

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Changements matriciels dans le cartilage de
l'épiphyse en développement : un événement
précoce dans la pathogénie de l'ostéochondrose
équine ?**

par

Marie LECOCQ, DMV

Département de sciences cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade Maître ès Sciences (M.Sc.)
En sciences vétérinaires
Option sciences cliniques

Août 2007

©Marie Lecocq, 2007



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Changements matriciels dans le cartilage de
l'épiphyse en développement : un événement
précoce dans la pathogénie de l'ostéochondrose
équine ?**

Présenté par :

Marie LECOCQ, DMV

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pierre Hélie, président-rapporteur

Sheila Laverty, directrice de recherche

Christiane Girard, codirectrice

Kate Alexander, membre du jury

Résumé

L'ostéochondrose est une des plus importantes maladies orthopédiques du développement chez le cheval de par ses conséquences sérieuses, à la fois en terme de santé animale, mais également en terme de perte économique pour les propriétaires et les éleveurs. La prévalence de l'ostéochondrose équine a été estimée entre 10 à 25% toutes races confondues (Jeffcott 1993). Il existe encore aujourd'hui une confusion considérable concernant son étiologie multifactorielle, ainsi que sa pathogénie. Les lésions histologiques d'ostéochondrose les plus précoces décrites sont dans le grasset d'un poulain âgé de 2 jours (Carlson *et al.* 1995) suggérant que ces lésions peuvent être déjà présentes avant la naissance. Notre objectif était d'étudier les caractéristiques histologiques de l'épiphyse équine en développement pour détecter des changements pouvant être des précurseurs de lésions d'ostéochondrose. Des sections d'épaule, de coude, de grasset, de jarret et de boulet provenant de 21 fœtus et de 13 poulains nouveau-nés ont été colorées avec Safranine O Fast green et rouge picrosirius pour visualiser l'apparence de la matrice extracellulaire du cartilage et l'agencement des fibres de collagène type II. Des changements matriciels ont été très fréquemment observés chez la majorité des individus nous laissant croire à des changements physiologiques associés au remodelage et au développement normal de la matrice, mais pouvant être des zones plus vulnérables aux traumatismes et sujettes au développement de lésions secondaires d'ostéochondrose.

Mots clés :

Ostéochondrose ; cheval ; fœtus ; histologie ; épiphyse ; cartilage épiphysaire ; matrice de collagène

Abstract

Osteochondrosis is one of the most important developmental orthopedic diseases in horses and results in considerable economic loss for both horse owners and breeders because of diminished athletic performance and cost of surgical therapy. The prevalence of osteochondrosis in horses is reported to be 10 to 25% all breeds combined (Jeffcott, 1993). Confusion persists however concerning its multifactorial etiology as well as its pathogenesis. The earliest histological lesions of osteochondrosis has been reported in the stifle of a 2-day-old foal (Carlson *et al.* 1995), suggesting that these lesions may be present prior to birth. Our objective was to study the histological features of the developing equine epiphysis to detect changes that could be precursors to osteochondrosis lesions. Osteochondral samples were harvested at predilection sites of osteochondrosis from shoulders, elbows, stifles, hocks and fetlocks of 21 fetuses and 13 newborn foals. Sections were stained with Safranin O Fast Green and Picrosirius red to determine the appearance of the extracellular matrix of the cartilage and the structural arrangement of the type II collagen fibers. Matrix changes were frequently observed in most horses suggesting physiological changes associated with normal matrix remodelling and development. However, specific areas were identified that could be structurally weaker and therefore more susceptible to trauma leading to the secondary development of osteochondrosis lesions.

Key-words :

Osteochondrosis ; horse ; fetus ; histology ; epiphysis ; epiphyseal cartilage ; collagen matrix

Table des Matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	1
Chapitre I : Recension de la littérature.....	3
1.1 <u>Description d'une articulation synoviale saine</u>.....	3
1.1.1 <u>Structure générale</u>	3
1.1.2 <u>L'os sous-chondral</u>	3
1.1.2.1 Aspect macroscopique.....	3
1.1.2.2 Aspect microscopique et biochimique.....	3
1.1.3 <u>Le cartilage articulaire, un cartilage hyalin</u>	4
1.1.3.1 Aspect macroscopique.....	5
1.1.3.2 Aspect microscopique et biochimique.....	5
1.1.3.3 Organisation structurale du cartilage articulaire.....	7
1.1.3.3.1 Méthodes d'étude de la structure du cartilage.....	7
1.1.3.3.2 Ultrastructure du cartilage articulaire.....	10
1.2 <u>Développement de l'articulation et ossification endochondrale</u>.....	12
1.2.1 <u>Bref rappel de l'ossification endochondrale des os longs</u>	13
1.2.2 <u>Développement des épiphyses</u>	14
1.2.2.1 Définition du cartilage de croissance.....	14
1.2.2.2 Structure histologique du cartilage de croissance.....	15
1.2.2.3 Rôle du périchondre.....	18

1.2.2.4	Vascularisation de l'épiphyse en développement.....	20
a.	Invasion de l'épiphyse par les vaisseaux sanguins.....	20
b.	Distribution des canaux vasculaires dans l'épiphyse.....	21
c.	Description anatomique de la vascularisation épiphysaire....	23
d.	Rôle des canaux vasculaires.....	24
e.	Régression des canaux vasculaires et chondrification.....	24
1.2.2.5	Développement du cartilage articulaire.....	26
a.	Période de développement.....	26
b.	Organisation moléculaire du cartilage articulaire en développement.....	27
1.2.3	<u>Contrôle moléculaire lors de l'ossification endochondrale</u>	28
1.3	<u>L'ostéochondrose</u>	30
1.3.1	<u>Définition</u>	30
1.3.2	<u>Contexte épidémiologique</u>	30
1.3.2.1	Espèces affectées.....	30
1.3.2.2	Prévalence de l'ostéochondrose chez le cheval.....	31
1.3.2.3	Articulations affectées par l'ostéochondrose chez le cheval...	32
1.3.2.4	Signes cliniques de l'ostéochondrose chez le cheval.....	34
1.3.3	<u>Hypothèses diverses sur l'étiologie de l'ostéochondrose</u>	35
1.3.3.1	Taille et taux de croissance.....	35
1.3.3.2	Genre.....	36
1.3.3.3	Hérédité.....	36
1.3.3.4	Nutrition.....	37
1.3.3.5	Exercice.....	40
1.3.3.6	Traumatismes et forces biomécaniques.....	41
1.3.3.7	Ischémie et rôles des canaux vasculaires.....	43
1.3.4	<u>Physiopathogénie de l'ostéochondrose</u>	47

1.3.5	<u>Pathologie</u>	50
1.3.5.1	Changements microscopiques lors d'ostéochondrose.....	51
1.3.5.2	Changements biochimiques lors d'ostéochondrose.....	55
1.4	<u>Hypothèse et objectifs</u>	60
Chapitre II : Article.....		61
2.1	<u>Abbreviations</u>	63
2.2	<u>Summary</u>	64
2.3	<u>Introduction</u>	65
2.4	<u>Methods</u>	67
2.4.1	<u>Sample collection and preparation</u>	67
2.4.2	<u>Safranin O Fast green staining and evaluation</u>	68
2.4.3	<u>Picrosirius red staining for collagen structural assessment</u>	69
2.4.4	<u>Statistical analysis</u>	70
2.5	<u>Results</u>	71
2.5.1	<u>Horses</u>	71
2.5.2	<u>Safranin O Fast green staining</u>	71
2.5.2.1	Appearance of the extracellular matrix and cellularity.....	71
2.5.2.2	Appearance of the ossification front.....	72
2.5.2.3	Vascular density of the growth cartilage.....	73
2.5.3	<u>Picrosirius red staining; collagen structural features</u>	74
2.5.3.1	Appearance of the extracellular matrix	74
a.	Articular region of the articular-epiphyseal cartilage complex....	75
b.	Epiphyseal region of the articular-epiphyseal cartilage complex..	75
c.	Comparison of ECM changes and Picrosirius red sections.....	77
2.5.3.2	Vascularity of the growth cartilage.....	77
2.5.3.3	Study of horses with mature cartilage for comparative purpose.....	78
2.6	<u>Discussion</u>	78
2.7	<u>Acknowledgements</u>	85
2.8	<u>References</u>	86

2.9 <u>Figure legends</u>	93
2.10 <u>Tables</u>	108
Chapitre III : Discussion.....	112
Conclusion.....	120
Bibliographie.....	121

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I : Molécules intervenant dans l'ossification endochondrale et leurs rôles principaux	28
Tableau II : Sites de prédilection des lésions d'ostéochondrose du cheval	33
Tableau III : Sites de prédilection de l'ostéochondrose dans les principales races de chevaux affectées	34
Tableau IV : Classement des lésions histologiques d'ostéochondrose selon Van Weeren et Barneveld et Henson <i>et al.</i>	54

Chapitre II

Table I : Percentage of ECM matrix changes of grade 0, 1 and 2 in each age group	108
Table II : Articular sites with a significant risk of having ECM changes (Odds Ratio; 95% confidence interval; pairwise p-value)	109
Table III : Articular sites with a significant risk of having an indented ossification front (Odds Ratio; 95% confidence interval; pairwise p-value)	110
Table IV : Significant differences in vascular density between pairs of articular sites as a function of age. The table shows estimates of the mean difference between the vascular densities of two articular sites; pairwise p-value	111

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1 : Schéma d'un os long (humérus)	4
Figure 2 : Diagramme représentant l'agencement des structures dans la matrice extracellulaire	7
Figure 3 : Cartilage articulaire du tibia d'une souris adulte, coloré au rouge picrosirius et observé sous lumière polarisée	9
Figure 4 : Modèle en arcade du collagène de type II dans le cartilage articulaire	10
Figure 5 : Stades de l'ossification endochondrale d'un os long	14
Figure 6 : Cartilage de croissance et centre d'ossification secondaire	15
Figure 7 : Zones histologiques du cartilage de croissance	16
Figure 8 : Formation du centre d'ossification secondaire	17
Figure 9 : Les différents composants du périchondre	19
Figure 10 : Distribution des canaux vasculaires dans l'épiphyse	22
Figure 11 : Vascularisation du cartilage de croissance	24
Figure 12 : Chondrification des canaux du cartilage	25
Figure 13 : Cartilages de croissance de tibia de souris colorés au Picrosirius red et observés sous lumière polarisée	27
Figure 14 : Lésion d'ostéochondrose chez un porcelet âgé de 11 semaines, nécrose vasculaire	44
Figure 15 : Rôle des stimuli mécaniques au site d'anastomose des vascularisations cartilagineuses et osseuses	45
Figure 16 : Lésions macroscopiques d'ostéochondrose	49
Figure 17 : Diagrammes de développement des lésions d'ostéochondrose dans le jarret et le grasset de poulains Warmbloods	50
Figure 18 : Lésions d'ostéochondrose chez un porc âgé de 7 semaines [A] et de 15 semaines [B] ; nécrose vasculaire et chondronécrose	51
Figure 19 : Coupes de lèvres trochléaires fémorales latérales de poulains âgés de 6 mois [A] et de 1 an [B] ; aspect des chondrones	52
Figure 20 : Zones hypertrophiques de cartilage de croissance de poulains ;	

perte de l'arrangement en colonne des chondrocytes hypertrophiques lors d'ostéochondrose	52
Figure 21 : Lésions d'ostéochondrite disséquante de la lèvre trochléaire fémorale latérale d'un cheval	53
Figure 22 : Echancrure dans le front d'ossification de la trochlée fémorale latérale d'un poulain âgé de 10 semaines	55
Figure 23 : Activité des gélatinases dans un cartilage articulaire avec ostéochondrite disséquante	58

Chapitre II

Figure 1 : The 9 articular sites (shaded areas) sampled for analysis	97
Figure 2 : Safranin O Fast green stained sections. [A] Distal metacarpal cartilage from a 11 month fetus illustrating fields where cartilage canals were counted (x40). [B] Distal tibial cartilage from an 8 month fetus [C] Glenoid cavity cartilage from a 1 day foal	98
Figure 3 : Percentage of specimens with ECM changes on Safranin O Fast green	99
Figure 4 : Percentage of specimens with regular or indented ossification front on Safranin O, all ages taken together, for each articular site	100
Figure 5 : [A] Mean \pm SD vascular density (number of cartilage canals per x40 microscope field) in each age group. [B] Mean \pm SD vascular density of the different articular sites in each age group. [C] Mean \pm SD cartilage canal area in the 3 zones of the growth cartilage (superficial, intermediate and deep) for each age group in 2 joints	101
Figure 6 : Fetal cartilage stained with Safranin O Fast green and picosirius red. [A] Distal metacarpal cartilage from a 6 month fetus. [B] Lateral femoral condyle cartilage from an 8 month fetus	102
Figure 7 : Collagen network organization in the articular-epiphyseal cartilage complex of the distal tibia from a 9 month fetus. In the section of the epiphysis stained with picosirius red and observed with the naked eye (left picture), the different histological zones of the cartilage	

corresponding to the pictures A to E are shown by dotted lines. The secondary center of ossification is visible in the middle of the section.

[A-E] Sections are observed by light microscopy (1) or polarized light microscopy (2)

103

Figure 8: Distal tibial cartilage section from a 11 month fetus stained with picosirius red and examined with polarized light microscopy. Presence of a very sudden transition (arrow) between the upper tangential orientation of the collagen fibers in the proliferative zone and their radial orientation in the lower hypertrophic zone

104

Figure 9: Distal metacarpal cartilage from a 6 month fetus. [A] Grade 1 ECM change in a Safranin O Fast green stained section. [B] Polarized light microscope image of the same section stained with picosirius red: the area of paleness of the matrix with hypocellularity noted in figure A is marked with arrows

105

Figure 10: Vascularity of different growth cartilages stained with Picosirius red. [A] Polarized light microscope (PLM) images of the Glenoid cavity cartilage from a 6 month fetus located around a cartilage canal. [B] PLM image of a glenoid cavity cartilage from a 6 month fetus. [C] PLM image of a glenoid cavity cartilage from a 1 day foal. [D] Light microscopy (LM) (1) and PLM (2) images of a glenoid cavity cartilage from a 11 month fetus. [E] LM (1) and PLM (2) images of a chondrifying cartilage canal from the distal metacarpal cartilage of a 1 day foal. [F] Sections of a lateral trochlear ridge of femur from a 1 day foal stained with Picosirius red and observed with the naked eye (1) or imaged using PLM (2)

106

Figure 11: [A] Distal tibial articular cartilage from a 2 year old horse stained with Safranin O Fast green (SOFG) (1) or with picosirius red and imaged using polarized light microscopy (PLM) (2). [B] Medial femoral condyle section from a 10 month weanling stained with SOFG (1) or with picosirius red and imaged using PLM (2)

107

Liste des sigles et des abréviations

BMP	B one m orphogenetic p rotein (Protéine morphogénique osseuse)
FGF	F ibroblast g rowth f actor (Facteur de croissance de fibroblastes)
DODs	D evelopmental o rthopedic d iseases (Maladies orthopédiques du développement)
GAG	G lycosaminoglycane
GH	G rowth h ormone (Hormone de croissance)
IGF-1	I nsulin-like g rowth f actor- 1 (Facteur de croissance insulinomimétique de type 1)
Ihh	I ndian h edgehog
μIRM	I magerie par r ésonance m agnétique de haute résolution
MEC	M atrice e xtra-cellulaire
MMP	M atrix m etallo p rotease (Métalloprotéase matricielle)
OC	O stéochondrose
OCD	O stéochondrite d issécante
PG	P rotéoglycane
PTHrP	P arathyroid h ormone-related p rotein (Peptide relié à l'hormone parathyroïdienne)
TGF-β	T ransforming g rowth f actor- β (Facteur de croissance transformant-β)
VEGF	V ascular e ndothelial g rowth f actor (Facteur de croissance endothélial vasculaire)

Remerciements

A Dr Sheila Laverty, *directrice*

Un immense merci pour ces 2 années passées ensemble. Votre enthousiasme, vos idées fourmillantes et votre rigueur m'ont vraiment fait aimer ce domaine jusqu'alors inconnu pour moi qu'est la recherche. Merci aussi pour votre disponibilité et vos encouragements, même dans les moments plus difficile, qui ont largement permis de mener à bien ce projet et de le finaliser à Dublin...je n'oublierai pas nos nombreuses répétitions pour essayer d'avoir le parfait accent irlandais! Et enfin, merci pour tout vos conseils personnels qui ont rendu mon intégration québécoise beaucoup plus facile.

A Dr Christiane Girard, *codirectrice*

Merci pour votre temps, votre patience, vos encouragements. Merci de m'avoir enseigné les bases de l'histologie du cartilage sur ces centaines de lames qui, au début, me semblaient si difficiles à interpréter.

A Dr Pierre Hélie, *Président-rapporteur*

Pour avoir accepté de présider le jury d'évaluation.

A Dr Kate Alexander, *membre du jury*

Pour avoir accepté de participer au jury d'évaluation.

A Dr Ursula Fogarty,

Pour avoir financé ce projet et nous avoir fourni les échantillons.

A Guy Beauchamp,

Pour son aide précieuse pour les analyses statistiques.

A Hélène Richard,

Pour tout le temps passé à nous aider, pour ta disponibilité, tes conseils précieux et ta bonne humeur!

A Fabien,

Merci d'être là, à mes côtés, et d'avoir confiance en moi. Et puis merci aussi, de m'avoir permis de vivre cette expérience québécoise... finalement, ce n'est pas si mal, ça me plaît bien !!!

A ma famille,

Merci pour votre amour, votre soutien...merci d'être si proches alors que vous êtes si loin.

Introduction

Les boiteries résultant d'anomalies de la croissance du squelette sont une préoccupation majeure dans l'industrie du cheval à travers le monde. Ces pathologies ont des conséquences sérieuses, à la fois en terme de santé animale, mais également en terme de pertes économiques pour les propriétaires et les éleveurs. Le complexe des maladies orthopédiques du développement (DODs : complex of Developmental Orthopedic Diseases) regroupe 6 pathologies sérieuses chez le cheval, dont la plus importante est l'ostéochondrose (OC) articulaire. Cette affection ostéoarticulaire juvénile est caractérisée par un défaut du processus d'ossification endochondrale des cellules du cartilage de croissance métaphysaire et épiphysaire. On désigne par ossification endochondrale le processus de transformation d'un tissu cartilagineux hyalin en tissu osseux qui permet la formation des os longs du milieu de la période embryonnaire jusqu'à la fin de la puberté. Lors d'OC, il y a un arrêt prématuré localisé de cette transformation, entraînant la formation de zones de rétention de cartilage à l'interface cartilage/os. Cette lésion primitive infra-clinique peut soit guérir partiellement ou même totalement, soit évoluer sous forme d'ostéochondrite disséquante (OCD) qui correspond à la libération partielle ou totale d'un fragment du complexe de cartilage articulaire/épiphysaire dans l'articulation. Ce dommage peut se manifester cliniquement par une distension articulaire, de la boiterie et de la douleur. De plus, la chronicité de l'inflammation associée à la lésion cartilagineuse favorise le développement d'ostéoarthrose qui peut devenir extrêmement invalidante.

Depuis les années 70 environ, de nombreuses études concernant l'OC ont été entreprises, mais sa compréhension reste encore limitée. En effet, il existe encore aujourd'hui une confusion considérable concernant son étiologie multifactorielle, ainsi que sa pathogénie. Pourtant une meilleure connaissance de l'étiologie et de la pathogénie de cette maladie pourrait permettre de diminuer sa prévalence, dans la population équine en particulier où son impact est majeur, en permettant de la diagnostiquer et de la traiter plus précocement pour améliorer son pronostic. En effet, la période durant laquelle la réparation des lésions d'OC est possible est très étroite, et se limite à 8-10 mois d'âge (Dik *et al.* 1999). La régression des canaux vasculaires du cartilage de croissance, qui semble avoir lieu avant l'âge de 7 mois chez le cheval

(Carlson *et al.* 1995), pourrait jouer un rôle (Carlson *et al.* 1991; Ytrehus *et al.* 2004c). Ainsi, une détection précoce de l'OC, quand une guérison est encore possible, pourrait être utile.

La précocité des phénomènes pathogéniques est fortement suspectée du fait de la mise en évidence de lésions histologiques d'OC chez des poulains nouveau-nés (Rejnö and Strömberg 1978; Carlson *et al.* 1995; Henson *et al.* 1997a; Henson *et al.* 1997b), ce qui rend absolument nécessaire l'étude de la période post-natale immédiate et fœtale.

Chapitre I : Recension de la littérature

1.1. Description d'une articulation synoviale saine

1.1.1. Structure générale

L'articulation synoviale ou diarthrose est une articulation assurant un mouvement ample entre deux os adjacents, permettant à la fois la stabilité et la mobilité du squelette. Afin de permettre les mouvements de frottements des extrémités osseuses les unes sur les autres, l'os est recouvert d'une couche lisse de cartilage articulaire (cartilage hyalin) lubrifié par un film de liquide synovial. L'articulation est maintenue par des bandes de tissu fibreux denses (ligaments), externes ou internes à la cavité articulaire ; les ligaments externes entourent une capsule articulaire fibreuse dont la face interne est recouverte par une membrane synoviale (Eurell and Van Sickle 1998).

1.1.2. L'os sous-chondral

1.1.2.1. Aspect macroscopique

L'os est un tissu de soutien hautement spécialisé, vascularisé et innervé, caractérisé par sa rigidité et sa dureté (Banks 1993a). Les os longs (fémur, tibia, métacarpes/métatarses, etc.) sont composés d'une diaphyse centrale à cortex épais, d'une épiphyse à chaque extrémité et d'une métaphyse les reliant (Fig.1). Ces deux dernières sont principalement composées d'os spongieux formé par un lavis tridimensionnel de trabécules osseuses, délimitant un labyrinthe d'espaces médullaires intercommunicants occupés par de la moelle osseuse et des vaisseaux. Le périoste recouvre la corticale sauf sur l'épiphyse où un cartilage articulaire recouvre l'os dit sous-chondral (Eurell and Van Sickle 1998).

1.1.2.2. Aspect microscopique et biochimique

L'os est un tissu composé de cellules entourées d'une matrice extracellulaire. Il existe quatre principaux types de cellules osseuses : les cellules ostéoprogénitrices (cellules souches) sont à l'origine des ostéoblastes actifs qui synthétisent la matrice osseuse (ostéoïde) et permettent sa minéralisation, et des ostéocytes inactifs, les plus

nombreux chez l'adulte, qui reposent dans l'os minéralisé. Enfin les ostéoclastes permettent la résorption osseuse impliquée dans le remodelage de l'os minéralisé (Stevens and Lowe 1997).

- La matrice extracellulaire ou ostéoïde est un tissu de soutien constitué de collagène de type I (90 à 95% du collagène total), inclus dans un gel homogène composé de protéoglycanes, de glycoprotéines spécifiques liant fortement le calcium, d'un fluide riche en acide hyaluronique et de dépôt de sels minéraux (cristaux de calcium ou d'hydroxyapatite) lui conférant sa rigidité et sa force mécanique (Eurell and Van Sickle 1998).

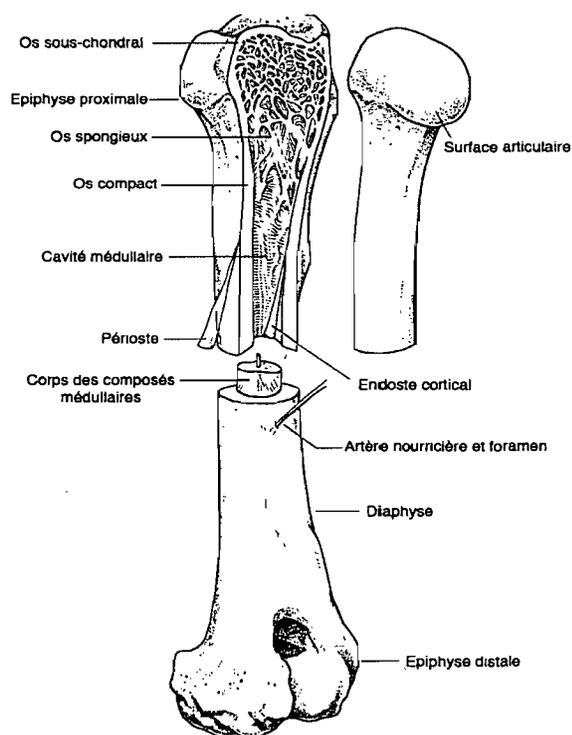


Figure 1 : Schéma d'un os long (humérus). Selon Banks 1993a.

1.1.3. Le cartilage articulaire, un cartilage hyalin

Au début de la vie fœtale, le cartilage forme temporairement la plus grande partie du squelette ; il persiste chez l'adulte sur les surfaces articulaires des os, et comme seul squelette de soutien dans les voies respiratoires et dans certaines parties de l'oreille.

1.1.3.1. Aspect macroscopique

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif lisse, translucide et blanchâtre, recouvrant les surfaces articulaires des os longs. Chez l'adulte, il est dépourvu de connections vasculaires, lymphatiques et nerveuses et non recouvert de périchondre. Malgré ses quelques millimètres d'épaisseur seulement, son rôle est primordial : il peut résister aux forces de compression et de tension imposées grâce à ses propriétés viscoélastiques et à sa forte propension à l'expansion et au gonflement par appel d'eau. Sa résistance aux cisaillements lui provient essentiellement de la résistance à la traction des fibres de collagène. Son système de lubrification lui permet de réduire les frictions existant entre les deux surfaces osseuses adjacentes et de supporter les variations de charge importantes auxquelles l'articulation est soumise (Poole *et al.* 2001).

1.1.3.2. Aspect microscopique et biochimique

- Cellules du cartilage articulaire

La cellule active dans le cartilage articulaire est le chondrocyte qui dérive du chondroblaste (présent uniquement dans le cartilage de croissance), lui-même issu d'une cellule mésenchymateuse (Poole 1997). Il assure la synthèse et la dégradation de tous les composants de la matrice extracellulaire cartilagineuse. Chaque chondrocyte est entouré par une fine couche de matrice péricellulaire de 2 μm d'épaisseur, le tout formant un chondrone, concentré dans une petite cavité appelée lacune, qu'il emplit complètement à l'état vivant (Poole 1997). Dans le tissu sain, les lacunes contiennent seulement une cellule, sauf lors du développement où quelques fois deux, quatre, voire six cellules peuvent s'y retrouver formant des groupes isogéniques. On observe également ces groupes isogéniques liés à des phénomènes pathologiques lors de fragmentation de la matrice extracellulaire ou lors de tentatives de réparation de lésions (Eurell and Van Sickle 1998; Chi *et al.* 2004).

Le cartilage articulaire adulte étant avasculaire, les chondrocytes se nourrissent et éliminent leurs déchets par diffusion à travers la matrice extracellulaire vers le liquide synovial, alors que la partie la plus profonde du cartilage articulaire (cartilage calcifié minéralisé) se nourrit plutôt par diffusion à partir des vaisseaux sanguins de l'os sous

chondral. Le métabolisme des chondrocytes est généralement anaérobie, rendant le cartilage riche en lactate (Poole *et al.* 2001).

- La matrice extracellulaire (MEC)

- La phase liquide (65 à 80% de la matrice) (Poole 1997) est constituée principalement d'eau, dans laquelle se retrouvent en suspension de l'oxygène, de petites molécules et de nombreux cations.
- A l'intérieur de cette phase liquide se trouve un échafaudage tridimensionnel, dont la trame est constituée par des fibres de collagène de type II (90% du collagène total), VI, IX, X, XI, XII et XIV synthétisées par les chondrocytes (Eurell and Van Sickle 1998).
- Les fibres de collagène de type II sont reliées entre elles par des molécules d'acide hyaluronique, sur lesquelles viennent s'enchâsser de manière non covalente, des protéoglycanes (PGs), en majorité des aggrecanes (Fig.2). Ceux-ci sont formés d'un noyau protéique sur lequel viennent se fixer plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) (principalement des chondroïtine sulfates et des kératane sulfates), riches en radicaux acides très hydrophiles responsables du transport des électrolytes et de la teneur en eau et de l'élasticité du cartilage (Eurell and Van Sickle 1998).

Ce réseau tridimensionnel donne au cartilage une forme, une stabilité, une force de tension et une résistance aux forces de cisaillement (Grunder 2006) tout en permettant d'ancrer la MEC à l'os sous-chondral et de protéger les chondrocytes.

- D'autres molécules sont également présentes dans le cartilage articulaire comme des protéines non collagéniques, des glycoprotéines, des enzymes protéolytiques, des facteurs de croissance et des cytokines.

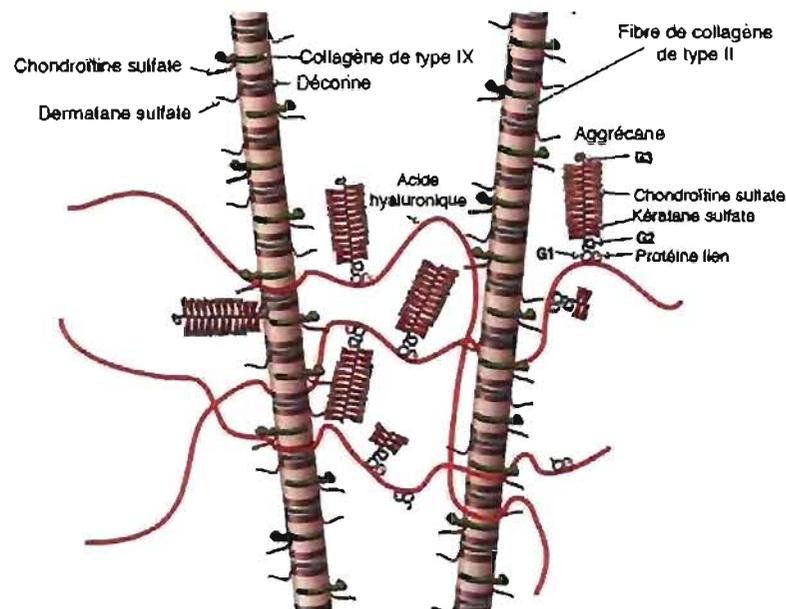


Figure 2 : Diagramme représentant l'agencement des structures dans la matrice extracellulaire. Selon Poole et al. 2001.

1.1.3.3. Organisation structurelle du cartilage articulaire

1.1.3.3.1. Méthodes d'étude de la structure du cartilage

Les deux principales molécules du cartilage sont le collagène et les PGs. Leur organisation spatiale, au sein de la MEC, est directement à l'origine des propriétés biomécaniques du cartilage articulaire (Jeffery *et al.* 1991). C'est principalement l'agencement des fibres de collagène sous forme d'un réseau tridimensionnel, sur lequel les PG vont s'enchâsser, qui va être important et qui va donner au cartilage toute sa forme. Pourtant, ce réseau de collagène a été assez peu étudié, car il requiert des méthodes d'imagerie de haute résolution. La microscopie électronique, la microscopie à lumière polarisée, et plus récemment la μ IRM permettent de mettre en évidence son ultrastructure.

- ***La microscopie à lumière polarisée pour l'étude de la structure du collagène***

La polarisation de la lumière est changée par les structures présentes dans son onde de propagation. La différence entre les vitesses respectives de chaque plan de lumière est généralement observée comme un changement dans la couleur ou

l'intensité de la lumière produite, appelé biréfringence. Un microscope à lumière polarisée utilise ces effets de lumière en se servant de filtres polarisant ; le premier filtre, le polariseur, permet de polariser la lumière avant son passage à travers l'échantillon, le deuxième filtre, l'analyseur, est positionné à 90° du premier et élimine toute la lumière qui ne provient pas de l'échantillon. Ainsi, l'angle entre le polariseur et l'analyseur et les structures anisotropes de l'échantillon sont importantes pour la quantité de lumière observée. La plus grande biréfringence est observée quand le polariseur et l'analyseur sont à 45° des structures, la plus faible est pour 0 ou 90° (Hughes 2005). Cette technique d'imagerie peut donc être utilisée pour déterminer l'orientation de structures ou de molécules dans les tissus biologiques. Certains auteurs mentionnent que l'utilisation simple de la microscopie à lumière polarisée manque de résolution pour identifier les fibres de collagène individuellement et pour déterminer précisément les différentes zones dans le cartilage, et que l'utilisation de 2 paramètres (le retardement optique et l'angle d'orientation des fibres en lumière polarisée) peut alors être très utile (Roth *et al.* 1979; Clark 1985).

Les structures isotropes (propriétés identiques dans toutes les directions de l'espace) ne provoquent pas de biréfringence. Par contre, en lumière polarisée, les structures anisotropes, comme la majorité des tissus conjonctifs, font pivoter (ou polarisent) la lumière les traversant permettant d'obtenir une information structurale détaillée souvent supérieure à celle obtenue en lumière simple. Ainsi, le cartilage articulaire est naturellement biréfringent (ou anisotrope) dans certaines zones histologiques du fait de l'orientation et de l'alignement des fibres de collagène dans le tissu et peut donc être étudié par microscopie à lumière polarisée. C'est probablement la technique d'étude conventionnelle la plus communément utilisée pour décrire la structure tridimensionnelle du cartilage. Par différentes méthodes de compensation optique, cette technique permet de donner un aperçu indirect de l'orientation des fibres de collagène. (Hughes 2005)

Trois facteurs influencent la biréfringence du collagène en lumière polarisée : l'orientation des fibres (des fibres mieux ordonnées donnent une meilleure biréfringence), le diamètre des fibres de collagène et la densité du paquetage (plus la densité est grande, meilleure est la biréfringence) (Xia *et al.* 2003).

• *Rouge picrosirius pour l'étude de la structure du collagène* (Fig.3)

La biréfringence naturelle du cartilage articulaire est assez faible et peut être difficile à détecter. Elle peut être rehaussée par l'utilisation d'une coloration spécifique, comme le rouge picrosirius qui colore intensément tous les collagènes (Puchtler *et al.* 1988). Cette coloration est utilisée depuis 1964 (Puchtler and Sweat 1964; Sweat *et al.* 1964) en remplacement de la microfuchsine de van Gieson (1889).

Bien que le rouge picrosirius ait d'abord été prévue pour une visualisation en lumière directe de par l'intense coloration rouge qu'elle produit sur les tissus, elle augmente également la biréfringence des tissus sous lumière polarisée ; cela améliore considérablement la sensibilité, la spécificité et la résolution de l'examen (Puchtler *et al.* 1988). Par contre, ce rehaussement de la biréfringence ne peut être fait que dans des tissus déjà anisotropiques, même faiblement. Le rehaussement de la biréfringence avec la coloration rouge picrosirius est de 700% par rapport aux tissus colorés seulement avec de l'acide picrique (Junqueira *et al.* 1979). Il a été suggéré, au début de l'utilisation du rouge picrosirius, que les différentes couleurs produites sous lumière polarisée indiquaient le type de collagène présent. On sait maintenant que ces couleurs sont plutôt liées au diamètre des fibres de collagène (les plus fines apparaissent vertes ou bleues, puis en s'épaississant deviennent jaunes ; les plus larges sont oranges ou rouges), à l'empaquetage plus ou moins serré de ces fibres (densité) et à leur alignement (Dayan *et al.* 1989).

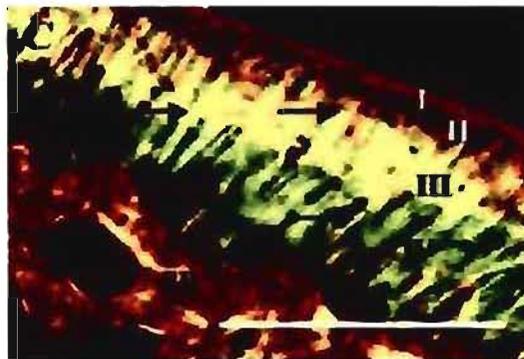


Figure 3 : Cartilage articulaire du tibia d'une souris adulte, coloré avec du rouge picrosirius et observé sous lumière polarisée. Quatre différentes zones histologiques sont visibles : zone tangentielle (I), zone transitionnelle (II), zone radiale (III) et zone calcifiée (IV). L'os sous-chondral (SB), sous la zone calcifiée, est également très biréfringent. (Hughes 2005)

1.1.3.3.2. Ultrastructure du cartilage articulaire adulte

L'organisation spatiale du réseau et la concentration du collagène et des PGs varient selon la région du cartilage. Par exemple, la proportion en eau et en collagène du cartilage est plus importante à proximité de la surface articulaire et diminue avec la profondeur. Le contenu en PG varie en sens inverse. Le cartilage non calcifié du cartilage articulaire s'organise en 3 zones (modèle en arcade (Benninghoff 1925) (Fig.4)), le cartilage calcifié constituant la 4^{ème} zone du cartilage articulaire.

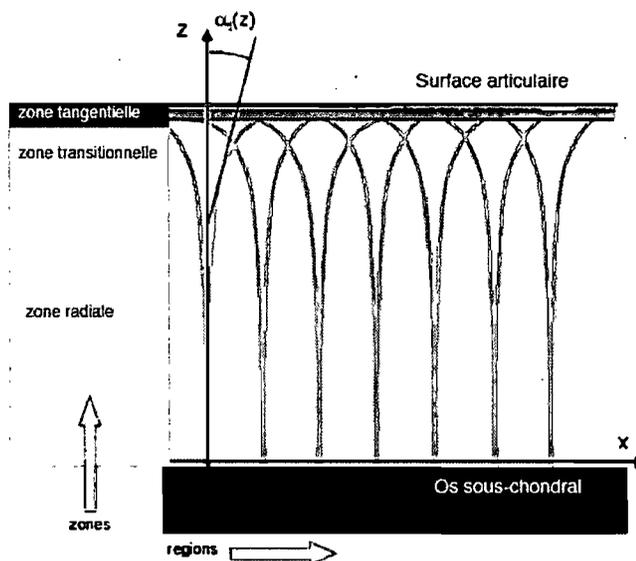


Figure 4 : Orientation de la majeure partie des fibres de collagène de type II dans la MEC du cartilage ; modèle en arcade décrit par Benninghoff en 1925. Selon Gründer 2006.

- La couche la plus superficielle, la zone tangentielle (ou zone superficielle), est directement en contact avec l'espace articulaire ; c'est la couche la plus exposée aux forces de cisaillement, de compression et de tension de l'articulation, elle est très facilement déformable. Elle ne contient que quelques cellules éparses, aplaties, ellipsoïdales (Poole 1997). Cette zone est très riche en fibres de collagène qui forment un réseau parallèle à la surface articulaire, mais pauvre en protéoglycanes. L'orientation des fibres est cruciale pour l'intégrité biomécanique de cette zone. Le filet de fibres de collagène est plus fin que dans les autres zones et chaque fibre individuelle est plus petite en taille. De fines fibres relient en plus les différents paquets de fibres de collagène formant un véritable treillis (Jeffery *et al.* 1991). En

lumière polarisée, cette zone a une apparence hyperintense, avec des fibres de collagène ordonnées (Nieminen *et al.* 2001).

- Vient ensuite la zone transitionnelle (ou zone médiane) où les chondrocytes, entourés par une vaste matrice extracellulaire, sont orientés obliquement. Les fibres de collagènes sont également obliques. Cette zone représente 40 à 60% de l'épaisseur du cartilage. En lumière polarisée, cette zone ne peut être identifiée, elle apparaît noire du fait de l'arrangement isotropique, désorganisé des fibres de collagène (Hughes *et al.* 2005).

- On trouve ensuite la zone radiale (ou zone profonde), qui correspond à environ 30% de l'épaisseur du cartilage articulaire (Mow and Ratcliffe 1997). Les chondrocytes, gros et arrondis, sont alignés en colonnes perpendiculaires à la surface articulaire, de la même façon que les fibres de collagène, épaisses et reliées entre elles par de nombreuses petites fibres formant des ponts (Jeffery *et al.* 1991). C'est dans cette zone du cartilage que la densité cellulaire est la plus importante. Sous lumière polarisée, cette zone est extrêmement biréfringente (Hughes *et al.* 2005).

- La 'tidemark' sépare ensuite le cartilage non calcifié du cartilage calcifié.

- La zone de cartilage calcifié (ZCC) a une frontière sinueuse souvent difficilement distinguable de l'os sous-chondral sous-jacent. Cette zone permet la fixation du cartilage sur l'os grâce à de larges fibres de collagène perpendiculaires à la surface articulaire. Elle permet également de résister aux forces de cisaillement. La biréfringence de la zone calcifiée sous lumière polarisée est assez irrégulière (Modis *et al.* 1996).

Cette structure du réseau de collagène diffère topographiquement selon les différents sites d'une même articulation ; cela peut être interprété comme une adaptation du réseau de collagène aux besoins biomécaniques des différentes régions. Ces variations incluent l'épaisseur des zones histologiques et du cartilage total, la proportion des principaux composés moléculaires, l'organisation des fibres de collagène dans le tissu et les propriétés mécaniques du tissu (Xia *et al.* 2003). Ainsi dans la région centrale du cartilage articulaire qui supporte la majorité de la charge, on retrouve l'organisation normale en 3 zones du cartilage non calcifié (modèle en

arcade). Par contre dans les régions plus périphériques de l'articulation, le collagène semble s'organiser en 5 zones (avec une seconde zone transitionnelle et une seconde zone tangentielle localisées dans la zone profonde du cartilage) (Xia *et al.* 2003).

