ostéoclastes et de la résorption osseuse ostéoclastique équine

La TRACP-5b est un nouveau biomarqueur spécifique des ostéoclastes et n'a pas encore été étudié chez le cheval, que ce soit lors d'étude *in vitro*, ou bien *in vivo* dans le sérum. Dans la première partie de la présente étude, la TRACP-5b a été mesurée dans le surnageant de cultures d'ostéoclastes équins et a été comparée avec le nombre de cellules dans les puits à la fin de l'étude. La TRACP-5b a significativement augmenté entre le début et la fin de la culture (concentration finale moyenne \pm écart-type de $0,20 \pm 0,08$ U/L ; intervalle de $0,071$ à $0,35$ U/L) et la concentration présente dans les milieux récoltés le dernier jour de l'étude était significativement corrélée au nombre d'ostéoclastes dans les puits, suggérant ainsi fortement que la TRACP-5b reflète le nombre d'ostéoclastes équins. D'autres rapports ont également détecté une concentration importante en fin de culture d'ostéoclastes chez la souris (intervalle de concentration finale de 0 à $0,37$ U/L)⁵⁹ ou chez l'humain.²²⁵

Néanmoins, dans notre étude, la concentration en TRACP-5b n'a pas présenté d'augmentation significative de j1 à j7. Cette observation est cohérente étant donné que la différenciation des ostéoclastes à partir des cellules souches hématopoïétiques était en cours à cet instant de la culture en raison de la supplémentation en cytokines ostéoclastogéniques M-CSF et RANKL. De plus, cette hypothèse est également soutenue par l'observation des premiers ostéoclastes matures à j7 à l'aide d'un système d'imagerie numérique à lumière transmise inversée, observation en accord avec d'autres rapports de cultures d'ostéoclastes de souris.²⁵¹ La libération de TRACP-5b dans le milieu de culture lorsque les ostéoclastes ont été mis en culture sur os équin a démontré une augmentation progressive et significative pendant la culture (concentration finale moyenne \pm écart-type de $0,61 \pm 0,55$ U/L ; intervalle de $0,066$ à $1,52$ U/L). Des ostéoclastes humains mis en culture sur des sections d'os équin par d'autres auteurs ont présenté une augmentation similaire (concentration finale moyenne \pm écart-type de $1,62 \pm 0,30$ U/L).²³² De plus,

ils ont également comparé la libération du TRACP-5b avec celle des cultures sur des sections d'os bovin et ont remarqué que la TRACP-5b libérée en présence d'os équin était 1,6 fois plus élevée que celle libérée par les ostéoclastes humains en présence d'os bovin.²³² D'autres recherches sur des cultures d'ostéoclastes humains sur os bovin ont révélé une augmentation significative de TRACP-5b pendant la culture.²²⁵ L'ensemble de ces études suggère que la mesure du taux de TRACP-5b reflète à la fois le nombre d'ostéoclastes,^{59,63,64} mais également la résorption osseuse.⁶⁶

Il y a quelques années, les taux sériques de la TRAP ont été mesurés chez des poulains,⁷⁶ cependant la TRAP mesure deux isoformes de l'enzyme dans le sérum : l'isoforme TRACP-5a et l'isoforme TRACP-5b. La TRACP-5a est synthétisée par les ostéoclastes, mais également par de nombreuses autres cellules – à savoir les cellules de la lignée myéloïde, telles que les macrophages et les cellules dendritiques – et est un biomarqueur d'inflammation chronique, alors que la TRACP-5b est uniquement sécrétée par les ostéoclastes.^{62,77,225} Ainsi, le taux de la TRAP ne constitue pas une mesure spécifique des ostéoclastes, contrairement à la TRACP-5b. Malgré tout, l'analyse de la concentration sérique de la TRAP équin a révélé une augmentation de cette enzyme pendant les premiers mois de vie de poulains à l'exercice ou au repos au box par rapport aux poulains en liberté dans des paddocks.⁷⁶ Des investigations supplémentaires sont désormais nécessaires afin d'étudier si le biomarqueur ostéoclastique TRACP-5b permet *in vivo* la détection et la mesure précise de la résorption osseuse chez les athlètes équins, et ainsi potentiellement prédire le risque de fractures de stress fatales.

Le kit ELISA, un outil diagnostique utile pour la mesure *in vivo* de biomarqueurs et la prédiction de fractures

Notre étude a démontré que le produit de dégradation osseuse CTX-I et l'enzyme ostéoclastique TRACP-5b sont deux biomarqueurs appropriés de l'activité des ostéoclastes équins en raison d'une corrélation positive modérée du TRACP-5b avec le nombre d'ostéoclastes et d'une forte corrélation positive du TRACP-5b ou du CTX-I avec la résorption osseuse. De plus, la corrélation modérée positive entre les deux biomarqueurs est cohérente avec une autre étude sur des surnageants de cultures d'ostéoclastes humains sur os bovin et sur sérum humain.²²⁵ Des kits ELISA ont également été validés en espèce humaine pour leur utilisation *in vivo* sur sérum ou urines afin de mesurer le CTX-I^{58,225,293,294} et plus récemment la TRACP-5b^{60,61,65,66,225,295} pour estimer le remodelage osseux systémique. De plus, il est important de noter que, chez l'homme,

une étude prospective a révélé que les taux sériques de TRACP-5b pouvaient prédire les fractures, en particulier les fractures vertébrales et autres fractures affectant l'os trabéculaire.²⁹⁶ Ces études en espèce humaine renforcent l'espoir futur de développer un test *in vivo* réalisable directement auprès du cheval dans les écuries afin de permettre la mesure rapide et précise de biomarqueurs sériques de résorption osseuse excessive chez ces athlètes équins à l'aide d'une simple prise de sang. Des concentrations seuils pourraient alors être établies afin de poser un diagnostic de résorption ostéoclastique excessive et donc de fracture de stress, voire même de les prévenir en adaptant le programme d'exercice du cheval afin d'éviter l'apparition de lésions irréversibles. En outre, en espèce humaine, un tel test existe déjà pour le diagnostic de l'arthrite rhumatoïde,³¹¹ ce qui renforce nos attentes d'identification d'un biomarqueur ostéoclastique dont l'action, bien que locale, est tout de même détectable dans la circulation systémique avec des variations suffisamment élevées pour être mesurées.

La stimulation inflammatoire de culture *in vitro* d'ostéoclastes équins, un protocole à optimiser

L'exercice est désormais reconnu pour produire une réponse inflammatoire osseuse en raison de la charge, des traumatismes et des microdommages appliqués sur l'os à la fois chez l'homme^{111,112,297} et chez le cheval.¹¹⁴⁻¹²⁰ Le LPS et les cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-17 ou TNF- α , stimulent le nombre d'ostéoclastes¹²¹⁻¹²⁴ et la résorption osseuse^{122,123} lors d'études *in vitro* d'ostéoclastes murins et humains mis en culture sur des sections de dentine. Certains auteurs spéculent même que l'IL-1 β active les ostéoclastes et produit une résorption osseuse excessive.¹²³ Néanmoins, dans notre étude, la stimulation pro-inflammatoire (IL-1 β) ou le LPS des cultures d'ostéoclastes équins seuls, ou des cultures d'ostéoclastes sur os, n'a démontré aucune différence significative entre les puits stimulés et les contrôles, aussi bien au niveau des biomarqueurs, du nombre d'ostéoclastes que de l'aire de résorption. Les doses de LPS et d'IL-1 β utilisées ont été sélectionnées car elles semblaient avoir le plus grand potentiel d'augmentation du nombre d'ostéoclastes et de résorption osseuse après réalisation de recherches préliminaires (données non publiées) et d'études antérieures.^{123,298}

Cependant, une interaction complexe entre les cytokines inflammatoires et les conditions de culture des ostéoclastes a été rapportée, ce qui pourrait expliquer en partie nos résultats. Dans cette étude, nous avons choisi de stimuler les cellules avec du RANKL avant l'ajout de stimuli

inflammatoires d'après l'analyse de précédentes études. En effet, le LPS ajouté à des puits pré-traités par du RANKL stimule l'ostéoclastogenèse, mais lorsqu'il est ajouté en même temps, le LPS inhibe l'ostéoclastogenèse en présence de RANKL en réduisant l'expression des récepteurs RANK et M-CSF, rendant ainsi les précurseurs d'ostéoclastes moins sensibles au RANKL.^{121,124} De même, l'ajout précoce d'IL-1 β ou l'ajout concomitant avec du RANKL réduit fortement l'ostéoclastogenèse en inhibant l'expression du récepteur RANK.³¹² Des facteurs supplémentaires pourraient influencer et expliquer nos résultats tels que la durée de l'inflammation ou le moment de l'ajout des stimuli inflammatoires. Par exemple, Shiratori et al. ont démontré que l'ajout d'IL-1 β uniquement avant la phase de résorption produisait plus de dégradation osseuse par rapport à l'ajout pendant la résorption ou comparé aux témoins sans IL-1 β .¹²³ La biologie ostéoclastique équine et leurs voies moléculaires ne sont en effet pas encore bien comprises à ce jour et d'autres investigations sont nécessaires avant de pouvoir réellement conclure sur les effets de facteurs inflammatoires sur les cultures *in vitro* d'ostéoclastes équins.

