

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

Imagerie multimodale (radiographie numérique, tomодensitométrie, résonance magnétique à 1,5 Tesla) pour l'évaluation des lésions d'ostéoarthrose

par

Maria BOUCHGUA, DMV

Département de Sciences Cliniques
Faculté de Médecine Vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des Etudes Supérieures
En vue de l'obtention du grade
Maître ès Sciences (M.Sc)
en Sciences Vétérinaires
Option Sciences Cliniques

Décembre 2007

© Maria Bouchgua, 2007



Université de Montréal

Faculté des Etudes Supérieures

Ce mémoire intitulé:

Imagerie multimodale (radiographie numérique, tomодensitométrie, résonance magnétique à 1,5 Tesla) pour l'évaluation des lésions d'ostéoarthrose

présenté par:

Maria BOUCHGUA, DMV

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Alexander de Oliveira El Warrak président-rapporteur

Sheila Laverty, directrice de recherche

Kate Alexander, co-directrice

Laurent Blond, membre du jury

Résumé

L'ostéoarthrose, pathologie articulaire dégénérative, présente une pathogénie complexe encore incomplètement élucidée. Afin de mieux comprendre cette maladie et dans le but de pouvoir trouver un traitement efficace inhibant ou ralentissant la dégénérescence de l'articulation, son diagnostic précoce est nécessaire. Par conséquent, une évaluation rapide, aisée, répétable et non-invasive des changements structuraux de l'articulation s'impose. L'utilisation d'outils d'imagerie non-invasifs tels que l'imagerie par résonance magnétique (IRM à haut champ (1.5 Tesla)), combinée à la tomodensitométrie ou computed tomography (CT) pourrait répondre à ces critères.

Cette étude a donc validé la capacité de l'IRM et du CT à détecter les lésions caractéristiques d'ostéoarthrose par comparaison avec les examens macroscopiques et histologiques post-mortem sur un modèle de section du ligament croisé crânial du genou chez le lapin. L'utilisation conjointe de l'IRM et du CT nous a permis d'évaluer *in vivo* et dans le temps les paramètres caractéristiques d'ostéoarthrose. Les ostéophytes, les lésions de la moëlle osseuse, l'espace articulaire latéral, l'épanchement articulaire, et les variations de densité minérale osseuse de l'os sous-chondral ont pu être évalués de façon objective. Cependant, sous les conditions expérimentales de cette étude, le cartilage articulaire, l'évaluation subjective de la sclérose de l'os sous-chondral, l'espace articulaire du compartiment médial de l'articulation ne purent être évalués avec fiabilité.

Mots clés : ligament croisé crânial du genou, imagerie par résonance magnétique (IRM), tomodensitométrie ou computed tomography (CT), ostéoarthrose, lapin.

Abstract

Osteoarthritis, a degenerative joint disease, presents a complex pathogenesis that remains to be fully elucidated. In order to gain a better understanding of this disease and to develop new therapeutic agents that inhibit or delay this degenerative process, its early diagnosis is needed. Therefore, a rapid, easy, repeatable and non-invasive assessment of structural joint changes is required. Non-invasive diagnostic imaging tools as high field magnetic resonance imaging (MRI) (1.5 Tesla) combined to computed tomography (CT) could be useful.

We studied the capacity of MRI and CT to detect osteoarthritic lesions by comparing them to morphologic and histologic post-mortem assessments in a rabbit stifle's cranial cruciate ligament transection model of osteoarthritis. Together, CT and MRI were enable to assess osteoarthritis *in vivo* and over time. They permitted an objective evaluation of osteophytes, bone marrow lesions, joint space width in the lateral compartment of the joint, joint effusion and bone mineral density. However, under our laboratory conditions, articular cartilage, the subjective subchondral bone sclerosis evaluation and minimal joint space width in the medial compartment could not be reliably assessed.

Key-words: stifle's cranial cruciate ligament, magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT), osteoarthritis, rabbit.

Table des Matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des Matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Recension de la littérature.....	3
1-1- <u>L'articulation synoviale saine ou diarthrose</u>	3
1-1-1- Structure générale.....	3
1-1-2- La capsule articulaire et la membrane synoviale.....	3
1-1-3- Le liquide synovial.....	4
1-1-4- Le cartilage articulaire ou cartilage hyalin.....	4
1-1-4-1- Composition biochimique du cartilage articulaire.....	5
1-1-4-1-1- Les chondrocytes.....	5
1-1-4-1-2- La matrice cartilagineuse.....	6
1-1-4-2- Histologie du cartilage articulaire.....	7
1-1-5- L'os sous- chondral.....	9
1-2- <u>L'ostéoarthrose</u>	9
1-2-1- Définition.....	9
1-2-2- Classification.....	10
1-2-3- Epidémiologie.....	10

1-2-4- Pathologie.....	12
1-2-4-1- Les changements macroscopiques.....	12
1-2-4-2- Les changements microscopiques et moléculaires.....	13
1-2-5- Pathogénie.....	15
1-2-5-1- Changements moléculaires du cartilage articulaire.....	16
1-2-5-2- Changements de l'os sous-chondral.....	18
1-2-5-3- Altération des tissus péri-articulaires.....	19
1-2-6- La gestion de l'ostéoartrrose.....	20
1-3- <u>L'imagerie dans le diagnostic des lésions d'ostéoartrrose</u>	21
1-3-1- La radiographie.....	22
1-3-2- La tomodensitométrie.....	24
1-3-3- La résonance magnétique.....	26
1-3-3-1- Principes physiques de l'IRM.....	26
1-3-3-2- Séquences IRM spécifiques à l'évaluation du cartilage articulaire..	29
1-3-3-3- L'IRM et les lésions d'ostéoartrrose.....	31
1-4- <u>Hypothèse et objectif</u>	32
Chapitre 2 : Deux articles.....	34
Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis- Part I.....	35
2-1- <u>Abstract</u>	36
2-2- <u>Introduction</u>	38
2-3- <u>Materials and methods</u>	41
2-4- <u>Results</u>	51
2-5- <u>Discussion</u>	58
2-6- <u>Acknowledgements</u>	65

2-7- <u>References</u>	66
------------------------------	----

Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis- Part II : Bone mineral density assessment.....88

2-1- <u>Abstract</u>	89
----------------------------	----

2-2- <u>Introduction</u>	90
--------------------------------	----

2-3- <u>Materials and methods</u>	93
---	----

2-4- <u>Results</u>	96
---------------------------	----

2-5- <u>Discussion</u>	99
------------------------------	----

2-6- <u>Acknowledgements</u>	104
------------------------------------	-----

2-7- <u>References</u>	105
------------------------------	-----

Chapitre 3: Discussion et conclusion.....120

3-1- Discussion.....	120
----------------------	-----

3-2- Conclusion.....	135
----------------------	-----

Bibliographie.....136

Liste des tableaux**Chapitre 1****Table I**

Système de gradation histologique-histochimique du cartilage articulaire selon (Mankin *et al.* 1971)

Chapitre 2**Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis- Part I****Table I**

Anatomical regions of the knee joints of the rabbits which were assessed with multimodality imaging, macroscopically and histologically

Table II

Summary of parameters evaluated in the knee joints with multimodality imaging, and their respective grades

Table III

Morphologic grade of the articular cartilage. Grade assigned following application of India ink

Table IV

Histological grade

Table V

Sensitivities and specificities of caudocranial CR, coronal (dorsal) CT and coronal (dorsal) MRI to detect osteophytes identified on morphological examination

Table VI

Evolution of bone marrow lesion scores over time for joints presenting a bone marrow lesion at least once, with the joint respective morphologic and histologic grade at euthanasia

Table VII

Sensitivity and specificity of 1.5 Tesla MRI for detection of cartilage lesions in the knee joint

Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis- Part II: Bone mineral density assessment**Table I**

Summary of ANOVA results for the comparisons of BMD in ACLT and sham operated knees relative to baseline measurements

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1

Représentation schématique du réseau de fibres de collagène

Figure 2

Coupe histologique des différentes couches du cartilage articulaire

Chapitre 2

Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis- Part I

Figure 1

Plexiglass mould (A) placed between the hindlimbs to standardize the position of the rabbits' knees throughout the study. The rabbit is under general anesthesia (B) during CT and MRI procedures

Figure 2

Grade 3 osteophytosis on caudocranial (A) and mediolateral (B) CR views, coronal (dorsal) (C) and axial (transverse) (D) CT images, coronal (dorsal) PD-Fat saturation (E) and sagittal SPGR (F) MRI images

Figure 3

Grade 0 (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D) of bone marrow lesions on coronal (dorsal) T2-Fat saturation MRI images

Figure 4

Illustration of the two extreme knee joint effusion scores (grade 0 and 3) on mediolateral CR views (grade 0 (A), grade 3 (B)), axial (transverse) CT images (grade 0 (C), grade 3(D)), and sagittal SPGR MRI images (grade 0 (E), grade 3 (F))

Figure 5

Sagittal SPGR MRI image of the knee joint, showing the site where articular cartilage thickness was measured

Figure 6

Total joint osteophyte scores on coronal (dorsal) CT examination

Figure 7

Minimal joint space width measurements for each joint over time on MRI

Figure 8

Joint effusion score for each joint over time on CT

Figure 9

Total joint gross morphologic (A) and histologic (B) scores following application of India ink for each group

Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis- Part II: Bone mineral density assessment

Figure 1

Region of interests for the measurement of bone mineral density in each femoral condyle (a, c) and tibial plateau (b, d) on the axial (transverse) CT sections. The phantom is composed of 5 parallel rods of different reference materials: water, K_2HPO_4 in concentrations of 50, 100, 200 mg/ml, and a high density polyethylene

Figure 2

Coronal (dorsal) CT image illustrating the depths at which bone mineral density was measured in the distal femoral and proximal tibial epiphyses

Figure 3

Evolution of bone mineral density over time in each compartment and for each depth for the control group

Figure 4

Temporal variation of bone mineral density measurements at various depths from the articular surface in the anterior cruciate ligament transection (ACLT) joints

Figure 5

Temporal variation of bone mineral density measurements at various depths from the articular surface in each joint compartment in the sham group

Liste des sigles et des abréviations

AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ACLT	<i>Anterior Cruciate Ligament Transection</i> , section du ligament croisé cranial
B ₀	Champ magnétique
CR	<i>Computed Radiography</i> , radiographie numérique
CT	<i>Computed Tomography</i> , Tomodensitométrie
2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
DEXA	Dual energy X-ray absorptiometry
DMOADs	<i>Disease Modifying Osteoarthritis Drugs</i> , médicament modifiant l'évolution de l'ostéoarthrose
DP	Densité de protons
3D-SPGR	3-Dimensional Spoiled Gradient Echo
FSE	Fast Spin Echo
GAG's	<i>Glycosaminoglycans</i> , Glycosaminoglycanes
GRE	<i>Gradient recalled echo</i> , écho de gradient 'rapides'
g/cm ²	Gramme par centimètre carré
H ⁺	Proton
HHGS	<i>Histologic-histochemical gradation system</i> , Système de gradation histologique-histochimique
HU	<i>Hounsfield Unit</i> , Unité Hounsfield
ICRS	International Cartilage Repair Society
IL	<i>Interleukin</i> , Interleukine
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
K ₂ HPO ₄	Phosphate de dipotassium
MEC	Matrice extra-cellulaire
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i> , Métalloprotéinases matricielles
NO	<i>Nitric oxyde</i> , Oxyde nitrique

PACS	Picture Archiving and Communication System
qCT	quantitative Computed Tomography
RF	Radiofréquence
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SMOADS	<i>Symptoms Modifying Osteoarthritis Drugs</i> , médicaments modifiant les symptômes de l'ostéoarthrose
STIR	<i>Short-tau inversion recovery</i>
T ₁	Relaxation longitudinale
T ₂	Relaxation transversale
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i> , Facteur de croissance transformant- β
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i> , Inhibiteur tissulaire de métalloprotéinases
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i> , Facteur onconécrosant α
TR	Temps de relaxation
WORMS	Whole-Organ Resonance Magnetic Imaging

Remerciements

A Dr Sheila Laverty

Pour m'avoir encadré dans ce projet de maîtrise, m'avoir transmis son enthousiasme pour la recherche et m'avoir toujours appris à aller de l'avant.

A Dr Kate Alexander

Pour m'avoir également encadré dans ce projet de maîtrise, renforcé mon intérêt pour l'imagerie médicale, pour sa patience et ses encouragements.

A Dr Marc André d'Anjou et à Dre Christiane Girard

Pour leur participation à ce projet et leur disponibilité.

A Hélène Richard

Pour sa disponibilité, son savoir-faire, sa patience et ses précieux conseils.

A Dr Eric Norman Carmel

Pour son investissement à la partie technique imagerie de ce projet de maîtrise.

A Guy Beauchamp

Pour le précieux travail d'analyses statistiques.

A Dr Alexander de Oliveira El Warrak

Pour avoir accepté de présider notre jury.

A Dr Laurent Blond

Pour avoir accepté de participer à notre jury.

Au Réseau Canadien de l'Arthrite

Pour le financement du projet.

Introduction

L'ostéoarthrose, processus articulaire dégénératif, est une pathologie affectant l'organe dans sa globalité, toutes les structures constituant l'articulation synoviale à savoir non seulement le cartilage articulaire, mais également l'os sous-chondral et les tissus mous environnants.

Le dernier recensement publié par le Réseau Canadien de l'Arthrite rapporte en 2005 que 4 millions de canadiens souffrent d'ostéoarthrose. Etant donné la complexité de cette pathologie, il n'existe pas encore aujourd'hui de traitements permettant d'interrompre ni de ralentir l'évolution de cette maladie. Seuls des thérapeutiques masquant les symptômes sont actuellement disponibles sur le marché. Le développement de nouvelles technologies suffisamment sensibles et spécifiques pour détecter de façon précoce toute modification de l'articulation est donc nécessaire. La validation de ces outils est également impérative pour évaluer le potentiel des nouvelles molécules de l'industrie pharmaceutique. L'imagerie médicale non-invasive est intensivement exploitée pour répondre à ce besoin. La radiographie est la première technologie non-invasive et diagnostique d'ostéoarthrose chez l'humain et reste encore la plus utilisée. Cependant, dû à ses propriétés intrinsèques, la radiographie manque de sensibilité et de spécificité pour évaluer l'intégrité d'une articulation et notamment pour évaluer l'état du cartilage articulaire. La tomодensitométrie ou 'computed tomography' (CT) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont utilisées en médecine humaine pour évaluer les changements structuraux des articulations atteintes d'ostéoarthrose, mais également dans les modèles animaux d'ostéoarthrose. Cependant, aucune étude ne s'est encore penchée

sur l'utilisation dans le temps et *in vivo* de l'IRM à 1.5Tesla pour quantifier, chez le lapin, le degré de destruction d'une articulation engendrée par l'ostéoarthrose. De même, le CT n'a pas encore fait l'objet d'outil de mesure de l'évolution de la densité minérale osseuse, à différents niveaux de l'os sous-chondral, dans un modèle expérimental animal d'ostéoarthrose, à la fois *in vivo* et dans le temps en utilisant chaque animal comme sa propre référence.

L'objet de notre étude est donc de valider la capacité de deux équipements cliniques, le CT et de l'IRM 1.5Tesla, à identifier *in vivo* les changements précoces d'ostéoarthrose et leur progression dans un modèle d'ostéoarthrose induit par section du ligament croisé crânial dans un genou de lapin. Cette validation s'est faite par comparaison des images obtenues avec un examen macroscopique et histologique post-mortem de l'articulation du genou suivant la dernière session d'imagerie. Si ces techniques cliniques d'imagerie répondent à notre objectif, il serait extrêmement intéressant dans le futur de les exploiter pour évaluer *in vivo*, sur des modèles expérimentaux d'ostéoarthrose, l'efficacité dans le temps des nouveaux composés pharmaceutiques conçus pour traiter les patients ostéoarthrosiques.

Chapitre 1 : Recension de la littérature

1-1- L'articulation synoviale saine ou diarthrose

1-1-1- Structure générale

L'articulation synoviale ou diarthrose est constituée de deux surfaces osseuses ou plus, sur lesquelles se trouve le cartilage hyalin ou cartilage articulaire. Pour permettre à une articulation de jouer sa pleine fonction de structure mobile, d'autres éléments sont nécessaires à sa constitution. En effet, en plus des os et du cartilage hyalin, la capsule articulaire ainsi que la membrane synoviale, le liquide synovial, les ligaments, les muscles, et les ménisques dans le cas de l'articulation du genou, permettent ensemble la stabilité, la mobilité et l'absorption des forces lors des mouvements (Dewire and Einhorn 2001).

1-1-2- La capsule articulaire et la membrane synoviale

La capsule articulaire est un tissu conjonctif fibreux, tapissé au niveau de sa couche interne par la membrane synoviale. La membrane synoviale est un épithélium sécrétoire, constitué de une à quatre assises de cellules. Trois types cellulaires sont décrits dans la membrane synoviale : les cellules de type A qui sont phagocytaires, les cellules de type B synthétisant l'acide hyaluronique (Dewire and Einhorn 2001) et les cellules de type C qui sont les précurseurs des types A et B. La membrane synoviale est richement vascularisée, innervée et possède un abondant réseau lymphatique. (Dewire and Einhorn 2001; Stevens and Lowe 1997). Elle est responsable de la production du liquide synovial.