De même, l'organisation de la MEC semble également différer entre les articulations : par exemple, le cartilage du tibia proximal est relativement pauvre en collagène par rapport au condyle fémoral distal où le paquetage du collagène est beaucoup plus dense. Le cartilage du tibia aurait une plus faible résistance pour les changements de forme instantanés dus à une charge externe soudaine que le cartilage du fémur. Ces différences structurales pourraient avoir une influence sur la pathogénie de maladies impliquant le cartilage articulaire (Modis *et al.* 1996).

1.2. Développement de l'articulation et ossification endochondrale

On désigne par ossification endochondrale la transformation d'un tissu cartilagineux hyalin en tissu osseux. Elle permet la formation des os puis leur élongation et leur épaissement du milieu de la période embryonnaire jusqu'à ce que cesse la croissance osseuse à l'âge adulte (Olsson and Reiland 1978). C'est un processus complexe, imparfaitement connu, qui se déroule en plusieurs étapes (Rivas and Shapiro 2002). On retrouve tout d'abord une ossification endochondrale primaire, conduisant à l'ossification de travées de tissu cartilagineux par de l'os réticulaire immature, puis, lors d'une deuxième phase qui s'étend jusqu'à la puberté, se déroule l'ossification secondaire permettant le remplacement complet de l'os immature par un os mature dit lamellaire. En parallèle, s'effectue la croissance en longueur et en épaisseur des os et du cartilage. Chez les Vertébrés, la croissance et la morphogénèse du squelette appendiculaire commencent par les éléments les plus proximaux, suivis des structures plus distales, avec l'épaule et la hanche qui se développent avant les régions plus distales. De même, dans un même segment osseux, l'ossification endochondrale commence toujours dans la région proximale du membre (Rivas and Shapiro 2002; Huret *et al.* 2005). Cela est l'inverse pour la fermeture des plaques de croissances où les éléments les plus proximaux se ferment en dernier. Chez le cheval,

les plaques de croissance proximale de l'humérus et du fémur se ferment vers 24-26 mois d'âge. La plupart des plaques de croissances plus distales se ferment avant (Butler *et al.* 1993).

Dans la suite de ce mémoire, nous nous intéresserons principalement au développement des épiphyses, car elles sont impliquées lors d'ostéochondrose.

1.2.1. Bref rappel de l'ossification endochondrale des os longs (Fig.5)

- Le futur os long se présente tout d'abord sous forme d'un bourgeon de tissu mésenchymateux immature. Les cellules mésenchymateuses se transforment en chondrocytes pour développer un centre de chondrification. Le nouveau modèle cartilagineux des ébauches osseuses du squelette fœtal a déjà la forme approximative du futur os long : une diaphyse centrale et des épiphyses à chaque extrémité.

- C'est à ce moment que la zone entre les deux os longs juxtaposés est résorbée : la cavité articulaire synoviale est formée. Il y a également formation de la couche de cartilage articulaire lisse aux deux extrémités des os longs. (Stevens and Lowe 1997)

- Un centre d'ossification primaire (ou diaphysaire) apparaît au milieu de la diaphyse, avec résorption du cartilage et arrivée d'ostéoblastes qui produisent de l'ostéoïde. Ce dernier est minéralisé et remplit la diaphyse.

- Puis, une épaisse plaque de cartilage hyalin en prolifération active (plaque de croissance, plaque épiphysaire ou cartilage de conjugaison) apparaît à la jonction de l'épiphyse et de la métaphyse. Elle permet principalement la croissance longitudinale des os longs jusqu'à la puberté par production d'os spongieux.

- À la naissance, la diaphyse osseuse est habituellement complètement ossifiée, mais les deux épiphyses sont encore très cartilagineuses. Le degré d'ossification de l'épiphyse à la naissance dépend de l'espèce. Chez le cheval, l'ossification endochondrale des épiphyses est assez précoce lors du développement fœtal, car à la différence d'autres mammifères, il a une capacité locomotrice totale dans les heures qui suivent sa naissance (Firth and Poulos 1982).

- Plus tard, à la fin de la croissance de l'individu, au moment de la puberté, alors que les plaques de croissance des os se ferment et se minéralisent complètement

(synostose), remplacées par de l'os trabéculaire, les épiphyses gardent une fine couche de cartilage hyalin spécialisé à leur extrémité qui servira de cartilage articulaire pour le reste de la vie de l'individu (Van de Lest *et al.* 2004).

La chronologie des événements majeurs de l'ossification endochondrale n'a pas été étudiée très en détail chez le cheval comme elle l'a été dans d'autres espèces, en particulier la souris et le lapin (Rivas and Shapiro 2002; Doschak *et al.* 2003).

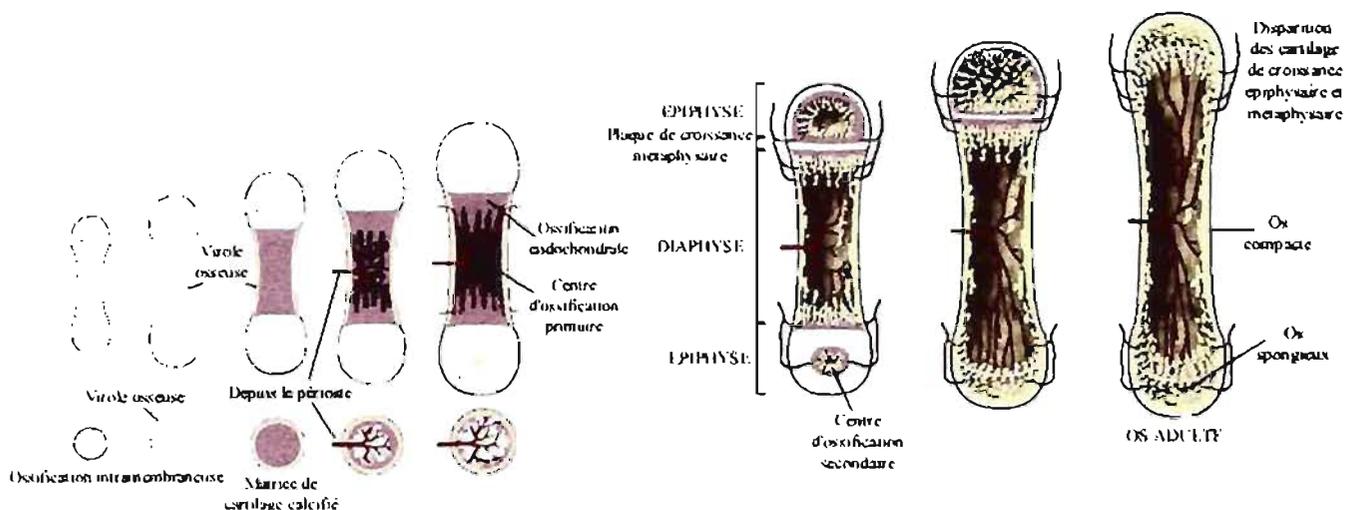


Figure 5 : Stades de l'ossification endochondrale d'un os long. Selon van Weeren 2006

1.2.2. Développement des épiphyses

1.2.2.1. Définition du cartilage de croissance

On appelle « cartilage de croissance » le cartilage transitoire, à forte capacité mitotique, qui sera transformé en tissu osseux lors de l'ossification endochondrale (Fig.6) ; il est formé du cartilage de croissance épiphysaire sub-articulaire (zone superficielle du cartilage de croissance en contact avec le futur cartilage articulaire, encore non différencié, qui sera permanent dans l'articulation synoviale), du cartilage de croissance épiphysaire ou plaque de croissance du centre d'ossification secondaire (responsable de la croissance transverse et sphérique des épiphyses et de la forme des surfaces articulaires) et de la plaque de croissance métaphysaire (importante pour la croissance longitudinale de la diaphyse et de la métaphyse) (Banks 1993b).

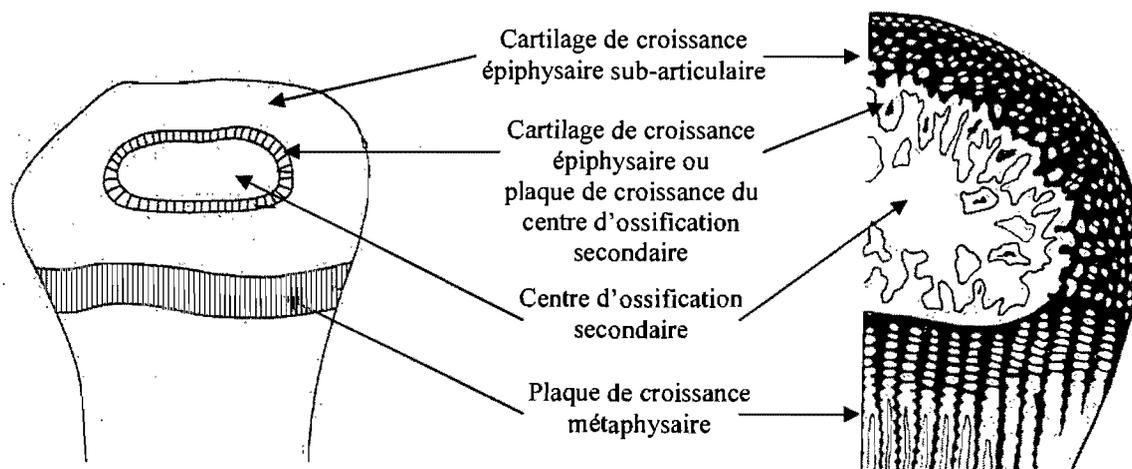


Figure 6 : Cartilage de croissance et centre d'ossification secondaire (Banks 1993b)

1.2.2.2. Structure histologique du cartilage de croissance

Quatre zones peuvent être distinguées d'un point de vue histologique dans le cartilage de croissance ; elles correspondent aux phases successives de la formation de l'os sous chondral (Fig. 7). Les processus histologiques qui se déroulent au sein de la plaque de croissance du centre d'ossification secondaire sont similaires à ceux de la plaque de croissance métaphysaire. La principale différence est que le front d'avancement de l'ostéogénèse est sphérique dans l'épiphyse et linéaire ondulante dans la métaphyse. Récemment, une controverse a fait surface soulignant des différences dans l'organisation cellulaire et l'ossification de ces 2 zones ; les chondrocytes hypertrophiques en particulier ne seraient pas disposés en colonne, mais groupés en petites masses irrégulières dans la plaque de croissance du centre d'ossification secondaire (Byers and Brown 2006).

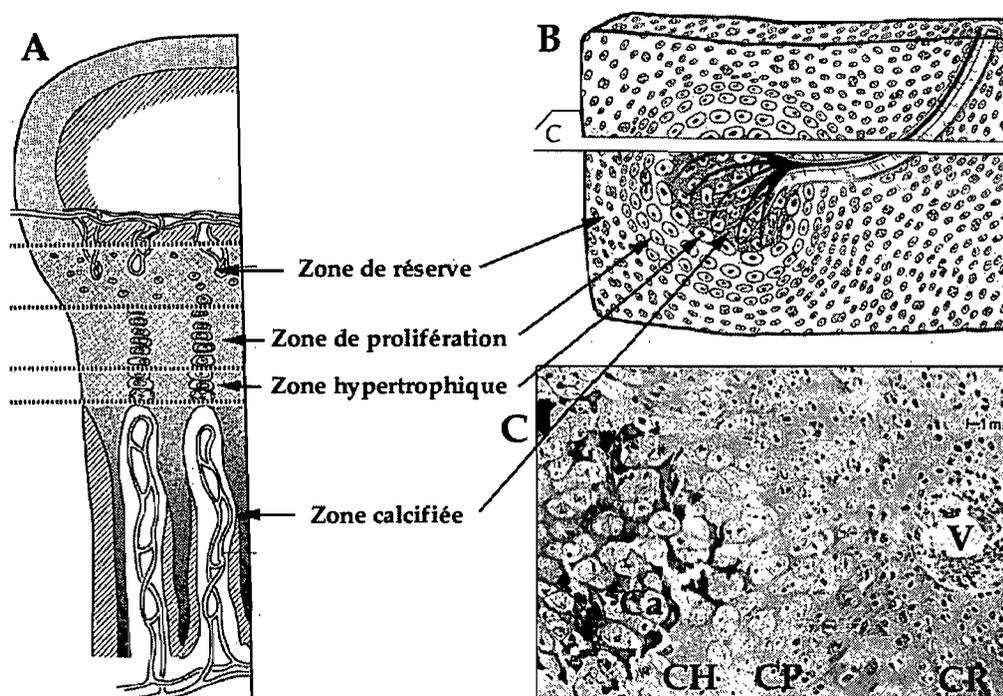


Figure 7 : Zones du cartilage de croissance.

[A] : plaque de croissance métaphysaire (Cormack 1993)

[B], [C] : plaque de croissance du centre d'ossification secondaire (Wilsman and Van Sickle 1970), dessin et photomicrographie de la section histologique correspondant à la coupe C du dessin B (Ca : matrice cartilagineuse calcifiée ; CH : chondrocyte hypertrophique ; CP : chondrocyte prolifératif ; CR : chondrocyte de réserve ; V : vaisseau sanguin)

- La première zone (zone superficielle en contact avec l'épiphyse dans la plaque de croissance métaphysaire ou zone la plus externe dans le cartilage de croissance épiphysaire) est la zone de repos ou de réserve ; elle est composée de cartilage hyalin primitif avec des chondrocytes de réserve (chondrocytes germinaux) entourés d'une abondante MEC, nourris par les vaisseaux sanguins épiphysaires. On parle de « repos » car les chondrocytes ne contribuent pas activement à la croissance osseuse. (Poole 1991; Cormack 1993)

- La zone suivante est la zone de prolifération (cartilage sérié), zone active montrant de nombreuses mitoses qui produisent des colonnes de chondrocytes au sein de la MEC, arrangées longitudinalement dans la plaque de croissance métaphysaire (croissance en longueur) et radialement dans la plaque de croissance du centre d'ossification secondaire (croissance circonférentielle centrifuge). (Poole 1991)

- Puis, les mitoses s'arrêtent. On entre dans la zone hypertrophique (ou zone de maturation) formée de chondrocytes disposés en colonnes ordonnées, avec de grandes vacuoles cytoplasmiques augmentant leur volume de 5 à 10 fois. Leur rôle majeur est de produire de grandes quantités de MEC et de la préparer pour sa future calcification en produisant de la phosphatase alcaline et du collagène de type X, deux composants importants lors de la calcification, concentrées dans des vésicules matricielles qui sont libérées dans la matrice extracellulaire (Gomori 1943; Alini *et al.* 1992). En vue de son ossification future, la MEC du cartilage est résorbée par un clivage sélectif, une dénaturation puis une disparition complète des collagènes de types II et X et des agrécanes par l'action des collagénases-3 et des cathepsines produites par les chondrocytes hypertrophiques (Poole 1991; Glaser *et al.* 2003). Chez le cheval, ces processus semblent plus actifs dans le mois qui suit la naissance puis diminuent rapidement après cette période (Van de Lest *et al.* 2004).

L'hypertrophie de chondrocytes dans le centre du cartilage épiphysaire, vers le 250ème jour de gestation chez l'espèce équine, est le premier changement structurel qui indique le développement du centre d'ossification secondaire dans l'épiphyse (Shingleton *et al.* 1997) (Fig.8). Le cartilage immédiatement périphérique à cette zone d'hypertrophie des chondrocytes devient la « plaque de croissance du centre d'ossification secondaire » (Poole 1991).

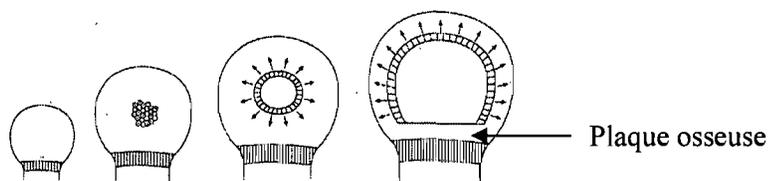


Figure 8 : Formation du centre d'ossification secondaire (Rivas and Shapiro 2002)

- La calcification débute dans de multiples foyers de la MEC de la zone suivante, appelée zone calcifiée, par des dépôts de sels de calcium insolubles (Hunter 1987, 1991). Ces foyers individuels de calcification, immédiatement adjacents à l'extrémité glomérulaire de canaux vasculaires, s'élargissent progressivement puis fusionnent pour donner un unique grand foyer de calcification (Wilsman and Van Sickle 1970). Cette calcification empêche la diffusion des nutriments vers les chondrocytes hypertrophiés qui vont alors fusionner avant de dégénérer et de mourir.

L'apoptose représente le dernier stade du processus hypertrophique (Hatori *et al.* 1995). Dans les lacunes laissées vides par l'apoptose des chondrocytes et la phagocytose de leurs restes et des tissus calcifiés par des ostéoclastes (Byers and Brown 2006), des capillaires sanguins épiphysaires (centre d'ossification secondaire) ou métaphysaires (plaque de croissance) provenant de l'os sous-jacent pénètrent et amènent des cellules mésenchymateuses indifférenciées. Ces cellules se différencient en ostéoblastes qui élaborent du tissu osseux qui remplacera progressivement le tissu cartilagineux calcifié (Ekman and Carlson 1998). Ce processus correspond à l'ossification endochondrale proprement dite.

- Les ostéoblastes déposent de l'ostéoïde, nouvelle MEC non encore minéralisée (substance pré-osseuse), sur la matrice cartilagineuse calcifiée. L'os réticulaire déposé est remplacé par de l'os lamellaire, qui sera spongieux (au centre) ou cortical (en périphérie) selon sa localisation. Une couche de cartilage calcifié persiste et forme la couche la plus profonde du cartilage articulaire en contact avec l'os sous-chondral.

Progressivement lorsque le centre d'ossification secondaire croît, il passe d'une forme sphérique à hémisphérique (Rivas and Shapiro 2002). Il avance vers la périphérie de l'épiphyse (zone du futur cartilage articulaire), rendant la couche de cartilage de croissance de plus en plus fine. La portion d'épiphyse en contact avec la plaque de croissance métaphysaire se ferme assez rapidement, totalement scellée par de l'os dense spongieux ; on l'appelle plaque osseuse terminale, ou simplement plaque osseuse (Brighton 1985; Byers and Brown 2006) (Fig.8).

1.2.2.3 Rôle du périchondre

Lors de l'ossification endochondrale, du tissu périchondral se développe à la base des épiphyses simultanément à la formation de la plaque de croissance métaphysaire qu'elle entoure. Le périchondre est une membrane résistante de tissu conjonctif formée de fibroblastes et d'un réseau dense de fibres de collagène. Contrairement au cartilage lui-même, le périchondre est un tissu vascularisé qui joue un rôle majeur dans le processus de vascularisation et de croissance des épiphyses (Brighton 1985;

Langenskiold 1998). Il est composé du sillon d'ossification péricondrale de Ranvier et de la virole péricondrale de LaCroix (Fig 9).

↳ Le sillon d'ossification péricondrale de Ranvier contient des cellules avec de fortes capacités mitotiques et migratoires (Brighton 1985; Langenskiold 1998; Robinson *et al.* 1999); son rôle est d'approvisionner la plaque de croissance en chondrocytes, permettant sa croissance circonférentielle périphérique de façon appositionnelle (Langenskiold 1998). On y trouve également de nombreuses fibres de collagène, en continuité à la fois avec les fibres de collagène du cartilage épiphysaire et du périoste/péricondre, permettant un ancrage ferme des épiphyses avec la métaphyse (Shapiro *et al.* 1977; Brighton 1985; Deppermann *et al.* 1989).

↳ La virole péricondrale de LaCroix est une bande fibreuse dense qui encercle la plaque de croissance à la jonction os-cartilage. Elle semble avoir deux rôles : d'une part agir comme une membrane de soutien, stabilisant la plaque de croissance, et d'autre part un rôle mécanique d'orientation de la croissance dans une direction axiale (Speer 1982; Brighton 1985).

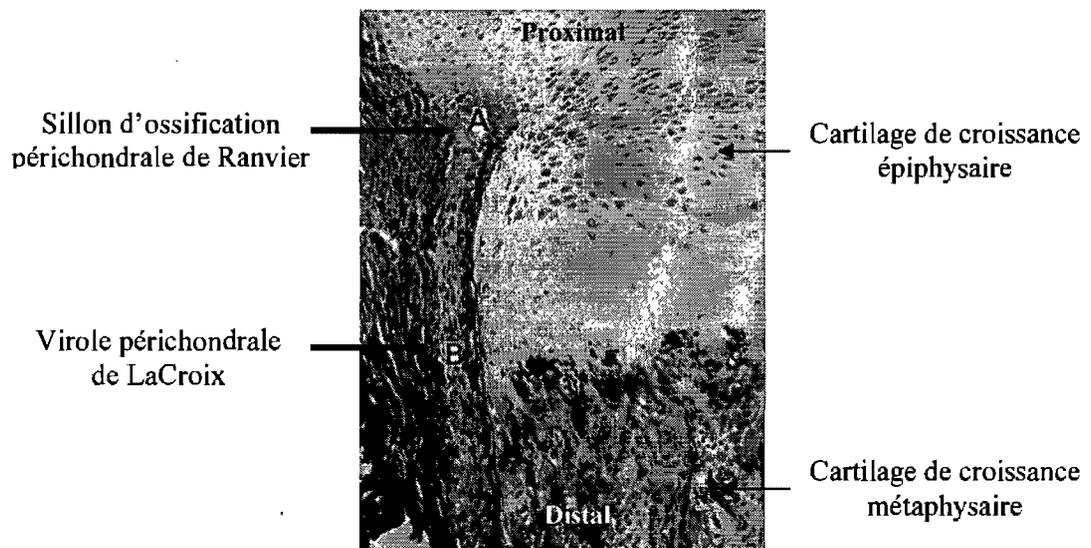


Figure 9 : Photomicrographie de la périphérie de la plaque de croissance proximale du fémur d'un rat âgé de 14 jours : visualisation des différents composants du péricondre (Brighton 1974).

1.2.2.4. Vascularisation de l'épiphyse en développement

La compréhension des structures vasculaires du cartilage de croissance de l'épiphyse en développement est importante car de nombreuses pathologies sont liées à des anomalies de cette vascularisation. C'est d'ailleurs une des hypothèses étiologiques de l'ostéochondrose.

Le développement du cartilage et de l'os dans l'épiphyse est étroitement associé aux modifications vasculaires. Lors de la deuxième moitié de la période embryonnaire, au moment où la cavité articulaire est totalement formée, bien avant la formation du centre d'ossification secondaire, le cartilage hyalin des épiphyses de la plupart des mammifères est largement irrigué par un système vasculaire complexe contenu dans des canaux vasculaires (Shapiro 1998). Puis, avec l'amincissement progressif du cartilage de croissance et l'ossification des épiphyses, la vascularisation régresse (Jaramillo *et al.* 2004).

a. Invasion de l'épiphyse par les vaisseaux sanguins

Des canaux vasculaires ont été observés dans le cartilage de croissance épiphysaire de fœtus équin vers le 130^{ème} jour de gestation pour une durée totale de gestation de 340 jours en moyenne chez cette espèce (Shingleton *et al.* 1997). A cette période, les chondrocytes du cartilage de croissance épiphysaire produisent des molécules angiogéniques et des facteurs de croissance de cellules endothéliales (bFGF et VEGF) nécessaires pour l'invasion des épiphyses par les vaisseaux sanguins (Gerber *et al.* 1999; Alvarez *et al.* 2005). Cette invasion est un mécanisme encore mal connu (Alvarez *et al.* 2005). Certains (Haines 1933; Wang 1975) parlent d'une inclusion passive; lorsque la matrice cartilagineuse s'étend par croissance appositionnelle à partir du périchondre, elle inclut les vaisseaux périchondraux environnants qui sont engloutis dans ce cartilage en développement. Leur croissance se poursuit alors passivement conjointement avec celle du cartilage. Cette hypothèse est aujourd'hui plus ou moins écartée. Actuellement, on pense plutôt que la vascularisation du cartilage de croissance épiphysaire se déroule par une invasion active et une chondrolyse enzymatique du cartilage de croissance par les canaux du

périchondre dans les zones qui requièrent des nutriments et qui ne peuvent pas être nourries par diffusion passive. Les canaux vasculaires périchondraux entrent activement dans la masse de cartilage épiphysaire, s'y ramifient et prolifèrent activement avant et pendant la formation du centre d'ossification secondaire (Lutfi 1970; Cole and Wezeman 1987; Burkus *et al.* 1993; Skawina *et al.* 1994; Shapiro 1998; Doschak *et al.* 2003).

Lorsque les vaisseaux sanguins pénètrent dans l'épiphyse, il y a dissolution de la matrice cartilagineuse face au front d'avancement du canal. La résorption du cartilage à ce niveau débute par une lyse des principaux composés de la MEC : destruction des liaisons peptides, lyse des protéoglycanes par des métalloprotéases matricielles (MMPs) non identifiés et des aggrécases (Lee *et al.* 2001) et désintégration du réseau de fibres de collagène par la gélatinase-B (MMP-9) et la collagénase-3 (MMP-13) (Davoli *et al.* 2001). Cette lyse est suivie par une résorption (perte de tissu visible microscopiquement) (Lee *et al.* 2001). Chez le rat, il a été montré que cette résorption du cartilage avait principalement lieu dans une zone entourant l'extrémité aveugle des canaux, appelée « preresorptive layer », présentant de nombreux chondrocytes dégénérés, peu de protéoglycanes et une perte de chaînes de glycosaminoglycanes (Lee *et al.* 2001).

b. Distribution des canaux vasculaires dans l'épiphyse

Les canaux peuvent être observés partout dans l'épiphyse, particulièrement dans les zones de fort métabolisme cellulaire autour du noyau d'ossification secondaire où ils sont orientés radialement. Ils sont cependant absents dans une étroite bande de cartilage hyalin sous la surface articulaire (Brighton 1985) (Fig.10). Ils représentent en moyenne 2 à 3% de la surface totale d'une coupe histologique d'épiphyse.

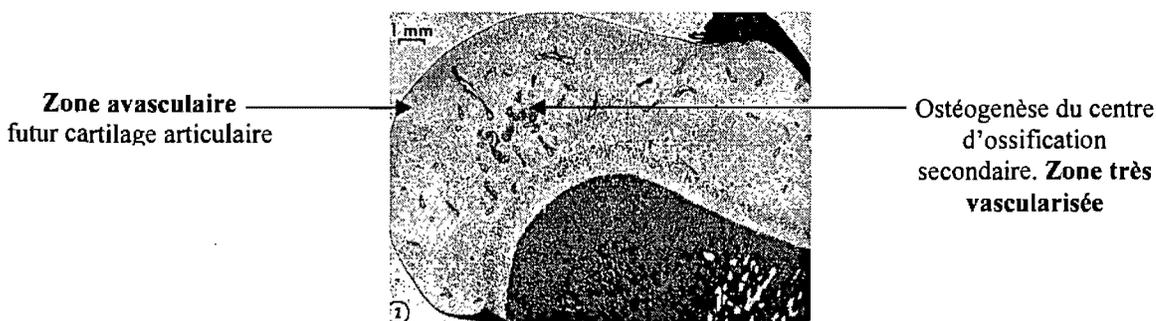


Figure 10 : Photomicrographie de l'épiphyse proximale humérale d'un chiot âgé de deux jours (Wilsman and Van Sickle 1972)

× Nutrition du cartilage articulaire avasculaire lors du développement

La largeur de la bande de cartilage articulaire non vascularisée correspond à la moitié de la distance entre deux canaux vasculaires adjacents dans le reste de l'épiphyse. Cette distance permet donc facilement la diffusion des nutriments dans le cartilage en complément de la diffusion à partir du liquide synovial. L'importance de chacun de ses modes de diffusion est fonction de l'âge, de l'espèce et du site anatomique. Ainsi, l'apport nutritif par le liquide synovial augmente avec l'âge pour être la seule source de nutrition chez l'adulte (Ekman and Carlson 1998).

× Controverse concernant la vascularisation de la plaque de croissance

Il est clair pour tous que le futur cartilage articulaire est une zone avasculaire quelque soit son stade de développement ; par contre l'éventuelle vascularisation de la plaque de croissance est encore sujette à discussion. Pour la grande majorité des auteurs, à aucun moment les canaux de l'épiphyse ne traversent la plaque de croissance pour s'anastomoser avec la vascularisation métaphysaire (Jaramillo *et al.* 2004). D'autres (Brookes 1958; Gardner and Gray 1970; Ekman and Carlson 1998; Shapiro 1998) prétendent le contraire et rapportent, en particulier chez le cheval (Firth and Poulos 1982), l'existence de canaux dits transphysaires, parallèles à l'axe longitudinal de l'os, qui traversent la plaque de croissance complètement ou partiellement de l'épiphyse vers la métaphyse, dans la période embryologique tardive ou post-natale précoce (Ekman and Carlson 1998; Shapiro 1998). Ils irrigueraient les zones prolifératives et hypertrophiques et communiqueraient avec la vascularisation métaphysaire. Rapidement après la naissance (quelques semaines chez le lapin et quelques mois chez l'homme), ces vaisseaux transphysaires seraient oblitérés, et la

plaque de croissance devenue avasculaire, serait alors nourrie par la diffusion de nutriments provenant des vaisseaux épiphysaires et métaphysaires (Shapiro 1998).

c. Description anatomique de la vascularisation épiphysaire

Tous les vaisseaux sanguins sont issus du plexus vasculaire dense du péricondre ; ils entrent dans l'épiphyse cartilagineuse à intervalle régulier le long de la ligne de jonction entre la capsule articulaire et le péricondre, formant une vascularisation en « épingles à cheveux » dans le cartilage adjacent au péricondre (Skawina *et al.* 1994; Doschak *et al.* 2003). La longueur des canaux varie considérablement, de moins de 1 mm sans ramifications, à des vaisseaux pouvant traverser plus de la moitié de l'épiphyse et être très ramifiés (Wilsman and Van Sickle 1972).

Ces canaux contiennent généralement quatre composants : une artériole, une veinule, des capillaires et du tissu conjonctif (Fig.11). L'artériole musculaire circulant dans la portion centrale des canaux se divise en un glomérule de capillaires dans la matrice cartilagineuse (Fig.11), dont la taille et la forme sont fonctions des besoins métaboliques de la zone irriguée. Ces capillaires se rejoignent ensuite en une veinule unique qui rejoint le péricondre par le même canal que l'artériole. Un tissu conjonctif lâche, riche en fibroblastes, en fibres conjonctives, en cellules mésenchymateuses indifférenciées et en macrophages, mais également avec quelques fibres nerveuses non myélinisées et des vaisseaux lymphatiques, en continuité avec le tissu conjonctif du péricondre, entoure ces vaisseaux. Sur toute la longueur du canal vasculaire, on peut apercevoir le départ de nombreux petits capillaires péri-vasculaires, qui facilitent ainsi les échanges métaboliques sur toute la longueur du canal et non uniquement au niveau glomérulaire, et ce, d'autant plus que les canaux sont entièrement baignés dans du plasma (Wilsman and Van Sickle 1972; Lutfi 1970).

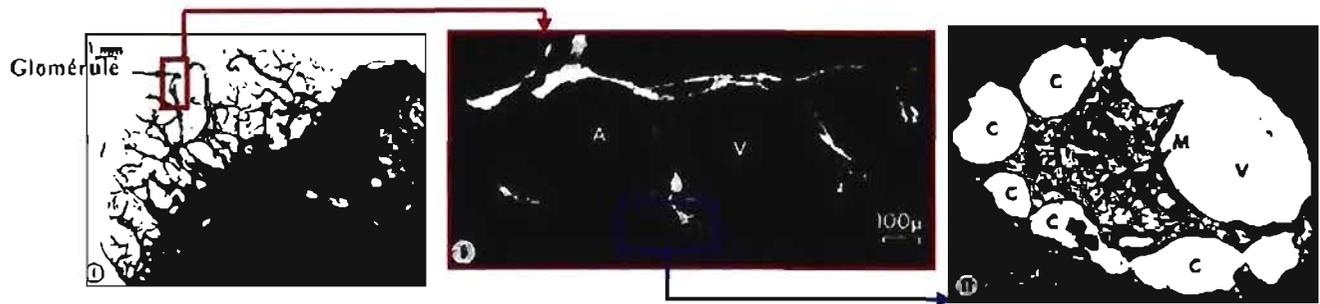


Figure 11 : Vascularisation du cartilage de croissance (V : veinule ; A : artériole ; C : capillaire ; M : macrophage)(Wilsman and Van Sickle 1972).

d. Rôles des canaux vasculaires dans l'épiphyse

Le rôle des canaux vasculaires du cartilage est encore sujet à débat. Ils semblent avoir 3 fonctions :

- Alimenter le cartilage en cellules mésenchymateuses à l'origine de chondroblastes (Wilsman and Van Sickle 1970).

- Nourrir les cellules mésenchymateuses et les chondrocytes par diffusion de nutriments et d'oxygène à travers la matrice extracellulaire. D'ailleurs, lorsque celle-ci se calcifie, la diffusion est rendue impossible et les chondrocytes meurent. Ce phénomène est physiologique lors de l'ossification endochondrale. La diffusion des nutriments se déroule en trois phases : vasculaire, canaliculaire et cartilagineuse (Jaramillo *et al.* 2004).

- Et seulement plus tard, ils jouent un rôle dans la formation (apport de cellules ostéoprogénitrices) et l'entretien du centre d'ossification secondaire. Il a été démontré que la formation de ce centre d'ossification a toujours lieu dans un environnement riche en canaux (Lutfi 1970). Sans apport sanguin, ni calcification, ni résorption cartilagineuse, ni formation osseuse ne seront possibles (Floyd *et al.* 1987; Poole *et al.* 2000). Les vaisseaux sanguins permettent en particulier à des phagocytes d'accéder aux chondrocytes hypertrophiques morts par apoptose, pour éliminer les restes. Les ostéoblastes qui arrivent en même temps peuvent alors déposer de la matrice extracellulaire osseuse le long des travées résiduelles de cartilage calcifié.

e. Régression des canaux vasculaires et chondrification

Lors de la croissance, les canaux qui ne sont pas incorporés dans le centre d'ossification secondaire dégèrent. Ils subissent une régression physiologique lorsque le cartilage de croissance s'amincit et devient moins dépendant de l'apport en sang, processus connu sous le nom de « chondrification » : leurs vaisseaux sont oblitérés et dégèrent, leur tissu conjonctif est transformé en fibrocartilage, et leurs cellules mésenchymateuses sont converties en chondrocytes proliférants et producteurs de matrice obstruant la lumière des canaux (Ytrehus *et al.* 2004b) (Fig.12). Ce processus met en jeu la troponine I, un inhibiteur de l'angiogenèse (Moses *et al.* 1999). Eventuellement, ces canaux obturés sont érodés par la cavité médullaire et disparaissent complètement (Lutfi 1970).

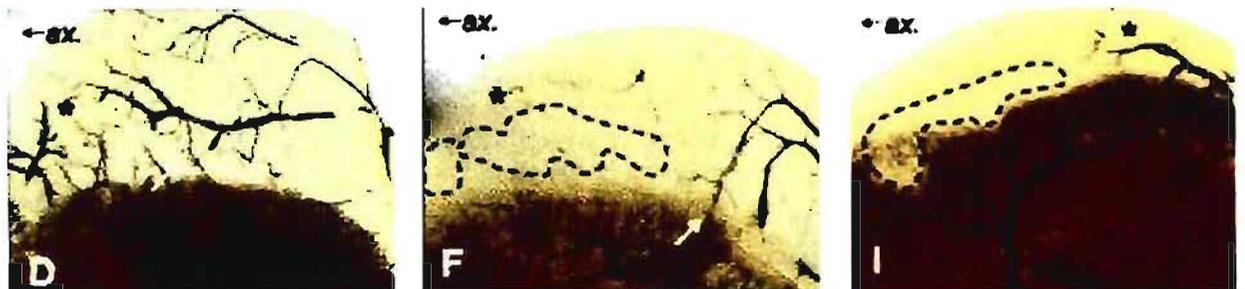


Figure 12 : Coupes de condyles fémoraux médiaux de porcelets âgés de 9 semaines [D], 11 semaines [F] et 15 semaines [I]. Chondrification progressive des canaux du cartilage () et zones de nécrose du cartilage associées (délimitées par des pointillés). L'épaisseur du cartilage s'amincit progressivement alors que sa perfusion diminue (Ytrehus *et al.* 2004b).*

Chez le cheval, les premières images de chondrification décrites sont dans le cartilage de croissance de fœtus âgés de 9 mois (Shingleton *et al.* 1997) ; de la chondrification a également été observée dans le condyle fémoral médial d'un poulain âgé d'un jour (Carlson *et al.* 1995). La régression vasculaire se déroule de façon topographique : les canaux du cartilage de l'épiphyse distale du tibia disparaissent vers l'âge de 3 mois et ceux du condyle fémoral vers l'âge de 5 mois (Ekman and Carlson 1998). A l'âge de 6 mois en général, aucun canal vasculaire n'est plus visible dans le cartilage d'aucune articulation (Shingleton *et al.* 1997).

1.2.2.5. Développement du cartilage articulaire

a. Période de développement

La formation du cartilage articulaire est assez indépendante et plus précoce que celle du cartilage de croissance épiphysaire ; elle débute lors du développement du centre d'ossification primaire de la diaphyse, donc avant le développement de l'épiphyse. Le développement du cartilage articulaire dépend surtout de la résorption de l'espace entre les deux os longs adjacents aboutissant à la formation de la cavité articulaire (Rivas and Shapiro 2002). Par contre, il est indéniable qu'il existe une relation étroite et une transition progressive entre le cartilage articulaire et le cartilage épiphysaire sous-jacent. L'interface les séparant est non visible histologiquement avec une coloration standard (Hématoxyline-Eosine, Bleu de Toluidine ou Safranine O Fast green) lors du développement, et la limite entre le tissu vascularisé et le non vascularisé ne correspond pas forcément à la limite entre le cartilage épiphysaire et le cartilage articulaire.

Le cartilage de croissance épiphysaire produit deux types de chondrocytes (McKibbin et Holdsworth 1967) ; un type, plus proche du centre de l'épiphyse, fusionne dans le centre d'ossification secondaire pour former le tissu osseux ; il participe à l'ossification endochondrale, de la même manière que les chondrocytes de la plaque de croissance. Les chondrocytes du deuxième type, plus proches de la surface articulaire, destinés à produire le cartilage articulaire, migrent vers l'extrémité des os longs pour produire les protéines structurelles et la matrice adaptée à cette surface articulaire viscoélastique (Hurtig et Pool 1996; Douglas 2003).

La maturation du cartilage articulaire (calcification de la couche profonde du cartilage articulaire et formation de la « tidemark ») et la formation de la plaque d'os sous-chondral sous-jacente (Byers et Brown 2006) sont les dernières étapes de l'ossification endochondrale (Rivas et Shapiro 2002). Par contre, les mécanismes expliquant l'arrêt de la vague d'ossification lorsqu'elle arrive à proximité de cartilage articulaire ne sont pas encore compris (Alvarez *et al.* 2005).

b. Organisation moléculaire du cartilage articulaire en développement

Peu d'études se sont penchées sur la structure du cartilage articulaire en développement. Récemment, une équipe l'a fait chez la souris de la naissance jusqu'à l'âge adulte (25 jours), en utilisant la microscopie à lumière polarisée avec une coloration rouge picosirius et la microscopie électronique (Hughes 2005). Ainsi, le cartilage de croissance épiphysaire, avant la formation du centre d'ossification secondaire, est très homogène. C'est un tissu relativement indifférencié qui ne montre quasiment aucune biréfringence (Fig.13A). Seules quelques petites fibres perpendiculaires à la surface articulaire sont visibles, à priori des capsules péricellulaires. À ce stade, le futur cartilage articulaire n'est pas encore distinguable. Puis, au fur et à mesure de la croissance, il y a une augmentation du contenu en collagène de la MEC et une augmentation de la biréfringence (augmentation de l'anisotropie). Les fibres biréfringentes sont d'abord orientées majoritairement parallèlement à la surface articulaire, puis la réorganisation du tissu se poursuit et des changements dans la direction de la biréfringence de la MEC peuvent être observés, avec certaines fibres orientées perpendiculairement au reste du tissu (Fig.13B). Ces différentes zones correspondent au futur cartilage articulaire. Il est important de noter que la formation d'une structure en zones du futur cartilage articulaire commence uniquement dans la zone de support de charge de l'articulation. Puis, le centre d'ossification secondaire apparaît, entouré par des fibres très biréfringentes, majoritairement perpendiculaires à la surface.