Un modèle *in vitro* de culture d'ostéoclastes équins sur os équin

Le modèle *in vitro* développé par notre laboratoire offre ainsi la possibilité d'explorer et d'identifier de **potentiels nouveaux biomarqueurs** spécifiques aux équidés plus performants dans le but de détecter et prévenir les fractures de stress fatales chez les chevaux de course. Il permet également l'étude **future de médicaments** quotidiennement utilisés en clinique et susceptibles d'affecter la fonction des ostéoclastes équins tels que les anti-inflammatoires non stéroïdiens,³⁰³⁻³⁰⁶ les corticoïdes²⁹² et les bisphosphonates.^{81,307,308} Par exemple, l'étude de ces derniers représente un enjeu majeur, puisque depuis plusieurs années un engouement s'est développé pour leur utilisation clinique. Après avoir été endocytés par l'ostéoclaste, les bisphosphonates entraînent l'apoptose de la cellule et constituent donc de véritables inhibiteurs de la résorption ostéoclastique osseuse.³¹³ Si à l'heure actuelle ils sont légalement autorisés chez les chevaux âgés de plus de 3 (Royaume-Uni) ou 4 ans (États-Unis)³¹⁴ pour le traitement du syndrome naviculaire,³¹⁵ d'éparvin³¹⁶ ou de lésions ostéo-articulaires de la colonne vertébrale thoraco-lombaire,³¹⁷ les bisphosphonates restent à ce jour un traitement très controversé dont les effets secondaires sont encore peu connus. Plusieurs études réalisées sur différentes espèces démontrent, après administration de bisphosphonates, une accumulation des microlésions, une fragilité osseuse augmentée,³⁰⁷ ainsi qu'une absence de diminution d'apparition de fractures de stress ;^{318,319} de plus, l'inhibition ostéoclastique causée par

le traitement entraîne jusqu'à 44 % de diminution de la formation osseuse.³⁰⁸ Aucune étude de l'effet de ces molécules sur le remodelage de stress n'a été effectuée chez les chevaux. Néanmoins, en 2002, Gray et al. ont montré que le bisphosphonate pamidronate inhibait de manière dose-dépendante le nombre d'ostéoclastes équins après sept jours de culture *in vitro* en augmentant leur mortalité cellulaire.⁸¹

Limites de l'étude

Il est certain que nous avons rencontré certains défis au cours de cette étude. Premièrement, de nombreux efforts ont été employés afin d'établir, puis d'optimiser ces cultures *in vitro* d'ostéoclastes équins, ce qui a suscité un nombre conséquent de cultures préliminaires. En effet, différents tests ont été réalisés afin d'optimiser la quantité de cellules souches hématopoïétiques prélevées, l'isolation de ces précurseurs (techniques d'isolation par gradient de densité Ficoll ou Percoll ou par lyse érythrocytaire, vitesse et durée de centrifugation), la technique de congélation et de décongélation, l'ensemencement (cellules fraîches ou décongelées, concentration cellulaire, type de puits, épaisseur des os), la différenciation ostéoclastique (cytokines de différenciation, sérum fœtal bovin, conditions et durée de culture, changement de milieu de culture), ainsi que les colorations TRAP, hématoxyline et bleu de toluidine, les protocoles de mesure du nombre d'ostéoclastes, de l'aire de résorption osseuse et l'utilisation des kits ELISA. Ces ostéoclastes équins semblent être des cellules très sensibles nécessitant des conditions de culture extrêmement précises; leur culture est sans aucun doute d'une grande complexité et de nombreuses recherches sont encore nécessaires afin de mieux comprendre cette cellule complexe très peu étudiée en espèce équine.

De plus, nous avons pu observer une certaine variation dans le nombre d'ostéoclastes obtenus dans des conditions exactement similaires, variation rapportée par d'autres auteurs.^{78,261} Nous supposons que la variation observée est liée aux précurseurs, les cellules souches hématopoïétiques équines ; en effet, elles sont récoltées dans la moelle osseuse et coexistent ainsi avec des cellules souches mésenchymateuses, pour lesquelles une variabilité considérable est également rapportée.^{299,300} De plus, les ostéoclastes font partie du système immunitaire de l'os, nous postulons donc également qu'en raison de ce rôle important de sentinelle, ils peuvent être plus sensibles aux signaux environnementaux des milieux de culture.

Dans cette étude, la résorption osseuse ostéoclastique a été évaluée en deux dimensions à l'aide d'une mesure de l'aire de résorption après coloration au bleu de toluidine. En espèce humaine, de nouvelles techniques d'analyse en trois dimensions permettent une mesure du volume de résorption de l'os *in vivo* par microtomodensitométrie.³²⁰⁻³²² En effet, les ostéoclastes migrent sur la surface osseuse tout en dégradant l'os, mais une part importante de la résorption se fait également en profondeur, résorption non évaluable avec la technique choisie pour cette étude. Ainsi, en mesurant le volume de résorption, nous pourrions émettre l'hypothèse que davantage de résorption serait détectée et que des différences significatives pourraient s'observer entre les différentes conditions inflammatoires étudiées, alors qu'avec une analyse en deux dimensions aucun effet de l'inflammation sur la résorption ostéoclastique n'a été mise en évidence de cette étude. L'évaluation du volume pourrait permettre une évaluation plus précise de la résorption et de montrer des modifications de la quantité, mais également des patterns de résorption osseuse.

Concernant le nombre de spécimens, cette étude présente une portée limitée dont les auteurs sont conscients. Un protocole de culture fiable étant désormais établi, des études de plus grande ampleur avec un nombre d'échantillons (individus prélevés et puits) plus élevé sont désormais nécessaires afin d'étudier, par exemple, les effets de l'âge des individus prélevés sur le potentiel de différenciation ostéoclastique et sur l'activité de ces ostéoclastes. Chez l'homme, il a été décrit que le remodelage osseux était plus élevé chez les enfants, mais également chez les adolescents dans une moindre mesure, comparé aux adultes.^{113,301,302} Bien qu'il n'y ait à ce jour aucune étude de l'effet de l'âge sur la différenciation ostéoclastique et sur l'activité de résorption osseuse lors de cultures *in vitro* d'ostéoclastes équins, une étude récente de notre laboratoire a révélé que les jeunes Thoroughbreds de moins de deux ans présentent un nombre plus important d'ostéoclastes que les adultes au niveau de l'os sous-chondral de l'os métacarpien III sain.²¹⁰ De plus, les chevaux de course de quatre ans ont la prévalence la plus élevée de fractures de stress fatales.^{5,13,127}

En outre, les cytokines M-CSF et RANKL, ainsi que les kits ELISA TRACP-5b et CTX-I utilisés dans cette étude sont conçus pour les cultures d'ostéoclastes humains et le fabricant ne garantit pas leur utilisation pour les cultures d'ostéoclastes équins. Cependant, de nombreuses études ont utilisé ces produits avec d'autres espèces telles que la souris^{59,295} ou le lapin⁵⁷ et nos résultats suggèrent que ces produits sont compatibles avec les cultures équines, compte tenu de la réussite de nos cultures d'ostéoclastes, de la résorption osseuse observée, ainsi que de la détection et de l'augmentation des concentrations en TRACP-5b et en CTX-I au cours des cultures.

CONCLUSION

L'urgente nécessité clinique de prévenir, diagnostiquer et contrôler régulièrement le développement de fractures de stress, dont l'issue est bien souvent fatale chez les chevaux de course, est désormais une évidence pour tous. Depuis l'établissement de rapports annuels factuels relatifs au nombre alarmant de décès de Thoroughbreds à la suite de ces blessures, une véritable prise de conscience collective s'est opérée dans le monde des courses, encouragée par de nombreuses manifestations de l'opinion publique. Ce sujet sensible, couramment à l'origine de nombreuses polémiques dans les médias, est en effet devenu une préoccupation prioritaire dans le milieu des courses où le bien-être des athlètes occupe désormais une place croissante, si bien que l'usage de médicaments, tels que les corticoïdes ou encore les bisphosphonates, est de plus en plus réglementée – notamment en Californie où il a récemment été décrété que tout cheval ayant reçu des bisphosphates dans les 6 derniers mois se verra refuser sur un champ de course.

L'étude *in vitro* de la biologie des ostéoclastes équins est une première étape nécessaire dans la compréhension de ce phénomène lésionnel – à l'heure actuelle encore énigmatique et qui demande à être davantage élucidée – puisque l'ostéoclaste semble jouer un rôle central par sa résorption osseuse excessive. De plus, les enzymes ostéoclastiques et les produits de dégradation de la matrice osseuse représentent de potentiels biomarqueurs prometteurs pour la détection précoce de ces fractures de stress dont l'enjeu est majeur.

Par la présente étude, nous avons dans un premier temps réussi à développer et optimiser à partir de moelle osseuse sternale un protocole de culture *in vitro* d'ostéoclastes équins sur des sections d'os équin afin d'établir un support fiable d'étude de cette cellule clé, et, pour la première fois, une résorption osseuse ostéoclastique, entièrement d'origine équine, a été observée et mesurée avec succès. Ce modèle de culture pourrait également permettre la recherche et l'identification de nouveaux biomarqueurs de fractures de stress, voire l'étude ultérieure de l'effet de médicaments couramment utilisés en clinique tels que les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, les corticoïdes, ou encore les bisphosphonates, et dont les conséquences sur les ostéoclastes équins restent à ce jour méconnues. Dans un second temps, nous avons mesuré pour la première fois dans le milieu de culture *in vitro* d'ostéoclastes équins deux biomarqueurs d'activité ostéoclastique, à savoir le CTX-I et la TRACP-5b, à l'aide de tests ELISA. Ces résultats sont prometteurs pour des recherches *in vivo* ultérieures, puisque nous sommes parvenus à démontrer *in vitro* que ces deux biomarqueurs sont effectivement synthétisés par les ostéoclastes équins au même titre qu'en espèce humaine, que la détection de leur présence et de leur variation est bien possible, mais surtout que le CTX-I est

un biomarqueur recevable de la résorption osseuse équine et que la TRACP-5b un biomarqueur convenable du nombre d'ostéoclastes équins et de la résorption osseuse équine.