1-1-3- Le liquide synovial

Le liquide synovial est un ultra-filtrat du plasma. Il est composé d'acide hyaluronique, de glycoprotéines (la lubricine) et de cellules (des monocytes, des macrophages et des lymphocytes) (Dewire and Einhorn 2001). L'acide hyaluronique et la lubricine sont responsables de la viscosité du liquide synovial. La lubricine est synthétisée par les chondrocytes et les synoviocytes (Rhee *et al.* 2005). L'acide hyaluronique résulte de la polymérisation de la glucosamine et des glucuronates par la hyaluronane synthase (Dewire and Einhorn 2001).

Cette viscosité permet au liquide synovial d'agir comme lubrifiant des surfaces articulaires, de supporter les forces de cisaillement et d'absorber l'énergie générée lors des mouvements. Le liquide synovial sert également de milieu de transport pour fournir par diffusion les nutriments aux chondrocytes du cartilage articulaire (Dewire and Einhorn 2001).

1-1-4- Le cartilage hyalin ou cartilage articulaire

Le cartilage hyalin est une forme de tissu conjonctif où les cellules sont incluses dans des lacunes creusées au sein d'une substance amorphe, la matrice extracellulaire, sous tendue par des faisceaux de collagène. Il a un rôle de support structural, de protection mécanique et de participation aux mouvements. Le cartilage articulaire chez l'adulte est caractérisé par l'absence de vaisseau sanguin, de vaisseau lymphatique et de nerf (Sandell and Hering 2001). Par conséquent, sa nutrition se fait par diffusion à partir du liquide synovial (Dewire and Einhorn 2001).

1-1-4-1- Composition biochimique du cartilage articulaire

1-1-4-1-1 Les chondrocytes

La taille, la forme et le nombre de chondrocytes par unité de volume de tissu varie de la surface à la profondeur du cartilage. Ceux qui sont situés en surface sont plus petits et plus plats. Chez l'adulte, ils représentent moins de 5% du volume du cartilage, le reste étant occupé par la matrice extracellulaire (Poole *et al.* 2002). Un chondrocyte entouré de sa matrice extracellulaire est un chondrone (Poole 1997). Un chondrone peut contenir deux chondrocytes. Au niveau de la couche superficielle du cartilage articulaire, les chondrocytes appariés à l'intérieur d'un chondrone communiquent entre eux via des jonctions gap. Cette communication permet aux chondrocytes de coordonner leur réponse lors d'altération de la matrice extracellulaire. En revanche les chondrocytes isolés ne communiquent pas entre eux (Chi *et al.* 2004).

Les chondrocytes sont responsables de la synthèse et de l'entretien de la matrice extracellulaire. L'état de cette dernière a une influence directe sur la fonction des chondrocytes. En effet, les chondrocytes sont très sensibles aux variations mécaniques et chimiques de leur environnement (DiMicco *et al.* 2003). Ce dernier peut influencer l'activité des chondrocytes dans le sens de la synthèse ou de la dégradation de la matrice extracellulaire. Il y a donc une réelle symbiose entre les chondrocytes et la matrice.

Durant la croissance du cartilage, les chondrocytes prolifèrent rapidement, mais avec l'âge, le pouvoir mitotique des chondrocytes diminue, ainsi que leur capacité de synthèse et d'assemblage des différents composants de la matrice extracellulaire (Buckwalter and C.Mow 1992).

1-1-4-1-2- La matrice cartilagineuse

La matrice cartilagineuse ou matrice extracellulaire est constituée d'une phase liquide, l'eau pour 65 à 80%, et d'une phase solide, dont l'élément structural majeur est le collagène de type II (Poole 1997). Elle est responsable des propriétés biomécaniques remarquables du cartilage articulaire.

• Le collagène

Plus de 50% du poids sec du cartilage articulaire adulte est composé de collagène (Mankin and Brandt 1992). Le collagène est une protéine fibrillaire qui par son organisation en un réseau de fibrilles donne au cartilage sa forme et lui confère sa résistance à la compression (Buckwalter and Mankin 1998; Poole 2001). Différents types

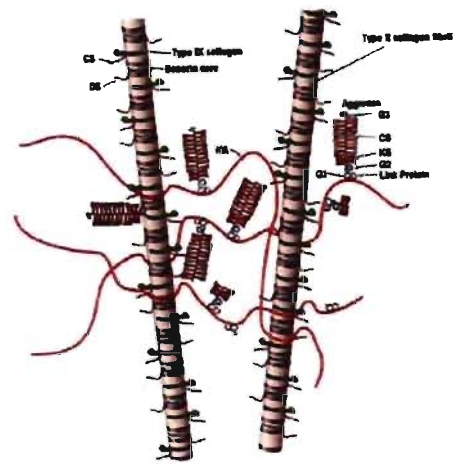


Fig 1 : Représentation schématique du réseau de collagène, selon Poole et al 2001

de collagène sont présents dans le cartilage articulaire en des proportions différentes. On retrouve les types II, V, VI, IX, X, et XI, le type II étant majoritaire. Le collagène de type IX est lié aux fibrilles de collagène de type II, et joue ainsi un rôle important dans l'organisation de la matrice (Fassler *et al.* 1994).

Le collagène de type II est synthétisé par les chondrocytes sous sa forme précurseur: le procollagène de type II qui est agencé en triple hélice. Une fois sécrétée dans la matrice extracellulaire, le procollagène subit une action enzymatique pour former les fibrilles de collagène de type II. Ce collagène forme une trame dans laquelle se

trouvent emprisonnées des protéoglycanes, et d'autres protéines collagéniques et non collagéniques qui participent au maintien et à l'intégrité du cartilage (Buckwalter *et al.* 2005).

• Les protéoglycanes

La principale protéoglycane est l'aggrécane. Elle est synthétisée par les chondrocytes, et est constituée d'une protéine à laquelle sont rattachés des glycosaminoglycanes ou « GAG's ». L'aggrécane est également reliée à l'acide hyaluronique, et ce par des protéines de liaison.

Les GAG's sont essentiellement des chondroïtines sulfates et des kératanes sulfates qui sont responsables de la charge négative des protéoglycanes. Ces charges négatives sont responsables de l'expansion du cartilage. En effet, l'expansion du cartilage s'explique par deux principes. Premièrement, les charges négatives se repoussent entre elles, et deuxièmement, elles attirent les molécules d'eau qui sont chargées positivement. Cette eau crée l'hydratation de la matrice et donc son gonflement. Cette propriété de gonflement de la matrice permet au cartilage de résister à la déformation et à la compression (Poole *et al.* 2002).

1-1-4-2- Histologie du cartilage articulaire

Le cartilage articulaire peut être différencié en quatre zones ou couches depuis sa superficie jusqu'à l'os sous-chondral. La première couche est la *zone superficielle ou tangentielle* qui est composée essentiellement de fibres de collagène de type II. Ces fibres sont disposées parallèlement à la surface articulaire et sont responsables de la résistance du cartilage face aux forces de cisaillement, de compression et de tension

qui peuvent être exercées au niveau d'une articulation. La deuxième couche est la *zone transitionnelle ou intermédiaire* suivie de la *zone radiale* où les chondrocytes sont alignés en colonne perpendiculairement à la surface articulaire. En profondeur à la zone radiale, le cartilage commence à se calcifier. La jonction entre le cartilage hyalin et le cartilage calcifié est la «*tidemark*». Elle se distingue par la coloration à l'hématoxyline-éosine. Sous la «*tidemark*», se trouve donc la *zone calcifiée* qui permet l'attache du cartilage à l'os sous-chondral. Plus on atteint les couches profondes du cartilage articulaire chez l'adulte, plus la densité cellulaire, le contenu en eau et en collagène diminue, alors que l'aggrécane se trouve en plus grande quantité (Poole 1997).

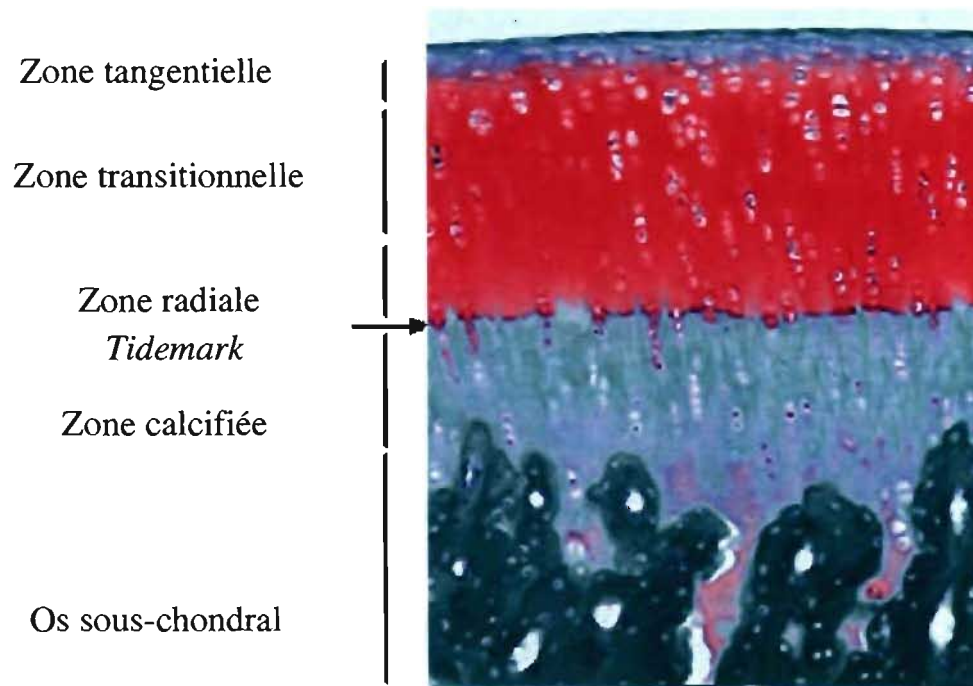


Fig 2. coupe histologique (Safranin O-fast Green) des différentes couches du cartilage articulaire – selon Spriet 2004.

1-1-5- L'os sous-chondral

L'os sous-chondral permet la jonction entre le cartilage articulaire et l'os spongieux sous-jacent. Il agit comme une barrière et empêche ainsi l'apport sanguin et de nutriments du milieu osseux vers le cartilage. L'os sous-chondral a une densité osseuse semblable à celle de l'os cortical, mais ses propriétés de compliance sont plus élevées. Ainsi sa légère capacité à pouvoir se déformer contribue à la répartition des charges sur la surface articulaire (Woo *et al.* 1992). Le remodelage de l'os sous-chondral consiste en un épaissement et une augmentation de densité de celui-ci, avec pour conséquence une répartition anormale des charges sur le cartilage articulaire. C'est une des hypothèses pour l'initiation du processus d'ostéoarthrose (Woo *et al.* 1992).

1-2- L'ostéoarthrose

1-2-1- Définition

L'ostéoarthrose ou ostéoarthrite consiste en une dégénérescence de l'articulation, à savoir une perte générale et progressive du cartilage articulaire, accompagnée de changements des tissus environnants constituant l'articulation.

En plus des changements structuraux de l'articulation synoviale, le diagnostic clinique d'ostéoarthrose nécessite la présence de symptômes tels que la douleur articulaire, la restriction de l'amplitude de mouvements, l'épanchement articulaire et la déformation de l'articulation (Buckwalter *et al.* 2005; Flores and Hochberg 2003).

1-2-2- Classification

On différencie l'ostéoarthrose primaire ou idiopathique de l'ostéoarthrose secondaire (Flores and Hochberg 2003; Sharma 2001). L'ostéoarthrose idiopathique chez l'Homme est plus fréquente que l'ostéoarthrose secondaire, et se développe en l'absence de cause connue (Buckwalter *et al.* 2005). De nombreuses suggestions ont été émises concernant la pathogénie de l'ostéoarthrose primaire chez l'humain, à savoir l'âge, les prédispositions génétiques, l'inflammation, les désordres hormonaux, métaboliques et immunologiques (Felson 2004; Sharma 2001). Cependant sa raison d'être reste encore inexpliquée. En revanche, l'ostéoarthrose secondaire chez l'Homme et chez les animaux est attribuée à de nombreuses causes telles qu'un trauma, une infection, des désordres héréditaires ou neurologiques (Flores and Hochberg 2003). L'ostéoarthrose secondaire peut donc se rencontrer autant chez l'adulte que chez l'enfant. Par contre, on observe que la prévalence de l'ostéoarthrose primaire augmente avec le vieillissement (Felson 2004; Sharma 2001).

1-2-3- Epidémiologie

L'ostéoarthrose est la maladie articulaire la plus commune chez l'Homme (Cooper 1998). Selon un rapport sur la prévalence de l'ostéoarthrose, une augmentation de 57% du nombre de personnes souffrant d'ostéoarthrose est à prévoir pour 2020 ainsi qu'une augmentation de 66% de la limitation d'activité liée à l'ostéoarthrose (Felson 2003). Ceci s'expliquerait par le vieillissement de la population américaine (Felson 2003).

Quatre millions de canadiens sont atteints d'ostéarthrose. Cette pathologie constitue un fardeau économique estimé annuellement à 15 milliards de dollars, coûts reliés aux soins de santé (Bulletin du Réseau Canadien de l'Arthrite mars 2005).

La prévalence de l'ostéarthrose varie selon les études car les définitions symptomatiques et radiographiques de l'ostéarthrose sont inconstantes (Felson 2003). Cependant, comparativement aux hommes, la prévalence est plus élevée chez les femmes de plus de 50 ans. L'influence hormonale post-ménopause en serait responsable (Sharma 2001).

L'ostéarthrose a également un impact majeur sur la qualité de vie et sur les performances athlétiques de nos animaux domestiques. Cette maladie dégénérative articulaire est une cause importante de boiterie. En effet, une étude réalisée sur des chevaux présentés pour boiterie, a montré qu'environ 40% de ces chevaux souffraient d'ostéarthrose (Todhunter 1996). Une autre enquête réalisée en 1996 auprès de 200 vétérinaires a estimé que 20% de la population canine de plus d'un an d'âge souffre d'ostéarthrose (Johnston 1997). En effet, chez les chiens, plusieurs pathologies musculo-squelettiques telles que la rupture du ligament croisé crânial du genou, des fractures intra-articulaires (fracture du condyle huméral, de la tête fémorale), des maladies développementales (ostéochondrose, dysplasie de la hanche et du coude) peuvent directement affecter l'intégrité d'une articulation, et aboutir à des lésions d'ostéarthrose (Martinez and Coronado 1997).

1-2-4- Pathologie

1-2-4-1- Les changements macroscopiques

Le cartilage d'une articulation synoviale saine apparaît comme une surface régulière, luisante, ferme et bien lisse. Lors d'ostéoarthrose, des lésions peuvent être visibles macroscopiquement. Ces lésions auront un grade de sévérité de plus en plus important au cours de l'avancement de la pathologie. Afin de mieux visualiser ces lésions, des colorations à l'encre de Chine sont réalisées. Les premières lésions visibles macroscopiquement sont les lésions dites de *fibrillation*. Elles se localisent à la surface du cartilage articulaire et se définissent par une atteinte de la couche superficielle du cartilage articulaire. La fibrillation correspond en une déchirure superficielle de la matrice extracellulaire, déchirure qui se fait verticalement (Hough 2001). En effet, lors d'ostéoarthrose, la perte de protéoglycanes de la matrice extracellulaire altère les propriétés de perméabilité hydraulique du cartilage, par conséquent ceci interfère avec la lubrification de l'articulation et entraîne plus de lésions mécaniques pour le cartilage. Cette perte de protéoglycanes et cette altération de lubrification de la surface articulaire induisent une perturbation au niveau des fibres de collagène de la surface du cartilage articulaire. Les zones de cartilage atteintes, sont de couleur brun-jaune et ont une apparence émoussée, légèrement rugueuse. Lorsque la fibrillation s'accompagne d'une perte partielle d'épaisseur du cartilage, on parle d'*érosion* cartilagineuse. Ultérieurement à la fibrillation et à l'érosion, il se produit une nécrose des chondrocytes dans la zone radiale du cartilage, rendant le cartilage hypocellulaire.

En réponse à la fibrillation, à l'érosion et à la nécrose des chondrocytes, les chondrocytes persistants vont former des clones : on parle d'hyperplasie régénérative. Cependant, chez l'adulte cette capacité des chondrocytes à se diviser est limitée, et donc la régénérescence est souvent inefficace. Les lésions peuvent progresser encore plus profondément au sein du cartilage articulaire, jusqu'à la perte de cartilage articulaire et exposition de l'os sous-chondral ; c'est l'*ulcération*. L'état le plus endommagé de l'articulation est l'*éburnation*, lorsque les frottements en continu sur l'os sous-chondral le rendent dense, poli avec une couleur ivoire (Weisbrode and Doidge 2001).

1-2-4-2- Les changements microscopiques et moléculaires

Le premier changement morphologique est l'œdème de la couche superficielle qui a pour conséquence un étirement et un amincissement de cette zone (Pritzker 2003). Les fibres de collagène deviennent donc plus susceptibles aux dommages ce qui entraîne une augmentation de l'apoptose et de la nécrose des chondrocytes. Ceci entraîne donc une réduction de la population chondrocytaire et ainsi une diminution de la capacité à sécréter et à maintenir une matrice extracellulaire fonctionnelle. Le cartilage est alors encore plus sensible aux forces externes. Un cercle vicieux est installé (Pritzker 2003).

Tant que la dégradation de la matrice extracellulaire est limitée à la déplétion des protéoglycanes, les lésions du cartilage sont réversibles. Au contraire, la perturbation du réseau de collagène est caractéristique de la progression de la maladie (Pritzker 2003).