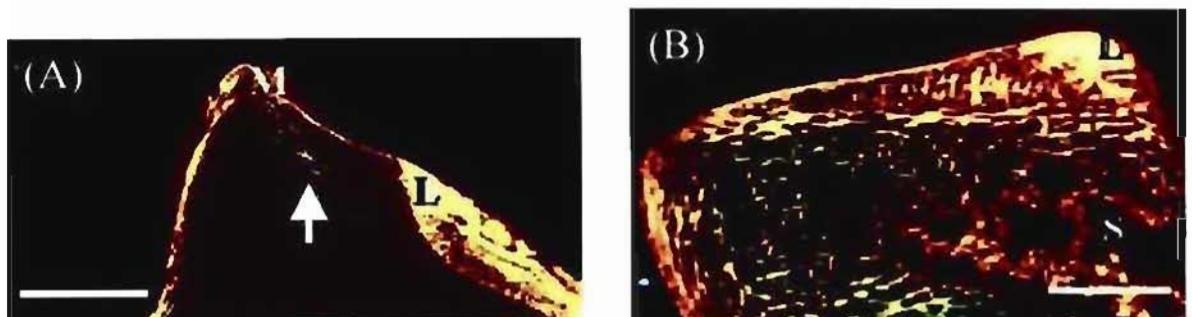


Figure 13 : Cartilages de croissance épiphysaires de tibia de souris âgés de 1 jour [A] et 14 jours [B], colorés avec du rouge picosirius et observés sous lumière polarisée (L : ligament croisé, M : ménisque, S : centre d'ossification secondaire) (Hughes 2005).

On parle de structure multizones (5 à 6 zones en général) du futur cartilage articulaire avec, en particulier, la présence d'une zone additionnelle avec orientation tangentielle des fibres, peut-être pour améliorer la résistance aux forces de cisaillements lors de la croissance (Xia *et al.* 2003; Grunder 2006). La zone calcifiée et la tidemark ne sont pas visibles à ce stade (Hughes 2005).

Chez l'humain, la réorganisation du réseau de collagène d'une structure multizonale juvénile à un aspect en arcade chez l'adulte a lieu entre 11 et 14 ans (Grunder 2006) ; chez la souris, on parle de structure adulte au 25^{ème} jour d'âge (Fig.3) (Hughes 2005). Chez le cheval, cette donnée n'existe pas.

1.2.3. Contrôle moléculaire lors de l'ossification endochondrale

Le contrôle moléculaire de l'ossification endochondrale commence à être connu. De nombreuses molécules intrinsèques et extrinsèques permettent une transition coordonnée de la chondrogenèse et de l'ostéogenèse (Forriol et Shapiro 2005).

Molécules	Actions principales	Références
TGF-β (Facteur de croissance transformant β)	- Contrôle la différenciation et l'hypertrophie des chondrocytes dans le cartilage de croissance - Contrôle l'invasion vasculaire du cartilage de croissance	(Ballock <i>et al.</i> 1993) (Henson <i>et al.</i> 1997c) (Jeffcott et Henson 1998)
IGF-I (Facteur de croissance insulino-mimétique I)	- Intervient dans la prolifération des chondrocytes, dans la synthèse des aggrecanes et du collagène - Effet anti-apoptotique pour les chondrocytes	(Semevolos <i>et al.</i> 2001) (Cruikshank <i>et al.</i> 2005)
PTHrP (Peptide relié à l'hormone parathyroïdienne) <i>Produit par les chondrocytes prolifératifs</i>	- Inhibe l'hypertrophie des chondrocytes	(Kronenberg 2003) (Kronenberg et Chung 2001)
Ihh (Protéine Indian hedgehog) <i>Produit par les chondrocytes hypertrophiques</i>	- Stimule la prolifération des chondrocytes - Stimule la synthèse de PTHrP (boucle régulatrice)	
VEGF (Facteur de croissance endothélial vasculaire)	- Stimule la néoangiogenèse - Rôle supposé dans le maintien et la régression des canaux	(Ytrehus <i>et al.</i> 2004c)
Angiopoïétine 1 et 2	- Rôle dans le maintien et la régression des canaux	(Jain 2003)

<p>MMPs (Métalloprotéases matricielles) <i>Produits par les septoclastes, les ostéoclastes et les cellules endothéliales</i></p> <p>MMPs 9 et 13 MMP 14</p> <p>MMPs 3 et 7</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Régulent la migration cellulaire, l'altération de la MEC et l'apoptose des chondrocytes lors de la résorption du cartilage de croissance avant sa transformation en os - Protéolyse du cartilage non minéralisé - Développement du centre d'ossification secondaire et de sa vascularisation - Activateur des autres MMPs - Clivage des aggrecanes 	<p>(Malemud 2006)</p> <p>(Alvarez <i>et al.</i> 2005)</p> <p>(Davoli <i>et al.</i> 2001)</p> <p>(Davoli <i>et al.</i> 2001)</p>
<p>Cathepsine</p> <p>Cathépsine L</p> <p>Cathepsine B</p> <p>Cathepsine K</p> <p>Cathepsine D</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Dégradation de la MEC du cartilage de croissance (collagène et surtout PG) - Dans zone proliférative, chez fœtus et très jeunes poulains : rôle lors des stades précoces du développement - Dans zone hypertrophique, chez poulains un peu plus âgés : rôle dans turnover de la MEC après la naissance - Surtout dans les ostéoclastes de la jonction ostéochondrale : rôle dans la résorption du cartilage calcifié - Dans les zones de réserve et proliférative 	<p>(Jeffcott et Henson 1998)</p> <p>(Glaser <i>et al.</i> 2003)</p> <p>(Glaser <i>et al.</i> 2003)</p> <p>(Gray <i>et al.</i> 2002)</p> <p>(Hernandez-Vidal <i>et al.</i> 1997)</p>
<p>FGF3 (facteur de croissance fibroblastique 3) <i>Exprimé par les cellules péri-chondrales, chondroblastes, ostéoblastes</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> - Limite la prolifération des chondrocytes et la différenciation terminale des chondrocytes hypertrophiques - Inhibe la synthèse d'Ihh 	<p>(Robinson <i>et al.</i> 1999)</p> <p>(Kronenberg 2003)</p>
<p>BMP (Protéine morphogénique osseuse)</p> <p>BMP-6 BMP-2</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentent l'expression d'Ihh par les cellules pré-hypertrophiques - Favorisent la prolifération et l'allongement des colonnes de chondrocytes prolifératifs - Rôle essentiel dans l'ostéogenèse par des effets combinés sur le recrutement, la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et de leurs précurseurs - Stimule la maturation du cartilage - Important pour le rétrocontrôle de PTH-rP/Ihh - Stimule la prolifération des chondrocytes et leur hypertrophie, puis induit leur apoptose 	<p>(Kronenberg 2003)</p> <p>(Semevolos <i>et al.</i> 2004)</p> <p>(Semevolos <i>et al.</i> 2005)</p>

Tableau 1 : Molécules intervenant dans l'ossification endochondrale et leurs rôles principaux

1.3. L'ostéochondrose

1.3.1. Définition

L'ostéochondrose (OC) affecte principalement le cartilage articulaire mais peut également toucher la plaque de croissance métaphysaire sans que cela n'ait vraiment de conséquences cliniques dans l'espèce équine. Ici, nous ne traiterons que l'OC du cartilage articulaire. Elle est traditionnellement définie comme une affection ostéoarticulaire du jeune en croissance due à un défaut localisé du processus d'ossification endochondrale. Elle appartient au complexe des maladies orthopédiques de développement (DODs- developmental orthopedic diseases) listées par l'Association Américaine des Quarter Horse en 1986 (Pool 1991; Bohanon 1995; Henson 1996; Hurtig et Pool 1996).

Lors d'OC, la différenciation des cellules du cartilage de croissance est anormale, ce qui induit un épaissement et une « rétention » du cartilage de croissance dans l'os sous-chondral, puis une dégénérescence et une nécrose de ce cartilage (Douglas 2003). Le défaut est focal dans l'os et le cartilage et se développe durant une courte période de la vie de l'individu (Hurtig et Pool 1996). L'OC au sens strict, pour laquelle les signes cliniques ne sont pas forcément présents (Douglas 2003) et dont la seule manifestation peut être une anomalie radiographique, évolue sous 2 formes : soit la libération partielle ou totale d'un fragment de cartilage articulaire, soit la formation de lésions kystiques sous-chondrales. Conventionnellement, on utilise le terme « ostéochondrite disséquante (OCD) » lorsqu'un fragment détaché est présent dans l'articulation et le terme « OC » pour décrire les lésions moins évoluées où un tel fragment ne s'est pas encore formé (Van Weeren 2006a).

1.3.2. Contexte épidémiologique

1.3.2.1. Espèces affectées

Chez l'humain, l'OC est relativement rare mais bien connue depuis les années 1900 (maladie de Scheuermann). On la retrouve également chez le porc, le cheval, le chien

et les bovins sous forme d'OC stricte ou d'OCD du cartilage articulaire d'un grand nombre d'articulations (Van de Lest *et al.* 2004). Elle n'est pas décrite chez le chat. Chez les volailles, elle affecte uniquement les plaques de croissance et on la nomme « dyschondroplasie » (Farquharson et Jefferies 2000).

1.3.2.2. Prévalence de l'ostéochondrose chez le cheval

C'est en 1947 que le premier cas d'OC a été rapporté dans le grasset d'un cheval en Scandinavie (Nilsson 1947). Depuis, cette affection a un impact important sur l'économie de l'industrie équine et dans une certaine mesure sur la santé animale, car chaque année des dizaines de milliers de chevaux doivent être opérés. Des efforts réalisés dans le domaine nutritionnel ont permis de diminuer l'incidence de cette maladie, cependant sa prévalence reste en plateau depuis quelques années malgré les efforts effectués pour identifier les différents facteurs intervenant dans sa pathogénie (Semevolos *et al.* 2001).

Une prédilection de l'OCD pour certaines races (Standardbred, Thoroughbred, Warmblood) semble évidente, supportant le concept d'une composante héréditaire de cette maladie. La prévalence de l'OCD a été surtout étudiée chez le Standardbred où elle reste très variable selon les études : 10,5% (Sandgren *et al.* 1993b), 12% (Schougaard *et al.* 1990) ou 26% (Hoppe et Philipsson 1998) dans le jarret, 14% (Sandgren *et al.* 1993a) ou 29% (Jorgensen *et al.* 1997) dans le boulet et 35% dans les grassets et boulets au Québec (Alvarado *et al.* 1989). Peu d'études ont été réalisées chez les Thoroughbred, mais l'incidence de l'OC dans cette race est très haute également (O'Donohue *et al.* 1992; McIlwraith 1996; Paasch et Bramlage 2004). Chez les Warmblood, l'incidence de l'OC serait de 15% en Suède tous sites confondus (Hoppe et Philipsson 1998), de 25% pour le jarret et de 15% pour le grasset aux Pays-Bas (Dik *et al.* 1999), de 11,1% pour le jarret, de 19,5% pour le boulet antérieur et de 7,2% pour le grasset en Allemagne (Arnan et Hertsch 2004). En Europe du nord-ouest, on estime que 20 000 à 25 000 des poulains qui naissent chaque année sont atteints d'OC à des degrés variés (Van Weeren et Barneveld 1999b). Par contre, l'OC est rarement rencontrée chez les poneys (Voûte *et al.* 1997)

et les chevaux sauvages (prévalence de 2,5% d'OC dans le jarret et 0% dans le grasset) (Valentino *et al.* 1999).

Cependant, il faut rester prudent face à tous ces chiffres car lors d'études de prévalence, de fortes différences peuvent exister entre les stratégies d'échantillonnage employées, les différents examens radiographiques effectués, ou les différents systèmes de gradation des lésions utilisés. Par exemple, une étude peut inclure uniquement des poulains issus d'étalons eux-mêmes atteints d'ostéochondrose, ce qui peut biaiser une étude de prévalence (Jorgensen *et al.* 1997).

Chez les Standardbreds et les Thoroughbreds, la plupart des lésions d'ostéochondrose ne semblent pas affecter les performances aux courses, même en l'absence de tout traitement, qu'il soit médical ou chirurgical (Torre et Motta 2000; Kane *et al.* 2003), bien que cela reste toujours sujet à débats (Glade 1986; Grondahl et Engeland 1995; Jorgensen *et al.* 1997; Kane *et al.* 2003). En effet, un cheval avec de sévères lésions d'OCD n'ira jamais en course, ce qui biaise les études de performances.

1.3.2.3. Articulations affectées par l'ostéochondrose chez le cheval

En général, l'ostéochondrose équine suit un « schéma typique » : le cheval présente seulement une à deux lésions articulaires caractéristiques, sur des sites anatomiques de prédilection connus. Si deux lésions sont présentes, elles sont généralement symétriques et bilatérales, mais n'ont pas forcément la même implication dans les signes cliniques. Il a été rapporté que les lésions d'ostéochondrose étaient bilatérales dans 66% des cas lorsque le grasset était atteint, dans 50% des cas pour le jarret et dans quasiment dans tous les cas pour les lésions d'OC sur la crête sagittale des boulets (McIlwraith 1982; Pascoe *et al.* 1984; McIlwraith et Martin 1985; Yovich *et al.* 1985; Trotter 1986; Alvarado *et al.* 1989; McIlwraith *et al.* 1991).

Les sites anatomiques de prédilection pour les lésions d'ostéochondrose sont spécifiques au cheval (Tableau II).

Articulations	Sites anatomiques affectés	Lésions observées	Références
Jarret (articulation tarsocrurale)	Crête intermédiaire du tibia distal , Lèvre trochléaire latérale du talus Malléole médiale du tibia distal, Lèvre trochléaire médiale du talus, [Malléole latérale du tibia distal (extra articulaire)]	Fragments Kystes très rares	(McIlwraith <i>et al.</i> 1991; Sandgren <i>et al.</i> 1993a; Dik <i>et al.</i> 1999)
Grasset (articulation fémoro-patellaire) (articulation fémoro-tibiale)	Lèvre trochléaire fémorale latérale Lèvre trochléaire fémorale médiale Face latérale de la patella Condyles fémoraux, médial surtout Plateau tibial médial	Fragments Kystes	(Dik <i>et al.</i> 1999; van Weeren et Barneveld 1999a)
Epaule (articulation scapulo-humérale)	Cavité glénoïde Face caudale de la tête humérale	Kystes Fragments	(McIlwraith 1996)
Boulet thoracique (articulation métacarpo-phalangienne)	Crête sagittale du métacarpe distal Bord articulaire dorsal de la 1 ^{ère} phalange Surface portante du condyle du métacarpe distal	Fragments Kystes	(Sandgren <i>et al.</i> 1993a; van Weeren et Barneveld 1999a)
Boulet pelvien (articulation métatarso-phalangienne)	Bord articulaire plantaire de la 1^{ère} phalange Crête sagittale du métatarse distal Surface portante du condyle du métatarse distal	Fragments Kystes	

Tableau II : Sites de prédilection des lésions d'ostéochondrose du cheval.

Il existe une controverse concernant la nature des fragments ostéochondraux proximaux plantaires à la première phalange (fragments intra-articulaires des éminences plantaires de P1, aussi appelés type 1) présents dans les boulets pelviens à savoir s'ils sont des fragments d'OCD (Sonnichsen *et al.* 1982) ou des fractures d'avulsion traumatiques (Dalin *et al.* 1993; Nixon et Pool 1995). Des lésions d'OC sur les processus articulaires des vertèbres cervicales ont également été décrites et semblent impliquées dans la spondylomyélopathie cervicale (syndrome wobbler) (Wagner *et al.* 1985; Stewart *et al.* 1991). Enfin, des lésions d'OC ont également été décrites, mais de façon moins fréquente et d'étiologie plus controversée, souvent sous forme kystique et non dissécante, dans d'autres sites : acétabulum, radius proximal, humérus distal, processus anconé, première phalange distale, seconde phalange

proximale, os du carpe, os sésamoïdes, os naviculaire, os du tarse, troisième phalange (Bohanon 1995).

De plus, il existe des différences considérables dans les incidences et dans les sites anatomiques de prédilections de cette maladie selon les races de chevaux (Bohanon 1995) (Tableau III).

Races de chevaux	Sites de prédilection pour l'ostéochondrose
Standardbred	Jarrets, boulets
Thoroughbred	Grassets, jarrets, épaules
Warmblood	Jarrets, grassets
Quarter Horse	Grassets, épaules, vertèbres cervicales

Tableau III : Sites de prédilection de l'ostéochondrose dans les principales races de chevaux affectées.

1.3.2.4. Signes cliniques de l'ostéochondrose chez le cheval

Les signes cliniques de l'ostéochondrose sont très difficiles à définir du fait de la diversité des lésions, des localisations et de la sévérité. Le patient typique atteint d'OC est le poulain ou yearling présenté pour une distension articulaire uni- ou bilatérale du jarret, du grasset ou du boulet. Ce poulain peut éventuellement présenter une boiterie, une raideur à l'exercice, mais ce n'est pas toujours le cas ; cela dépend du site et de la sévérité des lésions. L'âge auquel l'OC est cliniquement détectable varie, mais dans la grande majorité des cas les patients sont jeunes, entre 10 et 12 mois. Dans les cas les plus sévères, principalement lorsque le grasset ou l'épaule sont atteints, des signes cliniques peuvent être présents chez des poulains aussi jeunes que 6 mois d'âge. L'OC peut également se manifester lors de la mise à l'entraînement, lorsque les articulations sont mises à l'épreuve par une activité athlétique, ce qui suggère une influence biomécanique pour la stimulation des lésions subcliniques ; c'est souvent le cas lors de kystes fémoraux. Il arrive également que les signes cliniques soient totalement absents, même si des lésions radiologiquement visibles sont observées.

1.3.3. Hypothèses diverses sur l'étiologie de l'ostéochondrose

Encore aujourd'hui, il existe une grande confusion à propos de l'étiologie de l'OC et notre compréhension de cette maladie d'origine multifactorielle est encore largement déficitaire. Il a même été avancé qu'« aucun sujet en orthopédie n'a été à l'origine d'autant de débats... Malgré les millions de mots écrits à son sujet durant le siècle dernier, la confusion reste immense » (selon Barrie 1984). Si le trouble est toujours si grand, c'est principalement parce que cette maladie a été étudiée lors de ses stades chroniques, quand les lésions sont morphologiquement compliquées et la cause initiale impossible à déterminer. Pour ajouter à la confusion, le nom de la pathologie varie beaucoup selon les ouvrages et les espèces, ou même selon les articulations affectées chez l'humain. Cette différence de terminologie est en partie due aux aspects très différents de la maladie en fonction du stade dans laquelle elle se trouve. Ainsi, de nombreuses causes ont été impliquées : génétique, nutritionnelle, endocrine, biomécanique, traumatique, vasculaire ou toxique. Tous ces facteurs de risque peuvent jouer un rôle dans l'étiologie de l'OC, mais ils n'ont pas besoin d'être présents en même temps pour qu'il y ait maladie et leur contribution relative à une éventuelle manifestation clinique de la maladie peut varier largement. Ainsi, l'OC se développe lorsque les facteurs de risque cumulés sont assez élevés pour faire apparaître des lésions.

1.3.3.1. Taille, taux de croissance

L'ostéochondrose semble avoir une plus grande prévalence chez les chevaux de grande taille (hauteur au garrot et poids élevés) à croissance rapide. La phase de croissance la plus intense a lieu dans les 3 premiers mois après la naissance chez le poulain ; c'est à ce moment que les lésions d'ostéochondrose ont le plus de chance de se développer (Bohanon 1995).

Ainsi, chez les Standardbred, la présence de lésions d'ostéochondrose sur le jarret semble corrélée au poids des poulains à la naissance, à leur gain de poids quotidien lors de la période de croissance et à la taille de leur squelette. Par contre, il ne semble pas exister de relation entre ces différentes mesures et la présence

d'ostéochondrose au niveau du boulet (fragments d'OC palmaires/plantaires et non-union des éminences plantaires), ce qui laisserait entendre que les lésions d'ostéochondrose du jarret et du boulet n'ont pas la même pathogénie (Sandgren *et al.* 1993b). Chez les Warmblood, le développement de lésions d'ostéochondrose au niveau du grasset semble corrélé à un fort taux de croissance et à une atteinte, à la fin de la croissance, d'un poids et d'une taille importants, ce qui ne semble pas être le cas pour l'ostéochondrose du jarret (van Weeren *et al.* 1999).

Bien que la rapidité de croissance, d'origine nutritionnelle ou génétique, apparaisse comme un facteur de risque non négligeable pour la maladie, il ne semble pas que la prévalence des lésions puisse être réduite en diminuant le taux de croissance soit par une restriction alimentaire, soit par induction génétique, en croisant un reproducteur à fort taux de croissance avec un animal ayant une croissance plus lente (Woodard *et al.* 1987b; Uhlhorn *et al.* 1995).

1.3.3.2. Genre

Les mâles sont généralement deux fois plus atteints par l'ostéochondrose que les femelles, dont la croissance est plus lente (Ekman et Carlson 1998). Chez le cheval, certaines études confirment cette hypothèse (Stromberg 1979), d'autres l'infirmement (Sandgren *et al.* 1993a; Valentino *et al.* 1999; van Weeren *et al.* 1999). Le sexe semble être un facteur aggravant de la formation des lésions et non un facteur suffisant.

1.3.3.3. Héritéité

Les études sur l'héritabilité de l'ostéochondrose équine sont encore assez limitées, mais il semble acquis aujourd'hui que des facteurs génétiques jouent un rôle dans la pathogénie de cette maladie, particulièrement chez les Standardbred, Swedish Warmblood et Thoroughbred (Schougaard *et al.* 1990; Jeffcott 1991). Seules des études portant sur l'effet du père ont été réalisées ; mais chez le porc, il semble que la femelle ait une influence (Ytrehus *et al.* 2004d).

La plupart des études réalisées concernent les Standardbred. Par exemple, chez cette race, l'héritabilité de l'ostéochondrose du jarret est relativement haute,

comprise entre 0.24 et 0.52 (Philipsson *et al.* 1993). Les données actuelles suggèrent qu'une sélection génétique contre l'ostéochondrose du jarret et contre les fragments ostéochondraux palmaires/plantaires est faisable chez le cheval, mais la prévalence relativement haute de lésions chez la descendance d'étalons indemnes d'ostéochondrose indiquent que tout programme de sélection génétique devra être réalisé en se basant sur la descendance (Philipsson *et al.* 1993). La difficulté repose en particulier sur le caractère polygénique de cette pathologie (Philipsson 1996). Aux Pays-Bas, un programme de sélection génétique a été mis en place pour les Warmblood, avec une exclusion très stricte et rigoureuse de la reproduction des étalons avec des lésions radiographiques, même minimales, d'OC au niveau du jarret (exclusion dès 1984) ou du grasset (à partir de 1992). Mais jusqu'à présent, aucune diminution de l'incidence de l'OC n'a pu être notée dans ce pays (Van Weeren 2006b). La difficulté repose sur l'origine multifactorielle de cette pathologie, où des événements précoces après la naissance, comme un traumatisme, peuvent engendrer de l'ostéochondrose, même sur un cartilage « génétiquement » sain.

1.3.3.4. Nutrition

Chez plusieurs espèces, les déséquilibres nutritionnels et en particulier une forte consommation énergétique et protéique, semblent favoriser le développement d'OC. Chez le cheval, l'équilibre nutritionnel de différentes rations alimentaires a entraîné une diminution significative des anomalies orthopédiques (Gabel *et al.* 1987). Cela indique un lien entre la nutrition et le développement squelettique, mais ne donne aucune information sur la pathogénie de l'OC. Dans cette espèce, la survenue d'OC semble favorisée par un apport alimentaire hyperénergétique ou en excès, alors qu'isolément, le taux de protéines de la ration ne semble pas influencer sur le développement de la maladie (Savage *et al.* 1993a). Les rations dans lesquelles seul le taux de protéines est anormalement élevé n'entraînent que des lésions mineures, uniques et spécifiquement localisées à la plaque de croissance métaphysaire (Glade et Belling 1984). Les rations à forte teneur énergétique semblent à l'origine de lésions plus importantes, dispersées et touchant à la fois la plaque de croissance et le cartilage de croissance épiphysaire (Savage *et al.* 1993a). Enfin, des apports nutritionnels

élevés mais équilibrés ne semblent pas augmenter significativement l'incidence de l'OC, mais cumulés à d'autres facteurs de risque (sexe, génétique), ils pourraient y contribuer (Donabedian 2006).

L'excès alimentaire pourrait être lié à l'OC par des facteurs endocriniens. La relation entre un taux d'insuline anormal et les lésions d'OC semble supportée par le fait que les jeunes chevaux avec de l'OC ont une réponse exagérée de l'insuline lors de repas riches en énergie digestible (Ralston 1996). De récents travaux *in vitro* ont montré que l'insuline augmente l'index mitotique des chondrocytes prolifératifs dans le cartilage de croissance des chevaux et peut altérer la différenciation des chondrocytes en diminuant le taux de cellules entrant dans la phase terminale d'hypertrophie, qu'elle promeut la survie des chondrocytes en supprimant l'apoptose et qu'elle peut également altérer le métabolisme d'un grand nombre de facteurs systémiques ou locaux qui semblent également avoir un rôle important dans l'OC, en particulier IGF et TGF- β (Henson *et al.* 1997a; Jeffcott et Henson 1998). Une insulinémie augmentée entraîne donc une accumulation de chondrocytes pré-hypertrophiques dans le cartilage de croissance et donc un ralentissement de l'ossification endochondrale, prédisposant l'animal à développer des lésions focales. Il semble donc bien y avoir une relation entre l'apport énergétique de la ration, l'hyperinsulinémie et l'OC.

Un repas contenant une forte teneur en hydrates de carbone facilement digestibles entraîne une importante hyperinsulinémie post-prandiale (Glade 1986, 1987), qui elle-même stimule le retrait rapide de la circulation des hormones thyroïdiennes T₃ (triiodothyronine) et T₄ (thyroxine) (hypothyroxémie post-prandiale transitoire) (Glade *et al.* 1984). Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle important dans le contrôle de la différenciation terminale des chondrocytes (hypertrophie et minéralisation), dans la synthèse de protéoglycanes et de collagène type II (Glade *et al.* 1994), ainsi que dans l'invasion métaphysaire du cartilage de croissance par des vaisseaux sanguins (Ballock et Reddi 1994; Jeffcott et Henson 1998). Ainsi, une consommation glucidique augmentée pourrait être à l'origine d'une altération de la fonction thyroïdienne, ce qui entraînerait un arrêt de maturation du cartilage de croissance chez les jeunes chevaux (Glade et Belling 1984; Glade 1987). Supportant

ce concept, on peut remarquer une OC généralisée chez des poulains hypothyroïdiens (Vivrette *et al.* 1984).

L'administration de dexaméthasone chez des poulains a également entraîné le développement de lésions d'OC (Glade *et al.* 1983) en entraînant une inhibition de la croissance du cartilage (diminution de l'épaisseur totale du cartilage de croissance, rétrécissement de la zone hypertrophique, pénétration anormale des capillaires métaphysaires dans la plaque de croissance, déficience d'activité des lactates déshydrogénases, et baisse importante du contenu en GAGs, collagène et sulfure) (Glade *et al.* 1981, 1983). Après des administrations chroniques de dexaméthasone, des lésions de chondronécrose du cartilage de croissance peuvent être observées.

L'équilibre des apports en minéraux et en oligo-éléments de la ration est également important, particulièrement pour le calcium; le phosphore, le cuivre et le zinc qui interviennent dans l'élaboration du cartilage, ainsi que le respect des ratios vitamine A/vitamine D, Ca/P, Cu/Zn. Tout apport insuffisant ou excessif de ceux-ci peut entraîner la synthèse d'un cartilage anormal. Un excès de calcium alimentaire ne semble pas favoriser l'apparition de lésions d'OC (Savage *et al.* 1993b) à la différence d'un excès de phosphore connu pour être à l'origine d'un défaut d'ossification endochondrale. Le phosphore pourrait agir par inhibition de l'apport en calcium, même si l'effet pro-ostéochondrotique de la carence en Ca n'est pas documenté. En ce qui concerne le zinc, les troubles squelettiques semblent apparaître lorsque le taux de zinc dans la ration est soit très bas, soit très haut. De plus, un excès de zinc alimentaire peut causer une déficience en cuivre secondaire, carence connue depuis longtemps pour être à l'origine de lésions d'OC chez le cheval. De faibles taux de cuivre alimentaire semblent ainsi associés à un collagène articulaire de qualité inférieure (Bridges *et al.* 1984; Hurtig *et al.* 1993). Les lésions semblent plus généralisées et plus sévères lors d'OC liée à une déficience en cuivre, créant une situation un peu différente de celle d'un défaut primaire localisé de l'ossification endochondrale. Les lésions d'OC présentes chez les poulains intoxiqués au zinc sont similaires, mais dans ce cas là, ce sont des contaminations environnementales, clairement toxiques qui sont à l'origine des lésions ostéochondrales et elles ne

peuvent pas être considérées comme des facteurs entrant dans la pathogénie de l'OC. Des lésions d'OC peuvent déjà se développer lors des derniers stades de gestation, et cela pourrait en partie être influencé par de faibles taux de cuivre maternels (Knight *et al.* 1990). De plus, par la suite, le lait maternel étant une source assez pauvre de cuivre, zinc et manganèse, le poulain devra utiliser ces minéraux, qui ont été stockés dans son foie lors de la gestation. Il a été montré un effet significativement protecteur en donnant aux juments gravides une supplémentation orale en sulfate de cuivre au dernier tiers de gestation ; cela permet une réduction importante de la fréquence et de la sévérité des lésions d'OC de leurs poulains (Knight *et al.* 1990; Pearce *et al.* 1998). Par contre, une supplémentation des juments par plusieurs injections intramusculaires de cuivre lors de la même période de gestation n'a montré aucun effet protecteur significatif sur l'état du cartilage de leurs poulains (Gee *et al.* 2007). Une alimentation contenant une teneur en cuivre adaptée lors des premiers mois de vie des poulains influencerait positivement les processus de réparation des lésions d'OC, mais n'aurait aucun effet sur la pathogénie de ces lésions (Van Weeren *et al.* 2003).

Le rôle du cuivre dans le développement, la guérison ou la progression des lésions d'OC est encore très mal connu (Gee *et al.* 2007), mais il semble impliqué de par son rôle prépondérant dans l'activité de la lysyl oxydase, une métalloenzyme qui catalyse la formation des liaisons pyridinoline entre les fibres de collagènes II de la MEC, et dans la structure de la glycylystyllisine impliqué dans l'angiogénèse du cartilage et sa minéralisation (Bridges et Harris 1988 ; Kronfeld *et al.* 1990). Cependant, il reste certain que le cuivre est l'un des facteurs sur lequel il faut porter son attention lorsque l'on est face à une augmentation de l'incidence de l'OC dans un élevage.

1.3.3.5. Exercice

A la naissance, le cartilage épiphysaire est biochimiquement homogène. L'adaptation fonctionnelle aux charges biomécaniques qui pèsent sur l'articulation a lieu précocement dans la vie de l'individu, rendant le cartilage articulaire biomécaniquement hétérogène. À l'âge de 18 mois, l'adaptation fonctionnelle a atteint un niveau stable, comparable à l'adulte (Brommer *et al.* 2005). Ainsi, le

facteur « charge » est une variable cruciale lors de la croissance des poulains dont il faut se préoccuper lors des premiers mois de vie pour créer un cartilage articulaire avec des propriétés biomécaniques optimales, prévenant ainsi un certain nombre de pathologies articulaires. L'exercice pratiqué par le jeune poulain en croissance correspond à une charge qui va peser sur ses articulations.

Le rôle de l'exercice dans la pathogénie de l'OC est encore mal connu et controversé. Certains ont montré une incidence plus grande d'OC chez des poulains Standardbreds ayant pratiqué de l'exercice plus précocement dans leur vie (pâturage jusqu'au sevrage, vers 6 mois d'âge, puis détention dans une étable non chauffée donnant accès librement à un paddock pour les 6 mois suivants, puis à nouveau pâturage libre) (Sandgren *et al.* 1993b), d'autres rapportent une incidence d'OC augmentée chez des poulains Warmbloods soumis à un faible exercice (marches de 15 à 45 minutes, 5 jours par semaine, de 3 à 24 mois d'âge) comparativement à ceux soumis à un exercice important (trots et galops 15 à 45 minutes, 5 jours par semaine) (Bruin *et al.* 1992) et certains rapportent même un effet plutôt protecteur de l'exercice (poulains gardés au box avec des périodes de durée croissante de galop effectuées dans une carrière de grande taille suivies d'une période d'une demie heure d'exercice libre dans cette carrière, de 5 à 11 mois d'âge) vis-à-vis de l'OC chez des poulains Warmbloods (van Weeren et Barneveld 1999a).

En réalité, l'exercice ne semble pas jouer de rôle dans la pathogénie proprement dite de l'OC, mais il peut influencer l'apparence et la distribution des lésions (Jeffcott *et al.* 1983; McIlwraith 1998; van Weeren et Barneveld 1999a).

1.3.3.6. Traumatismes et forces biomécaniques

Comme pour l'exercice, le rôle des traumatismes et des forces biomécaniques dans la pathogénie des lésions d'OC n'est pas bien établi. Cependant, à la fois l'examen macroscopique et histologique des lésions chroniques (lorsqu'un lambeau cartilagineux a été formé) montrent que la lésion d'OC se localise au site de zones sollicitées mécaniquement, comme les zones de charge de l'articulation (Hillbery *et al.* 1986; Ekman et Carlson 1998). Des forces anormalement élevées peuvent résulter d'un exercice inapproprié ou excessif, d'un poids corporel excessif ou d'une

conformation défectueuse. L'intervention de facteurs comme les traumatismes ou les forces biomécaniques expliquerait les localisations préférentielles des sites d'OC. Par exemple, on sait que chez le cheval la patelle exerce une pression considérable sur la lèvre trochléaire fémorale latérale, particulièrement lorsque l'articulation est en flexion (Hurtig et Pool 1996). Cela pourrait expliquer pourquoi la lèvre trochléaire fémorale latérale est un des sites d'OCD les plus fréquents chez le cheval. Une pression importante est également exercée sur la crête intermédiaire du tibia distal lors d'une flexion maximale (Hurtig et Pool 1996). Cela pourrait expliquer pourquoi l'OCD est fréquente sur la partie apicale craniale de cette crête. Un fait supplémentaire semble confirmer l'hypothèse du traumatisme comme une des causes possibles de l'OC : des porcs logés sur des sols avec des revêtements durs ont une prévalence et une sévérité d'OC augmentées (Perrin *et al.* 1978).

Par contre, même si les traumatismes et les forces biomécaniques semblent intervenir lors de la pathogénie de l'OC, ils ne sont pas forcément à l'origine du processus. Certains auteurs pensent que de nombreuses lésions habituellement classées comme OC résultent simplement de facteurs mécaniques, sans anomalies sous-jacentes lors du développement. Il est généralement admis que les forces biomécaniques et les traumatismes sont responsables du passage de la lésion d'OC au stade d'OCD, bien que peu de preuves existent (Douglas 2003). On pense également que l'OC pourrait résulter soit de forces excessives sur un cartilage de croissance normal, soit de la superposition de forces normales sur un cartilage de croissance structurellement déficient (Whitton 1998). Certains ont émis l'hypothèse que le cartilage de croissance épiphysaire était naturellement plus faible et plus vulnérable vis-à-vis des traumatismes que le cartilage articulaire ; cependant, il n'existe aucune donnée pour confirmer cette théorie (Nakano et Aherne 1994). Par contre, on sait qu'une chondronécrose est un des premiers signes d'OC et il est certain que la vulnérabilité du cartilage nécrosé est augmentée. Une majorité de ces lésions primaires guérissent ; ainsi, si l'articulation pouvait être protégée des traumatismes pendant la période de fragilité du cartilage, la maladie clinique pourrait en théorie être réduite.

Certains auteurs ont classé les facteurs étiologiques de l'OC en 3 catégories : suffisant (facteurs qui peuvent entraîner de l'OC par eux-mêmes), nécessaire (facteurs qui doivent être présents pour l'expression de la maladie, mais qui, seuls, ne peuvent pas la causer) et contribuant (facteurs qui modifient l'expression et la sévérité des lésions) (Pool 1993; Hurtig et Pool 1996). Au sein des facteurs mécaniques, on peut classer les traumatismes directs et le cisaillement des canaux vasculaires du cartilage comme facteurs suffisants, les forces biomécaniques comme facteurs nécessaires, et les défauts de conformation, la ferrure et l'absence d'exercice comme facteurs contribuant (Hurtig et Pool 1996). Cependant, la distinction entre une lésion associée au développement et une lésion traumatique d'après des examens macroscopiques et histologiques est difficile, voire impossible, surtout si les lésions sont chroniques et si les chevaux ont subi un exercice intense avant l'évaluation. Comme un modèle mécanique d'induction de l'OC n'est pas disponible, la détermination du rôle véritable de la biomécanique dans la pathogénie de l'OC est difficile.

1.3.3.7. Ischémie et rôles des canaux vasculaires

Des études récentes chez le porc et le cheval, soutenues par des observations chez le chien et la vache ont montré que les lésions précoces d'OC dans le cartilage de croissance épiphysaire et articulaire semblent associées à des anomalies des canaux vasculaires du cartilage de croissance épiphysaire, entraînant un apport en sang inadéquat (Ytrehus *et al.* 2004b) (Fig.14). Ces défauts vasculaires seraient à l'origine d'ischémies locales au sein du cartilage de croissance et de chondronécrose (Ekman et Carlson 1998).

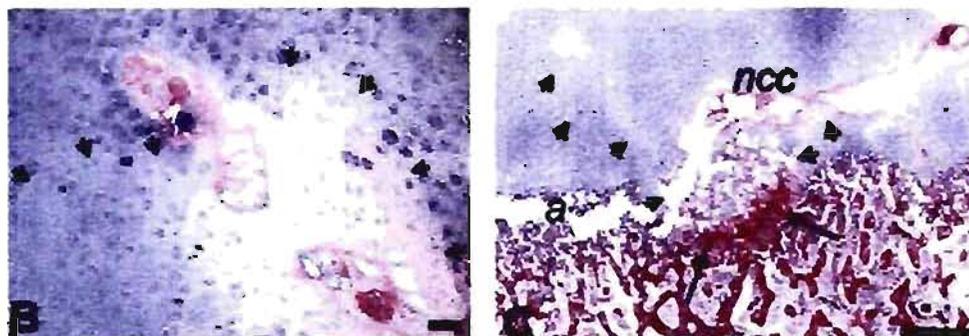


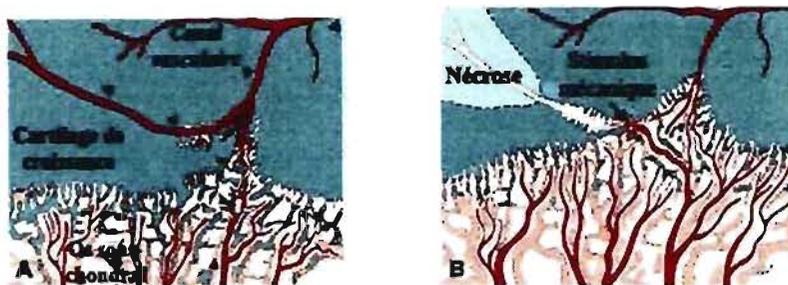
Figure 14: Lésions d'ostéochondrose chez un porcelet âgé de 11 semaines. [B] (HE, $\times 100$) : les canaux nécrosés du cartilage sont entourés par une étroite zone de chondrocytes nécrosés (têtes de flèches). [C] (HE, $\times 31,25$) : le cartilage au-dessus et à droite des têtes de flèches est nécrosé. (ncc) : canal du cartilage nécrosé. (longue flèche) : hémorragie. (a) : fissure artificielle due à la coupe. (Ytrehus *et al.* 2004b)

Cette ischémie semble donc être un élément clé dans l'initiation des lésions d'OC et pourrait expliquer beaucoup des caractéristiques de cette pathologie. Ainsi, un blocage chirurgical de la vascularisation du cartilage de croissance épiphysaire est suivi précocement par la nécrose des vaisseaux de la paroi, suivie 3 jours après par la nécrose du cartilage épiphysaire environnant (Carlson *et al.* 1991; Ytrehus *et al.* 2004a). La transection des canaux du cartilage entraîne donc une chondronécrose dans la partie profonde de la zone de repos du cartilage de croissance similaire à celle observée lors d'OC spontanée. De plus, les lésions vasculaires semblent précéder les lésions du cartilage.

D'autres auteurs proposent une séquence différente pour le développement initial des lésions d'OC où la nécrose des canaux vasculaires ne serait plus un facteur primaire mais secondaire de la pathologie. Ce serait l'incapacité à s'hypertrophier des chondrocytes entourant les canaux vasculaires qui serait le phénomène déclenchant et qui entraînerait l'échec dans l'ossification du cartilage (c'est-à-dire la rétention de cartilage dans l'os). La nécrose des chondrocytes contenus dans ce cartilage en rétention serait secondaire, rapidement suivie par une nécrose des canaux vasculaires à l'intérieur de cette zone de chondronécrose (Shingleton *et al.* 1997). Cette hypothèse semble confirmée par l'étude de Carlson qui observe des lésions de chondronécrose, sans nécrose vasculaire associée, chez des poulains âgés de 2 jours, alors que les premières lésions de chondronécrose associées à une nécrose des canaux

vasculaires du cartilage étaient seulement présentes chez des poulains âgés de 3 semaines et plus (Carlson *et al.* 1995).