Des études prospectives sur chevaux de course seront nécessaires dans les prochaines années afin de valider l'utilisation *in vivo* de ces biomarqueurs sériques, voire de développer un test simple et rapide réalisable directement à l'écurie à partir d'une prise de sang. Les biomarqueurs ostéoclastiques représentent un nouvel espoir diagnostique, mais également préventif des fractures de stress avec l'établissement potentiel d'une valeur seuil critique à partir de laquelle le vétérinaire serait en mesure de recommander une adaptation de l'exercice du cheval. À l'aube d'un changement essentiel et révolutionnaire dans les pratiques quotidiennes des écuries de course, il est aujourd'hui primordial que les entraîneurs, jockeys et vétérinaires travaillent main dans la main afin de détecter et prévenir ces fractures de stress aux conséquences dramatiques pour le cheval et son cavalier.

Références bibliographiques

1. The Jockey Club: The Jockey Club Releases Data from the Equine Injury Database for 2020 - Supplemental Tables of Equine Injury Database Statistics for Thoroughbreds, in News Releases (ed March 29, 2021), Vol. http://jockeyclub.com/pdfs/eid_12_year_tables.pdf, 2021.
2. Johnson BJ, Stover SM, Daft BM, et al: Causes of death in racehorses over a 2 year period. *Equine Vet J* 26:327-330, 1994.
3. Parkin TD, Clegg PD, French NP, et al: Analysis of horse race videos to identify intra-race risk factors for fatal distal limb fracture. *Prev Vet Med* 74:44-55, 2006.
4. Cohen ND, Berry SM, Peloso JG, et al: Association of high-speed exercise with racing injury in thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc* 216:1273-1278, 2000.
5. Estberg L, Stover SM, Gardner IA, et al: Relationship between race start characteristics and risk of catastrophic injury in thoroughbreds: 78 cases (1992). *J Am Vet Med Assoc* 212:544-549, 1998.
6. Hernandez J, Hawkins DL, Scollay MC: Race-start characteristics and risk of catastrophic musculoskeletal injury in Thoroughbred racehorses. *J Am Vet Med Assoc* 218:83-86, 2001.
7. Holmes JM, Mirams M, Mackie EJ, et al: Thoroughbred horses in race training have lower levels of subchondral bone remodelling in highly loaded regions of the distal metacarpus compared to horses resting from training. *Vet J* 202:443-447, 2014.
8. Maeda Y, Hanada M, Oikawa MA: Epidemiology of racing injuries in Thoroughbred racehorses with special reference to bone fractures: Japanese experience from the 1980s to 2000s. *J Equine Sci* 27:81-97, 2016.
9. Parkin TD, Clegg PD, French NP, et al: Risk factors for fatal lateral condylar fracture of the third metacarpus/metatarsus in UK racing. *Equine Vet J* 37:192-199, 2005.
10. Parkin TD, Clegg PD, French NP, et al: Catastrophic fracture of the lateral condyle of the third metacarpus/metatarsus in UK racehorses - fracture descriptions and pre-existing pathology. *Vet J* 171:157-165, 2006.
11. Peloso J, Mundy G, Cohen N: Prevalence of, and factors associated with, musculoskeletal racing injuries of Thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc* 204:620-626, 1994.
12. Peloso JG, Cohen ND, Vogler JB, et al: Association of catastrophic condylar fracture with bony changes of the third metacarpal bone identified by use of standing magnetic resonance imaging in forelimbs from cadavers of Thoroughbred racehorses in the United States. *Am J Vet Res* 80:178-188, 2019.
13. Stover SM: The epidemiology of Thoroughbred racehorse injuries. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2:312-322, 2003.
14. Stover SM: Nomenclature, classification, and documentation of catastrophic fractures and associated preexisting injuries in racehorses. *J Vet Diagn Invest* 29:396-404, 2017.
15. Stover SM, Murray A: The California Postmortem Program: leading the way. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24:21-36, 2008.
16. Sun TC, Riggs CM, Cogger N, et al: Noncatastrophic and catastrophic fractures in racing Thoroughbreds at the Hong Kong Jockey Club. *Equine Vet J* 51:77-82, 2019.
17. Whitton RC, Ayodele BA, Hitchens PL, et al: Subchondral bone microdamage accumulation in distal metacarpus of Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J* 50:766-773, 2018.

18. Whitton RC, Trope GD, Ghasem-Zadeh A, et al: Third metacarpal condylar fatigue fractures in equine athletes occur within previously modelled subchondral bone. *Bone* 47:826-831, 2010.
19. Hitchens PL, Hill AE, Stover SM: Jockey Falls, Injuries, and Fatalities Associated With Thoroughbred and Quarter Horse Racing in California, 2007-2011. *Orthop J Sports Med* 1:2325967113492625, 2013.
20. Boyde A, Firth EC: 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, 2005.
21. Firth EC: The response of bone, articular cartilage and tendon to exercise in the horse. *J Anat* 208:513-526, 2006.
22. Firth EC, Rogers CW, Jopson N: Effects of racetrack exercise on third metacarpal and carpal bone of New Zealand thoroughbred horses. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1:145-147, 2000.
23. Noble P, Singer ER, Jeffery NS: Does subchondral bone of the equine proximal phalanx adapt to race training? *J Anat* 229:104-113, 2016.
24. Cornelissen BP, van Weeren PR, Ederveen AG, et al: Influence of exercise on bone mineral density of immature cortical and trabecular bone of the equine metacarpus and proximal sesamoid bone. *Equine Vet J Suppl*:79-85, 1999.
25. Martig S, Chen W, Lee PV, et al: Bone fatigue and its implications for injuries in racehorses. *Equine Vet J* 46:408-415, 2014.
26. Bertuglia A, Lacourt M, Girard C, et al: 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, 2016.
27. Lacourt M, Gao C, Li A, et al: Relationship between cartilage and subchondral bone lesions in repetitive impact trauma-induced equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 20:572-583, 2012.
28. Norrdin RW, Stover SM: Subchondral bone failure in overload arthrosis: a scanning electron microscopic study in horses. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6:251-257, 2006.
29. Norrdin RW, Kawcak CE, Capwell BA, et al: Subchondral bone failure in an equine model of overload arthrosis. *Bone* 22:133-139, 1998.
30. Muir P, Peterson AL, Sample SJ, et al: Exercise-induced metacarpophalangeal joint adaptation in the Thoroughbred racehorse. *J Anat* 213:706-717, 2008.
31. Colopy SA, Benz-Dean J, Barrett JG, et al: Response of the osteocyte syncytium adjacent to and distant from linear microcracks during adaptation to cyclic fatigue loading. *Bone* 35:881-891, 2004.
32. Komori T: Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *Int J Mol Sci* 17, 2016.
33. Kular J, Tickner J, Chim SM, et al: An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem* 45:863-873, 2012.
34. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al: Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 17:1231-1234, 2011.
35. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Schwartz Z, et al: Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants. *Acta Biomater* 10:3363-3371, 2014.

36. Muir P, McCarthy J, Radtke CL, et al: Role of endochondral ossification of articular cartilage and functional adaptation of the subchondral plate in the development of fatigue microcracking of joints. *Bone* 38:342-349, 2006.
37. Riggs CM, Whitehouse GH, Boyde A: Pathology of the distal condyles of the third metacarpal and third metatarsal bones of the horse. *Equine Vet J* 31:140-148, 1999.
38. Powell SE: Low-field standing magnetic resonance imaging findings of the metacarpo/metatarsophalangeal joint of racing Thoroughbreds with lameness localised to the region: a retrospective study of 131 horses. *Equine Vet J* 44:169-177, 2012.
39. Ramzan PH, Palmer L, Powell SE: Unicortical condylar fracture of the Thoroughbred fetlock: 45 cases (2006-2013). *Equine Vet J* 47:680-683, 2015.
40. Morgan JW, Santschi EM, Zekas LJ, et al: Comparison of radiography and computed tomography to evaluate metacarpo/metatarsophalangeal joint pathology of paired limbs of thoroughbred racehorses with severe condylar fracture. *Vet Surg* 35:611-617, 2006.
41. Trope GD, Ghasem-Zadeh A, Anderson GA, et al: Can high-resolution peripheral quantitative computed tomography imaging of subchondral and cortical bone predict condylar fracture in Thoroughbred racehorses? *Equine Vet J* 47:428-432, 2015.
42. Simon V, Dyson SJ: Radiographic and scintigraphic evaluation of the third carpal bone of control horses and horses with carpal lameness. *Vet Radiol Ultrasound* 53:465-473, 2012.
43. Spriet M, Espinosa-Mur P, Cissell DD, et al: (18) F-sodium fluoride positron emission tomography of the racing Thoroughbred fetlock: Validation and comparison with other imaging modalities in nine horses. *Equine Vet J* 51:375-383, 2019.
44. Page AE, Adam E, Arthur R, et al: Expression of select mRNA in Thoroughbreds with catastrophic racing injuries. *Equine Vet J*, 2021.
45. Turlo AJ, Cywinska A, Frisbie DD: Revisiting predictive biomarkers of musculoskeletal injury in thoroughbred racehorses: longitudinal study in polish population. *BMC Vet Res* 15:66, 2019.
46. Parfitt AM: Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 55:273-286, 1994.
47. Stefaniuk-Szmukier M, Ropka-Molik K, Piórkowska K, et al: The expression profile of genes involved in osteoclastogenesis detected in whole blood of Arabian horses during 3 years of competing at race track. *Res Vet Sci* 123:59-64, 2019.
48. Stefaniuk-Szmukier M, Ropka-Molik K, Piórkowska K, et al: Transcriptomic hallmarks of bone remodelling revealed by RNA-Seq profiling in blood of Arabian horses during racing training regime. *Gene* 676:256-262, 2018.
49. Troen BR: The regulation of cathepsin K gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1068:165-172, 2006.
50. Ono T, Nakashima T: Recent advances in osteoclast biology. *Histochem Cell Biol* 149:325-341, 2018.
51. Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, et al: The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 273:32347-32352, 1998.
52. Garnero P, Ferreras M, Karsdal MA, et al: The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *J Bone Miner Res* 18:859-867, 2003.
53. Janckila AJ, Yam LT: Biology and clinical significance of tartrate-resistant acid phosphatases: new perspectives on an old enzyme. *Calcif Tissue Int* 85:465-483, 2009.
54. Vääräniemi J, Halleen JM, Kaarlonen K, et al: Intracellular machinery for matrix degradation in bone-resorbing osteoclasts. *J Bone Miner Res* 19:1432-1440, 2004.