La «tidemark» se calcifie en de multiples endroits, et la calcification plus diffuse de la zone calcifiée est un précurseur de l'invasion capillaire et du remodelage de l'os sous-chondral (Hough 2001; Pritzker 2003). Cette pénétration de vaisseaux sanguins au niveau du cartilage contribue au remodelage de ce dernier en fournissant une voie d'entrée directe pour les hormones et les facteurs paracrines des couches les plus profondes du cartilage. La pénétration des vaisseaux sanguins au travers du cartilage calcifié fournit des sites de micro fractures qui s'étendent jusqu'au cartilage. Des fibroblastes croissent à ce niveau là, induisent de la métaplasie cartilagineuse et élaborent une matrice fibreuse contenant du collagène de type I .

Les lésions du cartilage sont visibles microscopiquement grâce à des systèmes de colorations qui permettent une gradation histologique histochimique HHGS: c'est le score de Mankin.

HISTOLOGICAL-HISTOCHEMICAL GRADING *			
		Grade	Grade
I. Structure			
a. Normal		0	
b. Surface irregularities		1	
c. Pannus and surface irregularities		2	
d. Clefts to transitional zone		3	
e. Clefts to radial zone		4	
f. Clefts to calcified zone		5	
g. Complete disorganization		6	
II. Cells			
a. Normal		0	
b. Diffuse hypercellularity		1	
c. Cloning		2	
d. Hypocellularity		3	
III. Safranin-O staining			
a. Normal			0
b. Slight reduction			1
c. Moderate reduction			2
d. Severe reduction			3
e. No dye noted			4
IV. Tidemark integrity			
a. Intact			0
b. Crossed by blood vessels			1

Table I : Système de gradation histologique-histochimique du cartilage articulaire selon (Mankin *et al.* 1971)

Ce système est critiqué pour sa difficulté à distinguer les lésions intermédiaires du cartilage articulaire (Ostergaard *et al.* 1999). Ce score s'échelonne de 0 (cartilage sain) à 14 (lésions les plus sévères). Il estime la structure du cartilage, les cellules, la coloration par la Safranine-O, et l'intégrité de la «tidemark» (Ostergaard, K., C. B. Andersen, et al. 1999).

Il existe différents systèmes de coloration pour mettre en évidence les lésions cartilagineuses. La Safranine O est un colorant qui fixe de façon sélective les protéoglycanes de la matrice extracellulaire (Kalscheur 2001). Plus les lésions sont sévères, moins la coloration est intense.

1-2-5-Pathogénie

La dégénérescence articulaire implique tous les tissus qui forment l'articulation, incluant donc l'os sous-chondral, le cartilage articulaire, la membrane synoviale, la capsule articulaire, les ligaments et les muscles. Les premiers changements macroscopiques consistent en une perte du cartilage articulaire, un remodelage de l'os sous-chondral et une formation d'ostéophytes. Toutefois, une controverse est encore présente quant à la pathogénie de cette maladie. En effet, il existe actuellement deux théories. La première est que la perte du cartilage articulaire induit une augmentation des stress sur l'os sous-chondral ce qui entraîne un remodelage de ce dernier. La deuxième est que le durcissement de l'os sous-chondral résultant du remodelage précède et cause la dégénérescence du cartilage articulaire (Buckwalter *et al.* 2005). Ces deux hypothèses sont détaillées ci-dessous (section 1-2-5-1 et 1-2-5-2).

1-2-5-1- Changements moléculaires du cartilage articulaire

Au sein d'une articulation synoviale saine, il existe un équilibre entre les processus continus de production et de dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage articulaire. En cas d'ostéoarthrose, cet équilibre est rompu. Les mécanismes responsables de la rupture de cette homéostasie restent encore incomplètement élucidés, mais ils peuvent être divisés en trois étapes qui se chevauchent : une altération de la matrice extracellulaire (MEC), la réponse des chondrocytes aux dommages tissulaires, et la diminution de la synthèse de la MEC par les chondrocytes (Buckwalter *et al.* 2005).

Avant ou pendant la fibrillation du cartilage articulaire, la trame de la MEC est désorganisée, et son contenu en eau augmente. Cette désorganisation s'explique par une diminution de l'agrégation des protéoglycanes, une diminution de la concentration en aggrecane, et de la longueur des chaînes de glycosaminoglycanes. La concentration de collagène de type II reste cependant constante. Simultanément, les altérations de la trame de collagène entraînent le gonflement des molécules d'aggrecane. Les chondrocytes détectent ces modifications de la matrice extracellulaire, et libèrent des médiateurs qui stimulent la réponse des chondrocytes. Cette réponse consiste en une activité catabolique et anabolique, ainsi qu'en une prolifération des chondrocytes. Ils deviennent hypertrophiques et synthétisent du collagène de type X responsable de la calcification du cartilage articulaire. Ces chondrocytes hypertrophiés peuvent par la suite subir le phénomène d'apoptose comme cité plus loin dans ce mémoire.

Les produits de dégradation de la MEC, entre autres des fragments de fibronectine et des fragments de collagène de type II, induisent la production de cytokines : des interleukines (IL-1 β la plus importante) et un facteur onconécrosant (TNF α) (Poole *et al.* 2002).

Les cytokines (IL-1 β et TNF α) stimulent les chondrocytes qui vont synthétiser de l'oxyde nitrique NO en quantité plus importante que dans une articulation synoviale saine. Le NO va diffuser rapidement et induire également la production d'IL-1 qui stimule l'expression de métalloprotéases ou métalloprotéinases MMPs (Poole *et al.* 2002). Les chondrocytes hypertrophiés renforcent aussi la synthèse des métalloprotéases. Les métalloprotéases dégradent le collagène de type IX et XI, ce qui déstabilise la trame de collagène de type II et favorise l'augmentation du contenu en eau de la matrice extracellulaire. Vingt-sept métalloprotéases sont connues, dont la MMP-13 qui aurait le plus grand rôle dans la pathologie de l'ostéoarthrose (Poole *et al.* 2002). Ces MMPs sont subdivisées en collagénases, gélatinases, stromelysines et autres (Brandt 2003). L'action de ces MMPs est régulée par la sécrétion de proenzymes qui les activent (IL-1) ou qui les inhibent (les Tissue Inhibitors of Metalloproteinases TIMPs) (Pearle *et al.* 2005).

Cette dégradation enzymatique va également induire la libération de cytokines anaboliques (TGF β) qui stimulent la synthèse de la matrice extracellulaire et la prolifération des chondrocytes. La réponse de réparation contourne les effets cataboliques des métalloprotéases et stabilise ou restaure les tissus. Cette réponse en tant que réparation peut prendre plusieurs années et chez certains patients inverser temporairement le processus d'ostéoarthrose (Buckwalter *et al.* 2005). Cependant, cette réparation ou stabilisation tissulaire peut échouer. La puissante réponse

catabolique peut dépasser la réponse anabolique et proliférative des chondrocytes, ce qui a pour conséquence une perte progressive du cartilage articulaire. Cette diminution de la réponse des chondrocytes n'est pas encore bien comprise.

C'est donc cette hypothèse de perte du cartilage articulaire qui expliquerait que l'os sous-chondral peut être mis à nu et subir ainsi les forces appliquées directement sur lui, entraînant par conséquent son remodelage.

1-2-5-2- Changements de l'os sous-chondral

Les surcharges exercées au niveau des articulations induisent une augmentation de la densité et de l'épaississement de l'os sous-chondral. Celui-ci devient alors moins apte à répartir les forces, l'excès de charges au niveau du cartilage articulaire qui en résulte, aboutit à des lésions cartilagineuses (Burr 2003). Différentes études supportent cette hypothèse. Simon et son équipe (Simón *et al.* 1972) ont démontré que l'épaississement de l'os sous-chondral suite à la guérison de microfractures causées par des excès de charge au niveau articulaire, précède les lésions du cartilage chez des cochons d'inde. Ceci a également été montré chez l'Homme, où ces microfractures ont pour conséquence un épaississement de l'os sous-chondral qui serait la cause primaire d'ostéoarthrose (Radin 1973). Des études réalisées chez des lapins ont montré un épaississement de l'os sous-chondral 6 mois après un trauma de l'articulation fémoro-patellaire, mais les lésions du cartilage n'étaient visibles histologiquement que 12 mois après ce trauma (Newberry *et al.* 1997). Chez la souris, une autre étude (Benske *et al.* 1988) a montré que les lésions cartilagineuses sont présentes uniquement en regard des zones de sclérose de l'os sous-chondral, ce qui

suggère que l'épaississement de l'os sous-chondral est nécessaire à l'initiation des dommages du cartilage articulaire (Burr 2003; Westacott 2003). Dans une autre étude chez l'Homme, portant sur l'évaluation de l'épaisseur de l'os sous-chondral et de la couche de cartilage calcifié de la patella, les lésions du cartilage articulaire sont aussi bien observées au niveau de zones où l'os sous-chondral est épaissi ou non (Eckstein *et al.* 1998).

Par contre, une étude évaluant chez le lapin, à l'aide d'un appareil de résonance magnétique à 4.7 Tesla, l'articulation fémorotibiopatellaire suite à une menisectomie, a montré une augmentation focale de l'épaisseur du cartilage articulaire détectée avant les changements au niveau de l'os sous-chondral (Calvo *et al.* 2001).

Bien que certaines études montrent que le remodelage de l'os sous-chondral précède les altérations du cartilage articulaire, certaines observations (Burr 2003; Calvo *et al.* 2001; Eckstein *et al.* 1998) contredisent ce fait, ce qui démontre que la pathogénie de l'ostéoarthrose n'est pas encore bien comprise et nécessite des investigations supplémentaires.

1-2-5-3- Altération des tissus péri-articulaires

La perte du cartilage articulaire entraîne également des changements au niveau des autres structures composant l'articulation synoviale. Une inflammation légère à modérée se développe au niveau de la membrane synoviale et des fragments de cartilage articulaire peuvent se fixer dans les franges synoviales. De plus, avec le temps, les fascias musculaires, les ligaments et la capsule se fibrosent. La diminution des mouvements articulaires suite à la douleur aboutit à une atrophie musculaire.

Cette atrophie musculaire favorise l'instabilité articulaire et par conséquent favorise les dommages au niveau de l'articulation, notamment celle du genou et de la hanche pour lesquelles les muscles contribuent fortement à la stabilité (Pritzker 2003).

1-2-6- La gestion de l'ostéoarthrose

Les patients atteints d'ostéoarthrose souffrent de douleur et de déficit fonctionnel ce qui par conséquent diminue leur qualité de vie. Les objectifs principaux dans la gestion de l'ostéoarthrose sont donc de minimiser la douleur, d'optimiser la fonction articulaire, de réduire l'handicap et, si possible, de ralentir, voire d'arrêter, le processus d'ostéoarthrose.

Il existe des traitements qui ont pour but de soulager la douleur : les « SMOADs » (Bradley 2003; Simon and Strand 2001) pour « Symptoms Modifying Osteoarthritis Drugs », des traitements chirurgicaux et des traitements qui ont pour but de modifier la maladie : les « DMOADs » pour « Disease Modifying Osteoarthritis Drugs ». Les traitements soulageant la douleur consistent en des thérapies médicales dont *les analgésiques systémiques* (le Paracétamol : acetaminophen, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), le Tramadol (analgésique non AINS et non-opioïde), les opioïdes (Morphine, Fentanyl en intradermique)), *les analgésiques topiques* (les AINS topiques, la Capsaïcine), *les injections intra articulaires* (les glucocorticoïdes et l'acide hyaluronique) et *les suppléments oraux* (la glucosamine et la chondroïtine sulfate). Les thérapies chirurgicales sont le débridement, l'ostéotomie, l'arthrodèse, l'arthroplastie, la pénétration de l'os sous-chondral et le remplacement du cartilage endommagé avec des greffes de cartilage. L'utilisation de l'une ou/et l'autre des thérapies est fonction de l'état du patient. Les « DMOADs » sont définis comme

« des agents capables d'inverser, retarder, ou stabiliser la pathologie de l'ostéoarthrose et par conséquent de ralentir sa progression et éventuellement d'abolir les symptômes à long terme » (traduit de (Ghosh 2003). Jusqu'à aujourd'hui, aucun « DMOAD » prouvé efficace n'est encore disponible (McHughes and Lipman 2006).

Etant donné la complexité de l'ostéoarthrose, la clé de la réussite dans la gestion de cette pathologie est de détecter de façon précoce les lésions du cartilage articulaire en vue de ralentir, voire d'arrêter, la progression de l'ostéoarthrose afin de soulager les patients. Il faut également mieux comprendre la pathologie pour pouvoir mettre en place de nouvelles thérapies.

L'imagerie médicale avancée, comme la tomodensitométrie et la résonance magnétique, pourrait être un outil de diagnostic précoce de ces lésions d'ostéoarthrose. Cet outil permettrait également d'évaluer le potentiel d'action de nouvelles thérapies en évaluant l'évolution de l'état du cartilage articulaire des patients en cours de traitement.

1-3- L'imagerie dans le diagnostic des lésions d'ostéoarthrose

En raison de l'impact de l'ostéoarthrose sur la qualité de vie tant chez l'humain que chez les animaux, il est nécessaire de diagnostiquer de façon précoce les lésions de destruction du cartilage articulaire. De plus, la validation de l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques ayant pour but de prévenir ou de ralentir les lésions du cartilage articulaire requière la possibilité de suivre l'évolution de ces

lésions dans le temps. Un des principaux moyens diagnostics non invasifs pour évaluer ces lésions d'ostéoarthrose est l'imagerie. La radiographie demeure l'examen d'imagerie le plus utilisé, cependant elle présente de nombreuses limites (voir 1-3-1). D'autres techniques, telles que la tomodensitométrie et la résonance magnétique, se sont développées et suscitent un intérêt dans l'évaluation et le suivi des lésions d'ostéoarthrose (Chan *et al.* 1991). Ces techniques sont discutées ci-dessous.

1-3-1- La radiographie

À cause de la distorsion morphologique, de la magnification et de la superposition des structures anatomiques qu'elle engendre, et la faible résolution des tissus mous, la radiographie ne permet pas une évaluation complète d'une articulation (Peterfy *et al.* 2004). Cependant, elle est la première méthode standardisée d'évaluation de l'ostéoarthrose et reste la technique d'imagerie la plus économique, la plus accessible (Rovati 1999) et la plus couramment utilisée pour évaluer les changements articulaires structuraux (Ozdemir *et al.* 2005).

Une des limites principales de la radiographie dans l'évaluation de l'ostéoarthrose est qu'elle ne fournit qu'une infime information sur les tissus mous environnants constituant l'articulation fémoro-tibio-patellaire. Par conséquent, le cartilage articulaire ne peut être directement évalué à la radiographie. L'évaluation des changements radiographiques est basée sur un système de gradation développé chez l'humain par Kellgren et Lawrence en 1957. Ce système considère la présence et la sévérité des caractéristiques radiologiques suivantes: les ostéophytes, la sclérose de l'os sous-chondral et les kystes sous-chondraux (Kellgren and Lawrence 1957). Ce

système est critiqué pour son manque de spécificité (Altman *et al.* 1995), de sensibilité (Altman *et al.* 1995; Amin *et al.* 2005; Watt and Doherty 2003), pour le fait qu'il accorde trop d'importance aux ostéophytes, mais également parce-qu'il néglige l'espace articulaire fémoro-tibial minimal (Altman *et al.* 1995).

Un système basé sur la diminution de l'espace articulaire fémoro-tibial a été proposé (Brandt *et al.* 1991b). La mesure de l'espace articulaire est une évaluation indirecte de l'épaisseur du cartilage articulaire. Cependant, bien que la diminution de l'espace articulaire soit prédictive d'une perte de cartilage, le suivi de l'évolution radiographique de cette mesure n'est pas sensible (Amin *et al.* 2005). En effet, comparativement à l'imagerie par résonance magnétique (IRM), une proportion substantielle de perte de cartilage n'est pas détectée à la radiographie (Amin *et al.* 2005). Malgré une standardisation de la technique radiographique (Altman *et al.* 1995; Dieppe 1995), la mesure de l'espace articulaire fémoro-tibial minimal n'est pas constante. De faibles changements de positionnement d'une mesure à une autre peuvent compromettre la reproductibilité de cette évaluation (Abadie *et al.* 2004; Cicuttini *et al.* 2003). De plus, la diminution de l'espace articulaire à elle seule n'implique pas forcément une lésion du cartilage articulaire. Une diminution légère à modérée de l'espace articulaire fémoro-tibial peut refléter une extrusion méniscale sans pour autant qu'il y ait une érosion cartilagineuse (Adams *et al.* 1999). Chez les animaux de compagnie, les radiographies de l'articulation du genou ne sont pas réalisées avec les membres à l'appui : l'animal est en décubitus latéral ou ventral/dorsal, ce qui compromet d'autant plus la reproductibilité de la mesure de l'espace articulaire.

Bien que la radiographie soit encore la technique d'imagerie la plus utilisée (Watt and Doherty 2003) pour diagnostiquer et évaluer les lésions d'ostéoarthrose, ses limites majeures ont donc incité à rechercher et à développer d'autres techniques d'imagerie non invasives telle que la tomодensitométrie et la résonance magnétique qui permettent un diagnostic plus précoce et complet de l'ostéoarthrose.