La différence entre la perte pathologique de l'apport sanguin du cartilage et la régression vasculaire physiologique des canaux du cartilage n'est pas connue. La régression physiologique des canaux du cartilage ou « chondrification » est un processus hautement prévisible, lié à l'âge de l'animal, qui se produit principalement à la fin de la croissance à l'extrémité distale des canaux et qui est caractérisée par l'apoptose des cellules endothéliales et la transformation des cellules mésenchymateuses périvasculaires des canaux en chondrocytes (Wilsman et Van Sickle 1970; Kincaid *et al.* 1985; Ytrehus *et al.* 2004c). L'OC ne semble pas causée par une régression généralisée prématurée des canaux ou par une défaillance vasculaire pathologique affectant tous les canaux, mais est plutôt un événement localisé causant la défaillance d'un nombre limité de canaux et affectant seulement une zone limitée de cartilage. Différentes études (Kincaid *et al.* 1985; Woodard *et al.* 1987a; Carlson *et al.* 1991; Ytrehus *et al.* 2004c) attribuent la nécrose des canaux du cartilage observée lors d'OC à un échec de la chondrification physiologique. Les lésions primaires d'OC sont généralement observées dans des zones de cartilage qui ont récemment, ou qui sont en train de perdre leur apport vasculaire ; en général, ces zones d'interruption de l'apport sanguin sont situées à la jonction entre le cartilage et l'os, là où des anastomoses se forment entre les canaux du cartilage et les vaisseaux de la moelle osseuse (Ytrehus *et al.* 2004b; Ytrehus *et al.* 2004c) (Fig.15).



*Figure 15 : [A] Anastomose des vascularisations cartilagineuses et osseuses au niveau du front d'ossification, zone fragile de cartilage minéralisé et d'os trabéculaire partiellement ossifié. [B] Un stimulus mécanique peut causer une distorsion de la structure cartilage/os contenant les vaisseaux avec rupture ultérieure ou compression. Le canal non perfusé va se nécroser distalement à la lésion puis le cartilage lui-même va se nécroser créant une lésion d'ostéochondrose primaire. (Ytrehus *et al.* 2004c)*

Les facteurs de croissance intervenant dans la survie des cellules endothéliales des canaux du cartilage et dans leur morphogénèse (VEGF, Ang) pourraient également être impliqués dans le processus de régression des canaux vasculaires et dans la formation des lésions primaires d'OC (Ytrehus *et al.* 2004c). En effet, VEGF semble agir comme un facteur anti-apoptotique pour les cellules endothéliales. Une diminution du taux de VEGF dans l'environnement des canaux du cartilage, due à un stress et/ou à la mort par compression des chondrocytes, entraînerait alors une apoptose des cellules endothéliales et une régression vasculaire (Ytrehus *et al.* 2004b).

Il reste cependant à déterminer la nature précise du défaut vasculaire et sa pathogénie. Comme la morphologie de la lésion vasculaire et de la nécrose du cartilage environnant est la même dans l'OC naturelle et dans celle qui a été créée expérimentalement par une interruption chirurgicale de la vascularisation, l'étiologie éventuelle d'une embolie a été avancée (Carlson *et al.* 1995). Cependant, rien n'expliquerait que des embolies se produisent à des moments précis et dans des sites de prédilection lors du développement. Il est possible que des microfractures secondaires à des traumatismes mineurs ou à des cisaillements mécaniques directs des canaux du cartilage aient lieu lors d'un moment vulnérable du développement du cartilage et puissent être un événement primaire dans la pathogénie de l'OC. Il est également probable que les zones d'anastomose vasculaire soient des zones plus instables, où l'os est encore incomplètement ossifié donc fragile et largement exposé aux contraintes mécaniques, en particulier de compression. Ces compressions ou ces impacts répétés pourraient causer un arrêt prématuré et pathologique des apports sanguins, à l'origine d'une ischémie et d'une nécrose des chondrocytes. Cela causerait par la suite un retard de l'ossification endochondrale, avec persistance du cartilage nécrosé dans l'os sous-chondral et les traumatismes interviendraient sur ce cartilage fragilisé formant des fissures cartilagineuses et des signes cliniques. Alternativement, la compression pourrait stresser les chondrocytes au point qu'ils ne soient plus capables de s'adapter au remodelage et à la régression vasculaire. L'épaisseur du cartilage, très variable selon les endroits, pourrait être un facteur supplémentaire déterminant la capacité des chondrocytes à retirer suffisamment de

nutriments dans leur nouvelle situation. Cela semble cohérent avec certains sites chez le cheval, la lèvre trochléaire latérale du fémur par exemple, où les forces biomécaniques sont élevées, les rendant plus sujet au cisaillement, et où le cartilage est normalement assez épais, les prédisposant à la nécrose par manque de diffusion des nutriments (Hurtig et Pool 1996).

Par contre, il semble certain que de tels traumatismes pourraient être influencés par des facteurs héréditaires, comme une certaine conformation anatomique et/ou la qualité de l'os et du cartilage, et qu'ils pourraient être facilités et/ou aggravés par un stress mécanique lors de la période de temps limitée où cette vascularisation existe.

1.3.4. Physiopathogénie de l'ostéochondrose

La physiopathogénie de l'OC semble être la même pour toutes les espèces : elle correspond à un défaut focal d'ossification endochondrale du cartilage de croissance (Olsson et Reiland 1978). Les investigations histologiques des lésions d'OC montrent une incapacité des capillaires à pénétrer dans la région distale de la zone hypertrophique du cartilage de croissance, ce qui entraîne une défaillance dans les derniers stades de la maturation cartilagineuse et une absence de différenciation des chondrocytes qui restent bloqués au stade hypertrophique. Cela empêche la calcification de la matrice extracellulaire et provoque un arrêt de l'ossification endochondrale. Les chondrocytes continuent à se multiplier et à s'empiler localement, sans ne jamais être minéralisés, ce qui aboutit à une rétention et un épaissement du cartilage (Douglas 2003) (Fig.16A). Le liquide synovial ne parvient alors pas à pénétrer dans les couches les plus profondes pour nourrir les chondrocytes et on assiste à une dégénérescence et une nécrose locale du cartilage épaissi qui va se prolonger dans l'os sous-chondral (Hurtig et Pool 1996).

La lésion primitive, qui apparaît généralement lors des premiers mois de vie, est infra-clinique et passe inaperçue au début de l'évolution. A ce stade, l'OC peut évoluer de deux façons (Van de Lest *et al.* 2004) :

- L'évolution la plus favorable correspond à une guérison des lésions précoces de cartilage nécrosé qui vont être complètement entourées par de l'os. La vascularisation de l'os sous-chondral sous-jacent va tout d'abord contourner et envelopper la région

de nécrose du cartilage ; une ossification endochondrale normale est alors rétablie, entraînant une régression partielle ou même totale des lésions qui sont graduellement résorbées sans séquelles (Ekman et Carlson 1998; Kealy et McAllister 2005).

- Alternativement, la lésion peut s'aggraver. Là encore, deux options peuvent se présenter. Selon le site, soit le cartilage dégénéré est retenu dans l'os, formant des lésions kystiques sous-chondrales, soit ce cartilage dégénéré va donner des lésions disséchantes avec formation de fragments d'OC (Pool 1991; Bohanon 1995; Ekman et Carlson 1998; Douglas 2003). On a alors passage du stade d'OC à celui d'OCD. L'OCD se retrouve souvent dans des sites où il y a beaucoup de mouvements (jarret, boulet, grasset, épaule), alors que les kystes sont souvent retrouvés dans des endroits où il y a beaucoup de poids sur le cartilage articulaire, d'où l'implication probable d'un traumatisme chronique (fémur distal, radius proximal et distal, carpe, cavité glénoïde, métacarpe, métatarse, phalanges). Cependant, la nature exacte des kystes sous-chondraux suscite encore beaucoup de controverse et si beaucoup d'auteurs les considèrent comme une manifestation du syndrome d'OC, plusieurs sont plus conservateurs et les classent simplement dans les maladies orthopédiques de développement (Alini *et al.* 1992).

Comme le cartilage nécrosé est moins solide que le cartilage normal, il est beaucoup plus vulnérable aux traumatismes. Lorsque l'aire de cartilage nécrosé est assez grande, et qu'un traumatisme suffisant est appliqué, une fissure peut se former. La fissure initiale est parallèle à la plaque osseuse sous-chondrale. Sous l'effet des mouvements articulaires, d'autres fissures, perpendiculaires à l'os épiphysaire se forment ensuite, pouvant créer une fente allant de la surface articulaire jusqu'à l'os sous-chondral (Fayolle 2003), libérant un lambeau cartilagineux qui se décolle du plan osseux sous-jacent, mais qui reste au début adhérent au cartilage par une partie de sa périphérie. La formation de fissures libère des fragments de cartilage et des produits de dégradation cartilagineuse dans l'espace synovial entraînant une synovite et une effusion articulaire. Le terme d'ostéochondrite traduit l'existence de ces inflammations osseuse et synoviale. L'ostéochondrite est qualifiée de dissécente lorsque le lambeau cartilagineux se sépare de l'os sous chondral (Fig.16B) ; le fragment est alors appelé « souris articulaire » et peut migrer et se placer en différents

endroits de l'articulation ; ce fragment cartilagineux va souvent se minéraliser et s'ossifier secondairement.

Le fragment d'OC, détaché ou non, peut être résorbé par la membrane synoviale ou croître par ossification endochondrale, en se nourrissant par imbibition du liquide synovial. Dans un cas comme dans l'autre, l'évolution est lente et s'accompagne souvent d'une synovite chronique. La persistance d'une inflammation synoviale et l'irrégularité de la surface articulaire sont responsables du développement d'une ostéoarthrose éventuelle : l'évolution naturelle de l'OCD s'effectue dans tous les cas vers une dégénérescence articulaire. Celle-ci est irréversible et peut-être très invalidante pour l'animal. La perte de substance cartilagineuse due à l'élimination du lambeau est progressivement comblée par un tissu fibrocartilagineux constitué par bourgeonnement à partir de l'os sous-chondral. De la myélofibrose et un remodelage trabéculaire se développe dans l'os sous-chondral sous-jacent à la lésion cartilagineuse et ce processus peut être extrêmement étendu (Fig.16A) ; cependant, la nécrose de l'os sous-chondral n'est pas une caractéristique précoce, ni très spécifique de cette pathologie (Craig et Riser 1965; Olsson et Reiland 1978; Reiland 1978; Duthie et Houghton 1981; Siffert 1981).

Chez d'autres espèces, principalement le chien et le porc, l'OC semble systématiquement présente dans des zones où le cartilage articulaire normal est plus épais. Cette aspect de la pathogénie a également été étudié chez le cheval, et, bien que les sites d'OC les plus fréquents de l'humérus et du talus correspondent à des zones où le cartilage est très épais, ce n'est pas le cas de la lèvre trochléaire latérale du fémur ou de la crête intermédiaire du tibia distal, deux sites d'OC extrêmement courants chez le cheval (Firth et Greydanus 1987).



Figure 16: Lésions macroscopiques d'ostéochondrose sur le fémur distal d'un poulain âgé de 7 mois.

Concernant la période de formation et de remaniement des lésions d'OC chez le cheval, elle semble être très précoce, lors de la première année de vie du poulain avec une période de formation des lésions jusqu'à 5 mois environ (Donabedian 2006). Dans une étude (Dik *et al.* 1999) où 43 poulains Warmbloods ont été radiographiés jusqu'à l'âge de 5 mois, et 19 poulains jusqu'à l'âge de 11 mois (Fig.17), il a par exemple été démontré qu'au niveau du jarret, le poulain âgé de 1 mois présente déjà de nombreuses lésions d'OC ; entre 1 et 5 mois d'âge, la plupart des ces lésions guérissent et quelques nouvelles lésions apparaissent ; après 5 mois, la situation est plus ou moins stable (âge de non retour). Pour le grasset, aucune anomalie n'est présente au début de la vie du poulain, les lésions d'OC commencent à apparaître vers 3-4 mois d'âge, ont un pic vers 6 mois, et la plupart guérissent jusqu'à 8 mois où la situation reste stable (âge de non retour).

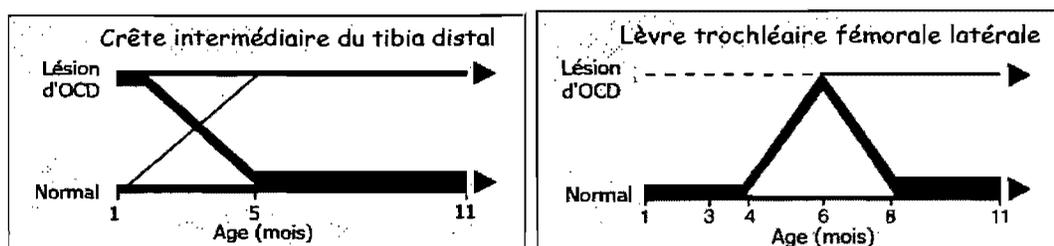


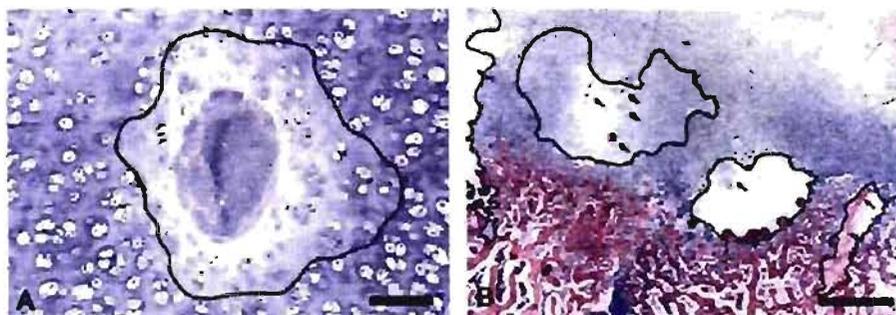
Figure 17 : Diagrammes de développement des lésions d'ostéochondrose dans le jarret et le grasset de poulains Warmbloods. D'après Dik et al, 1999.

1.3.5. Pathologie

Il est difficile de donner une description histologique ou moléculaire de l'OC ; les lésions précoces d'OC et leur évolution sont mal connues, rendant le diagnostic difficile. Leur caractère extrêmement dynamique chez les très jeunes animaux ne facilite pas la tâche. Non seulement de petites lésions peuvent disparaître (Carlsten *et al.* 1993), mais même des fragments radiographiquement visibles peuvent être complètement réintégrés dans les stades précoces (Dik *et al.* 1999). Il est donc très difficile de différencier les processus qui entraînent la formation des lésions et les processus de réparation qui tentent de guérir ces lésions, car ils sont très souvent concomitants. Toute la difficulté est de déterminer la chronologie, et donc l'événement initial de la pathologie.

1.3.5.1. Changements microscopiques lors d'ostéochondrose

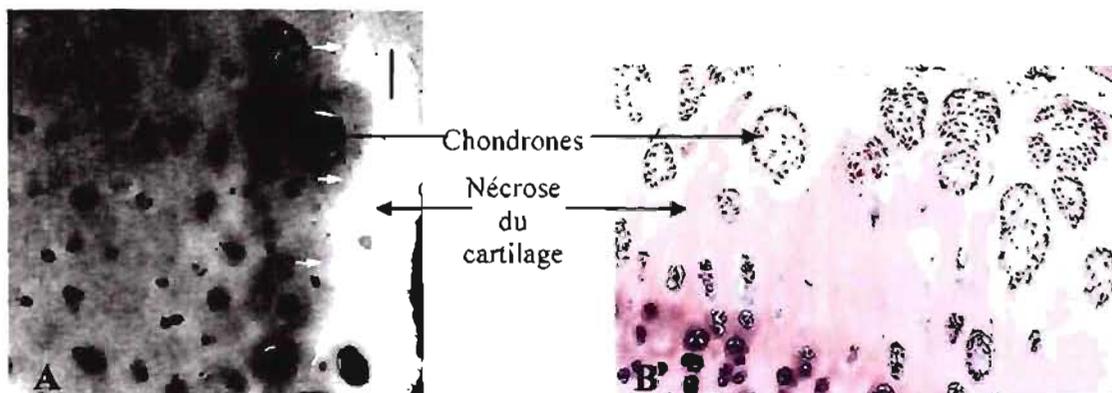
- La lésion d'OC primaire dans le cartilage semble être une nécrose des chondrocytes dans la zone de repos ou dans la zone hypertrophique du cartilage de croissance épiphysaire. Ces zones de chondronécrose sont caractérisées histologiquement par une pâleur de la MEC, une coloration irrégulière du cartilage (H&E, Safranine O Fast green) et la présence de petits chondrocytes dégénérés, voire une absence de ces cellules (Fig.18) (Rejnö et Strömberg 1978; Hill *et al.* 1985; Carlson *et al.* 1986; Carlson *et al.* 1995; Shingleton *et al.* 1997).



*Figure 18 : Lésions d'ostéochondrose chez des porcs âgés de 7 semaines [A] et de 15 semaines [B]. [A] : petite zone de chondrocytes morts avec une matrice pâle, entourant un canal vasculaire nécrosé. [B] : lésions comprenant une plus large zone de matrice cartilagineuse pâle, avec une diminution des chondrocytes nécrosés et colorés (délimitées par des pointillés), se prolongeant partiellement dans l'os sous-chondral. A l'intérieur et adjacent à ces zones de nécrose, des canaux vasculaires nécrosés sont visibles (flèches). Coloration H&E. (Ytrehus *et al.* 2004a).*

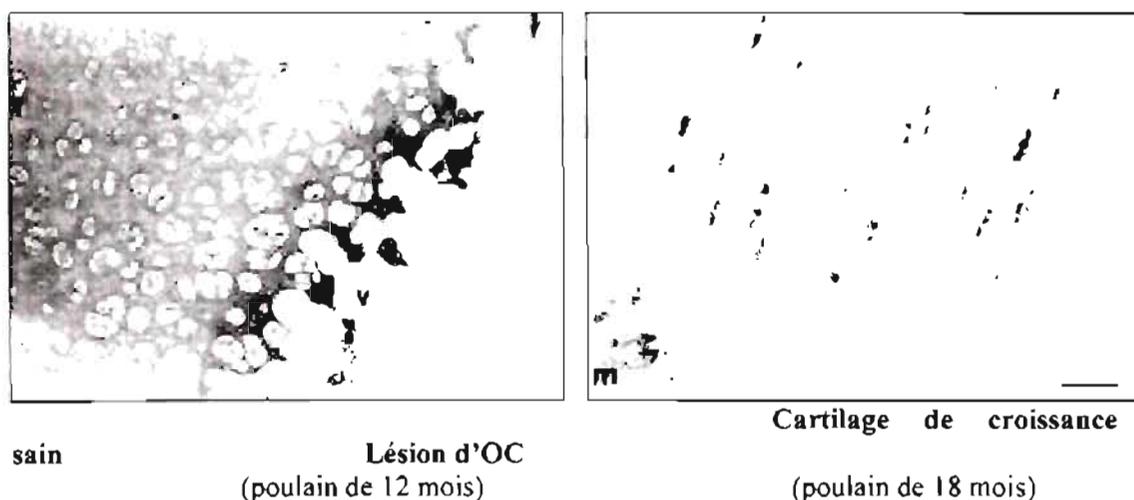
Ces lésions ont été observées chez des poulains aussi jeunes que 2, 3, 4 et 16 jours d'âge (Rejnö et Strömberg 1978; Carlson *et al.* 1995; Henson *et al.* 1997a; Henson *et al.* 1997b). Elles sont souvent centrées sur des zones de nécrose vasculaire avec dégénérescence des cellules mésenchymateuses et endothéliales. Les canaux vasculaires nécrosés sont facilement repérables car ils contiennent des restes de vaisseaux sanguins avec des cellules endothéliales nécrosées, des érythrocytes partiellement lysés et des débris cellulaires (Woodard *et al.* 1987a; Carlson *et al.* 1991; Carlson *et al.* 1995; Ytrehus *et al.* 2004b). Les chondrocytes à la périphérie immédiate de la zone de cartilage nécrosée semblent viables, mais contiennent de nombreux et larges globules lipidiques, probablement secondaires à l'hypoxie/anoxie (Ekman *et al.* 1990b); on y trouve également des chondrones, petits chondrocytes

entassés se partageant la même MEC dans une lacune subdivisée (Fig.19), distribués au hasard dans la MEC du cartilage de croissance (Henson *et al.* 1997c).



*Figure 19 : Coupes de lèvres trochléaires fémorales latérales de poulains âgés de 6 mois [A] et de 1 an [B]. Aspect des chondrones. (Henson *et al.* 1997a)*

▪ Dans un second temps, la lésion d'OC se présente sous forme d'un épaissement du cartilage, c'est-à-dire une rétention de cartilage se prolongeant dans l'os sous-chondral. Cette lésion touche principalement la zone pré hypertrophique et est caractérisée par une interruption dans la transition des chondrocytes entre la zone de prolifération et la zone hypertrophique. Les colonnes de chondrocytes hypertrophiques, normalement très ordonnées, sont disposées aléatoirement, de façon irrégulière (Fig.20). Il y a une absence de vaisseaux sanguins épiphysaires à l'interface cartilage/os.



*Figure 20 : Zones hypertrophiques de cartilage de croissance de poulains ; perte de l'arrangement en colonne des chondrocytes hypertrophiques lors d'ostéochondrose (Henson *et al.* 1997a).*

• Ces zones de cartilage de croissance anormal ne peuvent s'ossifier. On observe alors des îlots irréguliers de cartilage calcifié faisant protrusion dans l'os sous-chondral adjacent qui finissent par se nécroser et être entourés par des vaisseaux sanguins incapables de pénétrer dans ces zones pour synthétiser de l'os nouveau. C'est un stade d'OC un peu plus avancé caractérisé par une nécrose profonde, avec altération de la coloration de la MEC du cartilage minéralisé et de l'os sous-chondral (Hurtig et Pool 1996). Des kystes et des fêlures se développent entre les deux zones, hypertrophique et calcifiée ; des zones hémorragiques peuvent également apparaître (Savage *et al.* 1993a). Les fissures du cartilage peuvent atteindre l'os sous-chondral, mais généralement sont parallèles à celui-ci, au moins dans un premier temps. L'espace entre le cartilage épaissi et l'os sous-chondral de même que l'espace au centre des lésions kystiques est rempli d'un mélange de chondroclastes, d'ostéoclastes, d'ostéoblastes actifs, de macrophages, de bourgeons vasculaires en prolifération et de débris cellulaires amorphes (Rejnö et Strömberg 1978; Ytrehus *et al.* 2004c). De même, l'os sous chondral en contact avec le cartilage lésé (sous les lambeaux cartilagineux par exemple) présente des changements histologiques considérables, notamment de la sclérose osseuse et une fibrose de la moelle osseuse (Fig.21) (Rejnö et Strömberg 1978; Laverty *et al.* 2002).

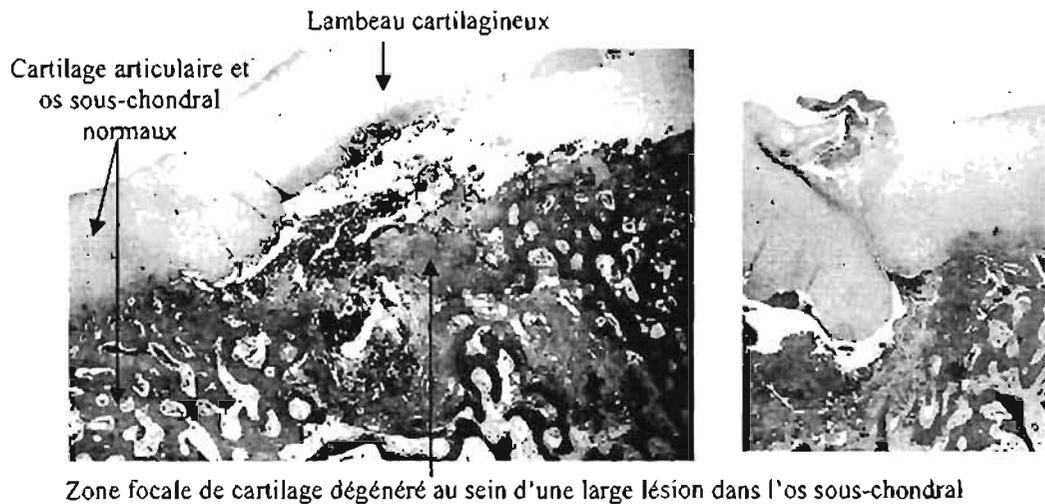


Figure 21 : Lésions d'ostéochondrite disséquante au niveau de la lèvre trochléaire fémorale latérale d'un cheval. (Laverty *et al.* 2002)

• Enfin, les derniers stades histologiques de l'OC correspondent à une ulcération du cartilage avec formation de fragments cartilagineux. Chez les chevaux âgés de plus d'un an avec des lésions apparemment chroniques, lorsque l'os sous-chondral est dénudé de son cartilage articulaire, il se couvre souvent d'un tissu conjonctif fibreux ou de fibrocartilage ; cela correspond à une tentative de réparation des lésions.

Un classement des lésions d'ostéochondrose sur une échelle de 0 à 6 (Van de Lest *et al.* 2004) a été réalisé selon les descriptions de Van Weeren et Barneveld (van Weeren et Barneveld 1999a) et la description histologique de Henson *et al.* (Henson *et al.* 1997b) (Tableau IV).

Grade	Lésions histologiques
0	Tissu normal
1	Front d'ossification découpé (échancrures), sans signes histologiques d'OC
2	Formation de chondrones, souvent en périphérie de petites zones de chondronécrose superficielles = stade précoce d'OC .
3	Perte de l'arrangement normal en colonnes régulières des chondrocytes et interruption de la séquence normale de transition des chondrocytes = stade précoce d'OC .
4	Fissures et nécrose dans la couche profonde du cartilage = stade intermédiaire d'ostéochondrose .
5	Lésions manifestes d'érosion du cartilage avec un fragment cartilagineux semi-détaché (lambeau articulaire) = stade avancé d'OC ou OCD .
6	Fragment cartilagineux libre dans l'articulation (souris articulaire) et ulcération du cartilage = stade avancé d'OC ou OCD .

*Tableau IV : Classement des lésions histologiques d'ostéochondrose selon van Weeren et Barneveld 1999a et Henson *et al.* 1997b*

On peut noter qu'un front d'ossification découpé, c'est-à-dire la prolongation de zones cartilagineuses dans l'os sous-chondral, a été noté grade 1 mais qu'il ne correspond pas encore à de l'OC. Shingleton *et al.* ont décrit l'existence de canaux vasculaires dans ces échancrures (Shingleton *et al.* 1997) (Fig.22).

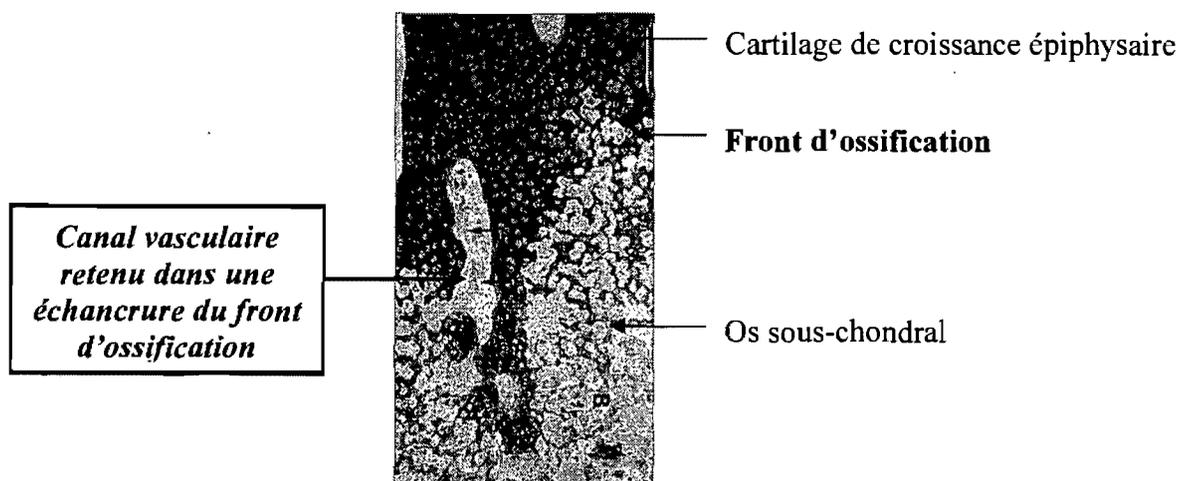


Figure 22 : Echancrure dans le front d'ossification de la trochlée fémorale latérale d'un poulain âgé de 10 semaines (Shingleton et al. 1997)

Les chondrocytes immédiatement adjacents à ces canaux sont de petite taille, arrondis, entourés par une MEC plus pâle et ne semblent pas suivre le schéma normal d'hypertrophie. L'influence de facteurs de croissance et d'hormones diffusant des canaux vasculaires a été incriminée. Cette absence de différenciation des chondrocytes à proximité des canaux empêcherait l'ossification endochondrale normale de se dérouler et entraînerait la rétention de cartilage et de leurs canaux associés dans le front d'ossification. Ces endroits pourraient correspondre à des sites pour l'initiation de lésions précoces d'OC (Shingleton *et al.* 1997).

1.3.5.2. Changements biochimiques lors d'OC

Lors de l'ossification endochondrale, la plupart si ce n'est tous les composants de la MEC du cartilage sont remplacés ou remodelés pour donner la MEC de l'os. Ces processus semblent plus actifs dans le mois qui suit la naissance puis, ils diminuent rapidement après cette période (Brama *et al.* 2002). C'est également à ce moment que les lésions d'OC sont susceptibles de se développer (Van de Lest *et al.* 2004). Ainsi, des altérations de la MEC du cartilage de croissance (changements moléculaires primaires dans la MEC et dans les enzymes de dégradation qui s'y trouvent) ont été observées chez des poulains atteints d'OC ; les chondrocytes semblaient incapables de produire une MEC mature pouvant autoriser une ossification endochondrale normale (Sokoloff 1990; Jeffcott et Henson 1998).

Cependant, il est important de préciser les périodes d'action des différentes molécules matricielles pour savoir si telle ou telle modification par rapport à la normale pourrait potentiellement être un facteur étiologique de l'OC ou être seulement une tentative de réparation par l'organisme. Ainsi, dans les lésions précoces d'OC, on a 2 zones voisines dans le cartilage qui correspondent aux 2 processus concomitantes : le site lésionnel proprement dit et à la périphérie de cette zone, les tentatives de réparation. Lors de lésions tardives d'OC, chez des poulains de plus de 8-10 mois, les chondrocytes ont un métabolisme diminué et une perte de vitalité, ce qui indique qu'à ce stade de la maladie, une guérison n'est plus envisageable (van den Hoogen *et al.* 1999).

- *Changements matriciels au sein des lésions*

Dans ces sites, il semblerait que la nécrose des chondrocytes précède l'altération de la composition de la MEC (Ekman *et al.* 1990a). Les changements matriciels observables sont en particulier une perte de GAGs, en particulier de chondroïtine sulfate (Lillich *et al.* 1997), une diminution de la production de PGs (Carlson *et al.* 1986; van den Hoogen *et al.* 1999) sans augmentation associée de leur dégradation (Lavery *et al.* 2002) et une altération de la distribution de la fibronectine (Jeffcott et Henson 1998).

Depuis quelques temps, on pense également qu'un trouble dans le métabolisme du collagène dans le cartilage de croissance atteint d'OC pourrait être une des clés de la pathogénie de cette affection (Lavery *et al.* 2000; Van de Lest *et al.* 2004). On observe en effet une augmentation de la solubilité du collagène de type II (Bridges et Harris 1988) et une diminution du nombre de liaisons longues entre ces différentes molécules de collagène (Hurtig *et al.* 1993) et une forte diminution en collagènes totaux dans le cartilage articulaire aux stades précoces ou avancés d'OC et dans l'os sous-chondral lors des stades précoces uniquement (Van de Lest *et al.* 2004).

Les collagénases semblent également jouer un rôle important dans le développement des lésions d'OC. Dans le processus normal d'ossification endochondrale, une dégradation sélective rapide du collagène de type II est mise en

place par l'action de la collagénase MMP-13 (Mwale *et al.* 2000), en particulier dans la zone hypertrophique du cartilage de croissance (Alini *et al.* 1992; Wu *et al.* 2002). Lors d'OC, pour une raison inconnue, l'activité de la MMP-13 semble dérégulée et excessive, ce qui retarde le déroulement normal de la maturation des chondrocytes dans l'épiphyse en croissance. Les traumatismes internes, isolés ou répétitifs, pourraient entraîner un tel dérèglement de l'activité des collagénases et altérer focalement l'activité métabolique du cartilage entraînant le développement de lésions d'OC (Laverty *et al.* 2002). Ainsi, une augmentation de la dégradation du collagène II par des collagénases (clivage des triples hélices de la molécule) a été notée dans les lésions d'OC (Laverty *et al.* 2002) ainsi qu'une altération des molécules de pro-collagène II dans le liquide synovial (Laverty *et al.* 2000). Par contre, contrairement à ce qui se passe dans l'ostéoarthrose, lors d'OC il n'y a pas de perte de collagène II associée à ce clivage excessif car la synthèse de ces molécules est également active (Nelson *et al.* 1998; Laverty *et al.* 2000). Il y a simplement un turnover accru du collagène de type II qui peut être la cause d'une MEC plus fragile susceptible de développer des lésions lors de charges trop importantes par exemple. Dans les lésions d'OC, on retrouve également une augmentation importante des cathepsines B et D (Hernandez-Vidal *et al.* 1998), des enzymes protéolytiques du collagène et des PGs (Glaser *et al.* 2003). L'activité des gélatinases (MMP-2 et MMP-9) semble également largement augmentée dans les lésions d'OCD. On retrouve des lignes verticales d'activité, se prolongeant depuis la zone profonde vers la surface articulaire (Al-Hizab *et al.* 2002) (Fig.23).

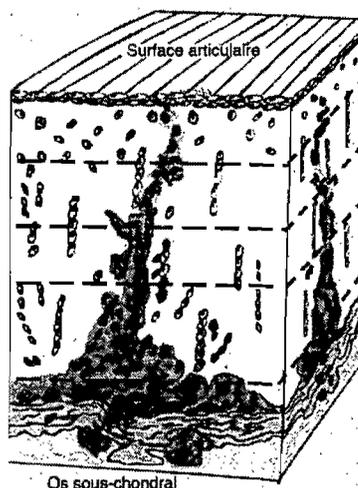


Figure 23 : Activité des gélatinases (zones sombres) dans un cartilage articulaire avec ostéochondrite disséquante (Al-Hizab et al. 2002)

Ces aires verticales pourraient indiquer des zones potentiellement plus vulnérables, car soumises à des activités protéolytiques augmentées, et donc pouvant se fissurer plus facilement. Elles pourraient également correspondre à d'anciennes localisations de canaux vasculaires, sachant que certains rapportent une mauvaise réparation du cartilage lors de la chondrification comme une cause d'OCD (Ekman et Carlson 1998). Enfin, cette activité augmentée des gélatinases pourrait représenter une tentative de réparation des lésions d'OCD ou être corrélée à une production augmentée des différents composants de la MEC et être alors un reflet du turnover majeur du tissu (Al-Hizab et al. 2002).

Dans les lésions, les taux d'IGF-1 (Cymbaluk et Smart 1993; Thorp et al. 1995; Cornish et al. 1996; Donabedian 2006) et de TGF- β 1 semblent diminués entraînant un arrêt de l'hypertrophie des chondrocytes, bloqués au stade pré-hypertrophique (Henson et al. 1997b; Douglas 2003). Une augmentation de l'expression de PTH-rP est également présente dans les couches plus profondes du cartilage lésé, inhibant la différenciation des chondrocytes et donc ralentissant l'ossification par un rétrocontrôle négatif sur Ihh (Semevolos et al. 2002).

- Tentatives de réparation à la périphérie des sites lésionnels

À la périphérie des zones de chondronécrose, il y a une augmentation importante de la prolifération des chondrocytes mise en évidence par la présence de chondrones,

associée à une activité métabolique augmentée de ces chondrocytes (synthèse augmentée des PGs (van den Hoogen *et al.* 1999) et du collagène II (augmentation des CPII) (Nelson *et al.* 1998; Laverty *et al.* 2000)). Dans les chondrones, on note une expression augmentée des collagènes de type VI et X (Bashey *et al.* 1989; Henson *et al.* 1997a). Le collagène de type VI joue un rôle important dans l'organisation de la MEC et dans la fixation des chondrocytes à cette MEC, à la fois dans le cartilage de croissance et dans le cartilage articulaire par la suite. Une surexpression de ce collagène pourrait servir à augmenter la stabilité mécanique des aires de MEC fragilisées par les zones de nécrose environnantes (Henson *et al.* 1997a). On peut également observer dans les chondrones une expression augmentée d'IGF-1 et de TGF- β 1 (Semevolos *et al.* 2001), facteurs de croissance très importants pour la prolifération et la différenciation des chondrocytes.

La prolifération des chondrocytes pourrait être secondaire à une stimulation par Ihh, dont l'expression semble significativement augmentée dans le cartilage avec des lésions d'OC, principalement dans les chondrones (Semevolos *et al.* 2005). Cela semble corrélé à une diminution significative dans le cartilage lésé de l'expression du facteur de transcription Gli1, facteur qui altère l'expression d'importants gènes du développement (Ihh, les promoteurs des protéines BMP favorisant la prolifération des chondrocytes, les gènes régulant le cycle cellulaire (adhésion, transduction, apoptose) (Won Yoon *et al.* 2002)) (Semevolos *et al.* 2005).

On peut se rendre compte de la difficulté de différencier les phénomènes de formation et de guérison des lésions d'OC, ainsi que les processus dégénératifs secondaires du cartilage. Cela est en partie dû au fait que jusqu'à présent, l'OC équine a beaucoup été étudiée lors de phases chroniques, quand les lésions étaient morphologiquement compliquées et la cause initiale impossible à déterminer. L'étude de lésions précoces et des changements matriciels associés chez de très jeunes animaux âgés de moins d'un mois, en examinant systématiquement toutes les articulations susceptibles de développer de l'OC, semble aujourd'hui primordiale pour mieux comprendre la pathogénie de cette maladie.

1.4. Hypothèse et objectifs

L'identification de lésions histologiques compatibles avec de l'OC chez des poulains aussi jeunes que 2, 3, 4 et 16 jours d'âge (Rejnö et Strömberg 1978; Carlson *et al.* 1995; Henson *et al.* 1997a; Henson *et al.* 1997b) suggère la possibilité de l'existence de changements dans la MEC fœtale. Ces changements matriciels pourraient être lésionnels ou seulement pré-lésionnels mais annonçant la survenue probable de lésions d'OC futures. De plus, la diminution d'incidence d'OC chez la progéniture de juments ayant reçu une supplémentation orale de cuivre lors de leur gestation suggère également que des événements *in utero* pourraient intervenir dans la pathogénie de cette affection. Enfin, des changements dans le métabolisme du collagène de type II semblent également intervenir dans le processus. Or le réseau de collagène se développe lors de la vie fœtale et mature après la naissance. L'étude d'épiphyes fœtales en développement à différents stades de gestation pourrait améliorer la compréhension des événements matriciels précoces à l'origine d'OC.

Notre hypothèse est donc que l'ostéochondrose est déjà décelable histologiquement chez le fœtus. Notre travail a plusieurs objectifs. Le premier est de déterminer si des anomalies du cartilage de croissance épiphysaire, pouvant correspondre à des stades précoces d'ostéochondrose, sont présentes dans les principales épiphyses de fœtus équins et de poulains nouveau-nés. Notre deuxième objectif est de quantifier et de caractériser la vascularisation du cartilage de croissance épiphysaire en fonction du stade de gestation, car c'est une donnée importante encore mal connue chez le cheval. Il est important en particulier de déterminer la période de formation des canaux vasculaires du cartilage, leur organisation dans le cartilage de croissance et leur régression. La relation existant entre cette vascularisation et les lésions éventuelles d'ostéochondrose sera également examinée. Enfin, notre troisième objectif est de décrire la structure tridimensionnelle du collagène de type II lors du développement épiphysaire, en particulier pour mieux comprendre les différentes étapes de formation du cartilage articulaire. A la différence de la biochimie du collagène, la structure tridimensionnelle du réseau est un aspect qui a été très peu étudié chez le cheval, et qui est primordiale pour la compréhension des propriétés biomécaniques du cartilage.

Chapitre II : Article

Matériel, méthode et résultats présentés sous forme d'article.

Manuscrit soumis pour publication dans Equine Veterinary Journal.