55. Halleen JM, Räsänen SR, Alatalo SL, et al: Potential function for the ROS-generating activity of TRACP. *J Bone Miner Res* 18:1908-1911, 2003.
56. Breuil V, Cosman F, Stein L, et al: Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. *J Bone Miner Res* 13:1721-1729, 1998.
57. Foged NT, Delaissé JM, Hou P, et al: Quantification of the collagenolytic activity of isolated osteoclasts by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Bone Miner Res* 11:226-237, 1996.
58. Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S, et al: Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem* 44:2281-2289, 1998.
59. Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, et al: Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* 46:1751-1754, 2000.
60. Alatalo SL, Ivaska KK, Waguespack SG, et al: Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type II autosomal dominant osteopetrosis). *Clin Chem* 50:883-890, 2004.
61. Chu P, Chao TY, Lin YF, et al: Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 41:1052-1059, 2003.
62. Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, et al: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 52:499-509, 2006.
63. Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, et al: Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a Marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 82:108-115, 2008.
64. Rissanen JP, Ylipahkala H, Fagerlund KM, et al: Improved methods for testing antiresorptive compounds in human osteoclast cultures. *J Bone Miner Metab* 27:105-109, 2009.
65. Halleen JM, Alatalo SL, Janckila AJ, et al: Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Clin Chem* 47:597-600, 2001.
66. Halleen JM, Ylipahkala H, Alatalo SL, et al: Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 71:20-25, 2002.
67. Hannon RA, Clowes JA, Eagleton AC, et al: Clinical performance of immunoreactive tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as a marker of bone resorption. *Bone* 34:187-194, 2004.
68. Billingham RC, Brama PA, van Weeren PR, et al: Significant exercise-related changes in the serum levels of two biomarkers of collagen metabolism in young horses. *Osteoarthritis Cartilage* 11:760-769, 2003.
69. Carstanjen B, Hoyle NR, Gabriel A, et al: Evaluation of plasma carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen concentration in horses. *Am J Vet Res* 65:104-109, 2004.
70. Frisbie DD, Mc Ilwraith CW, Arthur RM, et al: Serum biomarker levels for musculoskeletal disease in two- and three-year-old racing Thoroughbred horses: A prospective study of 130 horses. *Equine Vet J* 42:643-651, 2010.
71. Hussein H, Ishihara A, Menendez M, et al: Pharmacokinetics and bone resorption evaluation of a novel Cathepsin K inhibitor (VEL-0230) in healthy adult horses. *J Vet Pharmacol Ther* 37:556-564, 2014.
72. Jackson BF, Dyson PK, Lonnell C, et al: Bone biomarkers and risk of fracture in two- and three-year-old Thoroughbreds. *Equine Vet J* 41:410-413, 2009.

73. Kellerhouse PL, Brown C, Newhall K, et al: Assessment of Bone Resorption Marker Assays in Thoroughbred Horses. *J Bone Miner Res* 15, 2000.
74. Delguste C, Amory H, Guyonnet J, et al: Comparative pharmacokinetics of two intravenous administration regimens of tiludronate in healthy adult horses and effects on the bone resorption marker CTX-1. *J Vet Pharmacol Ther* 31:108-116, 2008.
75. Filipović N, Stojević Z, Plevnik N, et al: The influence of age on bone metabolism in mares during late pregnancy and lactation. *Res Vet Sci* 97:194-198, 2014.
76. van de Lest CH, Brama PA, van Weeren PR: The influence of exercise on bone morphogenic enzyme activity of immature equine subchondral bone. *Biorheology* 40:377-382, 2003.
77. Kawaguchi T, Nakano T, Sasagawa K, et al: Tartrate-resistant acid phosphatase 5a and 5b contain distinct sugar moieties. *Clin Biochem* 41:1245-1249, 2008.
78. Gray AW, Davies ME, Jeffcott LB: In vitro generation of equine osteoclasts from bone marrow cells using a novel culture system. *Res Vet Sci* 65:155-160, 1998.
79. Gray AW, Davies ME, Jeffcott LB: Equine osteoclast-like cells generated in vitro demonstrate similar characteristics to directly isolated mature osteoclasts. *Res Vet Sci* 68:161-167, 2000.
80. Gray AW, Davies ME, Jeffcott LB: Localisation and activity of cathepsins K and B in equine osteoclasts. *Res Vet Sci* 72:95-103, 2002.
81. Gray AW, Davies ME, Jeffcott LB: Generation and activity of equine osteoclasts in vitro: effects of the bisphosphonate pamidronate (APD). *Res Vet Sci* 72:105-113, 2002.
82. Hussein H, Boyaka P, Dulin J, et al: 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, 2017.
83. Ross MH, Pawlina W: Chapter 8 - Bone, in *Histology : a text and atlas with correlated cell and molecular biology* (ed 7), Vol Philadelphia : Wolters Kluwer, 2016, pp 214-243.
84. Eurell JAC, Van Sickle DC: Chapter 3 - Connective and supportive tissues, in *Textbook of Veterinary Histology* (ed 5), Vol H.D. Dellmann and J.A. Eurell, Williams and Wilkins, Baltimore, 1998, pp 32-61.
85. Van Weeren PR: Chapter 1 - General anatomy and physiology of joints, in *Joint disease in the horse* (ed 2), Vol Elsevier, 2016, pp 1-24.
86. Burr DB: Chapter 1 - Bone morphology and organization, in *Basic and applied bone biology*, Vol Elsevier, 2019, pp 3-26.
87. Bacha WJ, Bacha LM: Chapter 5 - Bone, in *Color atlas of veterinary histology* (ed 2), Vol Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp 21-26.
88. Craig LE, Dittmer KE, Thompson KG: Chapter 2 - Bones and Joints, in Maxie MG (ed): *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals* (ed 6), Vol 1 W.B. Saunders, 2016, pp 16-163.e161.
89. Ross MH, Pawlina W: Chapter 6 - Connective tissue, in *Histology : a text and atlas with correlated cell and molecular biology* (ed 7), Vol Philadelphia : Wolters Kluwer, 2016, pp 160-163.
90. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, et al: Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 124:991-998, 2011.
91. Weinstein RS, Manolagas SC: Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med* 108:153-164, 2000.
92. Manolagas SC: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21:115-137, 2000.
93. Dallas SL, Bonewald LF: Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci* 1192:437-443, 2010.

94. Aubin JE, Turksen K: Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microsc Res Tech* 33:128-140, 1996.
95. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL: Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 21:1457-1469, 2010.
96. Chow JW, Wilson AJ, Chambers TJ, et al: Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* 13:1760-1767, 1998.
97. Bruzzaniti A, Baron R: Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord* 7:123-139, 2006.
98. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, et al: The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys* 558:70-78, 2014.
99. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342, 2003.
100. Soysa NS, Alles N: Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. *Biochem Biophys Res Commun* 476:115-120, 2016.
101. Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, et al: The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113 (Pt 3):377-381, 2000.
102. Chambers TJ: The birth of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 1192:19-26, 2010.
103. Marino S, Logan JG, Mellis D, et al: Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep* 3:570, 2014.
104. Liu YC, Lerner UH, Teng YT: Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol* 2000 52:163-206, 2010.
105. Hadjidakis DJ, Androulakis, II: Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092:385-396, 2006.
106. Wolff J: *Das gesetz der transformation der knochen (The Law of Bone Remodeling)*. Verlag von August Hirschwald, Berlin, Germany 1:1-152, 1892.
107. Frost HM: Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec* 226:414-422, 1990.
108. Goldring SR: The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open* 1:e000049, 2015.
109. Gu G, Mulari M, Peng Z, et al: Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 335:1095-1101, 2005.
110. Kogianni G, Mann V, Noble BS: Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *J Bone Miner Res* 23:915-927, 2008.
111. Huldani, Pattelongi I, Massi MN, et al: Research Reviews on Effect of Exercise on DAMP's, HMGB1, Proinflammatory Cytokines and Leukocytes. *Sys Rev Pharm* 11:306-312, 2020.
112. Smith LL: Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? *J Strength Cond Res* 18:185-193, 2004.
113. Walsh JS, Paggiosi MA, Eastell R: Cortical consolidation of the radius and tibia in young men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 97:3342-3348, 2012.
114. Capomaccio S, Cappelli K, Spinsanti G, et al: Athletic humans and horses: comparative analysis of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) expression in peripheral blood mononuclear cells in trained and untrained subjects at rest. *BMC Physiol* 11:3, 2011.
115. Capomaccio S, Vitulo N, Verini-Supplizi A, et al: RNA sequencing of the exercise transcriptome in equine athletes. *PLoS One* 8:e83504, 2013.
116. Cappelli K, Felicetti M, Capomaccio S, et al: Effect of training status on immune defence related gene expression in Thoroughbred: are genes ready for the sprint? *Vet J* 195:373-376, 2013.