1-3-2- La tomодensitométrie

La tomодensitométrie, ou CT scan, consiste à produire une série d'images en coupe transversale à partir de rayons X. L'image en coupe obtenue est la résultante de l'atténuation des rayons X par les différents tissus imagés. Les atouts principaux de la tomодensitométrie sont: la détection de très faibles variations de densité tissulaire, la non superposition des structures anatomiques, le reformatage des images en différents plans et la reconstruction tridimensionnelle. Ce sont autant d'avantages par rapport à la radiographie.

La tomодensitométrie est très intéressante pour l'évaluation du système myoarthrosquelettique, plus particulièrement pour l'appréciation du tissu osseux (Buckwalter *et al.* 2001). Elle permet de détecter la sclérose de l'os sous-chondral, les modifications de l'os trabéculaire et de localiser les ostéophytes. De plus, la tomодensitométrie permet de faire des mesures quantitatives de la densité osseuse (Boyd *et al.* 2000; Patel *et al.* 2003). Les rayons X émis par le tomодensitomètre traversent en partie l'os puis sont captés par les détecteurs composants le tomодensitomètre et sont ensuite transformés en un signal électrique qui est lui même amplifié puis converti en un nombre CT ou Hounsfield Unit (HU). Par conséquent ce

nombre HU est directement proportionnel à la densité du tissu que les rayons X traversent, et permet ainsi de mesurer la densité osseuse. En 1988, Cann (Cann 1988) rapporte l'utilité du CT ostéoabsorptiométrie pour quantifier la densité minérale osseuse. Le principe de cette technique est de placer sous la région anatomique d'intérêt un fantôme de matériel de référence qui est imagé en même temps que la structure anatomique et qui sert ainsi de comparaison pour mesurer la densité minérale osseuse. Ce fantôme contient trois cylindres de concentrations différentes de phosphate de dipotassium (K_2HPO_4), un cylindre d'eau et un de polyéthylène de haute densité, servant tous de standards. Les valeurs HU de l'os mesurées au CT sont comparées aux valeurs HU des cylindres du fantôme et sont converties par une régression linéaire en une valeur de densité minérale osseuse exprimée en gramme par centimètre carré (g/cm^2).

La tomодensitométrie voit ainsi son intérêt surtout dans l'évaluation des changements osseux de l'ostéoartrrose. Les paramètres importants évalués par examen tomодensitométrique pour le diagnostic d'ostéoartrrose sont: la détection d'ostéophytes, et de changements de densité minérale osseuse, ou sclérose. Des études sur des modèles canins d'ostéoartrrose (Agnello, Boyd) ont déjà utilisé la tomодensitométrie comme outil de mesure de densité minérale osseuse.

En revanche, l'évaluation directe et de façon non invasive du cartilage articulaire se fera par résonance magnétique. La sensibilité de la tomодensitométrie à détecter des lésions du cartilage articulaire est plus faible que celle de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Chan *et al.* 1991).

1-3-3- La résonance magnétique

Contrairement à la radiographie et à la tomodensitométrie, l'IRM ne met pas en jeu des radiations ionisantes. Par sa capacité tomographique, tout comme le CT, l'IRM minimise les distorsions morphologiques et évite la magnification et les superpositions des structures anatomiques. L'IRM permet également de différencier de façon incomparable les différents tissus mous et osseux composant une articulation. En plus d'offrir une visualisation de la structure morphologique de l'articulation, sous certaines conditions l'IRM peut fournir une évaluation biochimique du cartilage articulaire (Wachsmuth *et al.* 2003). Ainsi par toutes ces propriétés, elle est l'outil d'évaluation non invasive de l'articulation dans son entièreté (Peterfy *et al.* 2004). Des études réalisées sur des modèles expérimentaux (Batiste *et al.* 2004a; Batiste *et al.* 2004b; Widmer *et al.* 1994a) ont montré que l'IRM à divers champs magnétiques (4 Tesla (Batiste *et al.* 2004a) et 1.5 Tesla (Widmer *et al.* 1994a)) permet de qualifier la progression de l'ostéoarthrose.

1-3-3-1- Principes physiques de l'IRM

Le principe physique de l'IRM a été découvert en 1946 par Bloch et Purcell et a été utilisé pour la première fois sur des animaux vivants en 1967 (Thomson 1993). L'IRM est basé sur le fait que les noyaux atomiques d'intérêt biologique ayant un nombre impair de nucléons (ex: le sodium, le phosphore, le carbone, le potassium et l'hydrogène) (Peterfy 2003; Thomson 1993) ont des propriétés magnétiques telles qu'ils se comportent comme des petits aimants en présence d'un champ magnétique.

L'hydrogène étant l'atome le plus représenté au niveau des tissus biologiques, ses propriétés magnétiques sont donc utilisées en résonance magnétique médicale.

- **Obtention d'un signal de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Le noyau d'hydrogène est constitué d'un seul nucléon : un proton H^+ . Ces protons sont disposés selon une orientation aléatoire en l'absence de champ magnétique. En revanche, lorsqu'ils sont mis en présence d'un champ magnétique puissant (appelé B_0), ces protons agissent comme des petits aimants et s'alignent selon la direction de B_0 pour atteindre un état d'équilibre. C'est le vecteur somme de toutes les aimantations de protons présents au niveau des différents tissus d'un organisme qui est le paramètre essentiel mesuré en résonance magnétique.

Si une onde de radiofréquence (RF) 90° , encore appelée impulsion RF ou onde électromagnétique est appliquée à ces protons, une petite proportion de ces derniers absorbent l'énergie fournie par cette onde RF. Ils se réalignent donc perpendiculairement à B_0 tant que l'impulsion RF 90° est présente. Cette impulsion RF est émise par l'antenne émettrice de l'appareil de résonance. L'impulsion RF va « exciter » les protons d'une coupe de tissu à la fois. Lorsque l'impulsion RF n'est plus appliquée, les protons qui ont été excités reviennent à un état d'équilibre en libérant l'énergie absorbée : c'est la relaxation des protons. C'est ce phénomène de relaxation des protons qui va contribuer, avec la densité des protons (nombre de protons par unité de volume) présents dans le tissu, à déterminer l'intensité du signal de résonance.

La relaxation des protons se décompose en relaxation longitudinale T_1 ou encore « temps de relaxation spin-réseau » et en relaxation transversale T_2 ou encore

« temps de relaxation spin-spin » (Tapprest and Radier 2002). Ces deux phénomènes mettent un certain temps à se produire. La récupération de l'aimantation longitudinale T1 est lente, de l'ordre de la seconde, alors que la décroissance de l'aimantation transversale T2 est rapide, de l'ordre du dixième de seconde (Tapprest and Radier 2002). T1 et T2 dépendent de la nature physique et chimique de l'environnement qui entoure les protons excités (Peterfy 2003; Thomson 1993).

• Formation de l'image

Pour obtenir des images en résonance magnétique, il est indispensable de pouvoir localiser précisément à l'intérieur de l'organisme le signal de perte d'énergie (ou relaxation) provenant des protons. La localisation de celui-ci se fait grâce à l'utilisation d'une gradation du champ magnétique dans trois axes (x, y, z):

Pour acquérir une image IRM, il faut d'abord sélectionner un plan de coupe à l'intérieur d'un volume donné de tissu. Le plan de coupe peut être transverse (axial), dorsal (coronal), sagittal ou oblique. Ensuite, on applique les différents gradients de champ magnétique permettant de localiser les protons dans les trois plans de l'espace (x, y, z).

L'énergie libérée lors de la relaxation des protons est captée par une antenne de réception puis transformée en signaux électriques mesurables et convertis par un outil mathématique : la double transformée de Fourier. Il en résulte une image IRM en deux dimensions qui est une représentation de la localisation anatomique précise du signal émis par chaque point de la coupe de tissu réalisée. Ce signal est représenté par une intensité lumineuse traduite en niveau de gris passant du noir au blanc. Lorsque le signal est nul, l'image est noire: on parle d'hyposignal. En revanche plus

le signal émis est intense, plus l'image sera blanche: on parle d'hypersignal ou d'hyperintensité. Ces intensités lumineuses sont différentes selon les tissus à imager puisqu'elles dépendent donc de la densité de protons et des temps de relaxation T1 et T2 qui sont tous les trois spécifiques d'un tissu donné.

1-3-3-2- Séquences IRM spécifiques à l'évaluation du cartilage articulaire

Une séquence IRM est un ensemble de paramètres bien précis nécessaires à l'acquisition d'une image. Chaque séquence se différencie d'une autre par sa capacité à mettre en évidence divers tissus à l'intérieur d'une région anatomique ou des lésions au sein d'un tissu spécifique. Pour détecter des lésions du cartilage articulaire, le signal de résonance émis par le tissu cartilagineux articulaire peut être modulé par la pondération des séquences en T1, en T2, et en densité de protons (DP) mais également en réalisant des séquences plus particulières ou par utilisation de produits de contraste tel que le gadolinium. En effet, le contenu élevé en eau (65 à 80%) (Poole 1997) et donc de protons de la matrice du cartilage articulaire constitue la base de son signal de résonance. Ainsi, toute modification de la proportion aqueuse du cartilage articulaire lors d'un processus pathologique tel que l'ostéoarthrose engendre une modification de l'intensité du signal pour une séquence donnée. De par leurs propriétés, les séquences conventionnelles spin-echo pondérées en T1 ne permettent pas une bonne délimitation de l'interface cartilage-liquide synovial et les séquences spin-echo pondérées en T2 ne distinguent pas les couches profondes du cartilage articulaire de l'os sous-chondral (Tsou *et al.* 2006). En janvier 2000, un comité du

« International Cartilage Repair Society (ICRS) » a conclu que les séquences 3D-SPGR (3-Dimensional Spoiled Gradient Echo) et « Fast Spin Echo (FSE) » pondérée en densité de protons sont les deux séquences optimales pour évaluer le cartilage articulaire avec des IRM à champ magnétique de 1.0 et 1.5 Tesla (Tsou *et al.* 2006). Une sensibilité de 86% à 95 % et une spécificité de 88% à 97% ont été rapportées dans une étude réalisée sur des genoux d'humains en se basant sur l'arthroscopie comme référence (Tsou *et al.* 2006). La séquence 3D-SPGR réalisée avec des coupes de moins de 1 mm d'épaisseur fournit une meilleure définition de la surface du cartilage articulaire. La séquence 3D-SPGR montre un cartilage sain comme une zone bien définie hyperintense, c'est à dire une parfaite structure blanche délimitant un os sous-chondral apparaissant gris suivi d'un os spongieux d'un gris plus clair. Les ligaments apparaissent comme des structures noires et les ménisques sont gris. La séquence FSE-DP est plus sensible pour mettre en évidence des altérations de structure du cartilage articulaire avant l'apparition de défauts du cartilage en tant que tels. La séquence FSE-DP offre également une meilleure visualisation des ligaments et des ménisques. De plus, c'est une séquence moins susceptible aux artefacts qui peuvent rendre les images ininterprétables ou mener à un faux diagnostic (Tsou *et al.* 2006). A l'inverse de la séquence 3D-SPGR, la séquence FSE-DP montre un cartilage sain comme une zone bien définie hypointense, c'est à dire une structure grise-noirâtre délimitant un os sous-chondral gris-blanc suivi d'un os spongieux encore plus blanc. Toute lésion affectant une ou plusieurs de ces structures, modifiera l'intensité de ces niveaux de blancs, gris et noirs en fonction du tissu atteint.

Le gras peut compliquer la visualisation de lésions pathologiques de signal élevé au sein ou au contact de structures graisseuses (par exemple, au niveau de la

moëlle osseuse). L'emploi de la technique de saturation des gras ou « Fat sat », donne des informations supplémentaires. Cette technique émet une radiofréquence sélective qui supprime le signal provenant des gras. Cette suppression des gras est par conséquent un avantage pour mettre en évidence les lésions de la moëlle osseuse, ou encore appelées «Bone marrow lesions» (Mandalia *et al.* 2005).

1-3-3-3- L'IRM et les lésions d'ostéoarthrose

Le premier score lésionnel uniquement basé sur l'évaluation du cartilage a été décrit pour la première fois par Yulish (Yulish *et al.* 1987) et son équipe. Ce système de gradation est basé sur la classification arthroscopique d'Outerbridge (Outerbridge 1961) : un grade 0 représente un cartilage normal, un grade 1 représente un cartilage à contour normal mais avec un signal plus ou moins anormal, un grade 2 indique la présence d'irrégularité superficielle et de défaut de l'épaisseur du cartilage articulaire de moins de 50%, un grade 3 indique la présence d'un défaut partiel d'épaisseur du cartilage articulaire de plus de 50% mais moins de 100% de l'épaisseur, et enfin le grade 4 représente une perte totale de l'épaisseur du cartilage articulaire jusqu'à exposition de l'os sous-chondral (Verstraete *et al.* 2004).

Plus récemment, un score IRM semi quantitatif, le Whole Organ Magnetic Resonance Imaging Score ou WORMS (Peterfy *et al.* 2004), a été décrit pour évaluer l'articulation du genou dans son entièreté. Il évalue quatorze critères et pour chacun d'eux, un score est attribué. Sur ces quatorze caractéristiques, cinq sont relatives aux surfaces articulaires: le signal et la morphologie du cartilage articulaire, les anomalies de la moëlle osseuse sous-jacente, les kystes sous-chondraux, les ostéophytes marginaux et la perte de l'os sub-articulaire. Les neuf autres critères sont: l'intégrité

du ménisque latéral et médial, l'intégrité du ligament croisé antérieur et postérieur, l'intégrité du ligament collatéral médial et latéral, l'épanchement articulaire, la présence de fragments intra-articulaires, les kystes ou bursite péri-articulaire. Pour utiliser ce système de gradation, l'articulation fémoro-tibio-patellaire est divisée en quinze compartiments au niveau desquels ces cinq critères sont évalués.

Des études sur des modèles animaux d'ostéoarthrose ont démontré la capacité de l'IRM à identifier des lésions du cartilage articulaire. Cependant ces appareils d'IRM ont des champs magnétiques extrêmement élevés et demeurent donc encore à utilisation expérimentale et non disponibles en application clinique. L'IRM à 1.5 Tesla est aujourd'hui exploité comme outil clinique diagnostique d'ostéoarthrose chez l'humain. Cependant sa validation ne s'est faite que par comparaison avec l'évaluation arthroscopique du genou comme référence. L'IRM 1.5 Tesla n'a encore jamais été utilisée *in vivo* dans une étude temporelle sur un modèle chirurgical d'ostéoarthrose afin d'étudier dans le temps l'évolution des lésions de l'articulation du genou ostéoarthrosique.

1-4-Hypothèse et objectif

Notre hypothèse était donc que le CT et l'IRM à 1.5Tesla seraient des outils cliniques utiles et complémentaires dans le diagnostic et le suivi du développement des lésions d'ostéoarthrose sur un modèle animal expérimental. De plus le CT et l'IRM à 1.5 Tesla devraient être plus précis que la radiographie numérique (Computed Radiography (CR)) et par conséquent plus aptes à diagnostiquer de façon précoce et non invasive les lésions d'ostéoarthrose.

L'objectif de notre étude a donc été de valider le CT et l'IRM à 1.5 Tesla, par comparaison avec la radiographie, et les évaluations macroscopiques et histologiques, pour leur capacité à évaluer *in vivo* et dans le temps les lésions d'ostéoarthrose sur un modèle de section du ligament croisé crânial du genou chez le lapin.

Chapitre 2 : Deux articles

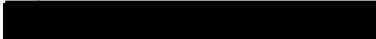
- **Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis- Part I**
- **Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis- Part II: Bone mineral density assessment**

Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis-Part I.

Maria Bouchgua, DMV ‡
Kate Alexander, DMV, MSc, Dipl.ACVR ‡
Marc André d'Anjou, DMV, Dipl. ACVR ‡
Christiane A. Girard, DMV, MSc, Dipl. ACVP †
Eric Norman Carmel, DMV ‡
Guy Beauchamp, PhD ‡
Hélène Richard ‡
Sheila Laverty, MVB, Dipl. ACVS, ECVS ‡

‡ Département de Sciences Cliniques,
† Département de Pathologie,
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada;

This work was funded by the Canadian Arthritis Network.

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
CP 5000
Saint Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6
Tel: (450) 773-8521 #18267
Fax: (450) 778-8158
Email: 

Abstract

Objective: To evaluate *in vivo* the evolution of osteoarthritis (OA) lesions temporally in a rabbit model of OA with clinically-available imaging modalities: computed radiography (CR), helical single-slice computed tomography (CT) and 1.5Tesla magnetic resonance imaging (MRI).

Methods: Imaging was performed on knees of anesthetized rabbits (10 ACLT and contralateral sham joints and 6 control rabbits) at baseline and at intervals up to 12 weeks post surgery. Osteophytosis, subchondral bone sclerosis, bone marrow lesions, joint space width, femoropatellar effusion and articular cartilage were assessed.

Results: CT had the highest sensitivity (90%) and specificity (91%) to detect osteophytes. A significant increase in both total joint osteophyte score and lateral minimal joint space width occurred at all time points post-operatively in the ACLT group alone. Bone marrow lesions were identified and occurred most commonly in the lateral femoral condyle of the ACLT joints and were not identified in the tibia. A significant increase in joint effusion was present in the ACLT joints until 8 weeks after surgery. Bone sclerosis or cartilage defects were not reliably assessed with the selected imaging modalities.

Conclusion: Combined clinically-available CT and 1.5 T MRI allowed the assessment of most of the characteristic lesions of OA and at early time points in the development of the disease. However, the selected 1.5 T MRI sequences and acquisition times did not permit the detection of cartilage lesions in this rabbit OA model.