SUBMISSION
October 30th, 2007

Cartilage Matrix Changes in the Developing Epiphysis: Early Events on the Pathway to Equine Osteochondrosis?

Marie Lecocq, D.V.M., M.Sc. ‡
Christiane A. Girard, D.V.M., M.Sc., Dipl. ACVP †
Ursula Fogarty, M.V.B., Ph.D., MRCVS, Dip. Stat. δ
Guy Beauchamp ‡
Hélène Richard ‡
Sheila Laverty, MVB, Dipl. ACVS, ECVS ‡

‡ Département de sciences cliniques,
† Département de pathologie et microbiologie,
Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada;
δ Department of Pathology, Irish Equine Center, Kildare, Ireland;

Address correspondence to:

Dr. Sheila Laverty MVB, Dipl. ACVS, ECVS

Professor

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Université de Montréal

3200, rue Sicotte

C. P. 5000

Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 7C6

Canada

Tel : [information retirée / information withdrawn]

Fax : [information retirée / information withdrawn]

E-mail : [information retirée / information withdrawn]

Keywords

Horse; fetus; histology; epiphyseal cartilage; collagen matrix; osteochondrosis.

2.1 Abbreviations

AC: Articular cartilage

AECC: Articular-epiphyseal cartilage complex

CI: Confidence interval

ECM: Extracellular matrix

EGC: Epiphyseal growth cartilage

μ MRI: Microscopic magnetic resonance imaging

OC: Osteochondrosis

OCD: Osteochondritis dissecans

OR: Odds ratio

PLM: Polarized light microscopy

SD: Standard deviation

2.2 Summary

Hypothesis/objectives: The earliest osteochondrosis (OC) microscopic lesion reported in the literature was present in the stifle joint of a 2 day old foal (Carlson *et al.* 1995) suggesting that OC lesions and factors initiating them may arise prior to birth. The objective of this study was to examine the developing equine epiphysis to detect histologic changes that could be precursors to OC lesions.

Methods: Osteochondral samples from 21 equine fetuses and 13 foals were harvested from selected sites in the shoulder, elbow, stifle, hock and fetlocks. Sections were stained with Safranin O (for proteoglycan) and picosirius red (for collagen) to assess cartilage changes and structural arrangement of the collagen matrix.

Results: On Safranin O sections, ECM changes observed included perivascular areas of paleness of the proteoglycan matrix associated with hypocellularity and, sometimes, necrotic chondrocytes. These changes were most abundant in the youngest fetuses and in the stifles. Indentations of the ossification front were also observed in most specimens, but, most frequently, in stifles and shoulders. A cartilage canal was almost always present in these indentations. The vascular density of the cartilage was higher in the youngest fetuses. In these fetuses, the most vascularized joints were the fetlocks but their cartilage canals regressed quickly. After birth, the most vascularized cartilage was present in the stifle. Picosirius red staining revealed a changing organization of the collagen matrix over time: articular cartilage differentiated into 4 zones early in fetal life and the epiphyseal cartilage also had a distinct zonal cartilage structure.

Conclusion: Matrix and ossification front changes were frequently observed and significantly associated with cartilage canals leading us to believe that they may be physiological changes associated with matrix remodelling and development. The collagen structure was variable through the growing epiphysis. A striking difference was observed in the collagen structure at the junction of the proliferative and hypertrophic zones where OCD lesions occur: a differential in biomechanical properties at this site could predispose it to injury.

2.3 Introduction

During fetal life, the epiphyseal region of bones is initially composed of hyaline cartilage and of a network of blood vessels, housed in cartilage canals (Firth and Poulos 1982). With fetal maturity, the cartilaginous epiphysis has a dual structure: the superficial component becomes the articular cartilage and the deeper one develops an ossification centre (growing cartilage); combined, they are called the articular-epiphyseal cartilage complex (AECC) (Jeffcott 1991). However, these zones cannot be delineated histologically (Rivas and Shapiro 2002). The transformation of the growth cartilage into bone is the process of endochondral ossification (Banks 1993). A focal disturbance of this pathway is a hallmark of osteochondrosis (OC) (Douglas 2003). Equine OC occurs at both the articular surface (osteochondritis dissecans (OCD)) and the metaphyseal growth plates, and articular OC, because of joint incongruity, may lead to degenerative joint disease. Consequently, articular OC has a major economic impact for the performance horse industry (Jeffcott 1991). The cause of OC remains poorly understood, but a number of factors, including skeletal growth rates, nutrition, genetics or physical activity, have been implicated (reviewed in Van Weeren 2006a).

Although chronic lesions of OC causing clinical lameness have been well documented in horses, few early lesions have been studied and the exact sequence of events leading to OC remains to be elucidated. It is now established, using standard histological and radiological assessment, that OC lesions develop in the first few months of life, much earlier than previously recognized, during the most intense phase of growth (Carlson *et al.* 1995; Dik *et al.* 1999). In 1993, Carlsten *et al.* speculated that “the development of OC lesions may start before birth” (Carlsten *et al.* 1993). Evidence to support this hypothesis is provided by the occurrence of histological lesions compatible with OC in 2 to 18 days old foals (Rejnö and Strömberg 1978; Carlson *et al.* 1995; Henson *et al.* 1997a; Henson *et al.* 1997b; Olstad *et al.* 2007). In addition, oral copper supplementation of pregnant mares has been shown to decrease the incidence of OC in their offspring, also suggesting that in utero events could pave the way to OC (Pearce *et al.* 1998). However, to the contrary, it was subsequently reported that an injectable copper supplementation of the dam

during late pregnancy had no significant effect on the prevalence of OC lesions in foals (Gee *et al.* 2007). This disparity in results is difficult to explain, but copper injections were perhaps administered too late when OC lesions have already begun to develop.

From the limited number of prior studies where early OC lesions were described, in both porcine and equine species, two main hypotheses for OC pathogenesis have evolved. Several investigators believe that ischemic necrosis is an important upstream event in the development of OC (Kincaid *et al.* 1985; Woodard *et al.* 1987; Carlson *et al.* 1991; Carlson *et al.* 1995; Ytrehus *et al.* 2004; Olstad *et al.* 2007). Results of a recent study suggest that “vascular failure leads to cartilage canal necrosis and chondrocyte necrosis followed by matrix changes” (Olstad *et al.* 2007), but the cause of the primary ischemic necrosis remains to be elucidated. The second alternative pathogenic hypothesis is that alterations of the collagen component of the extracellular matrix (ECM) may play a role in early OC. Evidence for this hypothesis includes reports of an increase in type II collagen solubility in cartilage from foals with OC (Bridges and Harris 1988) and a decrease in total type II collagen content and cross links in early OC lesions in an experimental model of OC (Hurtig *et al.* 1993) or in naturally occurring OCD (Wardale and Duance 1994; Van de Lest *et al.* 2004). In addition, an increased collagen turnover was identified in vitro employing cartilage explants of OCD lesions (Lavery *et al.* 2002) and on serum and synovial serum biomarker assessment in vivo in OCD affected animals (Billinghurst *et al.* 2004; Lavery *et al.* 2000). Finally, an increase in activity of enzymes capable of degradation of the collagen matrix has been identified in cartilage and in the synovial fluid of OCD affected horses (Hernandez-Vidal *et al.* 1997, 1998; Al-Hizab *et al.* 2002; Brama *et al.* 2002; Glaser *et al.* 2003). It remains to be determined whether the cartilage collagen molecular and metabolic changes observed are primary or secondary events in OC (Van Weeren 2006b).

Type II collagen is one of the major structural constituents of cartilage. The spatial organization of the collagen fibers’ three-dimensional network is important for the biomechanical function of the joint: resisting expanding pressure from cartilage proteoglycans and the shear stresses produced during joint movement (reviewed in

Basser *et al.* 1998; Bank *et al.* 2000; Grunder 2006). Little attention has been paid to the collagen structure of the equine fetal epiphysis and to its development, despite its possible implication in OC. Recently, cartilage collagen structure and its topographical and developmental variations in the developing epiphysis have been described for the first time in a mouse model using picosirius red staining combined with polarized light microscopy (PLM) (Hughes 2005; Hughes *et al.* 2005). PLM exploits the natural birefringence of cartilage in certain histological zones, due to the orientation and the alignment of collagen fibers, polarizing the light passing through them, and, consequently, providing detailed structural information. As this birefringence is fairly weak and difficult to detect (Trelstad and Silver 1981), the use of picosirius red enhances visualization with polarized light (Puchtler and Sweat 1964).

As relatively few studies have investigated the development of the articular-epiphyseal cartilage complex in equine fetuses (Rejnö and Strömberg 1978; Henson 1996; Henson *et al.* 1997a; Henson *et al.* 1997b; Shingleton *et al.* 1997; Olstad *et al.* 2007) and none, to our knowledge, have studied collagen structure, the objective of this investigation was to study the histological events in the growth cartilage of the developing epiphyses of the appendicular skeleton in equine fetuses and newborn foals at OCD susceptible sites by employing stains to concurrently examine the proteoglycan (Safranin O Fast green) and type II collagen (picrosirius red) in the matrix. Specifically, the aim of the study was to describe changes during epiphyseal development and those that could be potential precursors to OCD. A second objective of this study was to quantify the epiphyseal growth cartilage vascularity in respect to the gestational age and to the articular site because of its putative role in OC pathogenesis.

2.4 Materials and Methods

2.4.1 Sample collection and preparation

Twenty-one equine fetuses, either aborted or collected at an abattoir, and 13 foals that died during their first week of life were evaluated. Age of fetuses was determined using the crown-rump length, as previously described (Douglas and

Ginther 1975). Specimens were collected within 16 hours of death. Bilateral samples were harvested from 7 joints (scapulohumeral, humeroradial, metacarpophalangeal, femoropatellar, femorotibial, tarsocrural and metatarsophalangeal) (Fig 1) and yielded 18 samples per animal. Samples were selected because of predisposition to OC except humeroradial considered as a “control” site. They were frozen at -20°C until processing. They were sectioned (3mm thick) with a low speed Isomet saw (Buehler, Illinois, USA) with a 15 HC diamond blade (10.2 mm*0.3 mm), fixed in formalin for 24 hours, decalcified in 10% EDTA and routinely embedded in paraffin. Two 4- μ m-thick sections were cut from each block and stained with Safranin O fast green and Picrosirius red.

2.4.2 Safranin O Fast green staining and evaluation

Sections were stained with Safranin O Fast green, as described elsewhere (Lillie and Fulmer 1976; Conn and Lillie 1977; Melrose *et al.* 2004). Examination of the epiphyseal growth cartilage and cartilage/bone interface was performed using a Nikon LABPHOT SA microscope and a Leica DM4000B microscope, attached to a Leica DFC320 video camera. For each section, the following histological parameters were assessed: (1) appearance of the extracellular matrix and cellularity; (2) appearance of the ossification front; (3) presence and appearance of cartilage canals.

(1) Appearance of the extracellular matrix and cellularity

Changes were scored on a scale of 0 to 2: grade 0 represented normal matrix, grade 1, focal paleness of the matrix and hypocellularity, grade 2, multifocal paleness of the matrix and hypocellularity. Histological appearance of chondrocytes and cartilage canals inside these modified areas was also assessed: chondrocytes were interpreted as necrotic when they exhibited a condensed, round and dark nucleus, karyorrhexis or karyolysis. The cartilage canals were judged to be either normal, chondrifying or to have a necrotic appearance.

(2) Appearance of the ossification front

The cartilage/bone junction, which represented the ossification front, was described as being regular or indented. Indentations are characterized by cartilaginous

projections (presence of chondrocytes) in the subchondral bone. The presence of cartilage canals within these indentations was noted.

(3) Vascular density of the growth cartilage

Based on the method described by Shingleton *et al.* (1997), the number of sectioned cartilage canals was counted using a 40× objective. Sections through cartilage canals were counted in a series (depending on the cartilage thickness) of adjacent microscope fields running centrally through the section from the articular surface to the underlying bone, if present (Fig 2A), or to the distal boundary of the growth cartilage in the younger fetuses. The mean number of cartilage canal sections per microscopic field x40 was then calculated, corresponding to the vascular density of the growth cartilage.

In a series of sections (30) from fetuses and foals of different ages, we used ImageJ Software (Image Processing and Analysis in Java, Wright Cell Imaging Facility, Toronto Western Research Institute) to obtain a mean area of the cartilage canals in different zones of the growth cartilage. The epiphyseal growth cartilage (EGC) was divided into three zones, each one corresponding to a microscopic field x25: the superficial zone close to the articular surface, the intermediate zone and the deep one, close to the ossification front. The mean area of canal sections per zone was then calculated. This measurement was performed as a parameter to assess the cartilage development and to compare each joint's development.

2.4.3 Picrosirius red staining for collagen structural assessment

The picrosirius red staining method to stain 4 µm sections was based on the original picrosirius red method described by Sweat *et al.* (1964) with minor changes adapted from Hughes *et al.* (2005). The principal difference was the addition, before the staining with picrosirius red, of a preliminary digestion step with papain to strip the proteoglycans and permit the stain access to the collagen fibers (Dr K. Pritzker, September, 2006, personal communication). Briefly, sections were incubated for 90 minutes at 37°C in a 0.5% pre-warmed papain solution pH 4,4 (Fisher Scientific Company, USA), and then rinsed in distilled water prior to staining.

As little information is available in the literature concerning the use of picrosirius red staining for fetal tissues and OC lesions, we also stained additional samples from normal older horses of various ages (n=11, age ranges, one month to 18 years old) and horses with OC lesions (n=3, age range, five to 10 months old) with picrosirius red for comparative purposes.

Picrosirius red stained histologic sections were examined using a Leica DM4000B polarized light microscope (PLM) equipped with interference filters and compensator plates mounted with a Leica DFC320 video camera. The two cross polarizers were used such that highly ordered collagen parallel to the articular surface appeared bright and orange, while collagen that is not ordered (non birefringent) appears darkest. A general examination, at greatest birefringence, of the full depth articular and growth cartilage was conducted using low (x12.5, x25, x50) and high (x100, x200) magnifications to examine the collagen structure in each section. Normal appearing structures common to all sections were noted and any change in pattern was also noted.

For comparative purposes, similar histological parameters to the Safranin O Fast green assessment were studied: (1) the extracellular matrix; (2) the ossification front region; (3) the vascularity. Also, selected Safranin O Fast green stained slides with ECM changes (n=40) or indented ossification fronts (n=20) were compared with corresponding picrosirius red sections to identify any associated collagen structural abnormality.

2.4.4 Statistical analysis

A repeated-measures logistic regression model for dichotomic or trichotomic responses was used on Safranin O sections to determine the association between the extracellular matrix changes (grades 0, 1 and 2) or the ossification front changes (normal and indented) and each of the following parameters (age, sex, side of limb, joint). The different joints were also compared to each other with respect to each parameter to determine if there was an increased prevalence of changes in joints more susceptible to OC. Odd ratios (OR) for various contrasts among the levels of the independent variables and their 95% confidence interval (CI) were noted. A repeated-

measures linear model was used to determine the association between the vascular density in the growth cartilage (mean number of cartilage canals sections per microscope field x40) and each of the previous parameters (age, sex, side of limb, joint), and the association between the mean cartilage canal area and the joint, the zone in the growth cartilage and the age. In all analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$.

2.5 Results

2.5.1 Horses

The mean age of the fetuses was 9.4 ± 1.3 months gestation (range 6 to 11 months gestation) and mean age of foals was 58.7 ± 50.8 hours after birth (range 1 to 192 hours). The animals were arbitrarily divided into 3 groups based on age: 6-9 months fetuses (n=11 with 4 male and 7 female), 10-11 months fetuses (n=10 with 3 male and 7 female) and up to eight day-old foals (n=13 with 7 male, 4 female and 2 unknown sex). Fourteen of the horses were male and eighteen were female. The sex was not recorded for the remaining two horses. The majority of the horses were Thoroughbred (n=27); in addition, there was one Arabian, two mixed breed and four unknown breeds.

Samples were taken from the 18 sites previously described in the majority of the animals (n=23). A total of 568 articular sites were available for assessment (285 right and 283 left sites, 182 sites for the 6-9 months fetuses group, 159 among the 10-11 months fetuses group 2 and 228 among the foals).

2.5.2 Safranin O Fast green staining

2.5.2.1 Appearance of the extracellular matrix (ECM) and cellularity

ECM changes (grades 1 or 2) were present in 45% of the joints and in 100% of the animals. Forty percent of ECM changes were bilateral. In these areas, small, necrotic chondrocytes with a condensed or irregular appearance and little evidence of a nuclear component or, to the contrary, a very condensed and dark nucleus, were frequently present combined with normal chondrocytes (Fig 2B). These cells were surrounded by a wide area of pale staining matrix. The latter was frequently

associated with a cartilage canal, predominantly normal, but sometimes chondrifying (Fig 2B₂). These areas were found in all regions of the growth cartilage, but mainly in the resting and proliferating zones. There was no association between the ECM changes and sex or side, but there was a highly significant association between ECM changes and age ($p=0.0008$) (Table 1). The odds of having a higher grade of ECM change decreased by a factor of 0.26 (CI: 0.15-0.44) in foals compared with the 6-9 months fetus ($p<0.0001$) and by a factor of 0.43 (CI: 0.28-0.67) in the foals compared with the 10-11 months fetus ($p=0.0002$). The odds of having a higher grade were similar in the 6-9 months and 10-11 months classes of age ($p=0.10$). Thus, ECM changes (grades 1 or 2) occurred significantly more often in the youngest fetuses and, then, regressed rapidly.

The association between ECM changes and articular site was assessed in each age group (Table 2, Fig 3). The odds of having a higher grade were significantly increased in the lateral femoral condyle in the 6-9 months fetuses, in the medial and lateral trochlear ridges of the femur and in the medial and lateral femoral condyles in the 10-11 months fetuses, and in the medial trochlear ridge of the femur and in the medial and lateral femoral condyles in the foals. The ECM changes were therefore significantly more prevalent in the four articular sites from the stifle joint than in all other sites.

2.5.2.2 Appearance of the ossification front

Only 24% of sections of the 6-9 months fetuses had a visible ossification front, with these 24% which were older within this age group. It was present in all other samples.

In 41% of sections, all sites and age taken together, finger-like projections of cartilage were observed extending into the underlying subchondral bone. Chondrocytes and ECM within the indentations appeared normal. The indented ossification front was almost always associated with cartilage canals (92% of the cases) (Fig 2C₁) and, in the majority of cases, chondrocytes adjacent to these canals were hypertrophic. Cartilage canals were also observed entering the ossification front without evidence of indentation of the cartilage (Fig 2C₂).

There was no association between the appearance of the ossification front and age, sex or side. The odds of having a higher ECM grade on Safranin O staining were very slightly increased when the ossification front was indented compared to regular (OR: 1.62; CI: 1.01-2.62; $p=0.047$).

The association between indented ossification front and articular site was assessed all ages taken together. The odds of having an indented ossification front were significantly increased in the glenoid cavity of scapula, in the trochlear ridges of femur and in the femoral condyles when compared to all other sites (Table 3, Fig 4). Thus, the shoulder and the stifle had the highest number of indentations of the ossification front.

2.5.2.3 Vascular density of the growth cartilage

In both fetuses and foals, cartilage canals were seen throughout the epiphyseal cartilage at all sites examined, entering from the adjacent perichondrium, but the cartilage of fetuses between six and nine months of gestation was significantly more vascular than that of 10 to 11 months of gestation and than foals ($p<0.0001$). This vascularization regressed rapidly and afterwards, there was no significant difference in the vascular density between the 10 to 11 months fetuses and the foals (Fig 5A). Some of the cartilage canals had lost their vascular elements and were filled with a matrix that stained metachromatically with Safranin O; this cartilage canal regression, or chondrification, was observed in fetuses as young as eight months of gestation.

There was no association between the degree of vascularization of the growth cartilage and sex or side, but there was a significant association with the articular site in each age group (Table 4, Fig 5B). Contrasts between sites revealed that between six and nine months of gestation, the most vascularized articular sites were the midsagittal ridges of the third metacarpal and metatarsal bones, but their cartilage canals regressed quickly. After birth, the most vascularized cartilage was those of the four stifle sites. The glenoid cavity and head of radius were also well vascularized after birth.

Specimens with grade 2 ECM change were significantly more vascular than those with grade 0 ($p=0.003$); those with grade 1 change also tended to be more

vascular than grade 0 but this was not statistically significant ($p=0.07$). Samples with indentations of the ossification front were significantly more vascular than the others ($p<0.0001$).

Cartilage canal areas

Cartilage canal areas in different growth cartilage zones were assessed in selected joints (high vascularization in early and late development), including the midsagittal ridge of the third metacarpal bone and the lateral femoral condyle. The region corresponding to the future articular cartilage was always avascular. The growth cartilage was well vascularized. In the 10-11 months fetuses and foals, the cartilage section of the midsagittal ridge of the third metacarpal bone was too thin to permit assessment of three microscopic fields $\times 25$ and only the mean cartilage canal area in all the cartilage depth was assessed. Contrasts between the mean canal area in each zone of the cartilage revealed that in the distal metacarpus from 6-9 months fetuses, and in the lateral femoral condyles from all the 3 age groups, mean cartilage canal area was higher in deep zones compared to superficial and intermediate zones (Fig 5C). Mean cartilage canal area was also higher in the intermediate zone compared with superficial zones but this was not statistically significant. Thus, the cartilage canals were smaller near the articular surface and their size increased with the depth. All zones taken together, there was no association between the mean canal area and age in distal metacarpus, but the association was significant in the lateral femoral condyle, where cartilage canals were smaller in the 6-9 months fetuses compared to 10-11 months fetuses ($p=0.007$) and to foals ($p=0.01$). Mean canal area was equivalent in these two last groups. With all zones taken together, mean canal area was higher in the lateral femoral condyle compared to distal metacarpus in the 10-11 months fetuses ($p=0.002$) and in the foals ($p=0.03$).

2.5.3 Picrosirius red staining; collagen structural features

2.5.3.1 Appearance of the extracellular matrix (ECM)

The ECM of the articular-epiphyseal cartilage complex (AECC) organization could be divided into two major regions: the articular cartilage (AC) and the epiphyseal growth cartilage (EGC).

a. Articular region of the AECC

At six months of gestation, the AC was practically indistinguishable from the EGC (Fig 6A). With increasing age, global birefringence (i.e. color and light intensity) of the samples increased and slight changes in the direction of the birefringence in the ECM close to the articular surface were observed, with orientation of some fibers (parallel or perpendicular to the rest of the tissue) corresponding to the early development of the AC.

From eight months of gestation, on picrosirius red stained sections, unlike Safranin O Fast green, the AC region was clearly and easily differentiated from the EGC in all the articular sites (Fig 6B); four different zones (always avascular) were identified in the developing AC (Fig 7A): zone I is a superficial tangential zone, zone II is an intermediate transitional zone, zone III is a deep radial zone and zone IV is an additional deeper transitional zone. In transitional zones II and IV, almost no birefringence could be observed, even if the angle of polarization was changed (Fig 7A). Zone IV was always avascular and appeared to be a component of the AC; it corresponded to an area in which collagen fiber reorganization was occurring, with randomly oriented fibrils. In the AC region, the birefringent fibers displayed a range of colors, orange or red for the tangentially arranged fibers and yellow or green for radial fibers. This multi-zonal juvenile AC collagen network structure remained present for many months; the oldest foals with an articular cartilage composed of four zones were 10 months of age.

b. Epiphyseal region of the AECC and ossification front region

At six months of gestation, there was an interesting difference in collagen network development of EGC between the sites sampled. In the majority of articular sites (femoral condyles, trochlear ridges of femur, intermediate ridge of the distal tibia and midsagittal ridge of the third metacarpus/metatarsus), the global birefringence of the samples was moderate to good. In contrast, in the glenoid cavity of scapula and in the head of radius, very little birefringence was detectable, even when the polarizing filter was adjusted for maximum birefringence, apart from regions close to cartilage canals and from the surface of the articular cartilage

(*Lamina splendens*) identified as a slightly birefringent line. The collagen structure was relatively undifferentiated and homogeneous, without zonation, arranged randomly (isotropically).

From eight months of gestation, an increase in birefringence occurred in all the EGCs and at all sites indicating an increase in the collagen content of the ECM and in the anisotropy of this collagen. At high magnification (x100, x200), the typical woven pattern of collagen was easily recognized: the collagen fibers were interlaced and had the appearance of several arches in the tissue.

In the sections where an ossification front was present, so with a more advanced maturation, the EGC could be divided into three zones: a tangential one close to the developing AC, where the collagen network appeared very dense and birefringent, yellow or orange, well-ordered and generally oriented parallel to the articular surface (Fig 7B₂), an intermediate zone more isotropic, less birefringent but, also yellow and slightly looser (Fig 7D₂) and a deeper radial zone close to the ossification front, much looser (less collagen), less birefringent, with perpendicularly oriented fibers (Fig 7E₂). In this latter zone, the collagen fibrils appeared thinner and green and the woven appearance with both perpendicular and intersecting transverse collagen fibrils was very marked (Fig 7E₂, 8); the fiber's organization is more orthogonal. When these regions were observed without polarized light, the dense tangential collagen network corresponded to the resting zone with small dispersed chondrocytes (Fig 7B₁), the intermediate zone corresponded to the proliferative zone with flat chondrocytes organized in pairs and nests (Fig 7D₁) and the radial looser collagen region corresponded to the zone of hypertrophy with columnar arrangement of large chondrocytes (Fig 7E₁). The transition between the tangential orientation of the collagen fibers in the proliferative zone and their radial orientation in the hypertrophic zone was very sudden, drawing a clear marked border between these two zones (Fig 8).

In some articular sites where the growth cartilage was very thick (trochlear ridges of femur, femoral condyles, ridges of the 3rd metacarpus/ metatarsus), there was an additional large zone between the resting and proliferative zones. In contrast to these two latter zones, where collagen fibers were mainly oriented parallel to the

articular surface, and most of the birefringence was orange, in this large intermediate zone, the arrangement of fibers appeared more random (isotropic), less birefringent and heterogeneous (Fig 7C₂) with chondrocytes beginning to proliferate (Fig 7C₁).

c. Comparison of ECM changes and Picrosirius red sections

Occasionally, the ECM changes observed in Safranin O Fast green stained sections (Fig 9A) were also visible with picrosirius red staining (Fig 9B); the collagen network appeared to be also modified at some of these sites, with a higher birefringence (more orange). The collagen fibers appeared thicker or were packed more densely, perhaps due to the absence of chondrocytes.

2.5.3.2 Vascularity of the growth cartilage

The developing AC region (superficial region in six months fetuses, and the four superficial zones in older fetuses) was always avascular from early in development. Underneath, the growth cartilage was well vascularized, and the collagen network around cartilage canals appeared different, being more birefringent with a better alignment of the fibres, mainly in young fetuses (Fig 10A). The birefringent collagen fiber orientation followed the course of cartilage canals (Fig 10B); for example, when a cartilage canal went through the ossification front, the orientation of the very birefringent collagen fibers adjacent to the canal changed and followed the canal. Moreover, the very typical organization of the collagen fibers (linear and very birefringent) within the ossification front indentations indicated the course of a cartilage canal entering the subchondral bone (Fig 10C). Besides, when a cartilage canal was present in an indentation of the ossification front, collagen fibers orientation adjacent to it was characteristic of the hypertrophic zone, loose, with a radial columnar arrangement (Fig 10D).

In some sections, the vascularization was very abundant, occupying as much as half of the cartilage tissue, with some very large cartilage canals; and sometimes the ossification front could be crossed by many large canals (Fig 10F). As in Safranin O sections, chondrifying cartilage canals could also be identified in picrosirius red sections imaged using PLM. These zones were recognizable because of the

orthogonal collagen fibers arrangement as a rounded nest filled with many little lacunae for the chondrocytes (Fig 10E).

2.5.3.3 Study of horses with mature cartilage for comparative purpose

By 10 months of age, the structure of the AC was identical to that of adult horses (two years old and older) with a trilaminar appearance (Fig 11A). The articular surface was identified as a bright line (*Lamina splendens*). Underneath, in the superficial tangential zone (zone I), the birefringence was intense and the collagen fibers were arranged mostly parallel to the surface. The intermediate, transitional zone (zone II) appeared dark, suggesting an isotropic arrangement of the collagen fibrils in this zone. The deep zone (zone III) was the largest zone. The collagen sheets appeared to be formed mostly by collagen fibrils oriented perpendicularly to the articular surface; this zone was also intensely birefringent in each sample. The last zone (zone IV), the calcified zone, was the last zone to form and could be identified only late in the foal development.

In the animal with OC lesions, PLM revealed a total disorganization and a loss of integrity of the AC in the lesion region. The three histological zones had disappeared and were replaced with fibrous tissue (Fig 11B).

2.6 Discussion

The description of the earliest documented histological lesions of equine OC included a well-demarcated microscopic area of chondronecrosis characterized by shrunken, degenerative and necrotic chondrocytes or an absence of cells. This was surrounded by a matrix with reduced staining (loss of matrix proteoglycan), confined to the epiphyseal growth cartilage, usually in the proliferative or hypertrophic zones; these areas were often, but not always, associated with necrotic cartilage canals (Rejnö and Strömberg 1978; Hill *et al.* 1985; Carlson *et al.* 1991; Carlson *et al.* 1995; Henson *et al.* 1997a; Shingleton *et al.* 1997; Olstad *et al.* 2007). In the present study, in all the fetuses and foals up to one week and in the majority of joints, areas of paleness of the matrix with hypocellularity and the presence of necrotic chondrocytes (up to 10) were observed, mainly near cartilage canals. These areas were found in all

regions of the growth cartilage, but principally in the resting and proliferating zones. It is interesting to note that these changes were more common in the youngest fetuses (38% of the 6-9 months fetuses had grade 2 ECM changes, but only 6% of the newborn foals had these changes) and in the stifle joint sites. Recently, Olstad *et al.* described histological lesions of early OC in 12 and 18 day old foals, located in the proliferative zone of the growth cartilage, and expanded the previous descriptions as they quantified the necrotic chondrocytes (range 250 – 10000) observed in the lesions and their association with necrotic cartilage canals (range 4-12). These latest observations seem to indicate that the ECM changes we observed on Safranin O staining may not be precursors of OC because of the low numbers of necrotic chondrocytes observed. Because of certain similarities between these matrix changes, it could be also be argued that some, as yet unidentified event, could eventually link some of these matrix changes to early OC lesions by exacerbating what may be normal physiological events.

The earliest events leading to distinct histological OC lesions remain to be elucidated and vascular abnormalities implicating the nutrient cartilage canals have been speculated as one of these events (Kincaid *et al.* 1985; Woodard *et al.* 1987; Carlson *et al.* 1991; Carlson *et al.* 1995; Ytrehus *et al.* 2004; Olstad *et al.* 2007). Despite their proposed role as initiators of OC lesions, few studies have determined their natural evolution in utero and postpartum in the epiphysis (Firth and Poulos 1982; Carlson *et al.* 1995; Shingleton *et al.* 1997; Olstad *et al.* 2007). Shingleton reported that cartilage canals were present in the epiphysis of equine fetuses at 130 days gestation. At full term (340 days), the AECC was highly vascularized, and cartilage canals were absent from AECC of foals aged > 6 months. In the present study, we observed that the vascularity was greatest in the youngest fetuses and that its regression was slowest in the stifle joint sites. At birth, these latter sites are still highly vascularized compared to the others joints, indicating that the femoral epiphyseal maturation is late and differs from other sites. Furthermore, other investigators have reported that articular cartilage from the distal aspect of the femur is more metabolically active in yearling horses compared with activity in other joints (Bertone *et al.* 2005) which ties in with our hypothesis of late maturation at this site.

We also observed greater cartilage canal areas in the deeper zones of the growth cartilage near the ossification front, which could render these sites more weak and susceptible to trauma.

Although the appearance of the Safranin O- stained ECM changes in our study bear similarities to previous descriptions of the earliest OC lesions in the literature, their very high prevalence in the samples, combined with their regression with maturity, suggests that they are probably associated with a physiological process of cartilage development. This observation is in agreement with others (Ekman *et al.* 1990; Olstad *et al.* 2007) who described similar changes (low number of necrotic chondrocytes around normal canals) in their samples, in favour of a feature of normal cartilage turnover.

Indented ossification fronts were present in almost all subjects, in 41% of the sections, and, unlike the other parameters, were not correlated with age. They were more common in the shoulder and stifle joint sites. These indented ossification fronts have previously been described in a histological classification of OC lesions, scored on a scale of 0 to 4 (van Weeren and Barneveld 1999): grade 1 was defined as “locally thicker cartilage (indentation of the ossification front), no further abnormalities”; this grade was not classified as OC, but it was stated that it could have a “relation with the susceptibility to develop OC”. In the present study, like others (Shingleton *et al.* 1997), a cartilage canal was present in the majority of the ossification front indentations (92%). Consequently, indentation seems to correspond to the site of penetration of cartilage canals from the cartilage matrix into the ossification nucleus; however, we also observed cartilage canals entering the ossification front without evidence of indentation of the cartilage. The very high prevalence of indented ossification fronts associated with the presence of many cartilage canals suggests that this could be a physiological process of cartilage canal inclusion in the secondary ossification center during epiphyseal development. Nonetheless, these areas may be biomechanically weaker at specific periods of development and susceptible to internal and external trauma predisposing to OC, as suggested by others (Lewis 1986). Shingleton postulated that cartilage canals retained behind the ossification front, visible up to age 10 weeks even in horses without OC

lesions, may contribute to the retention of cartilage, which provides an ideal site for initiation of an early OC lesion (Shingleton *et al.* 1997). However, these authors pointed out that the cartilage canals were surrounded by small chondrocytes, even when located in the hypertrophic zone, which blocked the normal pathway of endochondral ossification. To the contrary, in the present study, cartilage canals entering the ossification front were occasionally surrounded by hypertrophic chondrocytes, indicating that they do not always block the normal process of hypertrophy of the growth cartilage when they cross the front. In the indentations of the ossification front where cartilage canals were not observed (8%) on Safranin O staining, perhaps the histological cut may have missed the canal because on the corresponding Picrosirius red sections imaged using PLM, the orientation of the collagen fibers revealed presence of a nearby cartilage canal adding further evidence that the indentations are probably a normal process of incorporation of the canals into the ossification center.

Although certain histological features of the equine fetal epiphyseal matrix have been studied to date (Rejnö and Strömberg 1978; Henson *et al.* 1997a; Olstad *et al.* 2007) and the biochemical characteristics of the collagen network of postpartum equine articular cartilage and its relationship to development have been reported (Brama *et al.* 2000), no investigations have, to our knowledge, described the collagen matrix ultrastructure of equine epiphyseal growth and articular cartilages. However, the orientation of the collagen fibrils is a key determinant of their functionality (Bi *et al.* 2005). Our observations indicate that the collagen scaffold matures in utero and our description of the different zones is very comparable to those in the mouse (Hughes *et al.* 2005). In order to comprehend the polarized light images of picrosirius red stained sections, it is important to understand that several factors influence the birefringence (i.e. light intensity) and the color observed in the sections when viewed under PLM: well-ordered collagen fibrils with a true parallelism and alignment of the fibers are the most birefringent (Xia *et al.* 2003; Nissi *et al.* 2006); on the other hand, collagen fibrils with an isotropic arrangement cannot be identified by PLM, appearing dark. The relative collagen fibril diameter and packing density also play a role: the thinnest fibrils appear green or blue, larger fibrils are yellow and the largest are

orange or red (Junqueira et al. 1979; Xia et al. 2003). The observation of a progressive increase in birefringence of the EGC with age on PLM sections suggests either an increase in collagen content of the ECM or a better alignment of the fibers with maturity (Hughes 2005). This would appear to indicate changes in the biomechanical properties of cartilage with maturation, although this would need to be confirmed. The existence of in utero cyclic hydrostatic forces and stresses placed on the joint by muscular activity ensuring normal development of the fetal epiphysis, is suspected to occur, although this is not yet fully understood (Carter *et al.* 1987; Carter and Wong 1988; Heegaard *et al.* 1999; Sundaramurthy and Mao 2006) and is a likely mechanism promoting the structural reorganization that we observed.

Interestingly, and for the first time in the equine epiphysis, we observed that picosirius red staining and PLM, unlike Safranin O Fast green staining, allowed the identification of a clear demarcation between the articular cartilage and the epiphyseal growth cartilage and also illustrated developmental changes in the cartilage. The demarcation of the AC occurs early in epiphyseal development (between 6 and 8 months of gestation) and it is subsequently remodelled during skeletal maturation. This developing AC has a complex zonal appearance, related to orientation of the collagen fibrils, with an additional isotropic zone, where collagen fiber reorganization occurs. Similarly, in certain zones of the EGC, a specific collagen organization was observed. It was overall more isotropic and heterogeneous with an interweaving meshwork of collagen fibrils, which is likely related to incomplete maturation of the collagen network. During the maturation process of the fetal epiphyses, it is likely that significant remodeling of the collagen network takes place. To our knowledge, the collagen structure of fetal epiphyses has never been studied. However, the collagen structure in immature epiphyses immediately after birth and in the first few months of life has been studied in various species (Kaab *et al.* 1998; Xia *et al.* 2003; Rieppo *et al.* 2004; Hughes *et al.* 2005; Grunder 2006; Nissi *et al.* 2006) but never in the horse. Scanning electron microscopy and PLM on unstained histologic sections (qualitative fashion) have been employed in the past to reveal the collagen structure of the mature AC (Maroudas and Bullough 1968; Weiss *et al.* 1968; Minns and Steven 1977; de Bont *et al.* 1986; Jeffery *et al.* 1991;

Arokoski *et al.* 1996; Nieminen *et al.* 2001; Xia *et al.* 2001; Alhadlaq *et al.* 2004; Hughes *et al.* 2005) and of the EGC post birth (Kaab *et al.* 1998; Xia *et al.* 2003; Rieppo *et al.* 2004; Nissi *et al.* 2006). Recently, it has also been shown that more advanced quantitative PLM methods requiring advanced computer-assisted calibrations (Arokoski *et al.* 1996; Kiraly *et al.* 1997; Xia *et al.* 2001; Bromage *et al.* 2003; Xia *et al.* 2003) and the high resolution microscopic magnetic resonance imaging (7 to 10 Tesla μ MRI) parameter, T_2 relaxation time (T_2 mapping) (Babyn *et al.* 1996; Nieminen *et al.* 2001; Xia *et al.* 2001; Xia *et al.* 2003; Alhadlaq *et al.* 2004; Grunder 2006; Nissi *et al.* 2006) are very sensitive to the three-dimensional arrangement of the collagen fibrils in cartilage and therefore also suited to detect collagen structure changes related to age. The investigators reported a similar zonal arrangement of the collagen fibers in immature epiphyses of various species to that we observed with our methods, confirming that it is a developmental feature similar to many species.

On picrosirius red stained sections, in most of the sections, we also observed a very specific organization of the collagen network near the ossification front. A dramatic change in the collagen fiber orientation occurred at the frontier between the proliferative and hypertrophic zones of the EGC, where the collagen network changed rapidly from a very densely packed structure oriented tangentially to a looser structure, composed of thinner fibers, oriented radially. This precipitous change in collagen structure could be translated into a transition of biomechanical strength at this site rendering it susceptible to trauma or stresses which could initiate early OC lesions. The collagen fibril organization near the cartilage canals in the EGC has a specific organization too (rectilinear trajectory) and this could also render these regions vulnerable when submitted to load because of possible different biomechanical properties from their surrounding matrix. The transition of collagen structure at these two key zones is of interest as previous hypotheses on the early events of OC have implicated both the proliferative and hypertrophic zones and the cartilage canals (Henson *et al.* 1997a; Olstad *et al.* 2007). The hypothesis of the existence of weak areas in cartilage as cause of OC has even been suggested by Bertone who mentioned that weakening of developing articular cartilage at

predisposed anatomic locations results in failure and separation causing the osteochondral fragment (Bertone *et al.* 2005).

Although the present investigation provided us with an opportunity to understand many histological characteristics of the developing equine fetal epiphysis, no specific change in the collagen matrix of fetuses compatible with an early OC lesion was identified. Further work would be required to examine material with very early histological lesions using Safranin O and examine the corresponding picrosirius red sections to attempt to identify collagen matrix changes associated with OC. A major obstacle is the difficulty obtaining this material. In a recent study, Olstad *et al.* did not identify any histological evidence of OC in 15 equine fetuses. However, they studied only one OC predilection site (distal tibia) (Olstad *et al.* 2007). This would indicate that either OC does not occur in the fetus or that sample size is too small or that the early events are molecular and the tools used were not able to identify them. Previous investigators have used immunohistochemistry (Henson *et al.* 1997a; Henson *et al.* 1997b; Hernandez-Vidal *et al.* 1998; Semevolos *et al.* 2001; Laverty *et al.* 2002) and molecular biology (Semevolos *et al.* 2001) to detect molecular events in the OC process. However, the problem remains that without an evident histological lesion, it will always remain difficult to link any observed early molecular changes to later OC lesions. Alternatively, a similar study could be performed in an OC susceptible population (van Weeren and Barneveld 1999) to increase the number of lesions for study.