117. Cywinska A, Turło A, Witkowski L, et al: Changes in blood cytokine concentrations in horses after long-distance endurance rides. *70:568-571*, 2014.
118. Donovan DC, Jackson CA, Colahan PT, et al: Exercise-induced alterations in pro-inflammatory cytokines and prostaglandin F2alpha in horses. *Vet Immunol Immunopathol 118:263-269*, 2007.
119. Horohov DW, Sinatra ST, Chopra RK, et al: The effect of exercise and nutritional supplementation on proinflammatory cytokine expression in young racehorses during training. *32:805-815*, 2012.
120. Liburt NR, Adams AA, Betancourt A, et al: Exercise-induced increases in inflammatory cytokines in muscle and blood of horses. *Equine Vet J Suppl:280-288*, 2010.
121. Krishner T, Bar-Shavit Z: Regulation of osteoclastogenesis by integrated signals from toll-like receptors. *J Cell Biochem 115:2146-2154*, 2014.
122. Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, et al: Proinflammatory cytokine (TNFalpha/IL-1alpha) induction of human osteoclast formation. *J Pathol 198:220-227*, 2002.
123. Shiratori T, Kyumoto-Nakamura Y, Kukita A, et al: IL-1 β Induces Pathologically Activated Osteoclasts Bearing Extremely High Levels of Resorbing Activity: A Possible Pathological Subpopulation of Osteoclasts, Accompanied by Suppressed Expression of Kindlin-3 and Talin-1. *J Immunol 200:218-228*, 2018.
124. Zou W, Bar-Shavit Z: Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res 17:1211-1218*, 2002.
125. Rosanowski SM, Chang YM, Stirk AJ, et al: Risk factors for race-day fatality in flat racing Thoroughbreds in Great Britain (2000 to 2013). *PLoS One 13:e0194299*, 2018.
126. Hitchens PL, Morrice-West AV, Stevenson MA, et al: Meta-analysis of risk factors for racehorse catastrophic musculoskeletal injury in flat racing. *Vet J 245:29-40*, 2019.
127. Estberg L, Stover SM, Gardner IA, et al: Fatal musculoskeletal injuries incurred during racing and training in thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc 208:92-96*, 1996.
128. Mohammed HO, Hill T, Lowe J: The risk of severity of limb injuries in racing thoroughbred horses. *Cornell Vet 82:331-341*, 1992.
129. Parkin TD: Epidemiology of racetrack injuries in racehorses. *Vet Clin North Am Equine Pract 24:1-19*, 2008.
130. Verheyen K, Price J, Lanyon L, et al: Exercise distance and speed affect the risk of fracture in racehorses. *Bone 39:1322-1330*, 2006.
131. Morrice-West AV, Hitchens PL, Walmsley EA, et al: Training practices, speed and distances undertaken by Thoroughbred racehorses in Victoria, Australia. *Equine Vet J 52:273-280*, 2020.
132. Mohammed HO, Hill T, Lowe J: Risk factors associated with injuries in thoroughbred horses. *Equine Vet J 23:445-448*, 1991.
133. Ramzan PH, Palmer L: Musculoskeletal injuries in Thoroughbred racehorses: a study of three large training yards in Newmarket, UK (2005-2007). *Vet J 187:325-329*, 2011.
134. Johnston AS, Sidhu ABS, Riggs CM, et al: The effect of stress fracture occurring within the first 12 months of training on subsequent race performance in Thoroughbreds in Hong Kong. *Equine Vet J 53:460-468*, 2021.
135. Hitchens PL, Blizzard CL, Jones G, et al: The incidence of race-day jockey falls in Australia, 2002-2006. *Med J Aust 190:83-86*, 2009.
136. Rueda MA, Halley WL, Gilchrist MD: Fall and injury incidence rates of jockeys while racing in Ireland, France and Britain. *Injury 41:533-539*, 2010.

137. McCrory P, Turner M, LeMasson B, et al: An analysis of injuries resulting from professional horse racing in France during 1991-2001: a comparison with injuries resulting from professional horse racing in Great Britain during 1992-2001. *Br J Sports Med* 40:614-618, 2006.
138. Turner M, McCrory P, Halley W: Injuries in professional horse racing in Great Britain and the Republic of Ireland during 1992-2000. *Br J Sports Med* 36:403-409, 2002.
139. Oikawa M: The science of safety helmets-safety for helmets or safety for jockeys. *Jpn Racing J* 12:5-6, 2004.
140. Hitchens PL, Hill AE, Stover SM: The role of catastrophic injury or sudden death of the horse in race-day jockey falls and injuries in California, 2007-2012. *Equine Vet J* 48:50-56, 2016.
141. Bailey CJ, Reid SW, Hodgson DR, et al: Flat, hurdle and steeple racing: risk factors for musculoskeletal injury. *Equine Vet J* 30:498-503, 1998.
142. Saunders L, Bergman C, Burnley M, et al: About equestrian industry in Canada - The economic contribution from horses (<https://www.equestrian.ca/industry/about>), 2010.
143. Frost HM: From Wolff's law to the Utah paradigm: insights about bone physiology and its clinical applications. *Anat Rec* 262:398-419, 2001.
144. Firth EC, Delahunt J, Wichtel JW, et al: Galloping exercise induces regional changes in bone density within the third and radial carpal bones of Thoroughbred horses. *Equine Vet J* 31:111-115, 1999.
145. Firth EC, Goodship AE, Delahunt J, et al: Osteoinductive response in the dorsal aspect of the carpus of young thoroughbreds in training occurs within months. *Equine Vet J Suppl*:552-554, 1999.
146. Martig S, Hitchens PL, Lee PVS, et al: The relationship between microstructure, stiffness and compressive fatigue life of equine subchondral bone. *J Mech Behav Biomed Mater* 101:103439, 2020.
147. Janes JG, Kennedy LA, Garrett KS, et al: Common lesions of the distal end of the third metacarpal/metatarsal bone in racehorse catastrophic breakdown injuries. *J Vet Diagn Invest* 29:431-436, 2017.
148. Cresswell EN, McDonough SP, Palmer SE, et al: Can quantitative computed tomography detect bone morphological changes associated with catastrophic proximal sesamoid bone fracture in Thoroughbred racehorses? *Equine Vet J* 51:123-130, 2019.
149. Soligard T, Schwelnus M, Alonso JM, et al: How much is too much? (Part 1) International Olympic Committee consensus statement on load in sport and risk of injury. *Br J Sports Med* 50:1030-1041, 2016.
150. Meeusen R: Overtraining syndrome, in Mujika I, Hausswirth C (eds): *Recovery for performance in sport*, Vol Human Kinetics, 2013, pp 9-20.
151. Dubois MS, Morello S, Rayment K, et al: Computed tomographic imaging of subchondral fatigue cracks in the distal end of the third metacarpal bone in the thoroughbred racehorse can predict crack micromotion in an ex-vivo model. *PLoS One* 9:e101230, 2014.
152. Wilson A, Weller R: Chapter 26 - The Biomechanics of the Equine Limb and Its Effect on Lameness, in Ross MW, Dyson SJ (eds): *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse (Second Edition)*, Vol. Saint Louis, W.B. Saunders, 2011, pp 270-281.
153. Bertone AL: Chapter 15 - Distal limb: Fetlock and pastern, in Hinchcliff KW, Kaneps AJ, Geor RJ (eds): *Equine Sports Medicine and Surgery (ed 2)*, Vol W.B. Saunders, 2014, pp 275-296.

154. Shaktivesh, Malekipour F, Whitton C, et al: A method for fatigue testing of equine McIII subchondral bone under a simulated fast workout training programme. *Equine Vet J* 52:332-335, 2020.
155. Bani Hassan E, Mirams M, Mackie EJ, et al: Prevalence of subchondral bone pathological changes in the distal metacarpi/metatarsi of racing Thoroughbred horses. *Aust Vet J* 95:362-369, 2017.
156. Malekipour F, Hitchens PL, Whitton RC, et al: Effects of in vivo fatigue-induced subchondral bone microdamage on the mechanical response of cartilage-bone under a single impact compression. *J Biomech* 100:109594, 2020.
157. Shaffer SK, To C, Garcia TC, et al: Subchondral focal osteopenia associated with proximal sesamoid bone fracture in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J*, 2020.
158. Barr ED, Pinchbeck GL, Clegg PD, et al: Post mortem evaluation of palmar osteochondral disease (traumatic osteochondrosis) of the metacarpo/metatarsophalangeal joint in Thoroughbred racehorses. *Equine Vet J* 41:366-371, 2009.
159. Riggs CM: Aetiopathogenesis of parasagittal fractures of the distal condyles of the third metacarpal and third metatarsal bones--review of the literature. *Equine Vet J* 31:116-120, 1999.
160. Loughridge AB, Hess AM, Parkin TD, et al: Qualitative assessment of bone density at the distal articulating surface of the third metacarpal in Thoroughbred racehorses with and without condylar fracture. *Equine Vet J* 49:172-177, 2017.
161. Richardson DW, Ortvad KF: Chapter 93 - Third Metacarpal and Metatarsal Bones, in Auer JA, Stick JA, Kümmeler JM, et al (eds): *Equine Surgery (Fifth Edition)*, Vol W.B. Saunders, 2019, pp 1618-1635.
162. Ruggles AJ: Chapter 95 - Carpus, in Auer JA, Stick JA, Kümmeler JM, et al (eds): *Equine Surgery (Fifth Edition)*, Vol W.B. Saunders, 2019, pp 1648-1667.
163. Jacklin BD, Wright IM: Frequency distributions of 174 fractures of the distal condyles of the third metacarpal and metatarsal bones in 167 Thoroughbred racehorses (1999-2009). *Equine Vet J* 44:707-713, 2012.
164. Zekas LJ, Bramlage LR, Embertson RM, et al: Characterisation of the type and location of fractures of the third metacarpal/metatarsal condyles in 135 horses in central Kentucky (1986-1994). *Equine Vet J* 31:304-308, 1999.
165. Bassage LH, 2nd, Richardson DW: Longitudinal fractures of the condyles of the third metacarpal and metatarsal bones in racehorses: 224 cases (1986-1995). *J Am Vet Med Assoc* 212:1757-1764, 1998.
166. Firth EC, Doube M, Boyde A: Changes in mineralised tissue at the site of origin of condylar fracture are present before athletic training in Thoroughbred horses. *N Z Vet J* 57:278-283, 2009.
167. Stephens PR, Richardson DW, Spencer PA: Slab fractures of the third carpal bone in standardbreds and thoroughbreds: 155 cases (1977-1984). *J Am Vet Med Assoc* 193:353-358, 1988.
168. Engiles JB, Stewart H, Janes J, et al: A diagnostic pathologist's guide to carpal disease in racehorses. *J Vet Diagn Invest* 29:414-430, 2017.
169. Schneider RK, Bramlage LR, Gabel AA, et al: Incidence, location and classification of 371 third carpal bone fractures in 313 horses. *Equine Vet J Suppl*:33-42, 1988.
170. Hornof W, O'Brien T, Pool R: Osteochondritis dissecans of the distal metacarpus in the adult racing Thoroughbred horse. *Veterinary Radiology* 22:98-106, 1981.