Keywords: Computed radiography, computed tomography, magnetic resonance imaging, osteoarthritis, *in vivo*, temporally, lesions evolution, rabbit.

Introduction

There is a tremendous need to develop potent drugs that either arrest the progression of osteoarthritis (OA) or prevent the development of the disease. Hand in hand with the discovery of novel disease-modifying OA compounds, there is a need for non-invasive *in vivo* diagnostic tools. These tools must be sufficiently accurate to diagnose OA early and to follow its progression, in order to assess the efficacy of disease-modifying therapeutics in experimental animal models of OA.

Radiography was the first diagnostic imaging technology used to assess, non-invasively, the severity and progression of OA in humans and animals. Radiographic findings have been the only outcome measure in the assessment of disease modification in human OA studies until recently and radiography remains the most commonly used imaging modality to evaluate joint structure changes [1-3]. However, as it is a two dimensional (2D) technique, radiography presents several limitations including: inability to directly visualize the articular cartilage, delay before detecting bone changes as a 30 to 50 % [4] change in bone mineral content is required, superimposition of anatomical structures, magnification and distortion, and finally, little information is provided on the soft tissue structures of the joint. Computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI), on the other hand, are non-invasive imaging modalities that expand the capacity to image lesions of both soft tissues and bone. Both CT and MRI eliminate superimposition of structures, provide higher contrast resolution and allow multi-planar and 3-dimensional acquisition (MRI) or reformatting (CT). CT is particularly useful for assessing bone changes in OA [5] and can also provide quantitative information on bone mineral

density in selected animal models of OA [6-8]. A few studies describe CT or micro-CT for knee OA assessment in animal models. In the rabbit model of OA, CT revealed osteochondral lesions and osteophytes [9] and micro-CT could measure volumetric bone mineral density and osteophyte volume [10].

MRI is mainly renowned for its great capacity to evaluate joint soft tissue structures such as the articular cartilage, synovial membrane, articular capsule, ligaments and menisci. Improvements in MRI technology, coils and sequences now allow macroscopic (cartilage fibrillation and erosions), microscopic and biochemical (variations in signal intensity) assessment of cartilage [11-14]. MRI has also proved to accurately evaluate human joint osseous components and therefore allowing a whole-organ assessment of arthritic joints [15]. Subchondral bone marrow lesions (BML), which may be related to pain [16] and cartilage degeneration [17], are increasingly investigated in clinical human studies. BML have also been recognized in the canine model of knee OA [18-21]. In the same model of OA, 1.5 T MRI was more sensitive than radiography in the detection of osteophytes [22].

The small size of articular structures in the rabbit knee represents a limiting factor that has justified the use of higher magnetic fields in several studies. High-field strength MRI (4 Tesla) was used to quantify disease progression in an *ex vivo* ACLT rabbit model of OA [23]. Although this study permitted the detection of cartilage lesions, it was conducted *ex vivo*. *In vivo* assessment of osteoarthritis changes was reported in a rabbit OA model using 7.1 Tesla MRI and permitted the detection of joint effusion, signal abnormalities of the cartilage layer, meniscal tears, cruciate ligament lesions and osteophytes [24]. Similarly, a more recent study using a 7 Tesla MRI permitted longitudinal measurement of medial tibial cartilage thickness [25].

However, as high-strength field MRIs are expensive to purchase and maintain, they are not readily available or accessible for animal studies.

The purpose of this study was to describe *in vivo* the evolution over time of knee lesions in a rabbit model of OA using clinically-available imaging modalities: computed radiography (CR), CT and 1.5 Tesla (T) MRI. We hypothesized that CT and 1.5T MRI would be complementary tools to accurately assess the progression of OA lesions in rabbit knee joints.

Materials and methods

Experimental protocol

Sixteen healthy, skeletally mature, male New Zealand White rabbits aged (mean \pm SD) 8 ± 0.5 months and weighing 4.01 ± 0.47 kg, were used in the study. Surgical transection of the anterior cruciate ligament (ACL) of a randomly assigned knee joint was performed to experimentally induce OA in ten rabbits (ACLT group). The contralateral knee joint was sham-operated (skin, joint capsule and synovial membrane incised, ACL left intact) (sham group). The remaining six rabbits constituted a control group to identify possible changes over time in a normal group. No surgery was performed on these individuals.

Three imaging modalities were used: CR (Solo AGFA developer, AGFA18*24 phosphor plate, Toronto, Canada), helical single-slice CT (Hi-Speed ZXI, General Electric Healthcare, Mississauga, Ontario, Canada), 1.5 T MRI (CXK4, Signa Echospeed, General Electric Healthcare, Mississauga, Ontario, Canada). Images were acquired on both knees under general anesthesia in all experimental animals (baseline: week -2). Each joint thus also served as its own control for the development of the OA in the ACLT knees and for changes due to the sham surgery. Multimodality imaging was repeated at weeks 2, 4 and 8 post-surgery for all ten ACLT/sham rabbits, and also at week 12 for 5 of the ACLT/sham rabbits. The six control rabbits were imaged at weeks -2 and 8 to detect changes related to time.

Eleven rabbits (six controls and five ACLT/sham) were euthanized at week 8 and the five remaining ACLT/sham rabbits were euthanized in the same manner at week 12. Macroscopic and histologic evaluations were performed on both knee joints of all

rabbits. All procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

Surgical procedure

The surgery was performed by a board-certified veterinary surgeon (SL) under sterile conditions. Trimethoprim-sulfamide (Tribissen 24%, Schering-Plough Animal Health, Pointe-Claire, Quebec, Canada), 15 mg/kg, SC, was administered pre-operatively for prophylaxis. Rabbits were then pre-medicated and anesthesia was induced with xylazine (Novopharm Limited, Animal Health, Toronto, Canada) 3 mg/kg, IM, glycopyrrolate (Sabex Inc, Quebec, Canada) 0.01 mg/kg, IM, and ketamine (Bioniche, Animal Health Canada Inc.) 17 mg/kg, IM. Anesthesia was maintained with 2-2.75% isoflurane (Baxter Corporation, Mississauga, Canada) via an orotracheal tube.

The anterior cruciate ligament was transected (ACLT) through a medial parapatellar incision which was subsequently sutured. Analgesia was achieved with the administration of buprenorphine (Schering-Plough Ltd, Welwyn Garden city, UK) 0.03 mg/kg, SC, pre-operatively and 12 hours later. A fentanyl patch, 25 µg/hour, was applied to the lumbar region for 72 hours (Duragesic 25, Fentanyl Transdermal System, Janssen-Ortho Inc., Markham, Ontario, Canada). Following surgery, rabbits were housed separately and permitted free cage activity until the termination of the study.

Imaging

All images were acquired with the rabbits under general anesthesia maintained with 2-2.75% isoflurane (Baxter Corporation, Mississauga, Canada) via an orotracheal tube. For CT and MRI procedures, a dedicated fixation device (homemade plexiglass mould) was created to standardize knee position throughout the study (Fig1).

Each image data set was transferred to a picture archiving and communication system (PACS) (Agfa IMPAX 4.5, Toronto, Canada). At the end of the experimental period, three observers [two board-certified veterinary radiologists (KA and MAD) and a veterinary post-graduate student (MB)] independently read all CR, CT and MRI images. Selected parameters were measured by two of the observers (KA and MB) and semi-quantitative image interpretation was made by all three observers (KA, MAD, and MB). Image order was randomized, so that each observer was blinded as to the animal's identification, group assignment, the surgical status of each knee and the date of examination. Images of the right knees were assessed prior to the ones of the left knees on CR, CT and MRI. Images were read on a diagnostic workstation (Advantage Workstation AW 4.3, General Electric (GE), Mississauga, Ontario, Canada) and observers were permitted to use all of the workstation functions. Radiographs were evaluated at a magnification of X 2. Tables 1 and 2 summarize the anatomical regions and parameters that were evaluated for imaging modality.

Computed Radiography

Computed radiographs (CR) were made using a phosphor plate CR system (Solo AGFA developer, AGFA18*24 phosphor plate, Toronto, Canada). Exposure

was set at 2 mAs and 46 kVp. Mediolateral and caudocranial views of the knee joints were obtained. Because the plexiglass mould increased the distance between the knee and the cassette creating magnification and edge blurring, the mould was not used for radiographs. The total image acquisition time for the two knees, including positioning, was approximately 5 minutes.

Computed Tomography

For each rabbit, both knees were scanned simultaneously with a single-slice helical CT scanner (Hi-Speed ZXi, General Electric Healthcare, Mississauga, Ontario, Canada). The rabbits were positioned in right lateral recumbency on a Canna-Genant bone mineral density phantom (CT Calibration Phantom, Midway Software, San Francisco, California, United States) for subsequent bone mineral density evaluation (Data relating to bone mineral density are presented in a separate article). Coronal (dorsal) and axial (transverse) scans of the knee joints were obtained and reformatting in additional image planes was not performed. For both scan planes, the following protocol was used: helical scan of 1 mm slice thickness; pitch of 1; display field-of-view (DFOV) of 25 cm; exposure of 120 kVp and 120 mAs; and matrix of 512 X 512. The rabbits' hindlimbs remained within the plexiglass mould, with the angle of the hips being adjusted between the coronal (dorsal) and axial (transverse) scans. For image interpretation purposes, images of each knee were reconstructed separately using a 10 cm DFOV. Total image acquisition time, including positioning, varied between 10-15 minutes.

Magnetic Resonance Imaging

MRI was accomplished using a 1.5 T short bore superconducting magnet (CXK4, Signa Echospeed, General Electric Healthcare, Mississauga, Ontario, Canada). The rabbits were placed in right lateral recumbency with the hindlimbs positioned in the plexiglass mould. A dual 7.5 cm diameter, circular general-purpose receive-only antenna were used (3 inch/7.5 cm General Purpose Coil with Dual Array package, General Electric Healthcare, Mississauga, Ontario, Canada).

The image acquisition protocol consisted of two sequences: 1) sagittal 3D T2*-weighted spoiled gradient recalled acquisition at steady state and with fat saturation (SPGR) [repetition time (TR) 23.8 ms, echo time (TE) 4.2 ms, flip angle 20°, 31.2 KHz bandwidth (BW), 7 X 7 cm field-of-view (FOV), 0.6 mm slice thickness, 256 X 256 matrix, 6 excitations (NEX)]; and 2) coronal (dorsal) dual proton density (PD) and T2-weighted fast spin echo acquisition with fat saturation (PD/T2-FS)[TR 3000 ms, TE 17.54/105.3 ms (PD)/T2), 15.6 KHz BW, 6 X 6 cm FOV, 2 mm slice thickness, 320 X 192 matrix, 2 NEX]. The SPGR took 20 minutes per knee and the PD/T2-FS took 10 minutes per knee with MRI examination time totaling approximately one hour. These sequences and imaging planes were chosen to optimize the evaluation of articular structures, while minimizing acquisition time, to obtain a practical *in vivo* protocol.

Imaging parameters assessed

All parameters assessed and views/planes used to assess each parameter are summarized in table 2.

Bone

Osteophytosis - The severity of osteophytosis (Fig.2) was graded on a subjective scale from 0 to 3 (grade 0: normal, grade 1: mild, grade 2: moderate, grade 3: severe) at multiple sites. Although all sites listed in Table 1 were evaluated, only the osteophyte scores from the medial and lateral femoral epicondyles, the femoral trochlea and the medial and lateral tibial plateau were summed for the total joint osteophyte score (from 0 to 15) and this score was retained for statistical analysis.

Subchondral bone sclerosis - The severity of subchondral bone sclerosis was graded on a subjective scale from 0 to 3 (grade 0: normal, grade 1: mild, grade 2: moderate, grade 3: severe). Sclerosis was also assessed by measuring the maximal depth of sclerosis in the center of the lateral and medial femoral condyles and tibial plateaus.

Bone marrow lesions (BML) - BML were graded semi-quantitatively (Fig.3) using a scale based on the extent of compartment involvement (medial and lateral femoral condyles, intercondylar fossa, medial and lateral tibial plateaus). This grade was adapted from a previous report in humans [15] and included grade 0: no bone marrow lesions, grade 1: lesions involving < 25% of the volume of the compartment, grade 2: lesions involving 25% -50%, and grade 3: lesions involving > 50%.

Minimal Joint Space Width

The minimal joint space width (MJSW) was assessed by measuring the width between the femoral and the tibial subchondral plate in the center of both the lateral and the medial sides of the knee joints.

Femoropatellar effusion

Femoropatellar effusion was scored subjectively (Fig.4): grade 0: no effusion, 1: mild effusion, 2: moderate effusion and 3: severe effusion. Effusion was also quantified by measuring the length of a line drawn perpendicular to midpoint in the proximodistal length of the patella to the underlying femoral trochlea.

Cartilage

Cartilage thickness

Cartilage thickness was measured in the center of the lateral and medial femoral condyles (LFC and MFC) and in the lateral and medial tibial plateau (LTP and MTP). The craniocaudal location on the LFC and MFC where cartilage thickness was measured was based on a previous study [26] and corresponded to a line tangent to the posterior border of the tibial plateau and perpendicular to the articular cartilage surface of the femoral condyle (Fig.5). On the coronal PD/T2 FS sections, the cartilage thickness was assessed in the midpoint of the LFC, MFC, LTP and MTP.

Cartilage defects

Cartilage defects were evaluated quantitatively by measuring the thickness of the remaining cartilage (RC) between the defect and the subchondral bone, the height of the defect (DH), the maximal length of the defect (MLD) in the craniocaudal axis, the maximal width of the defect (MWD) and the defect proportion of the total compartment surface (DPS): grade 0: no defect, 1: 0-25% of the surface, 2: >25% - 50%, 3: > 50%.

Morphologic evaluation

The articular cartilage of the femur and tibia was stained with India ink. The cartilage surface of each compartment (LFC, MFC, LTP, MTP) was evaluated for gross morphologic changes and graded (SL, MB) with a scale adapted for this study (Table 3) from the structural features reported by Yoshioka [27]. The evaluators were blinded to the identification of the rabbits and the surgical status of each knee. The osteophytes and the cartilage lesions were mapped on a schematic representation of the rabbit knee joint. Photographs of all knee joint surfaces were recorded using a digital camera (D1 Camera, Nikon, Tokyo, Japan).

Histologic evaluation

The distal part of the femur and the proximal part of the tibia were cut and fixed in a 10% buffered formalin solution for 48 hours. Each femoral condyle and tibial plateau were cut in sagittal sections through the weight bearing surface with a low speed Isomet saw (Buehler, Illinois, USA) and 15 HC diamond blade (10.2 mm* 0.3 mm). Sections were made to capture the most severe lesions in the compartment based on the macroscopic schemas. The tissues were then decalcified for 2 weeks in an EDTA solution, dehydrated using graded ethanol and cleared with 100% toluol. Following paraffin embedding, two sections of 2 to 4 μm were cut and stained with Safranin O fast green. Histologic evaluation was performed by a board-certified veterinary pathologist (CG) and a veterinary post-graduate student (MB), who were blinded to the identification of the rabbits and the surgical status of each knee. All the histological sections were evaluated using a grade adapted for this study, from the

structural features reported by Mankin [28] (Table 4). The section having the more severe changes was retained for subsequent analyses.

Articular cartilage thickness measurements were performed by one of the observers (MB), in the LFC and MFC from the superficial zone of the cartilage to the tidemark at mid-distance from the caudoproximal edge of the condyle to the distal edge of the femoral trochlea. This point was determined by comparing histological slides with sagittal SPGR MRI images.

Statistical analysis

Interobserver agreement and agreement between imaging modalities (semi-quantitative parameters) were calculated using a Kappa coefficient. Agreement between quantitative imaging parameters was calculated with linear regression analysis. Correlations between the imaging parameters (total joint osteophyte score, bone marrow lesion score, and joint effusion measurements) and the total joint cartilage histologic score in the ACLT group were made using Spearman's rank correlation. Changes over time and between joint groups were assessed with a repeated-measures linear model (quantitative parameters) with time and joints as within-subject factors and with a Cochran-Mantel-Haenszel test (semi-quantitative parameters). The association between the semi-quantitative grading system and the quantitative measures for effusion severity with each imaging modality was evaluated with a linear model with grade as a fixed factor and identity of the rabbit as a random factor.

The sensitivity and specificity of each imaging modality for the assessment of osteophytes was determined using gross morphologic evaluation as a gold standard.

Osteophyte detection sensitivity and specificity calculations were based on data obtained on a view/imaging plane common to all modalities (caudocranial CR view, coronal (dorsal) CT and MRI planes). The osteophyte severity scores were collapsed into absence (grade 0) or presence (grade 1-3) and compared to the absence or presence of osteophytes on the gross morphologic evaluation. Sensitivities and specificities were determined separately for each anatomic site, as well as for total joint osteophyte score. For each compartment (LFC, MFC, LTP and MTP) a correlation was made between the cartilage histologic score and osteophyte score, employing Spearman's rank correlation. Sensitivity and specificity of MRI for detection of cartilage lesions was calculated for each observer by using histological evaluation as the gold standard. The correlation between MRI cartilage thickness measurement and histologic cartilage thickness was calculated for each femoral condyle using linear regression analysis.