In conclusion, the equine fetal epiphyseal cartilage, which is highly vascularized, undergoes major developmental changes in the last two thirds of the gestational period. These changes involve concurrently both the proteoglycan and collagen structure of the ECM and the vascularization of the ECG. The degree and timing of change varies with articular site. These developmental changes could set the scene for “windows of susceptibility” (Lewis 1986) and sites of susceptibility to OC. Further studies of molecular changes in the collagen framework in fetuses could provide clues as to whether it could contribute to the early events of OC. However,

to date, no one has identified a clearly defined histological OC lesion in an equine fetus.

2.7 Acknowledgements

We gratefully acknowledge Dr K.P. Pritzker and Maria Mendes (Pathology and Laboratory Medicine, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canada) who provided us with their picrosirius red staining protocol, Dr Iolo ap Gwynn and L.C. Hughes (Institute of Biological Sciences, University of Wales, UK) who kindly shared their PhD study with us and Esther Simard for her technical assistance.

2.8 References

- Al-Hizab, F., Clegg, P.D., Thompson, C.C. and Carter, S.D. (2002) Microscopic localization of active gelatinases in equine osteochondritis dissecans (OCD) cartilage. *Osteoarthr. Cartil. / OARS, Osteoarthritis Research Society* **10**, 653-661.
- Alhadlaq, H.A., Xia, Y., Moody, J.B. and Matyas, J.R. (2004) Detecting structural changes in early experimental osteoarthritis of tibial cartilage by microscopic magnetic resonance imaging and polarised light microscopy. *Annals of the rheumatic diseases* **63**, 709-717.
- Arokoski, J.P., Hyttinen, M.M., Lapvetelainen, T., Takacs, P., Kosztaczky, B., Modis, L., Kovanen, V. and Helminen, H. (1996) Decreased birefringence of the superficial zone collagen network in the canine knee (stifle) articular cartilage after long distance running training, detected by quantitative polarised light microscopy. *Annals of the rheumatic diseases* **55**, 253-264.
- Babyn, P.S., Kim, H.K., Lemaire, C., Gahunia, H.K., Cross, A., DeNanassy, J. and Pritzker, K.P. (1996) High-resolution magnetic resonance imaging of normal porcine cartilaginous epiphyseal maturation. *J Magn Reson Imaging* **6**, 172-179.
- Bank, R.A., Soudry, M., Maroudas, A., Mizrahi, J. and TeKoppele, J.M. (2000) The increased swelling and instantaneous deformation of osteoarthritic cartilage is highly correlated with collagen degradation. *Arthritis and rheumatism* **43**, 2202-2210.
- Banks, W.J. (1993) Chapter 10 : Osteogenesis. In: *Applied Veterinary Histology, 3th Ed*, Ed: R.W. Reinhardt, Mosby-Year Book, Saint Louis, USA. pp 127-141.
- Basser, P.J., Schneiderman, R., Bank, R.A., Wachtel, E. and Maroudas, A. (1998) Mechanical properties of the collagen network in human articular cartilage as measured by osmotic stress technique. *Archives of biochemistry and biophysics* **351**, 207-219.
- Bertone, A.L., Bramlage, L.R., McIlwraith, C.W. and Malesmud, C.L. (2005) Comparison of proteoglycan and collagen in articular cartilage of horses with naturally developing osteochondrosis and healing osteochondral fragments of experimentally induced fractures. *Am J Vet Res* **66**, 1881-1890.
- Bi, X., Li, G., Doty, S.B. and Camacho, N.P. (2005) A novel method for determination of collagen orientation in cartilage by Fourier Transform infrared imaging spectroscopy (FT-IRIS). *Osteoarthr. Cartil. / OARS, Osteoarthritis Research Society* **13**, 1050-1058.

- Billingham, R.C., Brama, P.A., van Weeren, P.R., Knowlton, M.S. and McIlwraith, C.W. (2004) Evaluation of serum concentrations of biomarkers of skeletal metabolism and results of radiography as indicators of severity of osteochondrosis in foals. *Am J Vet Res* **65**, 143-150.
- Brama, P.A., Tekoppele, J.M., Bank, R.A., Barneveld, A. and van Weeren, P.R. (2000) Functional adaptation of equine articular cartilage: the formation of regional biochemical characteristics up to age one year. *Equine Vet J* **32**, 217-221.
- Brama, P.A., van den Boom, R. and Van Weeren, P.R. (2002) Collagenase (MMP-1) activity in synovial fluid as a marker for joint pathology in the horse. In: *Scientific Proceedings, 41st congress of the British Equine Veterinary Association*. Ed: B.E.V. Association, Glasgow, UK. p 192.
- Bridges, C.H. and Harris, E.D. (1988) Experimentally induced cartilaginous fractures (osteochondritis dissecans) in foals fed low-copper diets. *J Am Vet Med Assoc* **193**, 215-221.
- Bromage, T.G., Goldman, H.M., McFarlin, S.C., Warshaw, J., Boyde, A. and Riggs, C.M. (2003) Circularly polarized light standards for investigations of collagen fiber orientation in bone. *Anat Rec B New Anat* **274**, 157-168.
- Carlson, C.S., Cullins, L.D. and Meuten, D.J. (1995) Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply. *Vet Pathol* **32**, 641-647.
- Carlson, C.S., Meuten, D.J. and Richardson, D.C. (1991) Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res* **9**, 317-329.
- Carlsten, J., Sandgren, B. and Dalin, G. (1993) Development of osteochondrosis in the talocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of Standardbred trotters: I. A radiological survey. *Equine Vet J Suppl* **16**, 42-47.
- Carter, D.R., Orr, T.E., Fyhrie, D.P. and Schurman, D.J. (1987) Influences of mechanical stress on prenatal and postnatal skeletal development. *Clinical orthopaedics and related research*, 237-250.
- Carter, D.R. and Wong, M. (1988) The role of mechanical loading histories in the development of diarthrodial joints. *J Orthop Res* **6**, 804-816.
- Conn, H.J. and Lillie, R.D. (1977). In: *Biological Stains, 9th ed.*, Waverly Press, Baltimore, Md, USA. p 387.
- de Bont, L.G., Liem, R.S., Havinga, P., Boering, G. and van der Korst, J. (1986) Collagenous network in cartilage of human femoral condyles. A light

- microscopic and scanning electron microscopic study. *Acta anatomica* **126**, 41-47.
- Dik, K.J., Enzerink, E. and van Weeren, P.R. (1999) Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine Vet J Suppl*, 9-15.
- Douglas, J. (2003) Chapter 56 : Pathogenesis of Osteochondrosis. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*, Eds: M.W. Ross and S.J. Dyson, Saunders, Philadelphia. pp 534-543.
- Douglas, R.H. and Ginther, O.J. (1975) Development of the equine fetus and placenta. *Journal of reproduction and fertility*, 503-505.
- Ekman, S., Rodriguez-Martinez, H. and Ploen, L. (1990) Morphology of normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage. A study in the domestic pig and minipig of wild hog ancestry. *Acta anatomica* **139**, 239-253.
- Firth, E.C. and Poulos, P.W. (1982) Blood vessels in the developing growth plate of the equine distal radius and metacarpus. *Res Vet Sci* **33**, 159-166.
- Gee, E., Davies, M., Firth, E., Jeffcott, L., Fennessy, P. and Mogg, T. (2007) Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of copper supplemented and non-supplemented dams. *Vet J* **173**, 109-117.
- Glaser, K.E., Davies, M.E. and Jeffcott, L.B. (2003) Differential distribution of cathepsins B and L in articular cartilage during skeletal development in the horse. *Equine Vet J* **35**, 42-47.
- Grunder, W. (2006) MRI assessment of cartilage ultrastructure. *NMR in biomedicine* **19**, 855-876.
- Heegaard, J.H., Beaupre, G.S. and Carter, D.R. (1999) Mechanically modulated cartilage growth may regulate joint surface morphogenesis. *J Orthop Res* **17**, 509-517.
- Henson, F.M., Davies, M.E. and Jeffcott, L.B. (1997a) Equine dyschondroplasia (osteochondrosis)--histological findings and type VI collagen localization. *Vet J* **154**, 53-62.
- Henson, F.M., Schofield, P.N. and Jeffcott, L.B. (1997b) Expression of transforming growth factor-beta 1 in normal and dyschondroplastic articular growth cartilage of the young horse. *Equine Vet J* **29**, 434-439.
- Henson, F.M.D. (1996) *Cellular and molecular studies on normal and dyschondroplastic growth cartilage of the horse*. PhD dissertation, University of Cambridge, Cambridge, UK.

- Hernandez-Vidal, G., Jeffcott, L.B. and Davies, M.E. (1997) Cellular heterogeneity in cathepsin D distribution in equine articular cartilage. *Equine Vet J* **29**, 267-273.
- Hernandez-Vidal, G., Jeffcott, L.B. and Davies, M.E. (1998) Immunolocalization of cathepsin B in equine dyschondroplastic articular cartilage. *Vet J* **156**, 193-201.
- Hill, M.A., Ruth, G.R., Hilley, H.D., Torrison, J.L., Bagent, J.K. and Leman, A.D. (1985) Dyschondroplasias of growth cartilages (osteochondrosis) in crossbred commercial pigs at one and 15 days of age: radiological, angiomicrographical and histological findings. *Vet Rec* **116**, 40-47.
- Hughes, L.C. (2005) *The structure and development of mouse articular cartilage: a microscopy study*, PhD thesis, University of Wales Aberystwyth, Wales, UK.
- Hughes, L.C., Archer, C.W. and ap Gwynn, I. (2005) The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *European cells & materials* **9**, 68-84.
- Hurtig, M., Green, S.L., Dobson, H., Mikuni-Takagaki, Y. and Choi, J. (1993) Correlative study of defective cartilage and bone growth in foals fed a low-copper diet. *Equine Vet J Suppl* **16**, 66-73.
- Jeffcott, L.B. (1991) Osteochondrosis in the horse--searching for the key to pathogenesis. *Equine Vet J* **23**, 331-338.
- Jeffery, A.K., Blunn, G.W., Archer, C.W. and Bentley, G. (1991) Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery* **73**, 795-801.
- Junqueira, L.C., Bignolas, G. and Brentani, R.R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447-455.
- Kaab, M.J., Gwynn, I.A. and Notzli, H.P. (1998) Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *Journal of anatomy* **193** (Pt 1), 23-34.
- Kincaid, S.A., Allhands, R.V. and Pijanowski, G.J. (1985) Chondrolysis associated with cartilage canals of the epiphyseal cartilage of the distal humerus of growing pigs. *Am J Vet Res* **46**, 726-732.
- Kiraly, K., Hyttinen, M.M., Lapvetelainen, T., Elo, M., Kiviranta, I., Dobai, J., Modis, L., Helminen, H.J. and Arokoski, J.P. (1997) Specimen preparation

and quantification of collagen birefringence in unstained sections of articular cartilage using image analysis and polarizing light microscopy. *Histochem. J.* **29**, 317-327.

- Lavery, S., Ionescu, M., Marcoux, M., Boure, L., Doize, B. and Poole, A.R. (2000) Alterations in cartilage type-II procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **18**, 399-405.
- Lavery, S., Okouneff, S., Ionescu, M., Reiner, A., Pidoux, I., Webber, C., Rossier, Y., Billinghamurst, R.C. and Poole, A.R. (2002) Excessive degradation of type II collagen in articular cartilage in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **20**, 1282-1289.
- Lewis, R. (1986) Incidence of developmental orthopedic lesions. In: *AQHA Developmental Orthopedic Disease Symposium*, Ed: C.W. McIlwraith, American Quarter Horse Association, Amarillo. pp 10-12.
- Lillie, R.D. and Fulmer, H.M. (1976). In: *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, 4th ed.*, Ed: McGraw-Hill, New York, USA. p 657.
- Maroudas, A. and Bullough, P. (1968) Permeability of articular cartilage. *Nature* **219**, 1260-1261.
- Melrose, J., Smith, S. and Ghosh, P. (2004) Histological and Immunohistological Studies on Cartilage. In: *Cartilage and Osteoarthritis. Volume 2, Structure and In vivo Analysis.*, Eds: F. De Ceuninck, M. Sabatini and P. Pastoureau, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA. pp 39-63.
- Minns, R.J. and Steven, F.S. (1977) The collagen fibril organization in human articular cartilage. *Journal of anatomy* **123**, 437-457.
- Nieminen, M.T., Rieppo, J., Toyras, J., Hakumaki, J.M., Silvennoinen, J., Hyttinen, M.M., Helminen, H.J. and Jurvelin, J.S. (2001) T2 relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: a comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study. *Magn Reson Med* **46**, 487-493.
- Nissi, M.J., Rieppo, J., Toyras, J., Laasanen, M.S., Kiviranta, I., Jurvelin, J.S. and Nieminen, M.T. (2006) T(2) relaxation time mapping reveals age- and species-related diversity of collagen network architecture in articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 1265-1271.
- Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C.S. and Dolvik, N.I. (2007) Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. *J Orthop Res.*
- Pearce, S.G., Firth, E.C., Grace, N.D. and Fennessy, P.F. (1998) Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed New Zealand Thoroughbreds. *Equine Vet J* **30**, 211-218.

- Puchtler, H. and Sweat, F. (1964) Histochemical Specificity of Staining Methods for Connective Tissue Fibers: Resorcin-Fuchsin and Van Gieson's Picro-Fuchsin. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **79**, 24-34.
- Rejnö, S. and Strömberg, B. (1978) Osteochondrosis in the horse. II. Pathology. *Acta Radiol Suppl* **358**, 153-178.
- Rieppo, J., Hyttinen, M.M., Halmesmäki, E., Ruotsalainen, H., Vasara, A., Kiviranta, I. and *al., e.* (2004) Remodelation of collagen network architecture during cartilage maturation. *Trans Orthop Res Soc* **29**, 549.
- Rivas, R. and Shapiro, F. (2002) Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit. *J Bone Joint Surg Am* **84-A**, 85-100.
- Semevolos, S.A., Nixon, A.J. and Brower-Toland, B.D. (2001) Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II, and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis. *Am J Vet Res* **62**, 1088-1094.
- Shingleton, W.D., Mackie, E.J., Cawston, T.E. and Jeffcott, L.B. (1997) Cartilage canals in equine articular/epiphyseal growth cartilage and a possible association with dyschondroplasia. *Equine Vet J* **29**, 360-364.
- Sundaramurthy, S. and Mao, J.J. (2006) Modulation of endochondral development of the distal femoral condyle by mechanical loading. *J Orthop Res* **24**, 229-241.
- Trelstad, R. and Silver, F.H. (1981) Matrix assembly. In: *Cell biology of extracellular matrix*, Ed: E.D. Hay, Plenum Press, New York. pp 179-215.
- Van de Lest, C.H., Brama, P.A., van El, B., DeGroot, J. and van Weeren, P.R. (2004) Extracellular matrix changes in early osteochondrotic defects in foals: a key role for collagen? *Biochim Biophys Acta* **1690**, 54-62.
- Van Weeren, P.R. (2006a) Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). *Clin Tech Equine Pract* **5**, 248-258.
- Van Weeren, P.R. (2006b) Osteochondrosis. In: *Equine Surgery (ed 3)*, Eds: J.A. Auer and J.A. Stick, Saunders Elsevier, St. Louis, MO. pp 1166-1178.
- van Weeren, P.R. and Barneveld, A. (1999) The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal. *Equine Vet J Suppl*, 16-25.

- Wardale, R.J. and Duance, V.C. (1994) Characterisation of articular and growth plate cartilage collagens in porcine osteochondrosis. *Journal of cell science* **107** (Pt 1), 47-59.
- Weiss, C., Rosenberg, L. and Helfet, A.J. (1968) An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **50**, 663-674.
- Woodard, J.C., Becker, H.N. and Poulos, P.W., Jr. (1987) Articular cartilage blood vessels in swine osteochondrosis. *Vet Pathol* **24**, 118-123.
- Xia, Y., Moody, J.B., Alhadlaq, H. and Hu, J. (2003) Imaging the physical and morphological properties of a multi-zone young articular cartilage at microscopic resolution. *J Magn Reson Imaging* **17**, 365-374.
- Xia, Y., Moody, J.B., Burton-Wurster, N. and Lust, G. (2001) Quantitative in situ correlation between microscopic MRI and polarized light microscopy studies of articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil. / OARS, Osteoarthritis Research Society* **9**, 393-406.
- Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C.S., Teige, J. and Reinholt, F.P. (2004) Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. *Bone* **35**, 1294-1306.

2.9 Figure legends

Figure 1

The 9 articular sites (shaded areas) sampled for analysis

Figure 2

Safranin O Fast green stained sections. [A] Distal metacarpal cartilage from an 11 month fetus illustrating fields where cartilage canals were counted (x40) (Scale bar=0.5 cm). [B] Distal tibial cartilage from an 8 month fetus. An ECM change grade 1 is observed (inside the dotted line); a cartilage canal is chondrifying (arrowhead) and some necrotic chondrocytes are visible (arrow) (Scale bars=100 μ m in B1 and 50 μ m in B2). [C] Glenoid cavity cartilage from a 1 day foal. (1) Cartilage canals (arrowheads) in the indentations of the ossification front (arrows). (2) Cartilage canals (white arrowheads) entering the ossification front (black arrowheads) without associated cartilage in bone. (Scale bars=1000 μ m)

Figure 3

Percentage of specimens with ECM changes on Safranin O. G: glenoid cavity of scapula, R: head of radius, MC: midsagittal ridge of the third metacarpal bone, MTF: medial trochlear ridge of femur, LTF: lateral trochlear ridge of femur, MFC: medial femoral condyle, LFC: lateral femoral condyle, T: cranial intermediate ridge of the distal tibia and MT: midsagittal ridge of the third metatarsal bone. Articular sites in bold are significantly more affected. On the X-axis, the significantly most affected articular sites are in bold.

Figure 4

Percentage of specimens with regular or indented ossification front on Safranin O, all ages taken together, for each articular site (see fig 3 for key).

Figure 5

[A] Mean \pm SD vascular density (number of cartilage canals per x40 microscope field) in each age group (pairwise p-values are indicated). [B] Mean \pm SD vascular density of the different articular sites in each age group (see fig 3 for key). [C] Mean \pm SD cartilage canal area in the 3 zones of the growth cartilage (superficial, intermediate and deep) for each age group in 2 joints (MC: distal metacarpus and LFC: lateral femoral condyle) (pairwise p-values are indicated).

Figure 6

Fetal cartilage stained with Safranin O Fast green and picosirius red. [A] Distal metacarpal cartilage from a 6 month fetus. (1) Safranin O Fast green stained section. The articular cartilage (AC) can not be differentiating from the epiphyseal growth cartilage (EGC). (2) Picosirius red stained section imaged using polarized light microscopy (PLM). A slight change in the direction of the birefringence in the ECM occurs close to the articular surface, allowing the differentiation between the developing AC and the EGC. Cartilage canals are visible (arrowheads). [B] Lateral femoral condyle cartilage from an 8 month fetus. In the picosirius red stained section imaged using PLM (2), the developing AC, which is already avascular, was clearly distinguishable from the vascularized EGC (arrowheads: cartilage canals), in contrast to the Safranin O Fast green section which provides limited detail (1). (Scale bars= 500 μ m)

Figure 7

Collagen network organization in the articular-epiphyseal cartilage complex of the distal tibia from a 9 month fetus. In the section of the epiphysis stained with picosirius red and observed with the naked eye (left picture), the different histological zones of the cartilage corresponding to the pictures A to E are shown by dotted lines. The secondary center of ossification is visible in the middle of the section (arrow). Many cartilage canals are present in the growth cartilage (arrowhead). [A-E] Sections are observed by light microscopy (1) or polarized light microscopy (2). [A] Articular region of the articular-epiphyseal cartilage complex.

The developing articular cartilage (AC) has 4 zones: a superficial tangential zone (I), an intermediate isotropic zone (II), a deep perpendicular zone (III) and a second deeper isotropic zone (IV). [B-E] Epiphyseal region of the articular-epiphyseal cartilage complex: [B] In the zone close to the developing AC, the collagen network appears dense, well-ordered, very birefringent and parallel to the articular surface. It corresponds to the resting zone with small dispersed chondrocytes. [C] In the larger underlying zone, the collagen network appears more isotropic and heterogeneous. The chondrocytes begin to proliferate with some clusters visible. [D] Chondrocytes of this zone are clearly proliferating. Collagen network is mainly oriented parallel to the articular surface, but the birefringence is weaker than in the reserve zone. [E] In the deepest cartilage zone, close to the ossification front, the collagen network appears much looser, perpendicularly oriented with fibers interlacing. It corresponds to the zone of hypertrophy with column of large chondrocytes. (Scale bars = 0.5 cm in the left picture and 100 μm in A to E pictures)

Figure 8

Distal tibial cartilage section from an 11 month fetus stained with picosirius red and examined with polarized light microscopy. Presence of a very sudden transition (arrow) between the upper tangential orientation of the collagen fibers in the proliferative zone and their radial orientation in the lower hypertrophic zone (asterisks: cartilage canals). (Scale bar=300 μm)

Figure 9

Distal metacarpal cartilage from a 6 month fetus. [A] Grade 1 ECM change in a Safranin O Fast green stained section: focal paleness of matrix with hypocellularity (arrows) and necrotic chondrocytes (asterisk). There is a patent cartilage canal close to the area (arrowhead). [B] Polarized light microscope image of the same section stained with picosirius red: the area of paleness of the matrix with hypocellularity noted in figure A is marked with arrows; a change in the collagen pattern is visible. The same cartilage canal is visible (arrowhead). (Scale bars=50 μm)

Figure 10

Vascularity of different growth cartilages stained with picosirius red. [A] Polarized light microscope (PLM) images of the glenoid cavity cartilage from a 6 month fetus located around a cartilage canal (asterisk). Collagen fibrils network appears denser and much more birefringent close to the cartilage canal (2) compared to the looser and less birefringent collagen network further away (3) (scale bars=500 μm in A1, and 50 μm in A2,3). [B] PLM image of a glenoid cavity cartilage from a 6 month fetus. The orientation of the very birefringent collagen fibers (arrow) points out the course of a cartilage canal (asterisk) (scale bar=500 μm). [C] PLM image of a glenoid cavity cartilage from a 1 day foal. The organization of the birefringent collagen fibres imitates the course of a cartilage canal (asterisk) crossing the ossification front (arrow) (scale bar=500 μm). [D] Light microscopy (LM) (1) and PLM (2) images of a glenoid cavity cartilage from a 11 month fetus. Hypertrophic chondrocytes (arrows) adjacent to a cartilage canal going through the ossification front are observed (scale bars=300 μm). [E] LM (1) and PLM (2) images of a chondrifying cartilage canal (arrow) from the distal metacarpal cartilage of a 1 day foal (scale bars=100 μm). [F] Sections of a lateral trochlear ridge of femur from a 1 day foal stained with Picosirius red and observed with the naked eye (1) or imaged using PLM (2). A very large cartilage canal (arrows) goes through the ossification front (arrowhead). (Scale bars=0.5 cm in F1, 1000 μm in F2)

Figure 11

[A] Distal tibial articular cartilage from a 2 year old horse stained with Safranin O Fast green (SOFG) (1) or with picosirius red and imaged using polarized light microscopy (PLM) (2). There is a clear zonal difference in the collagen matrix. I, II, III, IV indicate the positions of the superficial, intermediate, deep and calcified zones respectively (scale bars=300 μm). [B] Medial femoral condyle section from a 10 month weanling stained with SOFG (1) or with picosirius red and imaged using PLM (2). An osteochondrosis lesion is visible on the articular cartilage. (Scale bars=1000 μm)

Figure 1

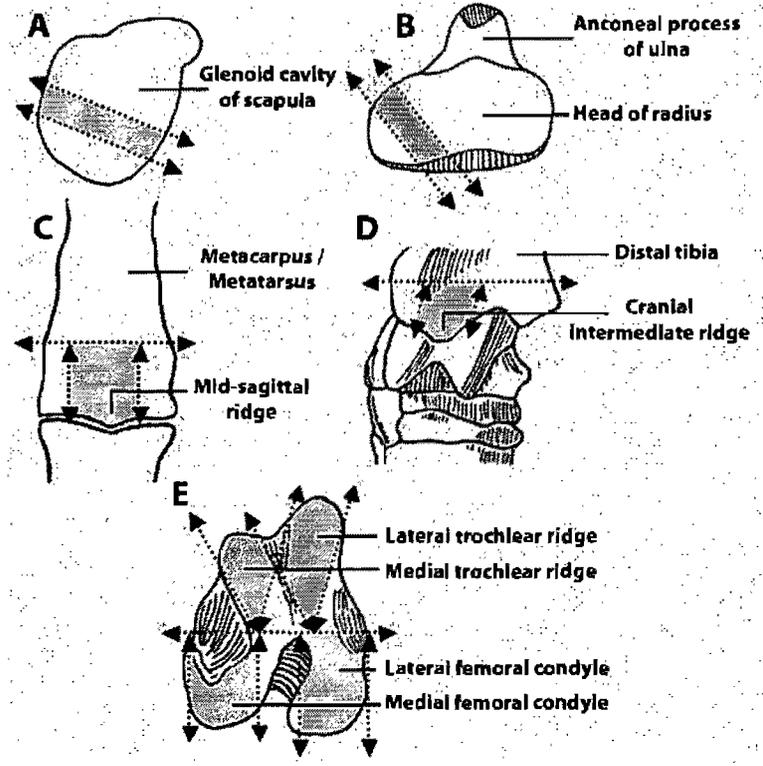


Figure 2

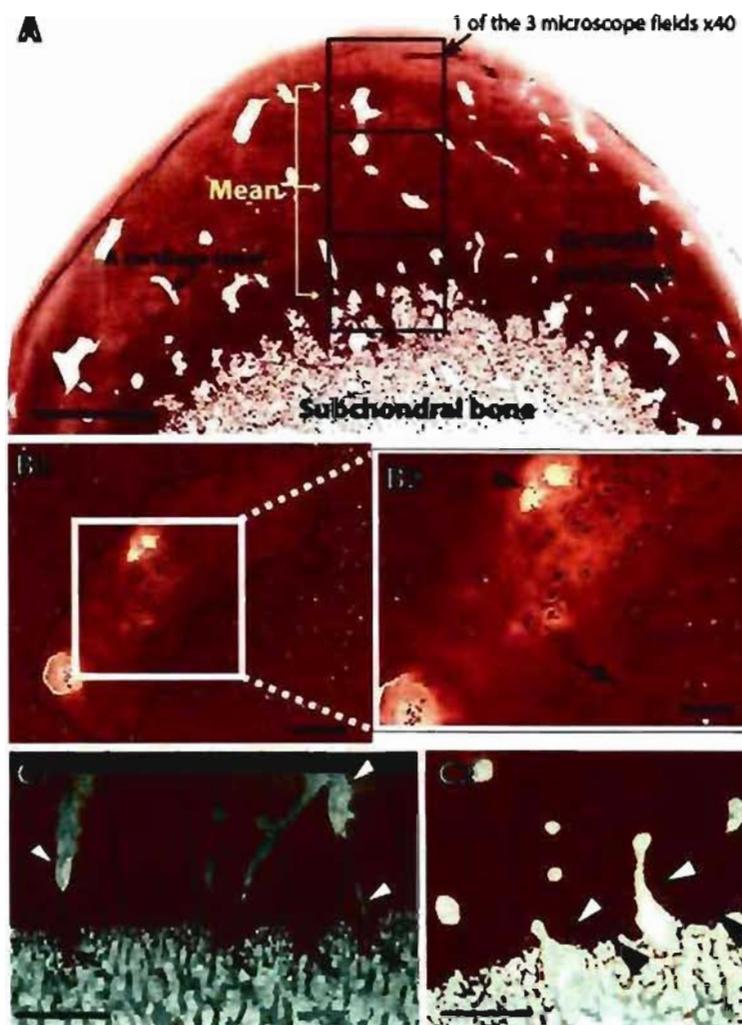


Figure 3

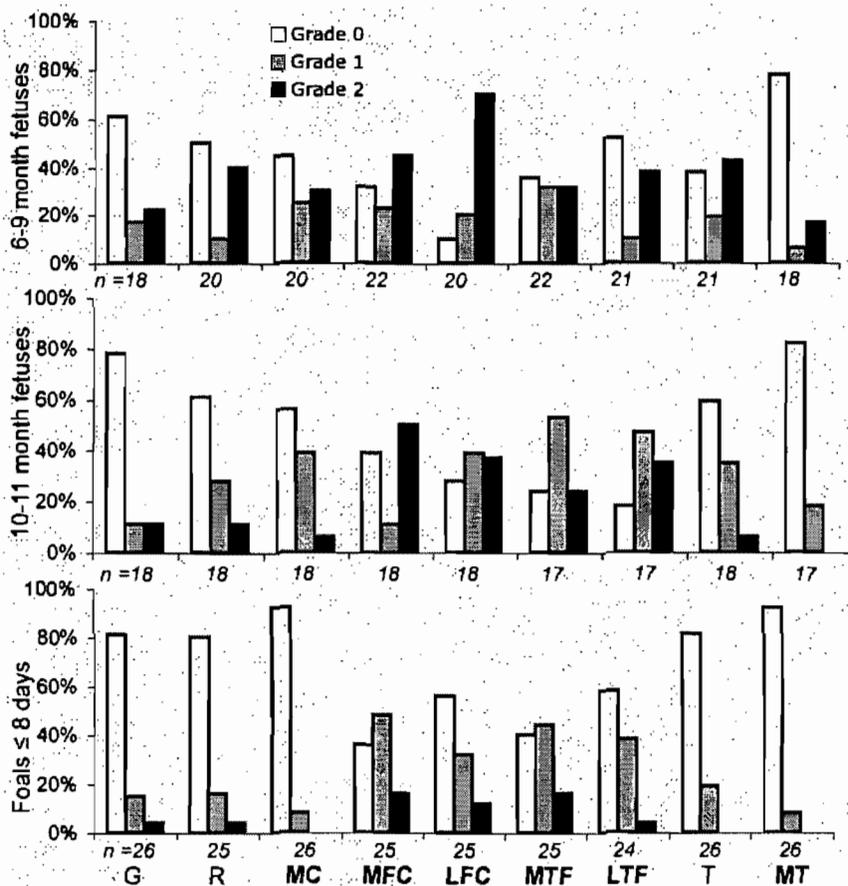


Figure 4

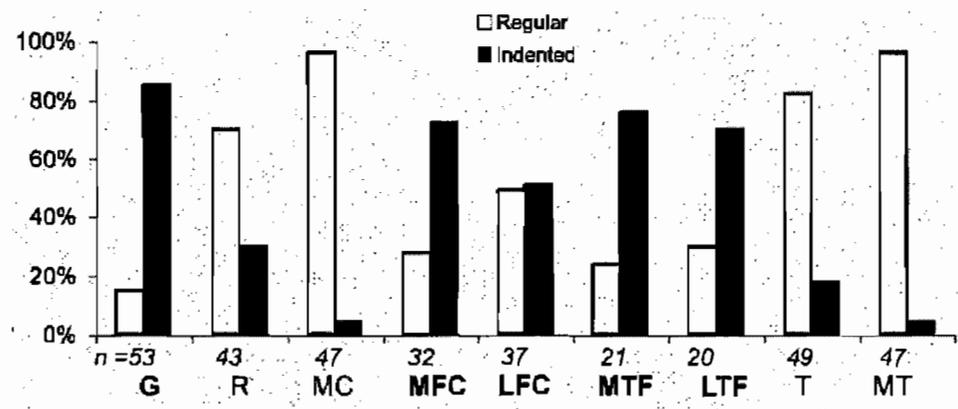
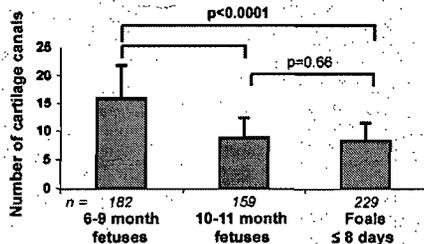
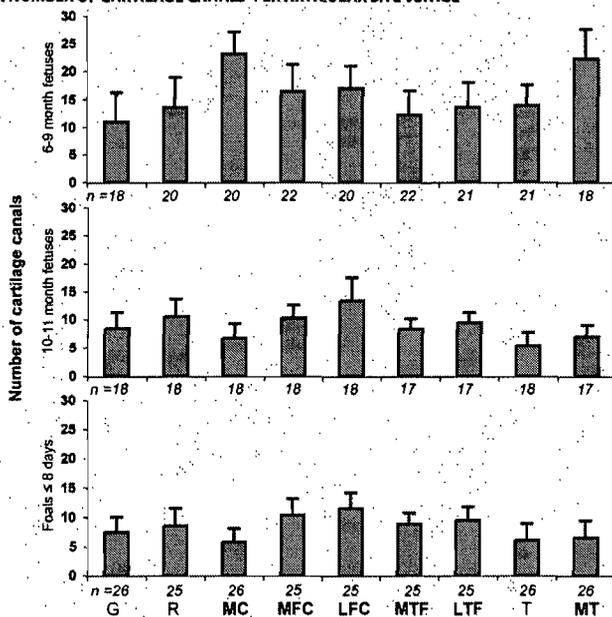


Figure 5

A. TOTAL NUMBER OF CARTILAGE CANALS PER AGE (ALL SITES INCLUDED)



B. NUMBER OF CARTILAGE CANALS PER ARTICULAR SITE VS. AGE



C. AREA OF CARTILAGE CANALS

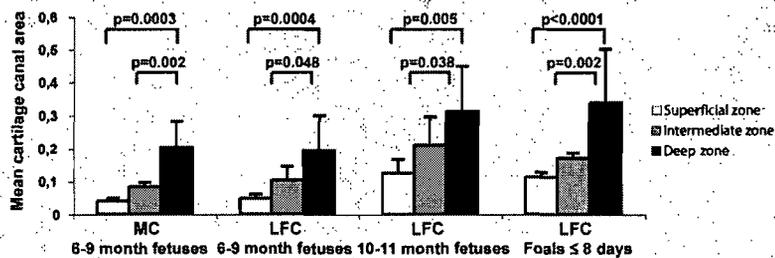
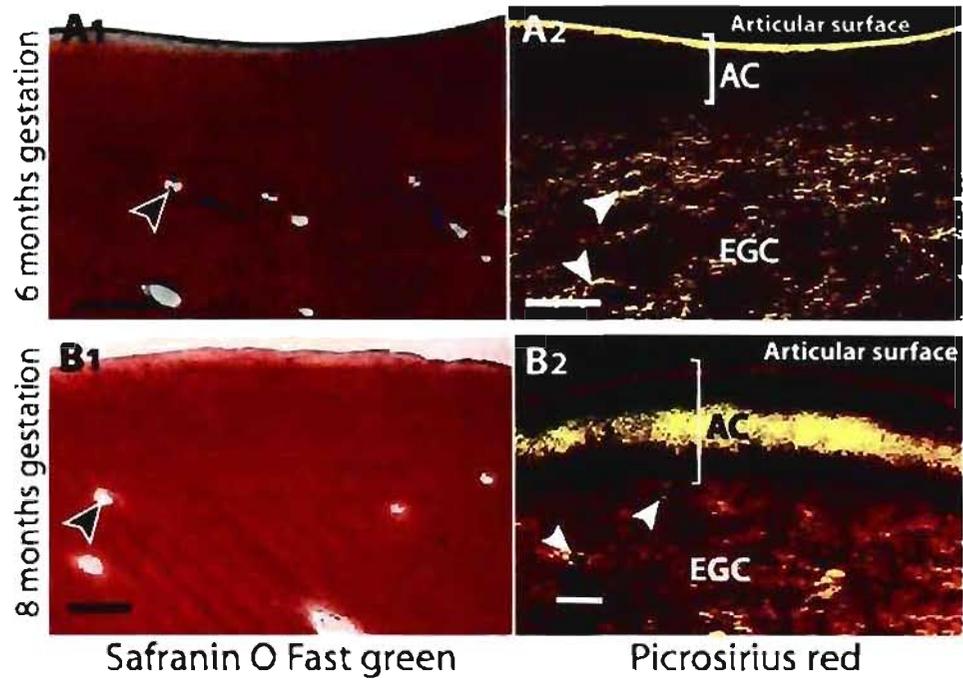