171. Pool RR: Pathologic manifestations of joint disease in the athletic horse, in McIlwraith CW, Trotter GW (eds): *Joint Disease in the Horse*, Vol. Philadelphia, W.B. Saunders, 1996, pp 87-104.
172. Nixon AJ: Chapter 92 - Phalanges and the Metacarpophalangeal and Metatarsophalangeal Joints, in Auer JA, Stick JA, Kümmerle JM, et al (eds): *Equine Surgery (Fifth Edition)*, Vol W.B. Saunders, 2019, pp 1587-1618.
173. Harrison SM, Whitton RC, Kawcak CE, et al: Relationship between muscle forces, joint loading and utilization of elastic strain energy in equine locomotion. *J Exp Biol* 213:3998-4009, 2010.
174. Bani Hassan E, Mirams M, Ghasem-Zadeh A, et al: Role of subchondral bone remodelling in collapse of the articular surface of Thoroughbred racehorses with palmar osteochondral disease. *Equine Vet J* 48:228-233, 2016.
175. Hitchens PL, Hill AE, Stover SM: Relationship Between Historical Lameness, Medication Usage, Surgery, and Exercise With Catastrophic Musculoskeletal Injury in Racehorses. *Front Vet Sci* 5:217, 2018.
176. Butler JA, Colles CM, Dyson SJ, et al: Chapter 5 - Metacarpophalangeal and metatarsophalangeal (fetlock) joints, in *Clinical radiology of the horse (ed 4)*, Vol John Wiley & Sons, 2016, pp 175-213.
177. Butler JA, Colles CM, Dyson SJ, et al: Chapter 7 - The carpus and antebrachium, in *Clinical radiology of the horse (ed 4)*, Vol John Wiley & Sons, 2016, pp 259-299.
178. Butler JA, Colles CM, Dyson SJ, et al: Chapter 6 - The metacarpal and metatarsal regions, in *Clinical radiology of the horse (ed 4)*, Vol John Wiley & Sons, 2016, pp 215-257.
179. Davis AM, Fan X, Shen L, et al: Improved radiological diagnosis of palmar osteochondral disease in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet J* 49:454-460, 2017.
180. Shan R, Johnston AS, Rosanowski SM, et al: Stress fracture of the palmar, distal cortex of the third metacarpal bone: A diagnostic challenge with a good prognosis. *Equine Vet J*, 2021.
181. Hopper BJ, Steel C, Richardson JL, et al: Radiographic evaluation of sclerosis of the third carpal bone associated with exercise and the development of lameness in Standardbred racehorses. *Equine Vet J* 36:441-446, 2004.
182. Uhlhorn H, Carlsten J: Retrospective study of subchondral sclerosis and lucency in the third carpal bone of Standardbred trotters. *Equine Vet J* 31:500-505, 1999.
183. Lopez MJ: Chapter 75 - Bone Biology and Fracture Healing, in Auer JA, Stick JA, Kümmerle JM, et al (eds): *Equine Surgery (Fifth Edition)*, Vol W.B. Saunders, 2019, pp 1255-1269.
184. Hornof WJ, O'Brien TR: Radiographic evaluation of the palmar aspect of the equinemetacarpal condyles: a new projection. *Veterinary Radiology* 21:161-167, 1980.
185. Davidson EJ, Martin BB, Jr.: Stress fracture of the scapula in two horses. *Vet Radiol Ultrasound* 45:407-410, 2004.
186. Geburek F, Rotting AK, Stadler PM: Comparison of the diagnostic value of ultrasonography and standing radiography for pelvic-femoral disorders in horses. *Vet Surg* 38:310-317, 2009.
187. Vaughan B, McKerney E, Wollenberger C, et al: Ultrasonographic diagnosis of humeral stress fractures in racehorses, *Proceedings, Proceedings of the 64th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Francisco, California, USA, 1-5 December 2018, 2018* (available from American Association of Equine Practitioners (AAEP))

188. Stover SM: Diagnostic Workup of Upper-Limb Stress Fractures and Proximal Sesamoid Bone Stress Remodeling, Proceedings, Proceedings of the 59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Nashville, Tennessee, USA, 7-11 December 2013, 2013 (available from American Association of Equine Practitioners (AAEP))
189. Zubrod CJ, Schneider RK, Tucker RL, et al: Use of magnetic resonance imaging for identifying subchondral bone damage in horses: 11 cases (1999-2003). *J Am Vet Med Assoc* 224:411-418, 2004.
190. Olive J, D'Anjou MA, Girard C, et al: Fat-suppressed spoiled gradient-recalled imaging of equine metacarpophalangeal articular cartilage. *Vet Radiol Ultrasound* 51:107-115, 2010.
191. Olive J, D'Anjou MA, Alexander K, et al: Comparison of magnetic resonance imaging, computed tomography, and radiography for assessment of noncartilaginous changes in equine metacarpophalangeal osteoarthritis. *Vet Radiol Ultrasound* 51:267-279, 2010.
192. Tranquille CA, Murray RC, Parkin TD: Can we use subchondral bone thickness on high-field magnetic resonance images to identify Thoroughbred racehorses at risk of catastrophic lateral condylar fracture? *Equine Vet J* 49:167-171, 2017.
193. Rubio-Martinez LM, Cruz AM, Gordon K, et al: Structural characterization of subchondral bone in the distal aspect of third metacarpal bones from Thoroughbred racehorses via micro-computed tomography. *Am J Vet Res* 69:1413-1422, 2008.
194. Spriet M: PETting horses? *Equine Vet J* 51:283-284, 2019.
195. Spriet M, Espinosa P, Kyme AZ, et al: (18) F-sodium fluoride positron emission tomography of the equine distal limb: Exploratory study in three horses. *Equine Vet J* 50:125-132, 2018.
196. Spriet M, Espinosa P, Kyme AZ, et al: POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY OF THE EQUINE DISTAL LIMB: EXPLORATORY STUDY. *Vet Radiol Ultrasound* 57:630-638, 2016.
197. Warren R: One Year of Equine PET Scans at Santa Anita Racetrack. (<https://equimanagement.com/news/one-year-of-equine-pet-scans-at-santa-anita-racetrack>), 2021.
198. Nixon AJ: *Equine Fracture Repair* (ed 2), John Wiley and Sons, 2020.
199. McIlwraith CW, Kawcak CE, Frisbie DD, et al: Biomarkers for equine joint injury and osteoarthritis. *J Orthop Res* 36:823-831, 2018.
200. World-Health-Organization: *Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation*, in, Vol, 2001.
201. Kraus VB, Burnett B, Coindreau J, et al: Application of biomarkers in the development of drugs intended for the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 19:515-542, 2011.
202. FDA-NIH-Biomarker-Working-Group, in *BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource*, Vol. Silver Spring (MD), Bethesda (MD), Food and Drug Administration (US) National Institutes of Health (US), 2016.
203. Karsdal MA, Henriksen K, Bay-Jensen AC: Biochemical markers in osteoarthritis with lessons learned from osteoporosis. *Clin Exp Rheumatol* 37 Suppl 120:73-87, 2019.
204. Kemp GJ, Birrell F, Clegg PD, et al: Developing a toolkit for the assessment and monitoring of musculoskeletal ageing. *Age Ageing* 47:iv1-iv19, 2018.
205. Stoch SA, Zajic S, Stone J, et al: Effect of the cathepsin K inhibitor odanacatib on bone resorption biomarkers in healthy postmenopausal women: two double-blind, randomized, placebo-controlled phase I studies. *Clin Pharmacol Ther* 86:175-182, 2009.
206. Drake FH, Dodds RA, James IE, et al: Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 271:12511-12516, 1996.