Results

Imaging

Bone

Osteophytosis –There was a fair [29] interobserver agreement (3 reader combinations) for osteophyte assessment on both the CT ($\kappa= 0.50, 0.52, 0.57$) and MRI ($\kappa= 0.45, 0.51, 0.58$) examinations. In contrast, there was only slight to fair interobserver agreement for osteophyte evaluation on the caudocranial radiographic views ($\kappa= 0.20, 0.33, 0.53$). All subsequent analyses of osteophytes were made using one observer's (KA) grade.

The sensitivity and specificity of each imaging modality for the detection of osteophytes compared with morphologic evaluation at the endpoint of the study, and at all anatomic sites are provided in table 5.

A significant increase in total joint osteophyte score occurred following surgery in the ACLT group. A priori contrasts revealed that the score was significantly higher at weeks 2 ($p=0.04$), 4 ($p=0.002$), 8 ($p=0.003$) and 12 ($p=0.03$) compared to pre-surgery scores (Fig.6). In the control group, no differences in total joint osteophyte score were detected over time. Also, no differences were detected in total joint osteophyte score between the right and left control joints (Fig. 6). Similarly, in the sham group, no differences in total joint osteophyte score occurred over time. When compartment scores (LFC, MFC, LTP, MTP) were assessed, there was also no significant association between the histologic cartilage scores and osteophyte scores.

Subchondral bone sclerosis –There was poor interobserver agreement when subchondral bone sclerosis was graded subjectively on both the caudocranial radiographic views ($\kappa = 0.06, 0.09, 0.23$) and coronal (dorsal) CT sections ($\kappa = 0.18, 0.22, 0.22$). There was also a weak relationship between subchondral bone thickness measurements made by different observers on the caudocranial radiographic views ($r^2 = 0.05, p < 0.0001$) and the coronal (dorsal) CT sections ($r^2 = 0.0001, p = 0.85$).

Bone marrow lesions –There was fair to good interobserver agreement ($\kappa = 0.46, 0.62, 0.67$) for the assessment of BML on MRI. For subsequent analyses of BML evolution over time, one observer's assessment (KA) was used. BML were not detected in the tibia in any group. Conversely, BML were observed at all 3 sites (LFC, MFC and intercondylar fossa) in the femur. BML occurred in 12 joints (at one or more imaging times) and were observed most commonly in ACLT joints (8/12) but also occurred occasionally in sham joints (1/12) and control joints (3/12). They occurred most frequently in the lateral femoral condyle followed by the intercondylar fossa (Table 6). Lesions in the intercondylar fossa occurred exclusively in the ACLT group. The first BML was observed at baseline before surgery in one joint on the LFC in the ACLT group. The evolution of the BML over time is illustrated in table 6. The most severe grade occurred on 2 occasions and in the ACLT group alone. BML were most often detected at week 4 in the ACLT group (Table 6) and grade 1 was the most represented (Table 6).

Minimal joint space width

There was a significant and positive relationship between interobserver measurements of the MJSW on caudocranial CR ($r^2 = 0.41$, $p < 0.0001$), coronal (dorsal) CT ($r^2 = 0.5$, $p < 0.0001$) and coronal (dorsal) MRI ($r^2 = 0.57$, $p < 0.0001$). The data of one rater (KA) was selected for subsequent analysis. There was a significant agreement between the caudocranial radiograph and coronal (dorsal) MRI measurements ($p < 0.0001$), coronal (dorsal) CT and coronal (dorsal) MRI ($p < 0.0001$) and coronal (dorsal) CT and caudocranial radiographs ($p = 0.0004$), but only at the lateral side of the joint for all comparisons. Because interobserver agreement was highest for MRI ($r^2 = 0.57$, $p < 0.0001$), this modality was chosen for evaluating for changes in the MJSW on the lateral side of the joint over time. In the control group, no significant differences in MJSW measurements were detected between the right and left joints, or over time. Similarly, no significant differences were detected in MJSW measurements in the sham-operated joints when compared to baseline, at any time point. A significant increase in MJSW was measured following surgery in the ACLT joints. With respect to baseline levels, MJSW was significantly higher at weeks 4 (mean estimate of the difference MJSW = 0.30 mm, $p = 0.0007$), 8 (mean estimate of the difference MJSW = 0.28 mm, $p = 0.02$) and 12 (mean estimate of the difference MJSW = 0.30 mm, $p = 0.006$) (Fig. 7). Furthermore, except at baseline, at each time point, the ACLT MJSW measurements were significantly higher (week 2 $p = 0.03$, week 4 $p = 0.005$, week 8 $p = 0.01$, week 12 $p = 0.002$) than those of the sham.

Femoropatellar effusion

The interobserver agreement for severity of effusion varied with the imaging modality; it was good ($\kappa = 0.69, 0.71, 0.72$) for CT, fair to good for MRI ($\kappa = 0.55, 0.67, 0.78$) and fair ($\kappa = 0.43, 0.43, 0.46$) for CR. A significant correlation (r^2) was found between observers in regard to synovial effusion (CT = 0.89, MRI = 0.87; and CR = 0.09) ($p < 0.0001$). One reader's (KA) assessments were retained for subsequent analyses. When severity of effusion was compared between imaging modalities, there was a fair to good agreement between CT and MRI ($\kappa = 0.56$), CT and CR ($\kappa = 0.53$), and a fair agreement between MRI and CR ($\kappa = 0.47$). When measurements of effusion on the three modalities were compared there was a positive and significant relationship between CT and MRI ($r^2 = 0.39, p < 0.0001$), but no association between the CT or MRI and CR measurements.

On CT, there was a significant association between the quantitative measurements of effusion and the subjective grades ($p < 0.0001$). The measurements of effusion were significantly lower with grade 0 than with grade 2 ($p < 0.0001$) and 3 ($p = 0.0003$), and lower with grade 1 than grade 2 ($p = 0.0074$). On MRI, the measurement was significantly lower with grade 0 than grade 3 ($p = 0.0001$). There were no other significant differences between grades and measurements for the MRI.

The values from the MRI assessment were selected for analysis of joint effusion with and without surgery and changes over time. In the control group, no difference in joint effusion measurements was detected between the right and left joints or over time. Similarly, no significant differences were detected in synovial effusion measurements in the sham-operated joints when compared to baseline, at any time

point (Fig 8). A significant increase in synovial effusion was measured following surgery in the ACLT joints. With respect to baseline, the values were significantly higher at week 2 (mean estimate of the difference = 0.59 mm, $p=0.01$), peaked at week 4 (mean estimate of the difference = 0.74 mm, $p=0.002$) and remained elevated until week 8 (mean estimate of the difference = 0.5 mm, $p=0.03$) (Fig.8). At week 12 the values were no longer significantly different from those recorded at baseline.

Cartilage

Cartilage thickness- There was a significant and positive relationship between interobserver measurements of the articular cartilage thickness ($r^2 = 0.45$, $p<0.0001$). For subsequent analyses one observer's assessment (KA) was used. There was no significant relationship between MRI and histology for cartilage thickness in either femoral condyle, or for any joint group with the exception of the MFC in the ACLT joint ($r^2 = 0.45$, $p = 0.03$). Therefore, subsequent analyses for cartilage thickness measurements on MRI were not performed.

Cartilage defects- There was poor agreement ($\kappa= 0.005, 0.08, 0.16$) between observers for the detection of cartilage defects on MRI. The sensitivity and specificity for detection of cartilage lesions was calculated individually for two observers (KA and MAD) and are presented in table 7. Because lesions were difficult to qualify on MRI, the morphologic and histologic grades were each collapsed to provide a dichotomic score. Grades 1-4 (Table 3) on the morphological examination represented normal to mild disease, which included fibrillation, and grades 5-7 (Table 3) represented more severe disease (ulceration of the cartilage). On histology, grades 1-5 (Table 4) represented normal to mild disease whereas grades 6 and 7 (Table 4)

represented ulceration of cartilage. The MRI evaluations were classified as presence or absence of a cartilage defect. In light of the overall low sensitivity and specificity, subsequent analyses were not performed.

Morphologic evaluation

Total joint morphologic score is presented in figure 9 (A). There were no differences between the right and the left control limbs, nor between the sham and the control limbs. ACLT joint scores were significantly higher than the right ($p = 0.01$), and left ($p = 0.03$) control joints and also the sham joints ($p = 0.01$) (Fig.9 A).

Histologic evaluation

There was a very good interobserver agreement for articular cartilage assessment on histologic ($\kappa = 0.81$) examination. Consequently, for all subsequent analyses of articular cartilage, one observer's (CG) grade was chosen.

The ACLT limbs had a significantly higher total joint histologic score than the right ($p = 0.002$) and the left ($p = 0.003$) control limbs and than the sham limbs ($p = 0.007$) (Fig. 9 B).

However, there was no significant differences in the cartilage thickness between knee joints group for any of the compartment at the termination of the study (week 8 or week 12) at the exception of the LFC of the ACLT joints that were significantly higher (mean estimates of the cartilage thickness difference= 0.12 mm, $p=0.01$) than the sham knee joints at week 8.

Correlations between imaging parameters assessed

There was no significant association between total joint histology scores and total joint osteophyte scores, BML scores and joint effusion measurements from joints in the ACLT group at the end of the study ($r \leq 0.19$, $p > 0.5$).

Discussion

Multimodality imaging of experimental OA in the rabbit permitted the quantitative and semi-quantitative assessment of several parameters associated with disease-related progressive structural joint modification. These parameters included osteophytosis (CR, CT, MRI), bone marrow lesions (MRI), lateral compartment minimal joint space width (CR, CT, MRI) and femoropatellar effusion (CR, CT, MRI). Certain parameters could not be reliably assessed, including articular cartilage, subchondral bone sclerosis and minimal joint space width in the medial compartment. In order to improve the assessment of all parameters characterizing OA in small joints such as rabbit knees, it would be necessary to use higher-field MRI systems. Indeed, their inherent higher signal-to-noise ratio would permit to improve the conspicuity of small structures and ultimately permit detection of smaller lesions. With 1.5 T MRI, such improvement would have required significantly increasing acquisition time. This is acceptable in *ex vivo* animal models experimentation of OA, but the purpose of the study herein was to use imaging modalities and protocols that are clinically practical.

Osteophytes

Computed Tomography (coronal (dorsal) images) was the most accurate modality in this study to assess osteophytosis as it had both high sensitivity and specificity. Osteophytosis was seen as early as 2 weeks post-surgery in the ACLT group. Although evaluation of osteophytosis has been reported [9, 23, 24, 30, 31] in a similar model using various imaging modalities, osteophytes have not been identified previously at such an early time-points postoperatively. Our results can be explained,

in part, by the difference in the time points that we selected. In an *ex vivo* study of an ACLT rabbit model of OA, osteophytes were identified with micro-CT in all OA joints by 4 weeks post-surgery, which was the first time-point of assessment [23]. Although CT was the most sensitive and specific in our hands, 1.5T MRI also permitted the early detection of osteophytes as early as 2 weeks. This is in contrast to a study where 4.7 T MRI was employed to visualize lesions in an *in vivo* meniscectomy rabbit model of OA and did not permit detection of osteophytes at any time-point, although morphologic assessment revealed osteophytes at 6 weeks post-surgery [32]. It is also surprising that 7.1 T MRI, with imaging at baseline, 2, 4, 8 and 12 weeks after either ACLT or medial meniscectomy in rabbits, did not permit detection of osteophytes until 8 weeks following surgery [24]. These differences between studies could be explained by several factors that are, in a MRI protocol, key parameters for obtaining high-quality, diagnostic images. Among those, the selection of imaging sequence may greatly impact the capacity to assess some of the features of OA. Despite the fact that our sequence protocol was selected primarily to target parameters such as joint effusion, cartilage and BML, osteophytes were seen. A T1-weighted sequence without fat saturation might have been even more appropriate to detect osteophytes [22].

Subchondral bone sclerosis

Subchondral bone sclerosis is a well-recognized feature of advanced OA in humans [33] and this parameter has been described as a measure of disease. However, neither radiography nor CT permitted reliable evaluation of subchondral bone sclerosis at any time point in this model. We postulate that this parameter was

not reliably assessed because the sclerosis was not marked as the time-points studied were early in the disease process.

Bone marrow lesions

Bone marrow lesions are most sensitively detected with fat-suppressed T2-weighted fast spin echo and short-tau inversion recovery sequences (STIR) [34]. In our rabbits, BML were detected as early as 2 weeks post-surgery and were observed most commonly in the ACLT group. To our knowledge, this is the first time that BML have been reported in the rabbit ACLT model of OA. This finding is in agreement with observations from a canine ACLT model of OA where the earliest bone marrow lesions were also observed at 2 weeks post-surgery [18]. The earliest time-point of bone marrow lesion detection is variable in other studies in canine models and include; 4 weeks [20, 21], and 6 weeks [19] post-surgery. Several factors affecting signal-to-noise ratio such as field strength and imaging coils, as well as sequence selection could in part explain these differences in time of detection of BML. In the study herein, a lateral femoral condyle BML was detected prior to surgical induction of OA in one animal from the ACLT group on the coronal (dorsal) dual PD/T2-FS MRI. This lesion was also detected at week 4 and at week 8, but not at week 2. A similar finding was also observed pre-operatively in a clinically healthy dog in another OA study [20]. In humans, similar lesions have been observed in patients without knee pain [35] as well as in healthy marathon runners [36] and basketball players [37]. Some have attributed these lesions to microfractures of the trabeculae [37-39]. However, the animals in this study were caged, and trauma-

induced changes are an unlikely explanation for the presence of bone marrow hyperintensity.

We only observed BML in the femur and most frequently in the LFC. In a canine ACLT model, lesions also occurred in the medial aspect of the LFC [21] and were observed in the LFC in the first 4 months post-surgery, while MFC lesions were detected from 4 months post-surgery until the end of the study at 13 months [20]. However, in the canine ACLT model, bone marrow lesions were most commonly detected in the medial tibia [18, 19, 21] and the caudal part of the tibial eminence [20]. It appears that bone marrow lesions occur at different locations in the bone and regress with time in certain cases [17, 40]. These species-related differences are likely due to differences in joint biomechanics and specific alterations of these biomechanics following ACLT. Nonetheless, as our study end point was 12 weeks, BML may have eventually developed in the tibia if the rabbits had been imaged at a later time point.

Minimal joint space width

In humans, a decrease of the joint space width, reflecting articular cartilage thinning or complete attrition, is a measure of disease progression in OA knee patients and is currently still used to indirectly assess articular cartilage [41-43]. Limitations of this measurement include interobserver and temporal variations in measurements, inaccuracy due to variable limb positioning and the loss of integrity of menisci [3]. MRI showed the least interobserver variation in assessment of the minimal joint space width in this study. The significant correlation between modalities only at the lateral side of the joint for all comparisons may potentially be

explained by the tension induced for positioning the hindlimbs in the plexiglass mould, therefore altering lateral joint space width of the knee in a more constant manner.

An increase in the MJSW of the lateral compartment of the knee joint was observed in the ACLT joints at week 4 and persisted until the termination of the study. This increase in MJSW can be ascribed to various factors. It should be noted that the limbs were in a non weight-bearing position for the acquisition of the images and the increased joint effusion observed in the progression of the disease could in part explain the changes. However, the changes in effusion at week 12 were no longer significantly different from baseline, whereas the MJSW remained significantly increased. Cartilage hypertrophy occurs in experimental models of OA and has been reported in the rabbit [26, 32], the dog [44, 45] and Dunkin-Hartley guinea pigs [46] and could potentially contribute to an increase in joint space width. However, the magnitude of MJSW increase observed was approximately 0.3 mm, which is greatly in excess of the contribution that cartilage hypertrophy would make. Furthermore, we did not measure any significant increase in thickness of articular cartilage at 8 or 12 weeks on histological assessment.

Femoropatellar effusion

Both CT and MRI permitted quantification of femoropatellar effusion in this OA animal model. The significant increase of femoropatellar effusion was measured as early as 2 weeks post-surgery in the ACLT joints and remained significantly increased until week 8. This finding is consistent with another study, in which 7.1 T MRI imaging permitted detection of severe joint effusion 2 weeks after surgery that

was still prominent at 8 weeks in an *in vivo* ACLT rabbit model of OA. [24]. The significant increase in effusion which occurred in the ACLT rabbits but not in the sham joints may be caused by a greater degree of post-operative inflammation than that generated in the sham joints due to section of the ACL. Furthermore, the joint laxity and subsequent cartilage degeneration potentially exacerbate the intra-articular inflammatory cascade.

Cartilage

MRI is the only imaging technique that allows *in vivo*, non-invasive visualization of the articular cartilage. The low sensitivity and specificity of 1.5 T MRI for the detection of cartilage lesions in the study herein was partly attributable to an inability to further optimize imaging parameters without greatly increasing acquisition time. A sensitivity of 78.3% and a specificity of 95.3% for detection of clinically significant cartilage lesions was reported when a 4 Tesla field strength MRI was employed in an *ex vivo* model [23].

In theory, a higher field MRI system would have permitted the detection of cartilage lesions. However, in a previous *ex vivo* study in the rabbit that used a very high magnetic field strength (7.1 Tesla), articular cartilage lesions were not reliably detected because of insufficient spatial resolution and image contrast obtained with the selected 2D protocol [24]. The choice of a 3D acquisition may have allowed an increase in these factors while using a similar acquisition time. Apart from sequence parameters, the use of a dedicated surface coil with an extremely close anatomic contact improves the signal-to-noise ratio, and therefore allows optimization of spatial and contrast resolutions, thus improving diagnostic images. Cartilage

thickness is another significant factor that limits its assessment with MRI. The thicker articular cartilage of the canine knee explains why cartilage lesions can be detected with a 1.5 Tesla MRI in this species [47, 48]. Other than MRI image quality, the low sensitivity and specificity obtained in our study could be explained by the fact that the articular cartilage lesions were not very severe, and consisted principally of fibrillation with fewer ulcerations of cartilage.