Figure 6



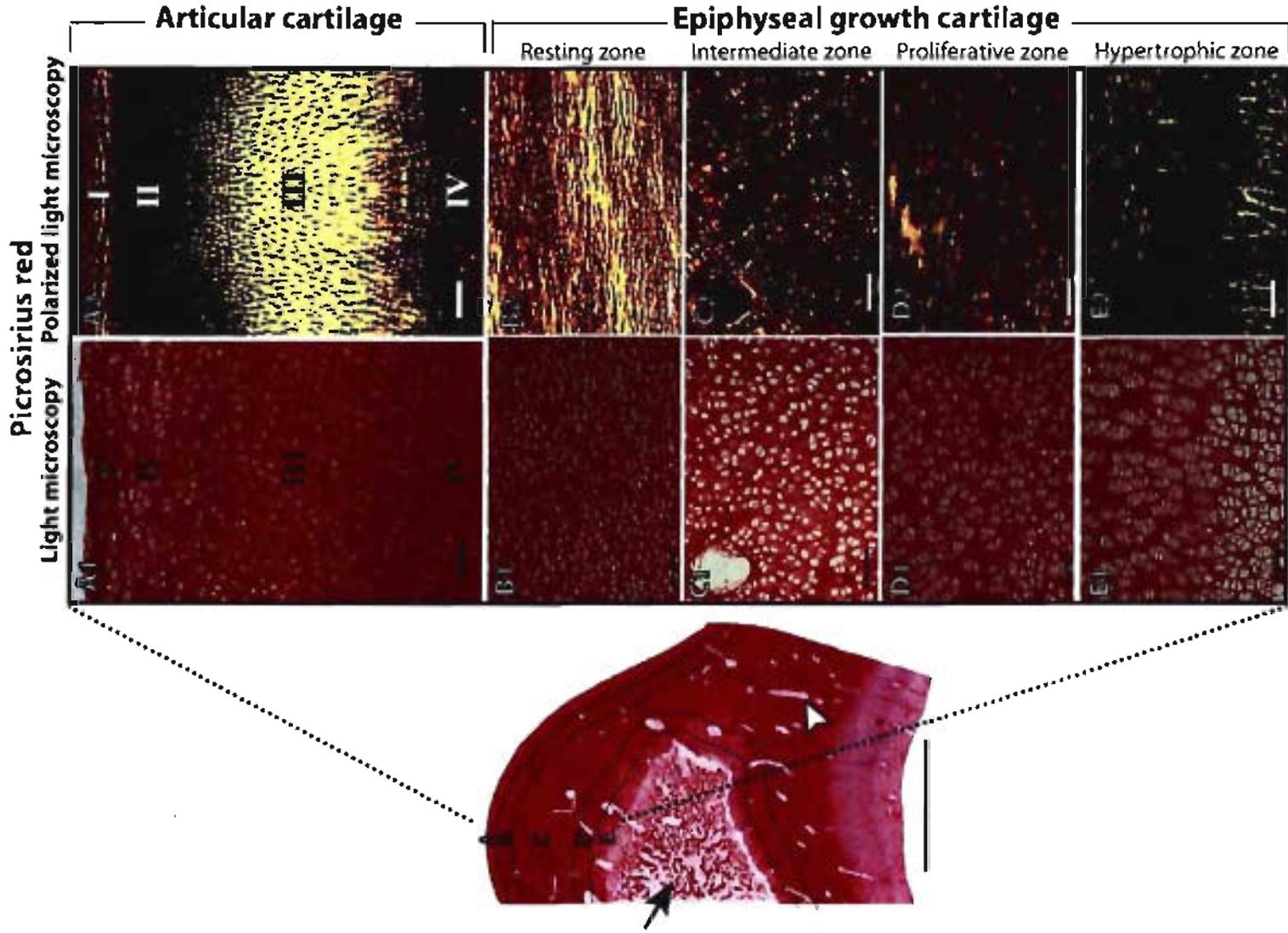


Figure 8

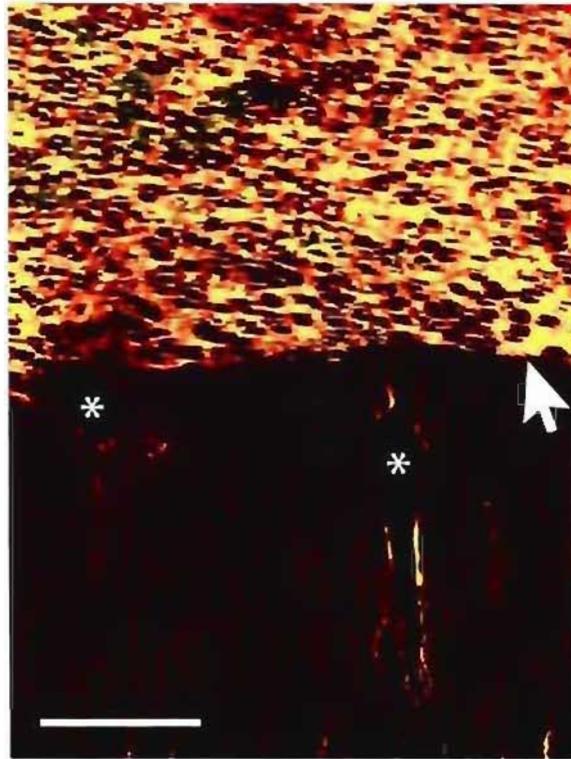


Figure 9

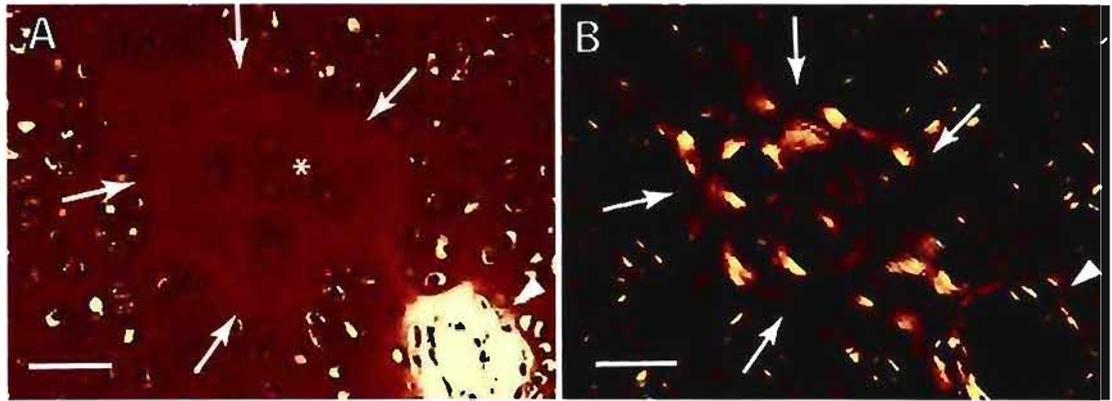


Figure 10

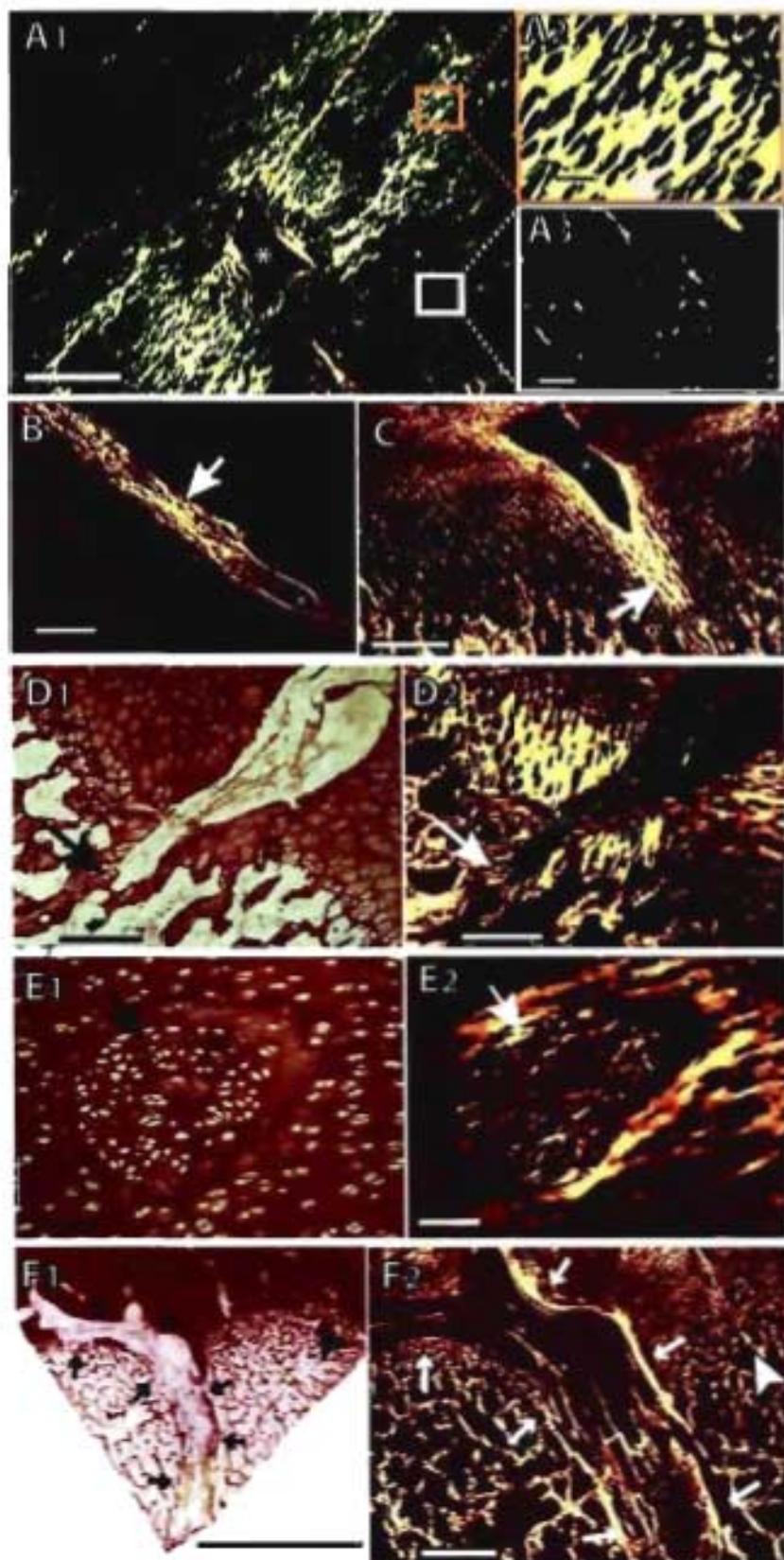
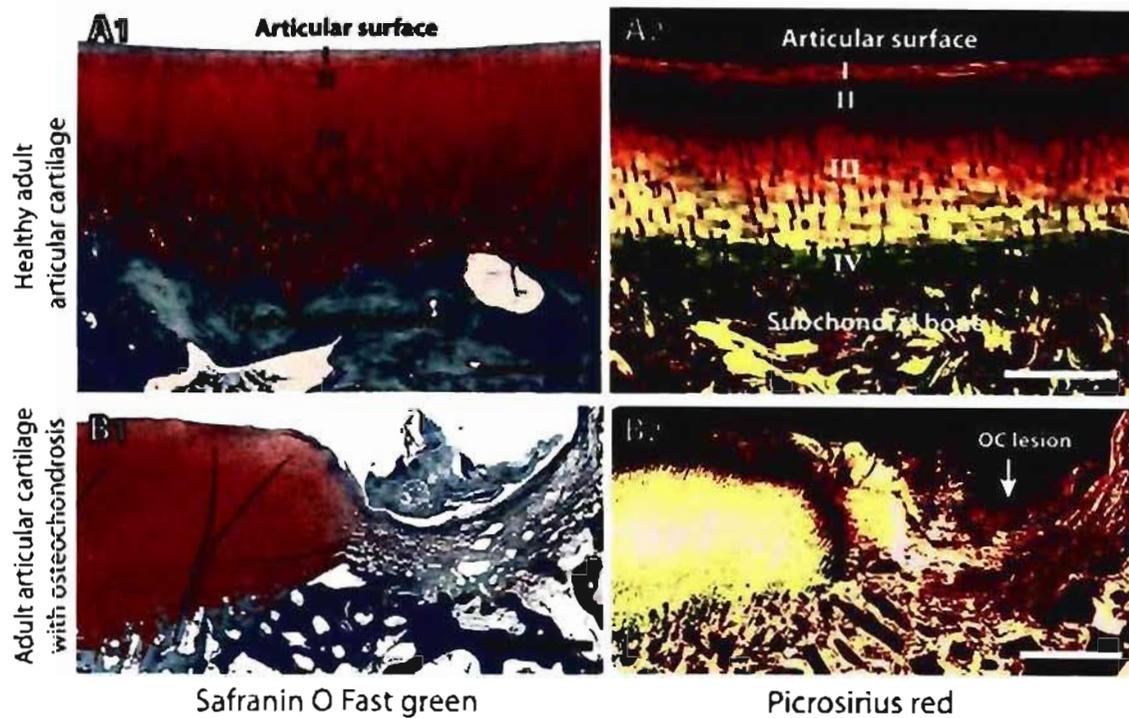


Figure 11



2.1 Tables

Table I

Percentage of ECM matrix changes of grade 0, 1 and 2 in each age group (n=number of sites studied for each age group)

Age	6-9 month fetuses	10-11 month fetuses	Foals \leq 8 days
ECM change	<i>n=182</i>	<i>n=158</i>	<i>n=228</i>
Grade 0	44%	49%	69%
Grade 1	18%	31%	25%
Grade 2	38%	20%	6%

Table II

Articular sites with a significant risk of having ECM changes (Odd Ratio; 95% confidence interval; pairwise p-value)

G: glenoid cavity of scapula, R: head of radius, MC: midsagittal ridge of the third metacarpal bone, MTF: medial trochlear ridge of femur, LTF: lateral trochlear ridge of femur, MFC: medial femoral condyle, LFC: lateral femoral condyle, T: cranial intermediate ridge of the distal tibia, and MT: midsagittal ridge of the third metatarsal bone

Articular sites	6-9 month fetuses		10-11 month fetuses		Foals ≤ 8 days	
	O.R. (95% C.I.)	p-value	O.R. (95% C.I.)	p-value	O.R. (95% C.I.)	p-value
LFC > R ⁽¹⁾					11.9 (2.0 – 72.9)	0.007
LFC > MC			4.0 (1.3 – 12.2)	0.02	11.9 (1.5 – 97.5)	0.02
LFC > MT					11.9 (1.5 – 97.4)	0.02
LFC > T					5.5 (1.2 – 26.1)	0.03
MTF < LFC	0.2 (0.05 – 0.6)	0.004				
G < LFC	0.2 (0.04 – 0.6)	0.007				
MFC > R					25.4 (2.0 – 215.3)	0.003
MFC > MT			9.1 (2.2 – 38.4)	0.003	25.4 (3.1 – 209.2)	0.003
MFC > LTF					4.5 (1.5 – 13.4)	0.007
MFC > T					11.8 (1.8 – 77.2)	0.01
MFC > MC					25.4 (2.0 – 316.1)	0.01
G < MFC			0.06 (0.006 – 0.5)	0.01	0.1 (0.03 – 0.8)	0.03 ₆
LTF > MT			15.0 (2.9 – 78.8)	0.001		
G < LTF			0.03 (0.004 – 0.3)	0.001		
LTF > R			7.7 (1.6 – 36.6)	0.01		
LTF > MC			9.0 (1.2 – 69.5)	0.04		
G < MTF			0.03 (0.002 – 0.4)	0.009	0.1 (0.03 – 0.4)	0.0004
MTF > T			4.4 (2.0 – 9.8)	0.0003	17.8 (3.1 – 104.3)	0.001
MTF > MC			10.9 (2.3 – 51.2)	0.002	38.5 (4.1 – 364.9)	0.001
MTF > MT			18.2 (3.3 – 100.5)	0.0009	38.5 (4.1 – 364.5)	0.002
MTF > R			9.3 (2.7 – 31.9)	0.0004	38.5 (3.9 – 378.9)	0.002
MTF > LTF					6.8 (1.0 – 44.3)	0.04

(1) Articular sites: LFC>R means that the odds of having a higher grade of ECM change are increased by a factor of 11.9 (CI: 2.0 – 72.9) in the lateral femoral condyle compared with the head of radius (p=0.007)

Table III

Articular sites with a significant risk of having an indented ossification front (Odd Ratio; 95% confidence interval; pairwise p-value)

<i>Articular sites</i>	<i>O.R. (95% C.I.)</i>	<i>p-value</i>
G > MC⁽¹⁾	101.6 (10.6 – 975.8)	< 0.0001
G > MT	106.1 (11.9 – 942.5)	< 0.0001
G > T	14.6 (3.5 – 60.8)	0.0002
G > R	14.7 (3.3 – 65.0)	0.0004
G > LFC	4.1 (1.2 – 14.3)	0.02
MFC > MC	66.2 (6.7 – 657.6)	0.0003
MFC > R	9.6 (2.4 – 38.3)	0.001
MFC > T	9.5 (2.2 – 40.9)	0.002
MFC > MT	69.1 (4.6 – 1031.6)	0.002
MTF > MC	76.5 (6.0 – 972.6)	0.0008
MTF > R	11.1 (2.0 – 60.5)	0.005
MTF > MT	79.9 (3.1 – 2029.6)	0.008
MTF > T	11.0 (1.5 – 78.9)	0.02
LTF > MC	36.7 (3.2 – 424.3)	0.004
LTF > MT	38.4 (3.3 – 442.7)	0.004
LTF > T	5.3 (1.2 – 23.4)	0.03
LFC > MT	25.6 (3.4 – 190.3)	0.002
LFC > MC	24.5 (2.7 – 222.7)	0.005

(1) *G > MC* means that the odds of having an indented ossification front are increased by a factor of 101.6 (CI: 10.6-975.8) in the glenoid cavity of scapula compared with the midsagittal ridge of the third metacarpal bone ($p < 0.0001$)

Table IV

Significant differences in vascular density between pairs of articular sites as a function of age. The table shows estimates of the mean difference (M.D.) between the vascular densities of two articular sites; pairwise p-value

<i>Articular sites</i>	<i>6-9 month fetuses</i>		<i>10-11 month fetuses</i>		<i>Foals ≤ 8 days</i>	
	<i>M.D.</i>	<i>p-value</i>	<i>M.D.</i>	<i>p-value</i>	<i>M.D.</i>	<i>p-value</i>
MC > G ⁽¹⁾	11.9	< 0.0001				
MC > T	9.2	< 0.0001				
MC > MTF	10.4	< 0.0001				
MC > LTF	10.2	< 0.0001				
MC > R	7.0	0.0002				
MC > MFC	5.9	0.001				
MC > LFC	5.0	0.007				
MT > G	11.5	< 0.0001				
MT > T	8.8	< 0.0001				
MT > MTF	10.0	< 0.0001				
MT > LTF	9.9	< 0.0001				
MT > R	6.7	0.0005				
MT > MFC	5.6	0.003				
MT > LFC	4.6	0.01				
LFC > G	6.9	0.0004	3.9	0.0003	4.2	< 0.0001
LFC > MTF	5.4	0.003	3.3	0.002	2.3	0.005
LFC > LTF	5.2	0.004	2.4	0.02	2.2	0.008
LFC > T	4.2	0.02	6.1	< 0.0001	5.8	< 0.0001
LFC > MC			4.6	< 0.0001	5.8	< 0.0001
LFC > MT			4.6	< 0.0001	4.8	< 0.0001
LFC > R					3.1	0.0002
MFC > G	6.0	0.001	2.7	0.01	2.6	0.002
MFC > MTF	4.5	0.01				
MFC > LTF	4.3	0.02				
MFC > T			4.8	< 0.0001	4.3	< 0.0001
MFC > MC			3.3	0.002	4.2	< 0.0001
MFC > MT			3.3	0.002	3.3	< 0.0001
R > G	4.9	0.01	3.0	0.004		
R > T			5.2	< 0.0001	2.7	0.001
R > MC			3.7	0.0006	2.7	0.001
R > MT			3.7	0.0006	1.7	0.03
R > MTF			2.3	0.03		
LTF > T			3.7	0.0006	3.7	< 0.0001
LTF > MC			2.2	0.04	3.6	< 0.0001
LTF > MT			2.2	0.04	2.7	0.001
LTF > G					2.0	0.02
MTF > T			2.8	0.007	3.5	< 0.0001
MTF > MC					3.4	< 0.0001
MTF > MT					2.5	0.002
MTF > G					1.8	0.02
G > T			2.2	0.04	1.7	0.04
G > MC					1.6	0.048

(1) MC > G means that the vascular density at the midsagittal ridge of the third metacarpal bone is larger than that in the glenoid cavity of scapula by 11.9 units on average ($p < 0.0001$)

Chapitre III : Discussion

Cette étude nous a permis d'étudier les changements histologiques liés au développement chez un nombre relativement important de fœtus et poulains nouveau-nés, dans un nombre important d'articulations, incluant les sites articulaires de prédilection de l'OCD équine. Le but était de rechercher des événements histologiques précoces pouvant expliquer l'existence de lésions d'OC chez des poulains aussi jeunes que 2 jours d'âge (Carlson *et al.* 1991) à partir des deux principales hypothèses histologiques de l'OC. La première hypothèse est que les lésions les plus précoces d'OC, des zones de chondronécrose, sont dues à des anomalies vasculaires (Kincaid *et al.* 1985; Woodard *et al.* 1987a; Carlson *et al.* 1991; Carlson *et al.* 1995; Ytrehus *et al.* 2004b; Olstad *et al.* 2007) bien que la cause de cette ischémie localisée reste à déterminer. La deuxième alternative est qu'une altération du collagène de type II, un des principaux composants de la MEC du cartilage, pourrait jouer un rôle dans les premiers stades de l'OC. Il a en effet été décrit une augmentation de la solubilité du collagène de type II dans le cartilage de poulains avec de l'OC (Bridges et Harris 1988), une diminution dans la teneur totale en collagène II dans les lésions précoces d'un modèle expérimental d'OC (Hurtig *et al.* 1993) ou dans les lésions naturelles (Wardale et Duance 1994; Van de Lest *et al.* 2004). Enfin, un turnover augmenté du collagène a également été identifié *in vitro* sur des explants de cartilage de lésions d'OCD (Laverty *et al.* 2002) ou *in vivo* sur du sérum de poulains affectés d'OCD (Billinghurst *et al.* 1997), ainsi qu'une activité accrue des enzymes de dégradation du collagène dans le cartilage et le liquide synovial de chevaux atteints d'OC (Hernandez-Vidal *et al.* 1997, 1998; Laverty *et al.* 2000; Al-Hizab *et al.* 2002; Brama *et al.* 2002; Glaser *et al.* 2003).

Dans la perspective de mettre en évidence de tels changements, 2 colorations histologiques différentes ont été utilisées. Safranine O Fast green colore les protéoglycanes et permet une bonne évaluation de la MEC mais également des chondrocytes ; le rouge picrosirius observé sous lumière polarisée met en évidence l'orientation des fibres de collagène dans la MEC, donnant une approche tridimensionnelle de l'architecture du réseau de collagène. Différents paramètres histologiques ont été évalués basés sur les connaissances actuelles de l'OC.

L'apparence de la MEC et sa cellularité ont été évaluées car différentes études rapportent des zones de chondronécrose dans l'OC (Rejnö et Strömberg 1978; Hill *et al.* 1985; Carlson *et al.* 1995; Shingleton *et al.* 1997; Olstad *et al.* 2007); l'apparence du front d'ossification a été évaluée car une perturbation de l'ossification endochondrale semble intervenir dans l'OC (Henson *et al.* 1997a; Shingleton *et al.* 1997; van Weeren et Barneveld 1999a). Pour finir, la densité vasculaire du cartilage de croissance a été mesurée comme un indice de développement du tissu en fonction de l'âge et du site articulaire. Une attention particulière a été portée sur l'apparence des canaux vasculaires du fait de l'association présumée entre des canaux anormaux et les lésions d'OC (Carlson *et al.* 1995; Shingleton *et al.* 1997; Olstad *et al.* 2007).

Dans la littérature, les lésions histologiques d'OC équine aux stades les plus précoces sont décrites comme des zones microscopiques et bien délimitées de chondronécrose, caractérisées par des chondrocytes dégénérés ou nécrotiques ou une absence de cellules, ainsi que par une pâleur de la matrice (perte de protéoglycanes matriciels); ces zones sont confinées dans le cartilage de croissance épiphysaire, en général dans les zones hypertrophiques ou prolifératives, et sont parfois associées avec des canaux vasculaires nécrotiques (Rejnö et Strömberg 1978; Hill *et al.* 1985; Carlson *et al.* 1991; Carlson *et al.* 1995; Henson *et al.* 1997a; Shingleton *et al.* 1997; Olstad *et al.* 2007). Dans la présente étude, nous avons observé chez tous les fœtus et poulains nouveau-nés, et dans la majorité des articulations, des zones de pâleur de la matrice associées à une hypocellularité et à la présence de chondrocytes nécrotiques (une dizaine en moyenne), principalement au voisinage de canaux vasculaires, qui eux n'étaient jamais nécrotiques. Ces zones étaient présentes dans toutes les régions du cartilage de croissance, mais principalement dans les zones de repos et de prolifération. Il est intéressant de noter que ces changements étaient plus fréquents chez les fœtus les plus jeunes (38% des fœtus entre 6 et 9 mois d'âge avaient des changements matriciels de grade 2, mais seulement 6% des poulains nouveau-nés avaient ces changements) et dans l'articulation du grasset. Récemment, Olstad *et al.* ont décrit des lésions histologiques précoces d'OC chez des poulains âgés de 12 et 18 jours, localisées dans la zone de prolifération du cartilage, et ont élargi les descriptions précédentes en quantifiant les chondrocytes nécrotiques (entre 250 et

10000) présents dans les lésions et leur association avec des canaux vasculaires nécrotiques (entre 4 et 12). Cette observation indique que les changements matriciels observés sur nos lames de Safranine O Fast green ne semblent pas être des lésions d'OC du fait du faible nombre de chondrocytes nécrotiques et de l'absence de canaux nécrotiques ou pourraient également être des stades encore plus précoces de ces lésions. Si plusieurs études ont impliqué les canaux vasculaires du cartilage dans la pathogénie de l'OC (Kincaid *et al.* 1985; Woodard *et al.* 1987a; Carlson *et al.* 1991; Carlson *et al.* 1995; Ytrehus *et al.* 2004c; Olstad *et al.* 2007), il reste surprenant que jusqu'à présent peu aient déterminé leur évolution naturelle *in utero* et postnatal au niveau de l'épiphyse du cheval (Firth et Poulos 1982; Carlson *et al.* 1995; Shingleton *et al.* 1997; Olstad *et al.* 2007). Shingleton précise que les canaux du cartilage sont présents dans l'épiphyse de fœtus équin à partir du 130^{ème} jour de gestation. Au terme de la gestation (340 jours), le cartilage de croissance épiphysaire est encore largement vascularisé, puis les canaux disparaissent vers l'âge de 6 mois en fonction des articulations. Dans notre étude, nous avons observé que la vascularisation était plus importante chez les fœtus les plus jeunes, et que sa régression était plus lente dans l'articulation du grasset. A la naissance, cette articulation est encore très largement vascularisée par rapport aux autres, soulignant que la maturation de l'épiphyse fémorale est tardive et diffère des autres sites. D'autre part, nous avons également pu voir que le diamètre des canaux du cartilage était supérieur dans les zones profondes du cartilage de croissance, à proximité du front d'ossification, ce qui peut rendre ces sites plus faibles et vulnérables lors de traumatismes.

Bien que l'apparence des changements matriciels de notre étude (Safranine O Fast green) soit très similaire aux lésions précoces d'OC décrites dans la littérature, leur très haute prévalence dans nos échantillons, combiné à leur régression importante lors du développement des fœtus, suggère qu'ils sont probablement associés à un processus physiologique de maturation du cartilage. Cette observation est en accord avec celles d'autres auteurs (Ekman *et al.* 1990b; Olstad *et al.* 2007) qui décrivent des changements similaires (faible nombre de chondrocytes nécrotiques autour de canaux normaux) dans leurs échantillons, comme des caractéristiques du turnover normal du cartilage.

D'autre part, des échancrures dans les fronts d'ossification sont présentes dans 41% des sections de la plupart des sujets, sans corrélation avec l'âge. Elles sont présentes en plus grand nombre dans les sites articulaires de l'épaule et du grasset. Ces fronts d'ossification découpés ont déjà été décrits dans une classification histologique des lésions d'OC sur une échelle de 0 à 4 (van Weeren et Barneveld 1999a) : le grade 1 étant décrit comme « un cartilage localement épaissi (échancrures du front d'ossification) sans aucune autre anomalie », ce grade n'était pas classé comme de l'OC, mais était présenté comme « prédisposé au développement de l'OC ». Dans notre étude, comme dans d'autres (Shingleton *et al.* 1997), un canal du cartilage était présent dans la majorité des échancrures du front d'ossification (92%). La très haute prévalence des fronts d'ossification découpés, associée à la présence de nombreux canaux du cartilage suggère que cela peut être un processus physiologique d'inclusion des canaux dans le centre d'ossification secondaire à partir de la matrice du cartilage lors du développement épiphysaire. Néanmoins, ces zones peuvent être biomécaniquement plus faibles à certaines périodes de leur développement et vulnérables lors de traumatismes internes ou externes, les prédisposant au développement de lésions d'OC, comme suggéré par certains (Lewis 1986). Shingleton précisait que des canaux du cartilage retenus derrière les fronts d'ossification étaient visibles jusqu'à l'âge de 10 semaines, même chez des chevaux sains sans OC, et que cette rétention de cartilage au sein de centres d'ossification fournissait des sites idéaux pour l'initiation de lésions précoces d'OC (Shingleton *et al.* 1997). Cependant, ces auteurs soulignaient le fait que les canaux du cartilage étaient entourés de très petits chondrocytes, même lorsqu'ils étaient localisés dans la zone hypertrophique, ce qui empêchait le bon déroulement du processus normal d'ossification endochondrale. Au contraire, dans notre étude, les canaux du cartilage entrant dans le front d'ossification étaient fréquemment entourés par des chondrocytes hypertrophiques, indiquant que le processus d'hypertrophie des chondrocytes du cartilage de croissance n'était pas toujours bloqué autour des canaux, au moment de traverser le front d'ossification. Dans les échancrures du front d'ossification où aucun canal vasculaire n'était visible à la coloration Safranine O Fast green (8%), l'observation des sections correspondantes colorées avec le rouge

picrosirius et observées sous lumière polarisée a révélé la présence quasi constante d'un canal à proximité ou dans l'échancrure par l'orientation des fibres de collagène. Cela semble confirmer l'hypothèse que les échancrures de cartilage au sein du front d'ossification correspondent probablement à un processus normal d'incorporation des canaux dans le centre d'ossification.

Bien que certaines caractéristiques histologiques de la matrice du cartilage épiphysaire des fœtus équins aient été étudiées jusqu'à aujourd'hui (Rejnö et Strömberg 1978; Henson *et al.* 1997a; Olstad *et al.* 2007) et que les caractéristiques biochimiques du réseau de collagène dans le cartilage articulaire de poulains nouveau-nés aient été rapportées (Brama *et al.* 2000), personne n'a, à notre connaissance, décrit la structure tridimensionnelle de la matrice de collagène dans les cartilages de croissance et articulaire équins. Cela a pu être réalisé dans notre étude en utilisant la coloration rouge picrosirius et la lumière polarisée. Afin de mieux comprendre les images obtenues, il est important de se rappeler que différents facteurs influencent l'intensité lumineuse (c'est-à-dire la biréfringence) et les couleurs obtenues sur les sections sous lumière polarisée : des fibres de collagène bien ordonnées et alignées, parallèles entre elles, apparaîtront très biréfringentes (Xia *et al.* 2003; Nissi *et al.* 2006) ; au contraire, un arrangement plus isotropique des fibres de collagène ne pourra pas être identifié sous lumière polarisée, apparaissant noir. Le diamètre relatif des fibres de collagène et leur densité de paquetage jouent également un rôle, les fibres les plus fines apparaissant vertes ou bleues, et les plus larges oranges ou rouges (Junqueira *et al.* 1979; Xia *et al.* 2003). Ainsi, l'observation de nos échantillons avec cette méthode nous a bien montré que l'échafaudage de collagène mûrissait *in utero*. L'observation d'une augmentation progressive de la biréfringence du cartilage de croissance épiphysaire avec l'âge sur les sections observées sous lumière polarisée suggère soit une concentration augmentée de collagène dans la MEC, soit un meilleur alignement des fibres lors de la maturation (Hughes 2005), indiquant dans tous les cas un changement dans les propriétés biomécaniques du cartilage avec le développement. *In utero*, les muscles semblent appliquer des forces hydrostatiques cycliques et du stress sur les articulations, permettant le développement normal des épiphyses fœtales (Carter *et al.* 1987; Carter

et Wong 1988; Heegaard *et al.* 1999; Sundaramurthy et Mao 2006). Bien que ce phénomène soit encore mal compris, il pourrait expliquer la réorganisation structurelle que nous observons.

Chose intéressante et pour la première fois dans l'épiphyse équine, nous avons observé que la coloration rouge picrosirius et la lumière polarisée, à la différence de la coloration standard Safranine O Fast green, permettait l'identification d'une démarcation nette entre le cartilage articulaire et le cartilage de croissance épiphysaire. La différenciation du cartilage articulaire a lieu tôt dans le développement de l'épiphyse, entre 6 et 8 mois de gestation, et il est par la suite remodelé lors de la maturation du squelette. Ce cartilage articulaire en développement a une apparence complexe, divisé en plusieurs zones selon l'orientation des fibres de collagène, avec, en particulier, une zone additionnelle par rapport aux 3 zones décrites chez l'adulte, isotropique, qui correspond à la zone où la réorganisation des fibres de collagène se produit. De la même façon, dans certaines zones du cartilage de croissance épiphysaire, une réorganisation spécifique du collagène est visible. Ces zones sont toujours plus isotropiques et hétérogènes avec des fibres de collagène s'entrelaçant, organisées comme une sorte de filet ou de grillage, ce qui est rapporté comme étant probablement lié à une maturation incomplète du réseau de collagène. Lors du processus de maturation des épiphyses fœtales, il est probable qu'un remodelage important du réseau de collagène ait lieu. A notre connaissance, la structure collagénique épiphysaire des nouveau-nés (de la naissance à quelques mois d'âge) a été rapporté chez certaines espèces (Kaab *et al.* 1998; Xia *et al.* 2003; Rieppo *et al.* 2004; Hughes *et al.* 2005; Grunder 2006; Nissi *et al.* 2006) mais jamais chez le cheval, ni chez le fœtus. La microscopie électronique à balayage et la microscopie à lumière polarisée sur sections histologiques non colorées ont été employées dans le passé pour étudier la structure du collagène dans le cartilage articulaire mature (Maroudas et Bullough 1968; Weiss *et al.* 1968; Minns et Steven 1977; de Bont *et al.* 1986; Jeffery *et al.* 1991; Arokoski *et al.* 1996; Nieminen *et al.* 2001; Xia *et al.* 2001; Alhadlaq *et al.* 2004; Hughes *et al.* 2005) et dans le cartilage de croissance épiphysaire après la naissance (Kaab *et al.* 1998; Xia *et al.* 2003; Rieppo *et al.* 2004; Nissi *et al.* 2006). Récemment, il a également été montré que

l'imagerie par résonance magnétique de haute résolution (7 à 10 Tesla IRM ou μ IRM), et en particulier le paramètre « temps de relaxation T2 » (T2 mapping), était très sensible pour mettre en évidence l'arrangement tridimensionnel des fibres de collagène dans le cartilage et détecter les changements de cette structure en fonction de l'âge (Babyn *et al.* 1996; Nieminen *et al.* 2001; Xia *et al.* 2001; Xia *et al.* 2003; Alhadlaq *et al.* 2004; Grunder 2006; Nissi *et al.* 2006). Ainsi, ces auteurs rapportent un arrangement des fibres de collagène en zones dans les épiphyses immatures des différentes espèces similaire à celui observé dans notre étude, confirmant cette caractéristique développementale similaire dans beaucoup d'espèces.

Dans la majorité de nos sections colorées avec du rouge picosirius, nous avons également pu observer une organisation très spécifique du réseau de collagène à proximité du front d'ossification. Un changement marqué de l'orientation des fibres de collagène est présent entre les zones proliférative et hypertrophique du cartilage de croissance épiphysaire, où le réseau de collagène passe rapidement d'une structure très dense avec des fibres orientées tangentiellement, vers une structure beaucoup plus lâche composée de fibres beaucoup plus fines orientées radialement. Il est possible que le changement très abrupt dans la structure du collagène à cet endroit entraîne des modifications de ses forces biomécaniques, le rendant plus vulnérable aux traumatismes et aux stress, et pouvant initier des lésions précoces d'OC. Nous avons également observé une organisation particulière des fibres de collagène autour des canaux du cartilage dans le cartilage de croissance épiphysaire (trajet rectiligne), et cela peut également rendre ces régions vulnérables aux stress du fait de propriétés biomécaniques potentiellement différentes du reste de la MEC. Ces caractéristiques d'organisation du collagène dans ces 2 zones d'intérêt (zones proliférative et hypertrophique) et autour des canaux vasculaires est primordiale car les hypothèses actuelles sur la pathogénie de l'OC impliquent à la fois les zones proliférative et hypertrophique (Henson *et al.* 1997b; Olstad *et al.* 2007) et les canaux du cartilage (Kincaid *et al.* 1985; Woodard *et al.* 1987a; Carlson *et al.* 1991; Carlson *et al.* 1995; Ytrehus *et al.* 2004c; Olstad *et al.* 2007).

Bien que cette étude nous ait donné l'opportunité de comprendre de nombreuses caractéristiques histologiques de l'épiphyse fœtale en développement dans l'espèce équine, elle a également un certain nombre de limites. Tout d'abord, nous n'avons aucun renseignement sur la cause de l'avortement ou de la mort des juments et de leur fœtus et des poulains, ni sur le statut d'OC des parents. D'autre part, bien que les sections colorées avec du rouge picrosirius proviennent de tissu immédiatement adjacent aux échantillons colorés avec Safranine O Fast green, ces coupes n'étaient jamais complètement contigües, d'où la comparaison de tissus légèrement différents. Les changements matriciels observés dans les sections Safranine O Fast green étaient très focaux et leurs morphologies variaient sur de très petites distances. Cela peut expliquer pourquoi il était difficile d'observer les mêmes changements dans les 2 sections colorées soit avec la Safranine O Fast green, soit avec le rouge picrosirius.

Finalement, nous n'avons identifié aucun changement dans la MEC des fœtus ou poulains nouveau-nés que nous ayons jugé comme pouvant être une lésion précoce d'OC. Une étude future nécessiterait d'examiner du matériel avec des lésions histologiques très précoces d'OC visibles avec une coloration standard (Safranine O Fast green) et d'examiner la section correspondante colorée avec le rouge picrosirius pour essayer d'identifier les changements de la matrice de collagène associés à l'OC. Un obstacle majeur est constitué par la difficulté d'obtenir de tels échantillons. Dans une étude récente, Olstad *et al.* n'ont identifié aucune évidence histologique d'OC chez 15 fœtus équins, similaires aux nôtres. Cependant, ils étudiaient uniquement un site de prédilection de l'OC (tibia distal). Cela indiquerait soit que l'OC n'apparaît pas lors de la gestation, soit que les événements les plus précoces sont moléculaires et que les outils que nous utilisons ne sont pas assez sensibles pour les détecter. Certains auteurs ont utilisés l'immunohistochimie ou l'immunoessai (Henson *et al.* 1997a; Henson *et al.* 1997b; Hernandez-Vidal *et al.* 1998; Semevolos *et al.* 2001; Laverty *et al.* 2002) et la biologie moléculaire (Semevolos *et al.* 2001) pour détecter des événements moléculaires dans le processus de l'OC. Cependant, le problème reste que sans lésion histologique évidente, il restera toujours difficile de faire le lien entre les changements moléculaires précoces observés avec les lésions d'OC plus tardives.

De façon alternative, une étude similaire pourrait être réalisée sur une population de chevaux prédisposée à l'OC (van Weeren et Barneveld 1999a) pour augmenter le nombre de lésions dans l'étude.

Conclusion

En conclusion, le cartilage épiphysaire des fœtus équins est largement vascularisé, et subit des changements développementaux majeurs dans les deux derniers tiers de gestation. Ces changements interviennent à la fois dans la structure des protéoglycanes et du collagène de la MEC, et dans la vascularisation du cartilage de croissance épiphysaire. Le degré et la période de ces changements varient selon le site articulaire. Ces changements développementaux peuvent être des zones de vulnérabilité et prédisposer à l'OC. Des études futures sur les changements moléculaires dans le réseau de collagène de fœtus pourraient apporter la clé sur leur rôle potentiel dans les événements précoces d'OC. En particulier, l'imagerie par résonance magnétique de haute résolution (μ IRM) est une technique non-invasive qui pourrait être utilisée pour évaluer la maturation du cartilage et investiguer *in vivo* et de manière longitudinale la pathogénie de l'OC. Cependant, jusqu'à présent, personne n'a jamais identifié de lésion histologique d'OC clairement définie chez le fœtus équin.

Bibliographie

- Al-Hizab, F., Clegg, P.D., Thompson, C.C. and Carter, S.D. (2002) Microscopic localization of active gelatinases in equine osteochondritis dissecans (OCD) cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **10**, 653-661.
- Alhadlaq, H.A., Xia, Y., Moody, J.B. and Matyas, J.R. (2004) Detecting structural changes in early experimental osteoarthritis of tibial cartilage by microscopic magnetic resonance imaging and polarised light microscopy. *Ann Rheum Dis* **63**, 709-717.
- Alini, M., Matsui, Y., Dodge, G.R. and Poole, A.R. (1992) The extracellular matrix of cartilage in the growth plate before and during calcification: changes in composition and degradation of type II collagen. *Calcif Tissue Int* **50**, 327-335.
- Alvarado, A.F., Marcoux, M. and Breton, L. (1989) The incidence of osteochondrosis on a Standardbred breeding farm in Quebec. *Am Assoc Equine Pract* **35**, 293-307.
- Alvarez, J., Costales, L., Serra, R., Balbin, M. and Lopez, J.M. (2005) Expression patterns of matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor during epiphyseal ossification. *J Bone Miner Res* **20**, 1011-1021.
- Arnan, P. and Hertsch, B.-W. (2004) Röntgenologische Untersuchung zur Erfassung der Osteochondrosis dissecans im Fessel-, Sprung- und Kniegelenk im Vergleich vom Fohlen zum Zweijährigen. In: *Göttinger Pferdetage 2004*, Ed: E. Bruns, FN-Verlag, Warendorf, Germany.
- Arokoski, J.P., Hyttinen, M.M., Lapvetelainen, T., Takacs, P., Kosztaczky, B., Modis, L., Kovanen, V. and Helminen, H. (1996) Decreased birefringence of the superficial zone collagen network in the canine knee (stifle) articular cartilage after long distance running training, detected by quantitative polarised light microscopy. *Ann Rheum Dis* **55**, 253-264.
- Babyn, P.S., Kim, H.K., Lemaire, C., Gahunia, H.K., Cross, A., DeNanassy, J. and Pritzker, K.P. (1996) High-resolution magnetic resonance imaging of normal porcine cartilaginous epiphyseal maturation. *J Magn Reson Imaging* **6**, 172-179.
- Ballock, R.T., Heydemann, A., Wakefield, L.M., Flanders, K.C., Roberts, A.B. and Sporn, M.B. (1993) TGF-beta 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Dev Biol* **158**, 414-429.

- Ballock, R.T. and Reddi, A.H. (1994) Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J Cell Biol* **126**, 1311-1318.
- Banks, W.J. (1993a) Chapter 9 : Supportive Tissues - Bone In: *Applied Veterinary Histology, 3th Ed.*, Ed: R.W. Reinhardt, Mosby-Year Book, St louis, USA. pp 107-126.
- Banks, W.J. (1993b) Chapter 10 : Osteogenesis. In: *Applied Veterinary Histology, 3th Ed*, Ed: R.W. Reinhardt, Mosby-Year Book, Saint Louis, USA. pp 127-141.
- Barrie, H.J. (1984) Hypothesis--a diagram of the form and origin of loose bodies in osteochondritis dissecans. *J Rheumatol* **11**, 512-513.
- Bashey, R.I., Leach, R.M., Gay, C.V. and Jimenez, S.A. (1989) Type X collagen in avian tibial dyschondroplasia. *Lab Invest* **60**, 106-112.
- Benninghoff, A. (1925) Form and structure of hyaline cartilage in relation to function [German]. *Erste Mitteilung Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* **76**, 43-63.
- Billinghurst, R.C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rorabeck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., Chen, J., Van Wart, H. and Poole, A.R. (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest* **99**, 1534-1545.
- Bohanon, T.C. (1995) Chapter 39: Developmental Muculoskeletal Disease. In: *The Horse: Diseases and Clinical management.*, Eds: C.N. Kobluck, T.R. Ames and R.J. Geor, W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 815-825.
- Brama, P.A., Tekoppele, J.M., Bank, R.A., Barneveld, A. and van Weeren, P.R. (2000) Functional adaptation of equine articular cartilage: the formation of regional biochemical characteristics up to age one year. *Equine Vet J* **32**, 217-221.
- Brama, P.A., TeKoppele, J.M., Bank, R.A., Barneveld, A. and van Weeren, P.R. (2002) Development of biochemical heterogeneity of articular cartilage: influences of age and exercise. *Equine Vet J* **34**, 265-269.
- Bridges, C.H. and Harris, E.D. (1988) Experimentally induced cartilaginous fractures (osteochondritis dissecans) in foals fed low-copper diets. *J Am Vet Med Assoc* **193**, 215-221.
- Bridges, C.H., Womack, J.E., Harris, E.D. and Scrutchfield, W.L. (1984) Considerations of copper metabolism in osteochondrosis of suckling foals. *J Am Vet Med Assoc* **185**, 173-178.