207. Kamiya T, Kobayashi Y, Kanaoka K, et al: Fluorescence microscopic demonstration of cathepsin K activity as the major lysosomal cysteine proteinase in osteoclasts. *J Biochem* 123:752-759, 1998.
208. Littlewood-Evans A, Kokubo T, Ishibashi O, et al: Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone* 20:81-86, 1997.
209. Tezuka K, Tezuka Y, Maejima A, et al: Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem* 269:1106-1109, 1994.
210. Gilday R, Richard H, Beauchamp G, et al: Abundant osteoclasts in the subchondral bone of the juvenile Thoroughbred metacarpus suggest an important role in joint maturation. *Equine Vet J*, 2020.
211. Henriksen K, Tanko LB, Qvist P, et al: Assessment of osteoclast number and function: application in the development of new and improved treatment modalities for bone diseases. *Osteoporos Int* 18:681-685, 2007.
212. Gowen M, Lazner F, Dodds R, et al: Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res* 14:1654-1663, 1999.
213. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, et al: Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13453-13458, 1998.
214. Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, et al: Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273:1236-1238, 1996.
215. Atley LM, Mort JS, Lalumiere M, et al: Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating by cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone* 26:241-247, 2000.
216. Nwosu LN, Allen M, Wyatt L, et al: Pain prediction by serum biomarkers of bone turnover in people with knee osteoarthritis: an observational study of TRAcP5b and cathepsin K in OA. *Osteoarthritis Cartilage* 25:858-865, 2017.
217. Sun S, Karsdal MA, Bay-Jensen AC, et al: The development and characterization of an ELISA specifically detecting the active form of cathepsin K. *Clin Biochem* 46:1601-1606, 2013.
218. Löfvall H, Newbould H, Karsdal MA, et al: Osteoclasts degrade bone and cartilage knee joint compartments through different resorption processes. *Arthritis Res Ther* 20:67, 2018.
219. Christgau S, Bitsch-Jensen O, Hanover Bjarnason N, et al: Serum CrossLaps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone* 26:505-511, 2000.
220. Christgau S, Rosenquist C, Alexandersen P, et al: Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin Chem* 44:2290-2300, 1998.
221. Robins SP, Woitge H, Hesley R, et al: Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res* 9:1643-1649, 1994.
222. Seyedin SM, Kung VT, Daniloff YN, et al: Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 8:635-641, 1993.
223. Kylmaja E, Nakamura M, Turunen S, et al: Peripheral blood monocytes show increased osteoclast differentiation potential compared to bone marrow monocytes. *Heliyon* 4:e00780, 2018.
224. Hussein H, Dulin J, Smanik L, et al: 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, 2017.

225. Mira-Pascual L, Patlaka C, Desai S, et al: A Novel Sandwich ELISA for Tartrate-Resistant Acid Phosphatase 5a and 5b Protein Reveals that Both Isoforms are Secreted by Differentiating Osteoclasts and Correlate to the Type I Collagen Degradation Marker CTX-I In Vivo and In Vitro. *Calcif Tissue Int* 106:194-207, 2020.
226. Chamberlain P, Compston J, Cox TM, et al: Generation and characterization of monoclonal antibodies to human type-5 tartrate-resistant acid phosphatase: development of a specific immunoassay of the isoenzyme in serum. *Clin Chem* 41:1495-1499, 1995.
227. Cheung CK, Panesar NS, Haines C, et al: Immunoassay of a tartrate-resistant acid phosphatase in serum. *Clin Chem* 41:679-686, 1995.
228. Kraenzlin ME, Lau KH, Liang L, et al: Development of an immunoassay for human serum osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Clin Endocrinol Metab* 71:442-451, 1990.
229. Scarnecchia L, Minisola S, Pacitti MT, et al: Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover. *Scand J Clin Lab Invest* 51:517-524, 1991.
230. Lau KH, Onishi T, Wergedal JE, et al: Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum: potential use to assess bone resorption. *Clin Chem* 33:458-462, 1987.
231. Eick GN, Devlin MJ, Cepon-Robins TJ, et al: A dried blood spot-based method to measure levels of tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP-5b), a marker of bone resorption. *Am J Hum Biol* 31:e23240, 2019.
232. Perrotti V, Nicholls BM, Piattelli A: Human osteoclast formation and activity on an equine spongy bone substitute. *Clin Oral Implants Res* 20:17-23, 2009.
233. MyBioSource: Horse Tartrate Resistant Acid Phosphatase 5B ELISA Kit, #MBS025116. (<https://www.mybiosource.com/tracp-5b-horse-elisa-kits/tartrate-resistant-acid-phosphatase-5b/25116>).
234. Jackson BF, Lonnell C, Verheyen KL, et al: Biochemical markers of bone metabolism and risk of dorsal metacarpal disease in 2-year-old Thoroughbreds. *Equine Vet J* 37:87-91, 2005.
235. Kingsmill VJ, Gray C, Boyde A: Osteoclastic resorption of equine cranial and postcranial bone in vitro. *J Bone Miner Metab* 18:148-152, 2000.
236. Boyde A, Ali NN, Jones SJ: Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br Dent J* 156:216-220, 1984.
237. Coxon FP, Frith JC, Benford HL, et al: Chapter 7 - Isolation and purification of rabbit osteoclasts, in Helfrich MH, Ralston S (eds): *Bone research protocols*, Vol 80Springer Science & Business Media, 2003, pp 89-100.
238. Collin-Osdoby P, Anderson F, Osdoby P: Chapter 6 - Primary isolation and culture of chicken osteoclasts, in Helfrich MH, Ralston S (eds): *Bone research protocols*, Vol 80Springer Science & Business Media, 2003, pp 65-88.
239. Hussein H, Boyaka P, Dulin J, et al: Cathepsin K inhibition renders equine bone marrow nucleated cells hypo-responsive to LPS and unmethylated CpG stimulation in vitro. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 45:40-47, 2016.
240. Desevaux C, Laverty S, Doize B: Sternal bone biopsy in standing horses. *Vet Surg* 29:303-308, 2000.
241. Eydtt C, Geburek F, Schrock C, et al: Sternal bone marrow derived equine multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): investigations considering the sampling site and the use of different culture media. *Vet Med Sci* 2:200-210, 2016.

242. Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, et al: Optimisation of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Vet J* 43:288-294, 2011.
243. Sellon D: How to Obtain a Diagnostic Bone Marrow Sample From the Sternum of an Adult Horse. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners* 52, 2006.
244. Flanagan AM, Massey HM: Chapter 9 - Generating human osteoclasts in vitro from bone marrow and peripheral blood, in Helfrich MH, Ralston S (eds): *Bone research protocols*, Vol 80Springer Science & Business Media, 2003, pp 113-128.
245. Chabannon C, Mannoni P: Les cellules souches hématopoïétiques du sang périphérique chez l'homme. *Médecine/sciences* Vol. 11:p. 17-27, 1995.
246. Quinn JM, Neale S, Fujikawa Y, et al: Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int* 62:527-531, 1998.
247. Hoggatt J, Pelus LM: Mobilization of hematopoietic stem cells from the bone marrow niche to the blood compartment. *Stem Cell Res Ther* 2:13, 2011.
248. Van't Hof RJ: Chapter 11 - Osteoclast formation in the mouse coculture assay, in Helfrich MH, Ralston S (eds): *Bone research protocols*, Vol 80Springer Science & Business Media, 2003, pp 145-152.
249. Takahashi N, Kukita T, MacDonald B, et al: Osteoclast-like cells form in long-term human bone marrow but not in peripheral blood cultures. *The Journal of clinical investigation* 83:543-550, 1989.
250. Collin-Osdoby P, Yu X, Zheng H, et al: Chapter 12 - RANKL-mediated osteoclast formation from murine RAW 264.7 cells, in Helfrich MH, Ralston S (eds): *Bone research protocols*, Vol 80Springer Science & Business Media, 2003, pp 153-166.
251. Boraschi-Diaz I, Komarova SV: The protocol for the isolation and cryopreservation of osteoclast precursors from mouse bone marrow and spleen. *Cytotechnology* 68:105-114, 2016.
252. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, et al: Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 28:766-772, 2007.
253. Pösel C, Moller K, Frohlich W, et al: Density gradient centrifugation compromises bone marrow mononuclear cell yield. *PLoS One* 7:e50293, 2012.
254. Lu Y, Ahmed S, Harari F, et al: Impact of Ficoll density gradient centrifugation on major and trace element concentrations in erythrocytes and blood plasma. *J Trace Elem Med Biol* 29:249-254, 2015.
255. Vannier JP, Monconduit M, Piguet H: [Comparison between 2 density gradients for separation of CFU]. *Biomedicine* 33:236-239, 1980.
256. Yeo C, Saunders N, Locca D, et al: Ficoll-Paque versus Lymphoprep: a comparative study of two density gradient media for therapeutic bone marrow mononuclear cell preparations. *Regen Med* 4:689-696, 2009.
257. Pountos I, Corscadden D, Emery P, et al: Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury* 38 Suppl 4:S23-33, 2007.
258. Kolf CM, Cho E, Tuan RS: Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther* 9:204, 2007.
259. Massey HM, Flanagan AM: Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br J Haematol* 106:167-170, 1999.