In summary, combined clinically-available CT and 1.5 T MRI permitted evaluation of several parameters of progressive OA in rabbit knees, including: osteophytes (coronal (dorsal) CT images, from 2 weeks post-surgery and until the termination of the study), bone marrow lesions (coronal (dorsal) PD/T2-FS images, 2 weeks post-surgery until 12 weeks), increased minimal joint space width (coronal (dorsal) dual PD/T2 MRI section, 4 weeks post-surgery until 12 weeks), and femoropatellar effusion (sagittal SPGR MRI section, 2 weeks post-surgery until 8 weeks). These parameters could therefore be temporally evaluated with clinically-available imaging modalities to measure the magnitude of disease related changes and their potential response to novel therapy *in vivo* in the rabbit model of OA. Subchondral bone sclerosis and cartilage defects were not reliably evaluated in this animal model of OA *in vivo* with these clinical imaging modalities.

Acknowledgements

The authors want to thank Geneviève Rouleau, Anne-Marie Martel, Suzie Lachance, and Marie Lecocq for their technical assistance.

References:

1. **Watt I, Doherty M. Plain radiographic features of osteoarthritis. In: Osteoarthritis, Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS Eds. New York: Oxford University Press 2003:211-225.**
2. **Rovati LC. Radiographic assessment. Introduction: existing methodology. Osteoarthritis Cartilage 1999; 7: 427-429.**
3. **Peterfy CG. Imaging of the disease process. Curr Opin Rheumatol 2002; 14: 590-596.**
4. **Barbee DD, Allen JR, Grant BD, Riggs MW, Crawley GR, Sande RD. Detection by computed tomography of occult osteochondral defects in the fetlock of a horse. Equine Vet J 1987; 19: 556-558.**
5. **Buckwalter KA, Rydberg J, Kopecky KK, Crow K, Yang EL. Musculoskeletal imaging with multislice CT. AJR Am J Roentgenol 2001; 176: 979-986.**
6. **Agnello KA, Trumble TN, Chambers JN, Seewald W, Budsberg SC. Effects of zoledronate on markers of bone metabolism and subchondral bone mineral density in dogs with experimentally induced cruciate-deficient osteoarthritis. Am J Vet Res 2005; 66: 1487-1495.**
7. **Boyd SK, Matyas JR, Wohl GR, Kantzas A, Zernicke RF. Early regional adaptation of periarticular bone mineral density after anterior cruciate ligament injury. J Appl Physiol 2000; 89: 2359-2364.**
8. **Chalmers HJ, Dykes NL, Lust G, Farese JP, Burton-Wurster NI, Williams AJ, et al. Assessment of bone mineral density of the femoral head in dogs with early osteoarthritis. Am J Vet Res 2006; 67: 796-800.**
9. **Torelli SR, Rahal SC, Volpi RS, Yamashita S, Mamprim MJ, Crocci AJ. Radiography, computed tomography and magnetic resonance imaging at 0.5 Tesla of mechanically induced osteoarthritis in rabbit knees. Braz J Med Biol Res 2004; 37: 493-501.**
10. **Batiste DL, Kirkley A, Laverty S, Thain LM, Spouge AR, Gati JS, et al. High-resolution MRI and micro-CT in an ex vivo rabbit anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage 2004; 12: 614-626.**
11. **Loeuille D, Olivier P, Watrin A, Grossin L, Gonord P, Guillot G, et al. The biochemical content of articular cartilage: an original MRI approach. Biorheology 2002; 39: 269-276.**
12. **Borthakur A, Mellon E, Niyogi S, Witschey W, Kneeland JB, Reddy R. Sodium and T1rho MRI for molecular and diagnostic imaging of articular cartilage. NMR Biomed 2006; 19: 781-821.**
13. **Eckstein F, Burstein D, Link TM. Quantitative MRI of cartilage and bone: degenerative changes in osteoarthritis. NMR Biomed 2006; 19: 822-854.**
14. **Gold GE, Burstein D, Dardzinski B, Lang P, Boada F, Mosher T. MRI of articular cartilage in OA: novel pulse sequences and compositional/functional markers. Osteoarthritis Cartilage 2006; 14 Suppl A: A76-86.**

15. Peterfy CG, Guermazi A, Zaim S, Tirman PF, Miaux Y, White D, et al. Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 177-190.
16. Felson DT, Chaisson CE, Hill CL, Totterman SM, Gale ME, Skinner KM, et al. The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* 2001; 134: 541-549.
17. Garnero P, Peterfy C, Zaim S, Schoenharting M. Bone marrow abnormalities on magnetic resonance imaging are associated with type II collagen degradation in knee osteoarthritis: a three-month longitudinal study. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 2822-2829.
18. Baird DK, Hathcock JT, Kincaid SA, Rumph PF, Kammermann J, Widmer WR, et al. Low-field magnetic resonance imaging of early subchondral cyst-like lesions in induced cranial cruciate ligament deficient dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39: 167-173.
19. Libicher M, Ivancic M, Hoffmann M, Wenz W. Early changes in experimental osteoarthritis using the Pond-Nuki dog model: technical procedure and initial results of in vivo MR imaging. *Eur Radiol* 2005; 15: 390-394.
20. Martig S, Boisclair J, Konar M, Sreng D, Lang J. MRI characteristics and histology of bone marrow lesions in dogs with experimentally induced osteoarthritis. *Veterinary radiology and ultrasound* 2007; 48: 105-112.
21. Nolte-Ernsting CC, Adam G, Buhne M, Prescher A, Gunther RW. MRI of degenerative bone marrow lesions in experimental osteoarthritis of canine knee joints. *Skeletal Radiol* 1996; 25: 413-420.
22. d'Anjou MA, Moreau M, Troncy E, Martel-Pelletier J, Abram F, Raynauld JP, et al. Osteophytosis, subchondral bone sclerosis, joint effusion and soft tissue thickening in canine experimental stifle osteoarthritis: a comparison between 1.5 T MRI and computed radiography. *Veterinary surgery*. In press.
23. Batiste DL, Kirkley A, Laverty S, Thain LM, Spouge AR, Holdsworth DW. Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 986-996.
24. Wachsmuth L, Keiffer R, Juretschke HP, Raiss RX, Kimmig N, Lindhorst E. In vivo contrast-enhanced micro MR-imaging of experimental osteoarthritis in the rabbit knee joint at 7.1T1. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 891-902.
25. Boulocher C, Chereul E, Langlois JB, Armenean M, Duclos ME, Viguier E, et al. Non-invasive in vivo quantification of the medial tibial cartilage thickness progression in an osteoarthritis rabbit model with quantitative 3D high resolution micro-MRI. *Osteoarthritis Cartilage* 2007.
26. Calvo E, Palacios I, Delgado E, Sanchez-Pernaute O, Largo R, Egido J, et al. Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 878-886.
27. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4: 87-98.
28. Mankin HJ. Biochemical and metabolic aspects of osteoarthritis. *Orthop Clin North Am* 1971; 2: 19-31.
29. Byrt T. How good is that agreement? *Epidemiology* 1996; 7: 561.

30. Hellio Le Graverand MP, Vignon E, Otterness IG, Hart DA. Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: Part I: cellular and matrix alterations. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 56-64.
31. Dawson J, Gustard S, Beckmann N. High-resolution three-dimensional magnetic resonance imaging for the investigation of knee joint damage during the time course of antigen-induced arthritis in rabbits. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 119-128.
32. Calvo E, Palacios I, Delgado E, Ruiz-Cabello J, Hernandez P, Sanchez-Pernaute O, et al. High-resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9: 463-472.
33. Watt I, Doherty M. Plain radiographic features of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis*, K.D B, M. D, L.S L Eds. New York: Oxford University Press 2003:211-225.
34. Peterfy CG, Gold G, Eckstein F, Cicuttini F, Dardzinski B, Stevens R. MRI protocols for whole-organ assessment of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14 Suppl A: A95-111.
35. Baranyay FJ, Wang Y, Wluka AE, English DR, Giles GG, Sullivan RO, et al. Association of bone marrow lesions with knee structures and risk factors for bone marrow lesions in the knees of clinically healthy, community-based adults. *Semin Arthritis Rheum* 2007; 37: 112-118.
36. Krampla W, Mayrhofer R, Malcher J, Kristen KH, Urban M, Hruby W. MR imaging of the knee in marathon runners before and after competition. *Skeletal Radiol* 2001; 30: 72-76.
37. Lohman M, Kivisaari A, Vehmas T, Kallio P, Malmivaara A, Kivisaari L. MRI abnormalities of foot and ankle in asymptomatic, physically active individuals. *Skeletal Radiol* 2001; 30: 61-66.
38. Mink JH, Deutsch AL. Occult cartilage and bone injuries of the knee: detection, classification, and assessment with MR imaging. *Radiology* 1989; 170: 823-829.
39. Yao L, Lee JK. Occult intraosseous fracture: detection with MR imaging. *Radiology* 1988; 167: 749-751.
40. Phan CM, Link TM, Blumenkrantz G, Dunn TC, Ries MD, Steinbach LS, et al. MR imaging findings in the follow-up of patients with different stages of knee osteoarthritis and the correlation with clinical symptoms. *Eur Radiol* 2006; 16: 608-618.
41. Nevitt MC, Peterfy C, Guermazi A, Felson DT, Duryea J, Woodworth T, et al. Longitudinal performance evaluation and validation of fixed-flexion radiography of the knee for detection of joint space loss. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1512-1520.
42. Bruyere O, Genant H, Kothari M, Zaim S, White D, Peterfy C, et al. Longitudinal study of magnetic resonance imaging and standard X-rays to assess disease progression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 98-103.
43. Hunter DJ, Zhang Y, Niu J, Goggins J, Amin S, LaValley MP, et al. Increase in bone marrow lesions associated with cartilage loss: a longitudinal magnetic resonance imaging study of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1529-1535.
44. Adams ME, Brandt KD. Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *J Rheumatol* 1991; 18: 428-435.
45. Braunstein EM, Brandt KD, Albrecht M. MRI demonstration of hypertrophic articular cartilage repair in osteoarthritis. *Skeletal Radiol* 1990; 19: 335-339.

46. **Watson PJ, Carpenter TA, Hall LD, Tyler JA. Cartilage swelling and loss in a spontaneous model of osteoarthritis visualized by magnetic resonance imaging. Osteoarthritis Cartilage 1996; 4: 197-207.**
47. **Widmer WR, Buckwalter KA, Braunstein EM, Hill MA, O'Connor BL, Visco DM. Radiographic and magnetic resonance imaging of the stifle joint in experimental osteoarthritis of dogs. Veterinary radiology and ultrasound 1994; 35: 371-383.**
48. **Brandt KD, Braunstein EM, Visco DM, O'Connor B, Heck D, Albrecht M. Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. J Rheumatol 1991; 18: 436-446.**

Figure legends

Fig.1. Plexiglass mould (A) placed between the hindlimbs to standardize the position of the rabbits' knees throughout the study. The rabbit is under general anesthesia (B) during CT and MRI procedures.

Fig.2. Grade 3 osteophytosis on caudocranial (A) and mediolateral (B) CR views, coronal (dorsal) (C) and axial (transverse) (D) CT images, coronal (dorsal) PD-Fat saturation (E) and sagittal SPGR (F) MRI images. White arrows illustrate osteophytes.

Fig.3. Grade 0 (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D) of bone marrow lesions on coronal T2-Fat saturation MRI images. White arrows outline bone marrow lesions.

Fig.4. Illustration of the two extreme knee joint effusion scores (grade 0 and 3) on mediolateral CR views (grade 0 (A), grade 3 (B)), axial (transverse) CT images (grade 0 (C), grade 3(D)), and sagittal SPGR MRI images (grade 0 (E), grade 3 (F)). White arrows indicate joint effusion. The white line shows the distance from the midpoint in the proximodistal patellar length to the femoral trochlea, which quantitatively represents femoropatellar effusion. FT= femoral trochlea, P= patella.

Fig.5. Sagittal SPGR MRI image of the knee joint; showing the site where articular cartilage thickness was measured. The solid white line represents the line tangent to the posterior border of the tibial plateau; the dashed white line represents the tangent to the articular cartilage

Fig.6. Total joint osteophyte scores on coronal (dorsal) CT examination. Control R= Control right, Control L= Control left, ACLT= anterior cruciate ligament transection, SX= surgery, n= number of joints, * = $p \leq 0.05$, **= $p \leq 0.01$, †= $p \leq 0.05$

Fig.7. Minimal joint space width measurements for each joint over time on MRI. Control R = Control right, Control L = Control left, ACLT = anterior cruciate ligament transection, n = number of joints, * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$.

Fig.8. Joint effusion score for each joint over time on CT. Control R= Control right, Control L= Control left, ACLT= anterior cruciate ligament transection, SX= surgery, n= number of joints, * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$.

Fig.9. Total joint gross morphologic (A) and histologic (B) scores following application of India ink for each group. Control L= Control left, Control R= Control right, ACLT= anterior cruciate ligament transection, LFC= lateral femoral condyle, MFC= medial femoral condyle, LTP= lateral tibia plateau, MTP= medial tibia plateau, n= number of joints, ** = $p \leq 0.01$.

Table 1: Anatomical regions of the knee joints of the rabbits which were assessed with multimodality imaging, macroscopically and histologically. **CR:** computed radiography, **CT:** computed tomography, **MRI:** magnetic resonance imaging, **CCV:** caudocranial view, **MLV:** mediolateral view, **CP:** coronal (dorsal) plane, **AP:** axial (transverse) plane, **SP:** sagittal plane, **Macro:** gross morphological evaluation, **Histo:** histology, +: evaluated, -: not evaluated

<i>Anatomical region</i>	<i>CR</i>		<i>CT</i>		<i>MRI</i>		<i>Macro</i>	<i>Histo</i>
	<i>CCV</i>	<i>MLV</i>	<i>CP</i>	<i>AP</i>	<i>CP</i>	<i>SP</i>		
Lateral femoral condyle	+	+	+	+	+	+	+	+
Medial femoral condyle	+	-	+	+	+	+	+	+
Lateral femoral epicondyle	+	-	+	+	+	+	+	-
Medial femoral epicondyle	+	-	+	+	+	+	+	-
Femoral intercondylar fossa	+	-	+	+	+	-	+	-
Femoral trochlear ridge	-	+	+	+	+	+	+	-
Lateral tibial plateau	+	-	+	+	+	-	+	+
Medial tibial plateau	+	-	+	+	+	-	+	+
Cranial tibial plateau	-	+	-	+	-	+	-	-
Caudal lateral tibial plateau	-	-	-	-	-	+	-	-
Caudal medial tibial plateau	-	-	-	-	-	+	-	-
Proximal patella	-	+	-	+	-	+	-	-
Distal patella	-	+	-	+	-	+	-	-
Lateral femorotibial joint	+	-	+	-	+	+	-	-
Medial femorotibial joint	+	-	+	-	+	+	-	-
Femoropatellar joint	-	+	-	+	-	+	-	-

Table 2: Summary of parameters evaluated in the knee joints with multimodality imaging, and their respective grades. **MJSW:** minimal joint space width, **RC:** remaining cartilage thickness adjacent to cartilage defect, **DH:** height of the cartilage defect, **MLD:** maximal length of cartilage defect, **MWD:** maximal width of cartilage defect, **DPS:** proportional cartilage defect surface, (+): parameter was assessed in this modality, (-): parameter was not assessed in this modality. **CR=** computed radiography, **CT:** computed tomography, **MRI:** magnetic resonance imaging, **CCV:** caudocranial view, **MLV:** mediolateral view, **CP:** coronal (dorsal) plane, **AP:** axial (transverse) plane, **SP SPGR:** sagittal plane SPGR, **CP PD-FS:** coronal (dorsal) plane proton density-fat saturation, and **CP T2-FS:** coronal (dorsal) plane T2-fat saturation.

	CR		CT		MRI		
	CCV	MLV	CP	AP	SP SPGR	CP PD-FS	CP T2-FS
Bone							
<i>Osteophytosis</i>							
- Severity (0-3)	+	+	+	+	+	+	-
<i>Subchondral sclerosis</i>							
- Severity (0-3)	+	-	+	-	-	-	-
- Depth (mm)	+	-	+	-	-	-	-
<i>Bone Marrow lesions</i>							
- Severity (0-3)	-	-	-	-	-	+	+
MJSW (mm)	+	+	+	-	+	+	-
Femoropatellar effusion							
- Severity (0-3)	-	+	-	+	+	-	-
- Measure (mm)	-	+	-	+	+	-	-
Cartilage							
Thickness (mm)	-	-	-	-	+	+	-
RC (mm)	-	-	-	-	+	+	-
DH (mm)	-	-	-	-	+	+	-
MLD (mm)	-	-	-	-	+	+	-
MWD (mm)	-	-	-	-	+	+	-
DPS (Grade 0-3)	-	-	-	-	+	+	-

Table 3: Morphologic grade of the articular cartilage. Grade assigned following application of India ink.

Fibrillation= surface irregularities or clefts in the cartilage thickness, ulceration= cartilage thickness loss.