- Brighton, C.T. (1985) Chapter Two: Normal Bone Formation. Section One : Epiphyseal Bone Formation. In: *Textbook of Small Animal Orthopaedics*, Eds: C.D. Newton and D.M. Nunamaker, JB Lippincott Company, Baltimore.
- Brommer, H., Brama, P.A., Laasanen, M.S., Helminen, H.J., van Weeren, P.R. and Jurvelin, J.S. (2005) Functional adaptation of articular cartilage from birth to maturity under the influence of loading: a biomechanical analysis. *Equine Vet J* **37**, 148-154.
- Brookes, M. (1958) The vascular architecture of tubular bone in the rat. *Anat Rec* **132**, 25-47.
- Bruin, G., Creemers, J.J.H.M. and Smolders, E.E.A. (1992) Effect of exercise on osteochondrosis in the horse. In: *Equine osteochondrosis in the '90s*, Cambridge, UK.
- Burkus, J.K., Ganey, T.M. and Ogden, J.A. (1993) Development of the cartilage canals and the secondary center of ossification in the distal chondroepiphysis of the prenatal human femur. *Yale J Biol Med* **66**, 193-202.
- Butler, J.A., Colles, C.E., Dyson, S.J. and al, e. (1993) Clinical radiology of the horse, Blackwell Science, Oxford, UK.
- Byers, P.D. and Brown, R.A. (2006) Cell columns in articular cartilage physes questioned: a review. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 3-12.
- Carlson, C.S., Cullins, L.D. and Meuten, D.J. (1995) Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply. *Vet Pathol* **32**, 641-647.
- Carlson, C.S., Hilley, H.D., Henrikson, C.K. and Meuten, D.J. (1986) The ultrastructure of osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in growing swine. *Calcif Tissue Int* **38**, 44-51.
- Carlson, C.S., Meuten, D.J. and Richardson, D.C. (1991) Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res* **9**, 317-329.
- Carlsten, J., Sandgren, B. and Dalin, G. (1993) Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and ostéochondral fragments in the fetlock joints of Standardbred trotters. I. A radiological survey. *Equine Vet J Suppl* **16**, 42-47.
- Carter, D.R., Orr, T.E., Fyhrie, D.P. and Schurman, D.J. (1987) Influences of mechanical stress on prenatal and postnatal skeletal development. *Clin Orthop Relat Res*, 237-250.

- Carter, D.R. and Wong, M. (1988) The role of mechanical loading histories in the development of diarthrodial joints. *J Orthop Res* **6**, 804-816.
- Chi, S.S., Rattner, J.B. and Matyas, J.R. (2004) Communication between paired chondrocytes in the superficial zone of articular cartilage. *J Anat* **205**, 363-370.
- Clark, J.M. (1985) The organization of collagen in cryofractured rabbit articular cartilage: a scanning electron microscopic study. *J Orthop Res* **3**, 17-29.
- Cole, A.A. and Wezeman, F.H. (1987) Morphometric analysis of cartilage canals in the developing mouse epiphysis. *Acta Anat (Basel)* **128**, 93-97.
- Cormack, D.H. (1993) Chapter 8 : Dense connective tissue, cartilage, bone and joints. In: *Essential Histology.*, Ed: R. Winters, J.B. Lippincott Company, Philadelphia. pp 159-190.
- Cornish, J., Callon, K.E. and Reid, I.R. (1996) Insulin increases histomorphometric indices of bone formation In vivo. *Calcif Tissue Int* **59**, 492-495.
- Craig, P.H. and Riser, W.H. (1965) Osteochondritis dissecans in the proximal humerus of the dog. *J Am Vet Radiol Soc* **6**, 40.
- Cruickshank, J., Grossman, D.I., Peng, R.K., Famula, T.R. and Oberbauer, A.M. (2005) Spatial distribution of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I receptor and apoptotic chondrocytes during growth plate development. *J Endocrinol* **184**, 543-553.
- Cymbaluk, N.F. and Smart, M.E. (1993) A review of possible metabolic relationships of copper to equine bone disease. *Equine Vet J Suppl*, 19-26.
- Dalin, G., Sandgren, B. and Carlsten, J. (1993) Plantar osteochondral fragments in the metatarsophalangeal joints in Standardbred trotters: Results of osteochondrosis or trauma? *Equine Vet J Suppl* **16**, 62.
- Davoli, M.A., Lamplugh, L., Beauchemin, A., Chan, K., Mordier, S., Mort, J.S., Murphy, G., Docherty, A.J., Leblond, C.P. and Lee, E.R. (2001) Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats aged 0-21 days: II. Two proteinases, gelatinase B and collagenase-3, are implicated in the lysis of collagen fibrils. *Dev Dyn* **222**, 71-88.
- Dayan, D., Hiss, Y., Hirshberg, A., Bubis, J.J. and Wolman, M. (1989) Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* **93**, 27-29.

- de Bont, L.G., Liem, R.S., Havinga, P., Boering, G. and van der Korst, J. (1986) Collagenous network in cartilage of human femoral condyles. A light microscopic and scanning electron microscopic study. *Acta Anat (Basel)* **126**, 41-47.
- Deppermann, F., Dallek, M., Meenen, N., Lorke, D. and Jungbluth, K.H. (1989) [The biomechanical significance of the periosteum for the epiphyseal groove]. *Unfallchirurgie* **15**, 165-173.
- Dik, K.J., Enzerink, E. and van Weeren, P.R. (1999) Radiographic development of osteochondral abnormalities, in the hock and stifle of Dutch Warmblood foals, from age 1 to 11 months. *Equine Vet J Suppl*, 9-15.
- Donabedian, M. (2006) *Les affections de type ostéochondrotique: effet d'une croissance rapide liée à des apports nutritionnels élevés, mécanisme endocrine, et outils de détection précoces chez le cheval*, Thèse de doctorat, Université de Limoges, Limoges, France.
- Doschak, M.R., Cooper, D.M., Huculak, C.N., Matyas, J.R., Hart, D.A., Hallgrimsson, B., Zernicke, R.F. and Bray, R.C. (2003) Angiogenesis in the distal femoral chondroepiphysis of the rabbit during development of the secondary centre of ossification. *J Anat* **203**, 223-233.
- Douglas, J. (2003) Chapter 56 : Pathogenesis of Osteochondrosis. In: *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*, Eds: M.W. Ross and S.J. Dyson, Saunders, Philadelphia. pp 534-543.
- Duthie, R.B. and Houghton, G.R. (1981) Constitutional aspects of the osteochondroses. *Clin Orthop Relat Res*, 19-27.
- Ekman, S. and Carlson, C.S. (1998) The pathophysiology of osteochondrosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **28**, 17-32.
- Ekman, S., Heinegard, D., Johnell, O. and Rodriguez-Martinez, H. (1990a) Immunohistochemical localization of proteoglycans and non-collagenous matrix proteins in normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage complex. *Matrix* **10**, 402-411.
- Ekman, S., Rodriguez-Martinez, H. and Ploen, L. (1990b) Morphology of normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage. A study in the domestic pig and minipig of wild hog ancestry. *Acta Anat (Basel)* **139**, 239-253.
- Eurell, J.A.C. and Van Sickle, D.C. (1998) Chapter 3 : Connective and supportive tissues. In: *Textbook of Veterinary Histology, 5th Ed.*, Eds: H.D. Dellmann and J.A. Eurell, Williams and Wilkins, Baltimore. pp 32-61.

- Farquharson, C. and Jefferies, D. (2000) Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poult Sci* **79**, 994-1004.
- Fayolle, P. (2003) Lésion du cartilage de croissance du chiot. Physiopathogénie des ostéochondroses et ostéochondrites. *Le Point Vétérinaire* **34** (**Affections ostéoarticulaires du chien et du chat en croissance**), 42-46.
- Firth, E.C. and Greydanus, Y. (1987) Cartilage thickness measurement in foals. *Res Vet Sci* **42**, 35-46.
- Firth, E.C. and Poulos, P.W. (1982) Blood vessels in the developing growth plate of the equine distal radius and metacarpus. *Res Vet Sci* **33**, 159-166.
- Floyd, W.E., 3rd, Zaleske, D.J., Schiller, A.L., Trahan, C. and Mankin, H.J. (1987) Vascular events associated with the appearance of the secondary center of ossification in the murine distal femoral epiphysis. *J Bone Joint Surg Am* **69**, 185-190.
- Forriol, F. and Shapiro, F. (2005) Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. *Clin Orthop Relat Res*, 14-33.
- Gabel, A.A., Knight, D.A., Reed, S.M. and ... (1987) Comparaison of incidence and severity of developmental orthopedic disease on 17 farms before and after adjustment of ration. *Proc Am Assoc Equine Pract* **33**, 163.
- Gardner, E. and Gray, D.J. (1970) The prenatal development of the human femur. *Am J Anat* **129**, 121-140.
- Gee, E., Davies, M., Firth, E., Jeffcott, L., Fennessy, P. and Mogg, T. (2007) Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of copper supplemented and non-supplemented dams. *Vet J* **173**, 109-117.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z. and Ferrara, N. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* **5**, 623-628.
- Glade, M.J. (1986) The control of cartilage growth in osteochondrosis: a review. *Equine Vet Sci* **6**, 175.
- Glade, M.J. (1987) The role of endocrine factors in equine developmental orthopedic disease. *Proc Am Assoc Equine Pract* **33**, 171.
- Glade, M.J. and Belling, T.H., Jr. (1984) Growth plate cartilage metabolism, morphology and biochemical composition in over- and underfed horses. *Growth* **48**, 473-482.

- Glade, M.J., Gupta, S. and Reimers, T.J. (1984) Hormonal responses to high and low planes of nutrition in weanling thoroughbreds. *Journal of animal science* **59**, 658-665.
- Glade, M.J., Kanwar, Y.S. and Stern, P.H. (1994) Insulin and thyroid hormones stimulate matrix metabolism in primary cultures of articular chondrocytes from young rabbits independently and in combination. *Connect Tissue Res* **31**, 37-44.
- Glade, M.J., Krook, L., Schryver, H.F. and Hintz, H.F. (1981) Growth inhibition induced by chronic dexamethasone treatment of foals. *J Eq Vet Sci* **1**, 198-204.
- Glade, M.J., Krook, L., Schryver, H.F. and Hintz, H.F. (1983) Morphologic and biochemical changes in cartilage of foals treated with dexamethasone. *Cornell Vet* **73**, 170-192.
- Glaser, K.E., Davies, M.E. and Jeffcott, L.B. (2003) Differential distribution of cathepsins B and L in articular cartilage during skeletal development in the horse. *Equine Vet J* **35**, 42-47.
- Gomori, G. (1943) Calcification and phosphatase. *American Journal Pathology* **19**, 197-209.
- Gray, A.W., Davies, M.E. and Jeffcott, L.B. (2002) Localisation and activity of cathepsins K and B in equine osteoclasts. *Res Vet Sci* **72**, 95-103.
- Grondahl, A.M. and Engeland, A. (1995) Influence of radiographically detectable orthopedic changes on racing performance in standardbred trotters. *J Am Vet Med Assoc* **206**, 1013-1017.
- Grunder, W. (2006) MRI assessment of cartilage ultrastructure. *NMR in biomedicine* **19**, 855-876.
- Haines, R.W. (1933) Cartilage canals. *J Anat* **68**, 45-64.
- Hatori, M., Klatte, K.J., Teixeira, C.C. and Shapiro, I.M. (1995) End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res* **10**, 1960-1968.
- Heegaard, J.H., Beaupre, G.S. and Carter, D.R. (1999) Mechanically modulated cartilage growth may regulate joint surface morphogenesis. *J Orthop Res* **17**, 509-517.
- Henson, F.M., Davenport, C., Butler, L., Moran, I., Shingleton, W.D., Jeffcott, L.B. and Schofield, P.N. (1997a) Effects of insulin and insulin-like growth factors I and II on the growth of equine fetal and neonatal chondrocytes. *Equine Vet J* **29**, 441-447.

- Henson, F.M., Davies, M.E. and Jeffcott, L.B. (1997b) Equine dyschondroplasia (osteochondrosis)--histological findings and type VI collagen localization. *Vet J* **154**, 53-62.
- Henson, F.M., Schofield, P.N. and Jeffcott, L.B. (1997c) Expression of transforming growth factor-beta 1 in normal and dyschondroplastic articular growth cartilage of the young horse. *Equine Vet J* **29**, 434-439.
- Henson, F.M.D. (1996) *Cellular and molecular studies on normal and dyschondroplastic growth cartilage of the horse*. PhD dissertation, University of Cambridge, Cambridge, UK.
- Hernandez-Vidal, G., Jeffcott, L.B. and Davies, M.E. (1997) Cellular heterogeneity in cathepsin D distribution in equine articular cartilage. *Equine Vet J* **29**, 267-273.
- Hernandez-Vidal, G., Jeffcott, L.B. and Davies, M.E. (1998) Immunolocalization of cathepsin B in equine dyschondroplastic articular cartilage. *Vet J* **156**, 193-201.
- Hill, M.A., Ruth, G.R., Hilley, H.D., Torrison, J.L., Bagent, J.K. and Leman, A.D. (1985) Dyschondroplasias of growth cartilages (osteochondrosis) in crossbred commercial pigs at one and 15 days of age: radiological, angiographic and histological findings. *Vet Rec* **116**, 40-47.
- Hillbery, B.M., van Sickle, D.C., Maturo, C.J. and ... (1986) A model of studying the influence of mechanical usage on articular cartilage. In: *the XVth Symposium of European Society of Osteoarthrology*, Kuopio, Finland.
- Hoppe, F. and Philipsson, J. (1998) A genetic study of osteochondrosis dissecans in Swedish horses. *Equine Pract* **57**, 7.
- Hughes, L.C. (2005) *The structure and development of mouse articular cartilage: a microscopy study*, PhD thesis, University of Wales Aberystwyth, Wales, UK.
- Hughes, L.C., Archer, C.W. and ap Gwynn, I. (2005) The ultrastructure of mouse articular cartilage: collagen orientation and implications for tissue functionality. A polarised light and scanning electron microscope study and review. *European cells & materials* **9**, 68-84.
- Hunter, G.K. (1987) An ion-exchange mechanism of cartilage calcification. *Connect Tissue Res* **16**, 111-120.
- Hunter, G.K. (1991) Role of proteoglycan in the provisional calcification of cartilage. A review and reinterpretation. *Clin Orthop Relat Res*, 256-280.

- Huret, J.-L., Dessen, P. and Bernheim, A. (2005) Gènes du développement. Exemple: développement du squelette chez l'humain. In: *Atlas of genetics and cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Hurtig, M., Green, S.L., Dobson, H., Mikuni-Takagaki, Y. and Choi, J. (1993) Correlative study of defective cartilage and bone growth in foals fed a low-copper diet. *Equine Vet J Suppl* **16**, 66-73.
- Hurtig, M.B. and Pool, R.R. (1996) Chapter 20 : Pathogenesis of equine osteochondrosis. In: *Joint Disease in the Horse.*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 335-358.
- Jain, R.K. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685-693.
- Jaramillo, D., Villegas-Medina, O.L., Doty, D.K., Rivas, R., Strife, K., Dwek, J.R., Mulkern, R.V. and Shapiro, F. (2004) Age-related vascular changes in the epiphysis, physis, and metaphysis: normal findings on gadolinium-enhanced MRI of piglets. *AJR Am J Roentgenol* **182**, 353-360.
- Jeffcott, L.B. (1991) Osteochondrosis in the horse--searching for the key to pathogenesis. *Equine Vet J* **23**, 331-338.
- Jeffcott, L.B. and Henson, F.M. (1998) Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (osteochondrosis). *Vet J* **156**, 177-192.
- Jeffcott, L.B., Kold, S.E. and Melsen, F. (1983) Aspects of the pathology of stifle bone cysts in the horse. *Equine Vet J* **15**, 304-311.
- Jeffery, A.K., Blunn, G.W., Archer, C.W. and Bentley, G. (1991) Three-dimensional collagen architecture in bovine articular cartilage. *The Journal of bone and joint surgery* **73**, 795-801.
- Jorgensen, H.S., Proschowsky, H., Falk-Ronne, J., Willeberg, P. and Hesselholt, M. (1997) The significance of routine radiographic findings with respect to subsequent racing performance and longevity in standardbred trotters. *Equine Vet J* **29**, 55-59.
- Junqueira, L.C., Bignolas, G. and Brentani, R.R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447-455.
- Kaab, M.J., Gwynn, I.A. and Notzli, H.P. (1998) Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. *J Anat* **193 (Pt 1)**, 23-34.

- Kane, A.J., McIlwraith, C.W., Park, R.D., Rantanen, N.W., Morehead, J.P. and Bramlage, L.R. (2003) Radiographic changes in Thoroughbred yearlings. Part 2: Associations with racing performance. *Equine Vet J* **35**, 366-374.
- Kealy, J.K. and McAllister, H. (2005) Chapter 4 : Bones and Joints, developmental Anomalies. In: *Diagnostic Radiology Ultrasonography of the Dog and Cat. 4th Edition.*, Ed: A.J. Winkel, Elsevier Saunders, St Louis. pp 329-336.
- Kincaid, S.A., Allhands, R.V. and Pijanowski, G.J. (1985) Chondrolysis associated with cartilage canals of the epiphyseal cartilage of the distal humerus of growing pigs. *Am J Vet Res* **46**, 726-732.
- Knight, D.A., Weisbrode, S.E., Schmall, L.M., Reed, S.M., Gabel, A.A., Bramlage, L.R. and Tyznik, W.I. (1990) The effects of copper supplementation on the prevalence of cartilage lesions in foals. *Equine Vet J* **22**, 426-432.
- Kronenberg, H.M. (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-336.
- Kronenberg, H.M. and Chung, U. (2001) The parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog feedback loop in the growth plate. *Novartis Found Symp* **232**, 144-152; discussion 152-147.
- Kronfeld, D.S., Meacham, T.N. and Donoghue, S. (1990) Dietary aspects of developmental orthopaedic disease in young horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* **6**, 451-65.
- Langenskiold, A. (1998) Role of the ossification groove of Ranvier in normal and pathologic bone growth: a review. *J Pediatr Orthop* **18**, 173-177.
- Laverty, S., Ionescu, M., Marcoux, M., Boure, L., Doize, B. and Poole, A.R. (2000) Alterations in cartilage type-II procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **18**, 399-405.
- Laverty, S., Okouneff, S., Ionescu, M., Reiner, A., Pidoux, I., Webber, C., Rossier, Y., Billinghamurst, R.C. and Poole, A.R. (2002) Excessive degradation of type II collagen in articular cartilage in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **20**, 1282-1289.
- Lee, E.R., Lamplugh, L., Davoli, M.A., Beauchemin, A., Chan, K., Mort, J.S. and Leblond, C.P. (2001) Enzymes active in the areas undergoing cartilage resorption during the development of the secondary ossification center in the tibiae of rats ages 0-21 days: I. Two groups of proteinases cleave the core protein of aggrecan. *Dev Dyn* **222**, 52-70.

- Lewis, R. (1986) Incidence of developmental orthopedic lesions. In: *AQHA Developmental Orthopedic Disease Symposium*, Ed: C.W. McIlwraith, American Quarter Horse Association, Amarillo. pp 10-12.
- Lillich, J.D., Bertone, A.L., Malemud, C.J., Weisbrode, S.E., Ruggles, A.J. and Stevenson, S. (1997) Biochemical, histochemical, and immunohistochemical characterization of distal tibial osteochondrosis in horses. *Am J Vet Res* **58**, 89-98.
- Lutfi, A.M. (1970) Mode of growth, fate and functions of cartilage canals. *J Anat* **106**, 135-145.
- Malemud, C.J. (2006) Matrix metalloproteinases: role in skeletal development and growth plate disorders. *Front Biosci* **11**, 1702-1715.
- Maroudas, A. and Bullough, P. (1968) Permeability of articular cartilage. *Nature* **219**, 1260-1261.
- McIlwraith, C.W. (1998) Subchondral bone cysts in the horse: aetiology, diagnosis and treatment options. *Equine Vet Educ* **10**, 313.
- McIlwraith, C.W., Foerner, J.J. and Davis, D.M. (1991) Osteochondritis dissecans of the tarsocrural joint: results of treatment with arthroscopic surgery. *Equine Vet J* **23**, 155-162.
- McIlwraith, C.W. and Martin, G.S. (1985) Arthroscopic surgery for the treatment of osteochondrosis dissecans in the equine femoro-patellar joint. *Vet Surg* **14**, 105.
- McIlwraith, C.W. (1982) Subchondral cystic lesions (osteochondrosis) in the horse. *Compend Contin Educ Pract Vet* **4**, S394.
- McIlwraith, C.W. (1996) Chapter 22 : Clinical Aspects of Osteochondritis Dissecans. In: *Joint Disease in the Horse.*, Eds: C.W. McIlwraith and G.W. Trotter, W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 362-383.
- McKibbin, B. and Holdsworth, F.W. (1967) The dual nature of epiphyseal cartilage. *J Bone Joint Surg Br* **49B**,351-361.
- Minns, R.J. and Steven, F.S. (1977) The collagen fibril organization in human articular cartilage. *J Anat* **123**, 437-457.
- Modis, L., Botos, A., Kiviranta, I., Lukacsko, L. and Helminen, H.J. (1996) Differences in submicroscopic structure of the extracellular matrix of canine femoral and tibial condylar articular cartilages as revealed by polarization microscopical analysis. *Acta biologica Hungarica* **47**, 341-353.

- Moses, M.A., Wiederschain, D., Wu, I., Fernandez, C.A., Ghazizadeh, V., Lane, W.S., Flynn, E., Sytkowski, A., Tao, T. and Langer, R. (1999) Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2645-2650.
- Mow, V.C. and Ratcliffe, A. (1997) Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: *Basic Orthopaedic Biomechanics 2nd Ed*, Ed: W.C. Hayes, Lippincott-Raven, Philadelphia. pp 133-177.
- Mwale, F., Billingham, C., Wu, W., Alini, M., Webber, C., Reiner, A., Ionescu, M., Poole, J. and Poole, A.R. (2000) Selective assembly and remodelling of collagens II and IX associated with expression of the chondrocyte hypertrophic phenotype. *Dev Dyn* **218**, 648-662.
- Nakano, T. and Aherne, F.X. (1994) The pathogenesis of osteochondrosis--a hypothesis. *Med Hypotheses* **43**, 1-5.
- Nelson, F., Dahlberg, L., Lavery, S., Reiner, A., Pidoux, I., Ionescu, M., Fraser, G.L., Brooks, E., Tanzer, M., Rosenberg, L.C., Dieppe, P. and Robin Poole, A. (1998) Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest* **102**, 2115-2125.
- Nieminen, M.T., Rieppo, J., Toyras, J., Hakumaki, J.M., Silvennoinen, J., Hyttinen, M.M., Helminen, H.J. and Jurvelin, J.S. (2001) T2 relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: a comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study. *Magn Reson Med* **46**, 487-493.
- Nilsson, F. (1947) Gonitis in the horse. *Svensk Vetidn* **52**, 1-14.
- Nissi, M.J., Rieppo, J., Toyras, J., Laasanen, M.S., Kiviranta, I., Jurvelin, J.S. and Nieminen, M.T. (2006) T(2) relaxation time mapping reveals age- and species-related diversity of collagen network architecture in articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **14**, 1265-1271.
- Nixon, A.J. and Pool, R.R. (1995) Histologic appearance of axial osteochondral fragments from the proximoplantar/proximopalmar aspect of the proximal phalanx in horses. *J Am Vet Med Assoc* **207**, 1076-1080.
- O'Donohue, D.D., Smith, F.H. and Strickland, K.L. (1992) The incidence of abnormal limb development in the Irish thoroughbred from birth to 18 months. *Equine Vet J* **24**, 305-309.
- Olsson, S.E. and Reiland, S. (1978) The nature of osteochondrosis in animals. Summary and conclusions with comparative aspects on osteochondritis dissecans in man. *Acta Radiol Suppl* **358**, 299-306.

- Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C.S. and Dolvik, N.I. (2007) Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. *J Orthop Res*.
- Paasch, K.M. and Bramlage, L.R. (2004) Influence of birth month on location of osteochondrosis dissecans. In: *Proc Am Assoc Equine Pract Focus on Joints Meeting*, Louisville, Ky, July 22-24. p 17.
- Pascoe, J.R., Pool, R.R., Wheat, J.D. and O'Brien, T.R. (1984) Osteochondral defects of the lateral trochlear ridge of the distal femur of the horse: clinical, radiographic, and pathological examination and results of surgical treatment. *Vet Surg* **13**, 99.
- Pearce, S.G., Firth, E.C., Grace, N.D. and Fennessy, P.F. (1998) Effect of copper supplementation on the evidence of developmental orthopaedic disease in pasture-fed New Zealand Thoroughbreds. *Equine Vet J* **30**, 211-218.
- Perrin, W.R., Aherne, F.X., Bowland, J.P. (1978) Effects of age, breed and floor type on the incidence of articular cartilage lesions in pigs. *Can J Anim Sci* **58**, 129.
- Philipsson, J., Andréasson, E., Sandgren, B. (1993) Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints in standardbred trotters. II. Heritability. *Equine Vet J Suppl* **16**, 38.
- Philipsson, J. (1996) Pathogenesis of osteochondrosis – genetic implications. In: *Joint Disease in the Horse*, Eds: C.W. McIlwraith and G. Trotter, WB Saunders, Philadelphia, PA, pp 359-362.
- Pool, R.R. (1991) Gross, histologic and microradiographic findings in subchondral lesions including OCD in the young horse. In: *Pathology and pathogenesis of athletic injuries in the performance horse. Proceedings of the Thirteen Bain Fallon Memorial Lectures*. Australian Equine Veterinary Association, Melbourne, Australia.
- Pool, R.R. (1993) Difficulties in definition of equine osteochondrosis; differentiation of developmental and acquired lesions. *Equine Vet J Suppl* **16**, 5-12.
- Poole, A.R. (1991) The growth plate : cellular physiologie, cartilage assembly and mineralization. In: *Cartilage : molecular aspects*, Eds: B.K. Hall and S. Newman, CRC Press, New York. pp 179-211.
- Poole, A.R. (1997) Chapter 13 : cartilage in health and disease. In: *Arthritis and Allied Conditions, A textbook of Rheumatology, 13th Edition*, Ed: W.J. Koopman, Williams and Wilkins, A waverly company., Baltimore. pp 255-308.

- Poole, A.R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M. and Laverty, S. (2001) Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, S26-33.
- Poole, A.R., Laverty, S. and Mwale, F. (2000) Endochondral bone formation and development in the axial and appendicular skeleton. In: *The Osteoporosis Primer*, Eds: J. Henderson and D. Goltzman, Cambridge University Press., Cambridge, UK.
- Puchtler, H., Meloan, S.N. and Waldrop, F.S. (1988) Are picro-dye reactions for collagens quantitative? Chemical and histochemical considerations. *Histochemistry* **88**, 243-256.
- Puchtler, H. and Sweat, F. (1964) Histochemical Specificity of Staining Methods for Connective Tissue Fibers: Resorcin-Fuchsin and Van Gieson's Picro-Fuchsin. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* **79**, 24-34.
- Ralston, S.L. (1996) Hyperglycaemia/hyperinsulinaemia after feeding a meal of grain to young horses with osteochondritis dissecans (OCD) lesions. *Pferdeheilkunde* **12**, 320.
- Reiland, S. (1978) Morphology of osteochondrosis and sequelae in pigs. *Acta Radiol Suppl* **358**, 45-90.
- Rejnö, S. and Strömberg, B. (1978) Osteochondrosis in the horse. II. Pathology. *Acta Radiol Suppl* **358**, 153-178.
- Rieppo, J., Hyttinen, M.M., Halmesmäki, E., Ruotsalainen, H., Vasara, A., Kiviranta, I. and *al., e.* (2004) Remodelation of collagen network architecture during cartilage maturation. *Trans Orthop Res Soc* **29**, 549.
- Rivas, R. and Shapiro, F. (2002) Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit. *J Bone Joint Surg Am* **84-A**, 85-100.
- Robinson, D., Hasharoni, A., Cohen, N., Yayon, A., Moskowitz, R.M. and Nevo, Z. (1999) Fibroblast growth factor receptor-3 as a marker for precartilaginous stem cells. *Clin Orthop Relat Res*, S163-175.
- Roth, V., Mow, V.C. and Grodzinsky, A.J. (1979) Biophysical and electromechanical properties of articular cartilage. In: *Skeletal research: an experimental approach*, Eds: D.J. Simmons and A.S. Kunin, Academic Press, New York. pp 301-341.
- Sandgren, B., Dalin, G. and Carlsten, J. (1993a) Osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of standardbred trotters. I. Epidemiology. *Equine Vet J Suppl* **16**, 31.

- Sandgren, B., Dalin, G., Carlsten, J. and Lundeheim, N. (1993b) Development of osteochondrosis in the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints of standardbred trotters. II. Body measurements and clinical findings. *Equine Vet J Suppl* **16**, 48.
- Savage, C.J., McCarthy, R.N. and Jeffcott, L.B. (1993a) Effects of dietary energy and protein on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine Vet J Suppl* **16**, 74.
- Savage, C.J., McCarthy, R.N. and Jeffcott, L.B. (1993b) Effects of dietary phosphorus and calcium on induction of dyschondroplasia in foals. *Equine Vet J Suppl* **16**, 80.
- Schougaard, H., Falk Ronne, J. and Phillipson, J. (1990) A radiographic survey of tibiotarsal osteochondrosis in a selected population of trotting horses in Denmark and its possible genetic significance. *Equine Vet J* **22**, 288-289.
- Semevolos, S.A., Brower-Toland, B.D., Bent, S.J. and Nixon, A.J. (2002) Parathyroid hormone-related peptide and indian hedgehog expression patterns in naturally acquired equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **20**, 1290-1297.
- Semevolos, S.A., Nixon, A.J. and Brower-Toland, B.D. (2001) Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II, and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis. *Am J Vet Res* **62**, 1088-1094.
- Semevolos, S.A., Nixon, A.J. and Strassheim, M.L. (2004) Expression of bone morphogenetic protein-6 and -2 and a bone morphogenetic protein antagonist in horses with naturally acquired osteochondrosis. *Am J Vet Res* **65**, 110-115.
- Semevolos, S.A., Strassheim, M.L., Haupt, J.L. and Nixon, A.J. (2005) Expression patterns of hedgehog signaling peptides in naturally acquired equine osteochondrosis. *J Orthop Res* **23**, 1152-1159.
- Shapiro, F. (1998) Epiphyseal and physeal cartilage vascularization: a light microscopic and tritiated thymidine autoradiographic study of cartilage canals in newborn and young postnatal rabbit bone. *Anat Rec* **252**, 140-148.
- Shapiro, F., Holtrop, M.E. and Glimcher, M.J. (1977) Organization and cellular biology of the perichondrial ossification groove of ranvier: a morphological study in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* **59**, 703-723.
- Shingleton, W.D., Mackie, E.J., Cawston, T.E. and Jeffcott, L.B. (1997) Cartilage canals in equine articular/epiphyseal growth cartilage and a possible association with dyschondroplasia. *Equine Vet J* **29**, 360-364.

- Siffert, R.S. (1981) Classification of the osteochondroses. *Clin Orthop Relat Res*, 10-18.
- Skawina, A., Litwin, J.A., Gorczyca, J. and Miodonski, A.J. (1994) Blood vessels in epiphyseal cartilage of human fetal femoral bone: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Anat Embryol (Berl)* **189**, 457-462.
- Sokoloff, L. (1990) Acquired chondronecrosis. *Ann Rheum Dis* **49**, 262-264.
- Sonnichsen, H.V., Kristoffersen, J. and Falk-Ronne, J. (1982) Joint mice in the fetlock joint--osteochondritis dissecans. *Nordisk veterinærmedicin* **34**, 399-403.
- Speer, D.P. (1982) Collagenous architecture of the growth plate and perichondrial ossification groove. *J Bone Joint Surg Am* **64**, 399-407.
- Stevens, A. and Lowe, J. (1997) Musculoskeletal system : bone and joints. In: *Human histology, 2nd Ed.*, Ed: L. Cook, Mosby, Philadelphia. pp 234-250.
- Stewart, R.H., Reed, S.M. and Weisbrode, S.E. (1991) Frequency and severity of osteochondrosis in horses with cervical stenotic myelopathy. *Am J Vet Res* **52**, 873-879.
- Stromberg, B. (1979) A review of the salient features of osteochondrosis in the horse. *Equine Vet J* **11**, 211-214.
- Sundaramurthy, S. and Mao, J.J. (2006) Modulation of endochondral development of the distal femoral condyle by mechanical loading. *J Orthop Res* **24**, 229-241.
- Sweat, F., Puchtler, H. and Rosenthal, S.I. (1964) Sirius Red F3ba as a Stain for Connective Tissue. *Archives of pathology* **78**, 69-72.
- Thorp, B.H., Ekman, S., Jakowlew, S.B. and Goddard, C. (1995) Porcine osteochondrosis: deficiencies in transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I. *Calcif Tissue Int* **56**, 376-381.
- Torre, F. and Motta, M. (2000) Osteochondrosis of the tarsocrural joint and osteochondral fragments in the fetlock joints: incidence and influence on racing performance in a selected group of Standardbred Trotters. In: *AAEP Proceedings. Vol. 46*. pp 287-294.
- Trotter, G.W. (1986) Incidence and diagnosis of osteochondrosis. *Proc Vet Surg Forum* **14**, 6.
- Uhlhorn, H., Dalin, G., Lundeheim, N. and Ekman, S. (1995) Osteochondrosis in wild boar-Swedish Yorkshire crossbred pigs (F2 generation). *Acta Vet Scand* **36**, 41-53.

- Valentino, L.W., Lillich, J.D., Gaughan, E.M. (1999) Radiographic prevalence of osteochondrosis in yearling feral horses. *Vet Comp Orthop Trauma* **12**, 151.
- Van de Lest, C.H., Brama, P.A., van El, B., DeGroot, J. and van Weeren, P.R. (2004) Extracellular matrix changes in early osteochondrotic defects in foals: a key role for collagen? *Biochim Biophys Acta* **1690**, 54-62.
- van den Hoogen, B.M., van de Lest, C.H., van Weeren, P.R., van Golde, L.M. and Barneveld, A. (1999) Changes in proteoglycan metabolism in osteochondrotic articular cartilage of growing foals. *Equine Vet J Suppl*, 38-44.
- Van Weeren, P.R. (2006a) Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). *Clin Tech Equine Pract* **5**, 248-258.
- Van Weeren, P.R. (2006b) Osteochondrosis. In: *Equine Surgery (ed 3)*, Eds: J.A. Auer and J.A. Stick, Saunders Elsevier, St. Louis, MO. pp 1166-1178.
- van Weeren, P.R. and Barneveld, A. (1999a) The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal. *Equine Vet J Suppl*, 16-25.
- Van Weeren, P.R. and Barneveld, A. (1999b) Study design to evaluate the influence of exercise on the development of the musculoskeletal system of foals up to age 11 months. *Equine Vet J Suppl*, 4-8.
- Van Weeren, P.R., Knaap, J. and Firth, E.C. (2003) Influence of liver copper status of mare and newborn foal on the development of osteochondrotic lesions. *Equine Vet J* **35**, 67-71.
- van Weeren, P.R., Sloet van, O.-O. and Barneveld, A. (1999) The influence of birth weight, rate of weight gain and final achieved height and sex on the development of osteochondrotic lesions in a population of genetically predisposed Warmblood foals. *Equine Vet J Suppl*, 26-30.
- Vivrette, S.L., Reimers, T.J. and Krook, L. (1984) Skeletal disease in a hypothyroid foal. *Cornell Vet* **74**, 373-386.
- Voûte, L.C., Henson, F.M.D., Platt, D. and al, e. (1997) Lesions of the lateral trochlear ridge of the distal femur in ponies with histological features of equine dyschondroplasia. In: *Scientific Proceedings, 36th Congress of the British Equine Veterinary Association*, Harrogate, UK. pp 153-154.
- Wagner, P.C., Grant, B.D., Watrous, B.J., Appell, L.H. and Blythe, L.L. (1985) A study of the heritability of cervical vertebral malformation in horses. *Proc Am Assoc Equine Pract* **31**, 43-50.

- Wang, Y.C. (1975) Intrachondral microcirculation and cartilage growth : cartilage and bone development during the embryonic stage *Chin. Med. J.* **1**, 449-460.
- Wardale, R.J. and Duance, V.C. (1994) Characterisation of articular and growth plate cartilage collagens in porcine osteochondrosis. *J Cell Sci* **107 (Pt 1)**, 47-59.
- Weiss, C., Rosenberg, L. and Helfet, A.J. (1968) An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* **50**, 663-674.
- Whitton, R.C. (1998) Equine developmental osteochondral lesions: the role of biomechanics. *Vet J* **156**, 167-168.
- Wilsman, N.J. and Van Sickle, D.C. (1970) The relationship of cartilage canals to the initial osteogenesis of secondary centers of ossification. *Anat Rec* **168**, 381-391.
- Wilsman, N.J. and Van Sickle, D.C. (1972) Cartilage canals, their morphology and distribution. *Anat Rec* **173**, 79-93.
- Won Yoon, J., Kita, Y., Frank, D.J. and al, e. (2002) Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem* **277**, 5548-5555.
- Woodard, J.C., Becker, H.N. and Poulos, P.W., Jr. (1987a) Articular cartilage blood vessels in swine osteochondrosis. *Vet Pathol* **24**, 118-123.
- Woodard, J.C., Becker, H.N. and Poulos, P.W., Jr. (1987b) Effect of diet on longitudinal bone growth and osteochondrosis in swine. *Vet Pathol* **24**, 109-117.
- Wu, C.W., Tchetina, E.V., Mwale, F., Hasty, K., Pidoux, I., Reiner, A., Chen, J., Van Wart, H.E. and Poole, A.R. (2002) Proteolysis involving matrix metalloproteinase 13 (collagenase-3) is required for chondrocyte differentiation that is associated with matrix mineralization. *J Bone Miner Res* **17**, 639-651.
- Xia, Y., Moody, J.B., Alhadlaq, H. and Hu, J. (2003) Imaging the physical and morphological properties of a multi-zone young articular cartilage at microscopic resolution. *J Magn Reson Imaging* **17**, 365-374.
- Xia, Y., Moody, J.B., Burton-Wurster, N. and Lust, G. (2001) Quantitative in situ correlation between microscopic MRI and polarized light microscopy studies of articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, 393-406.

- Yovich, J.V., McIlwraith, C.W. and Stashak, T.S. (1985) Osteochondritis dissecans of the sagittal ridge of the third metacarpal and metatarsal bones in horses. *J Am Vet Med Assoc* **186**, 1186-1191.
- Ytrehus, B., Andreas Haga, H., Mellum, C.N., Mathisen, L., Carlson, C.S., Ekman, S., Teige, J. and Reinholt, F.P. (2004a) Experimental ischemia of porcine growth cartilage produces lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res* **22**, 1201-1209.
- Ytrehus, B., Carlson, C.S., Lundeheim, N., Mathisen, L., Reinholt, F.P., Teige, J. and Ekman, S. (2004b) Vascularisation and osteochondrosis of the epiphyseal growth cartilage of the distal femur in pigs--development with age, growth rate, weight and joint shape. *Bone* **34**, 454-465.
- Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C.S., Teige, J. and Reinholt, F.P. (2004c) Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. *Bone* **35**, 1294-1306.
- Ytrehus, B., Grindflek, E., Teige, J., Stubsoen, E., Grondalen, T., Carlson, C.S. and Ekman, S. (2004d) The effect of parentage on the prevalence, severity and location of lesions of osteochondrosis in swine. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **51**, 188-195.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

Nom de l'étudiant		Code permanent
LECOQ Marie		LECM08577806
Sigle du programme	Titre du programme	Option
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Sciences cliniques

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs	
Marie Lecocq, Christiane Girard, Ursula Fogarty, Guy Beauchamp, Hélène Richard, Sheila Laverty	
Titre	
Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis ?	
Revue	Date de publication
Equine Veterinary Journal	

DECLARATION DES COAUTEURS

Déclaration		
<p>À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que</p> <p>Marie Lecocq inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Changements matriciels dans le cartilage de l'épiphyse en développement : un événement précoce dans la pathogénie de l'ostéochondrose équine ? »</p>		
Coauteur	Signature	Date
Christiane Girard	[Signature]	13/08/07
Coauteur	Signature	Date
Ursula Fogarty	[Signature]	12-07-07
Coauteur	Signature	Date
Guy Beauchamp	[Signature]	15/07/07
Coauteur	Signature	Date
Hélène Richard	[Signature]	12-07-07
Coauteur	Signature	Date
Sheila Laverty	[Signature]	12-07-07
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date