260. Lader CS, Scopes J, Horton MA, et al: Generation of human osteoclasts in stromal cell-free and stromal cell-rich cultures: differences in osteoclast CD11c/CD18 integrin expression. *Br J Haematol* 112:430-437, 2001.
261. Crisan M, Dzierzak E: The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Development* 143:4571-4581, 2016.
262. Tung JW, Parks DR, Moore WA, et al: New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol* 110:277-283, 2004.
263. Baumgarth N, Roederer M: A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 243:77-97, 2000.
264. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, et al: U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry* 30:214-230, 1997.
265. Preobrazhensky SN, Bahler DW: Immunomagnetic bead separation of mononuclear cells from contaminating granulocytes in cryopreserved blood samples. *Cryobiology* 59:366-368, 2009.
266. Inokuchi H, Suzuki Y, Kasagi N, et al: Micro magnetic separator for stem cell sorting system, Proceedings, Proceedings of the sensor symposium on sensors micromachines and applied systems, 2005 (available from The Institute of Electrical Engineers of Japan)
267. Ng YY, Baert MR, de Haas EF, et al: Isolation of human and mouse hematopoietic stem cells, in *Genetic Modification of Hematopoietic Stem Cells*, Vol Springer, 2009, pp 13-21.
268. Genuardi E, Barbero D, Dogliotti I, et al: Ficoll-hypaque separation vs whole blood lysis: Comparison of efficiency and impact on minimal residual disease analysis. *Int J Lab Hematol* 40:201-208, 2018.
269. Horn P, Bork S, Diehlmann A, et al: Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy* 10:676-685, 2008.
270. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267-274, 1976.
271. Roux S, Leotot J, Chevallier N, et al: [Mesenchymal stromal cells: Biological properties and clinical prospects]. *Transfus Clin Biol* 18:1-12, 2011.
272. Ishihara A, Helbig HJ, Sanchez-Hodge RB, et al: Performance of a gravitational marrow separator, multidirectional bone marrow aspiration needle, and repeated bone marrow collections on the production of concentrated bone marrow and separation of mesenchymal stem cells in horses. *Am J Vet Res* 74:854-863, 2013.
273. Kopesky P, Tiedemann K, Alkekhia D, et al: Autocrine signaling is a key regulatory element during osteoclastogenesis. *Biol Open* 3:767-776, 2014.
274. Chappard D: Osteoclast count on human bone biopsies: Why and How? *Bone Morphometry*, 1988.
275. Gouron R: Reconstruction osseuse par la technique de la membrane induite: développement et caractérisation d'un modèle animal chez le rat. Amiens, 2011.
276. Quinn JM, Morfis M, Lam MH, et al: Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts. *Bone* 25:1-8, 1999.
277. Sabokbar A, Athanasou NS: Chapter 8 - Generating human osteoclasts from peripheral blood, in Helfrich MH, Ralston S (eds): *Bone research protocols*, Vol 80 Springer Science & Business Media, 2003, pp 101-112.
278. Vesprey A, Yang W: Pit Assay to Measure the Bone Resorptive Activity of Bone Marrow-derived Osteoclasts. *Bio Protoc* 6, 2016.

279. Merrild DM, Pirapaharan DC, Andreasen CM, et al: Pit- and trench-forming osteoclasts: a distinction that matters. *Bone Res* 3:15032, 2015.
280. Vanderost J, van Lenthe GH: From histology to micro-CT: Measuring and modeling resorption cavities and their relation to bone competence. *World J Radiol* 6:643-656, 2014.
281. Zhou Y, Mohan A, Moore DC, et al: SHP2 regulates osteoclastogenesis by promoting preosteoclast fusion. *FASEB J* 29:1635-1645, 2015.
282. Stover SM: The epidemiology of Thoroughbred racehorse injuries. 2:312-322, 2003.
283. Peloso JG, Mundy GD, Cohen ND: Prevalence of, and factors associated with, musculoskeletal racing injuries of thoroughbreds. *J Am Vet Med Assoc* 204:620-626, 1994.
284. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, et al: ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. 18:1-26, 2017.
285. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. 9:676-682, 2012.
286. Durand M, Komarova SV, Bhargava A, et al: Monocytes from patients with osteoarthritis display increased osteoclastogenesis and bone resorption: the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis study. *Arthritis Rheum* 65:148-158, 2013.
287. Noé B, Poole AR, Mort JS, et al: C2K77 ELISA detects cleavage of type II collagen by cathepsin K in equine articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 25:2119-2126, 2017.
288. Vézina Audette R, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP, et al: Inflammatory stimuli differentially modulate the transcription of paracrine signaling molecules of equine bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 21:1116-1124, 2013.
289. Strålberg F, Kassem A, Kasprzykowski F, et al: Inhibition of lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo by cysteine proteinase inhibitors. *J Leukoc Biol* 101:1233-1243, 2017.
290. Collar E, Huber M, Iwaniec U, et al: Third Carpal bone fracture is associated with focal subchondral bone porosity in racehorses, Proceedings, Proceedings of the 2016 ACVS Surgegry Summit, Seattle, WA, USA, 6-8 October 2016, 2016 (available from American College of Veterinary Surgeons (ACVS))
291. Susa M, Luong-Nguyen NH, Cappellen D, et al: Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *J Transl Med* 2:6, 2004.
292. Søre K, Delaissé JM: Glucocorticoids maintain human osteoclasts in the active mode of their resorption cycle. *J Bone Miner Res* 25:2184-2192, 2010.
293. Bonde M, Qvist P, Fledelius C, et al: Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem* 40:2022-2025, 1994.
294. Garnero P, Gineyts E, Riou JP, et al: Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 79:780-785, 1994.
295. Alatalo SL, Peng Z, Janckila AJ, et al: A novel immunoassay for the determination of tartrate-resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *J Bone Miner Res* 18:134-139, 2003.
296. Gerdhem P, Ivaska KK, Alatalo SL, et al: Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *J Bone Miner Res* 19:386-393, 2004.
297. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, et al: Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 17:6-63, 2011.
298. Sloan AJ, Taylor SY, Smith EL, et al: A novel ex vivo culture model for inflammatory bone destruction. *J Dent Res* 92:728-734, 2013.

299. Carter-Arnold JL, Neilsen NL, Amelse LL, et al: In vitro analysis of equine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates differences within age- and gender-matched horses. *Equine Vet J* 46:589-595, 2014.
300. Schnabel LV, Pezzanite LM, Antczak DF, et al: Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Res Ther* 5:13, 2014.
301. Mora S, Prinster C, Proverbio MC, et al: Urinary markers of bone turnover in healthy children and adolescents: age-related changes and effect of puberty. *Calcif Tissue Int* 63:369-374, 1998.
302. Rauchenzauner M, Schmid A, Heinz-Erian P, et al: Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J Clin Endocrinol Metab* 92:443-449, 2007.
303. Hatipoglu MG, Inal S, Kabay S, et al: The Influence of Different Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Alveolar Bone in Rats: An Experimental Study. *Acta Stomatol Croat* 49:325-330, 2015.
304. Shi J, Wang Z, Guo X, et al: Aspirin inhibits osteoclast formation and wear-debris-induced bone destruction by suppressing mitogen-activated protein kinases. *J Cell Physiol* 235:2599-2608, 2020.
305. Son HS, Lee J, Lee HI, et al: Benzydamine inhibits osteoclast differentiation and bone resorption via down-regulation of interleukin-1 β expression. *Acta Pharm Sin B* 10:462-474, 2020.
306. Zhang S, Huo S, Li H, et al: Flufenamic acid inhibits osteoclast formation and bone resorption and act against estrogen-dependent bone loss in mice. *Int Immunopharmacol* 78:106014, 2020.
307. Mashiba T, Turner CH, Hirano T, et al: Effects of suppressed bone turnover by bisphosphonates on microdamage accumulation and biomechanical properties in clinically relevant skeletal sites in beagles. *Bone* 28:524-531, 2001.
308. Sloan AV, Martin JR, Li S, et al: Parathyroid hormone and bisphosphonate have opposite effects on stress fracture repair. *Bone* 47:235-240, 2010.
309. Delling U, Lindner K, Ribitsch I, et al: Comparison of bone marrow aspiration at the sternum and the tuber coxae in middle-aged horses. *Can J Vet Res* 76:52-56, 2012.
310. Rowland AL, Navas de Solis C, Lepiz MA, et al: Bone Marrow Aspiration Does Not Induce a Measurable Pain Response Compared to Sham Procedure. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 2018.
311. Egerer K, Feist E, Burmester GR: The serological diagnosis of rheumatoid arthritis: antibodies to citrullinated antigens. *Dtsch Arztebl Int* 106:159-163, 2009.
312. Lee B, Kim TH, Jun JB, et al: Direct inhibition of human RANK+ osteoclast precursors identifies a homeostatic function of IL-1 β . *J Immunol* 185:5926-5934, 2010.
313. Soto SA, Barbará AC: Bisphosphonates: pharmacology and clinical approach to their use in equine osteoarticular diseases. *J Equine Vet Sci* 34:727-737, 2014.
314. McLellan J: Science-in-brief: Bisphosphonate use in the racehorse: Safe or unsafe? *Equine Vet J* 49:404-407, 2017.
315. Denoix JM, Thibaud D, Riccio B: Tiludronate as a new therapeutic agent in the treatment of navicular disease: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Equine Vet J* 35:407-413, 2003.
316. Gough MR, Thibaud D, Smith RK: Tiludronate infusion in the treatment of bone spavin: a double blind placebo-controlled trial. *Equine Vet J* 42:381-387, 2010.

317. Coudry V, Thibaud D, Riccio B, et al: Efficacy of tiludronate in the treatment of horses with signs of pain associated with osteoarthritic lesions of the thoracolumbar vertebral column. *Am J Vet Res* 68:329-337, 2007.
318. Kidd LJ, Cowling NR, Wu AC, et al: Bisphosphonate treatment delays stress fracture remodeling in the rat ulna. *J Orthop Res* 29:1827-1833, 2011.
319. Milgrom C, Finestone A, Novack V, et al: The effect of prophylactic treatment with risedronate on stress fracture incidence among infantry recruits. *Bone* 35:418-424, 2004.
320. Arlot ME, Jiang Y, Genant HK, et al: Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. *J Bone Miner Res* 23:215-222, 2008.
321. Schulte FA, Lambers FM, Kuhn G, et al: In vivo micro-computed tomography allows direct three-dimensional quantification of both bone formation and bone resorption parameters using time-lapsed imaging. *Bone* 48:433-442, 2011.
322. Zhou J, Yang F, Xu X, et al: Dynamic Evaluation of Orthodontically-Induced Tooth Movement, Root Resorption, and Alveolar Bone Remodeling in Rats by in Vivo Micro-Computed Tomography. *Med Sci Monit* 24:8306-8314, 2018.