Grade 1: Intact surface: surface normal in appearance and does not retain India ink

Grade 2: $0 \text{ mm} < \text{Fibrillation} \leq 4 \text{ mm}$

Grade 3: $4 \text{ mm} < \text{Fibrillation} \leq 8 \text{ mm}$

Grade 4: $8 \text{ mm} \leq \text{Fibrillation}$

Grade 5: $0 \text{ mm} < \text{Ulceration} \leq 2 \text{ mm}$

Grade 6: $2 \text{ mm} < \text{Ulceration} \leq 5 \text{ mm}$

Grade 7: $5 \text{ mm} < \text{Ulceration}$

Table 4: Histological grade

Grade 1: Normal

Grade 2: Decrease of Safranin O fast green staining

Grade 3: Fibrillation or clefts

Grade 4: Erosion to a depth of 1/3 of hyaline cartilage

Grade 5: Erosion to a depth of 2/3 of hyaline cartilage

Grade 6: Ulceration of the hyaline cartilage (to the tidemark)

Grade 7: Ulceration of the hyaline and calcified cartilage to the subchondral bone

Table 5: Sensitivities and specificities of caudocranial CR, coronal (dorsal) CT and coronal (dorsal) MRI to detect osteophytes identified on morphological examination.

CR= computed radiography, CT= computed tomography, MRI= magnetic resonance imaging, Se= sensitivity, Sp= specificity, TrF= femoral trochlea, Ep.L= lateral epicondyle, Ep.M= medial epicondyle, LTP= lateral tibia plateau, MTP= medial tibia plateau, NE= not evaluable.

Site	Caudocranial CR		Coronal CT		Coronal MRI	
	Se %	Sp%	Se %	Sp%	Se %	Sp%
TrF	NE	NE	100	86	90	77
Ep.L	100	54	100	79	75	87
Ep.M	50	100	100	73	90	100
LTP	10	100	50	100	10	100
MTP	50	95	100	90	60	91

Table 6: Evolution of bone marrow lesion scores over time for joints presenting a bone marrow lesion at least once, with the joint respective morphologic and histologic grade at euthanasia.

NI= not imaged, Control L= Control Left, ACLT= anterior cruciate ligament transection, LFC= Lateral femoral condyle, MFC= medial femoral condyle, IF= Intercondylar fossa.

Rabbit identity	Group	Anatomic site	Week					Macroscopic grade	Histologic grade
			-2	2	4	8	12		
35	Control L	LFC	0	NI	NI	2	NI	5	2
43	Control L	LFC	0	NI	NI	2	NI	1	2
45	Control L	LFC	0	NI	NI	2	NI	1	1
59	Sham	LFC	0	0	0	1	0	2	3
47	ACLT	LFC	1	0	1	2	NI	2	4
44	ACLT	IF	0	1	2	0	NI	NI	NI
		LFC	0	1	1	1	NI	5	3
52	ACLT	IF	0	2	0	0	0	NI	NI
		LFC	0	0	3	1	1	3	5
59	ACLT	LFC	0	1	0	0	1	3	3
		MFC	0	1	0	0	0	2	4
46	ACLT	LFC	0	0	1	0	NI	2	6
		IF	0	0	0	3	NI	NI	NI
60	ACLT	MFC	0	0	1	0	NI	6	6
		LFC	0	0	0	1	NI	1	2
63	ACLT	LFC	0	0	1	0	0	4	5
65	ACLT	IF	0	0	2	1	0	NI	NI

Table 7: Sensitivity and specificity of 1.5 Tesla MRI for detection of cartilage lesions in the knee joint

Obs.1= Observer 1, Obs.2= Observer 2, LFC= Lateral Femoral Condyle, MFC= Medial Femoral Condyle, LTP= Lateral Tibia Plateau, MTP= Medial Tibia Plateau, Se= Sensitivity, Sp= Specificity, NE= not evaluable.

Compartment	Se (%)		Sp (%)	
	Obs1	Obs2	Obs1	Obs2
LFC	0	0	100	96
MFC	50	0	100	96
LTP	NE	NE	100	95.7
MTP	0	NE	100	95.7

Fig.1 (Bouchgua et al)



Fig.2 (Bouchgua et al)

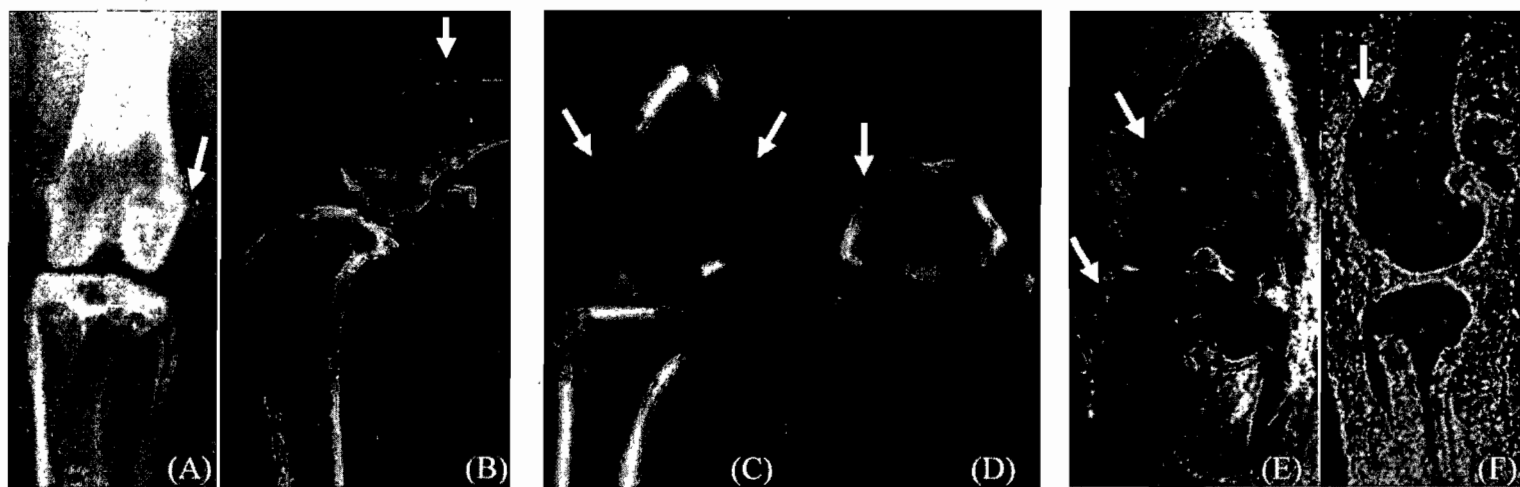


Fig. 3 (Bouchgua et al)

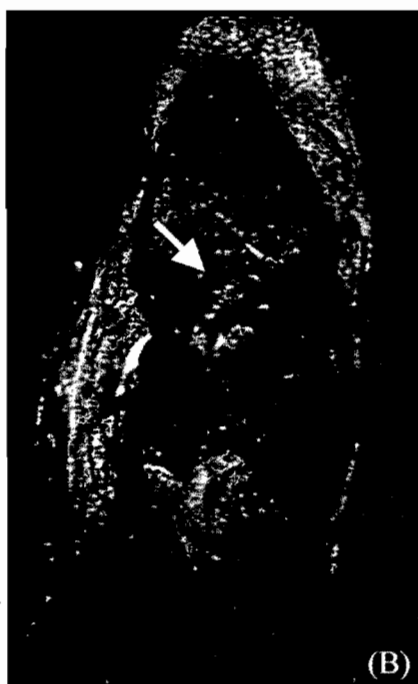
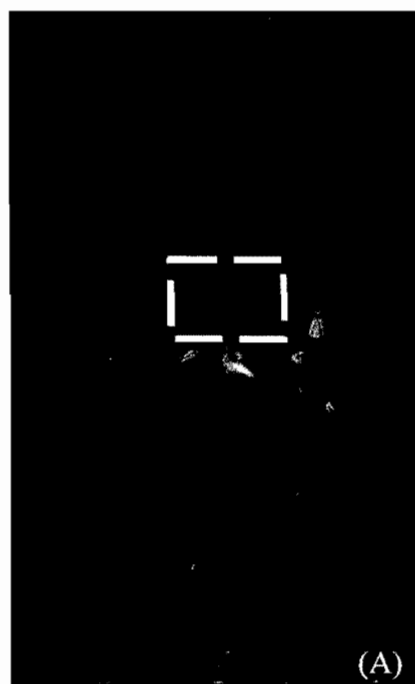


Fig. 4 (Bouchgua et al)

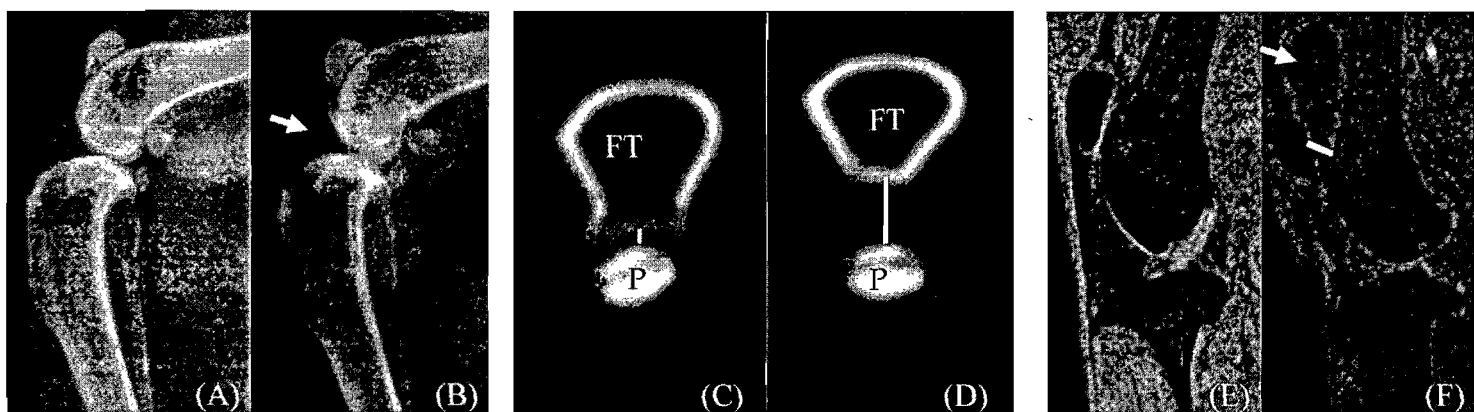


Fig. 5 (Bouchgua et al

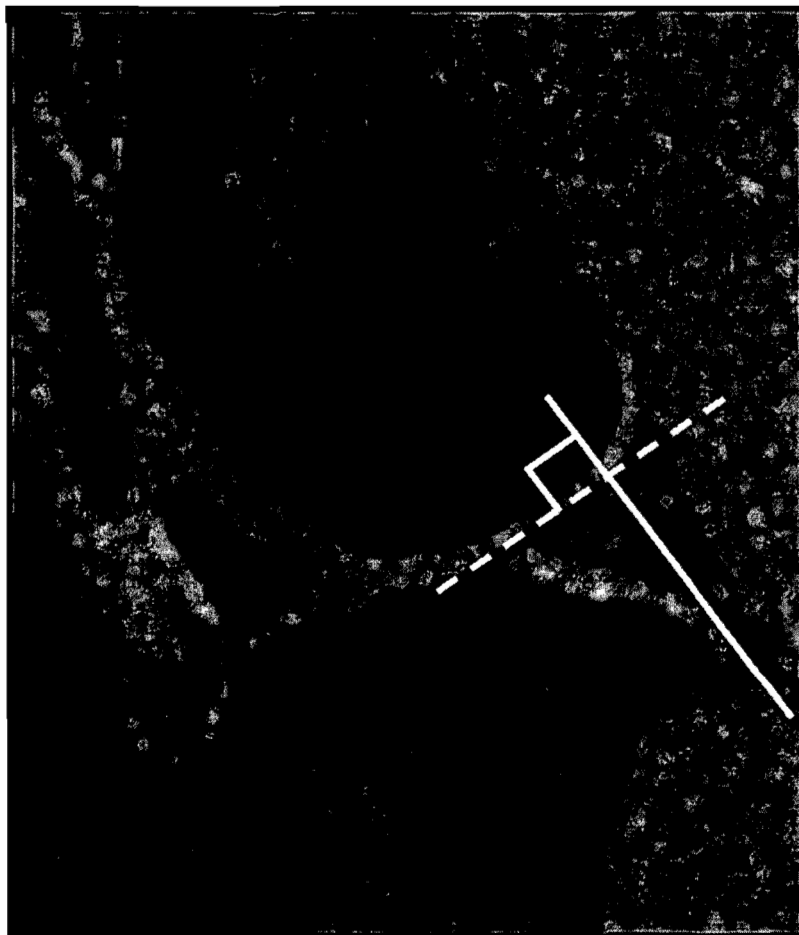


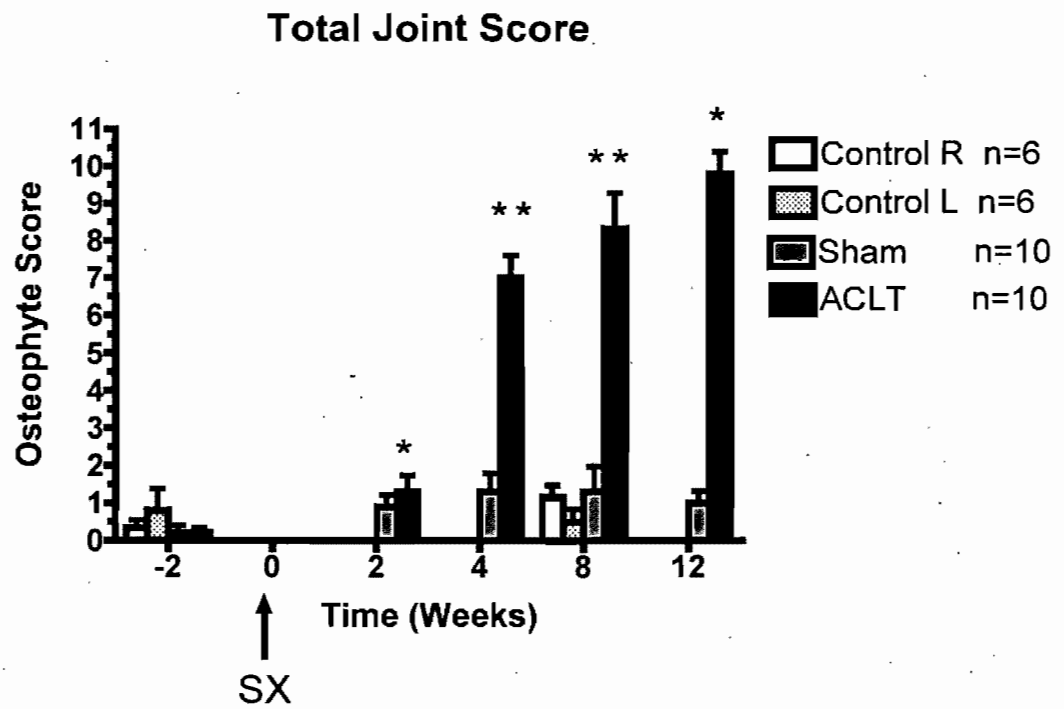
Fig.6 (Bouchgua et al.)

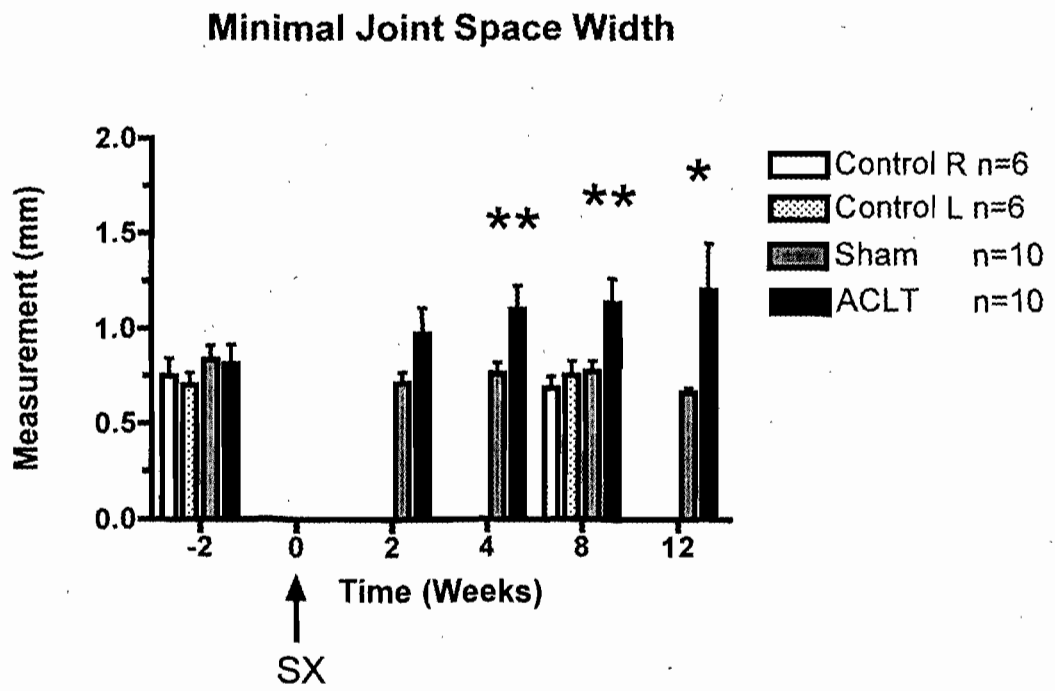
Fig. 7 (Bouchgua et al.)

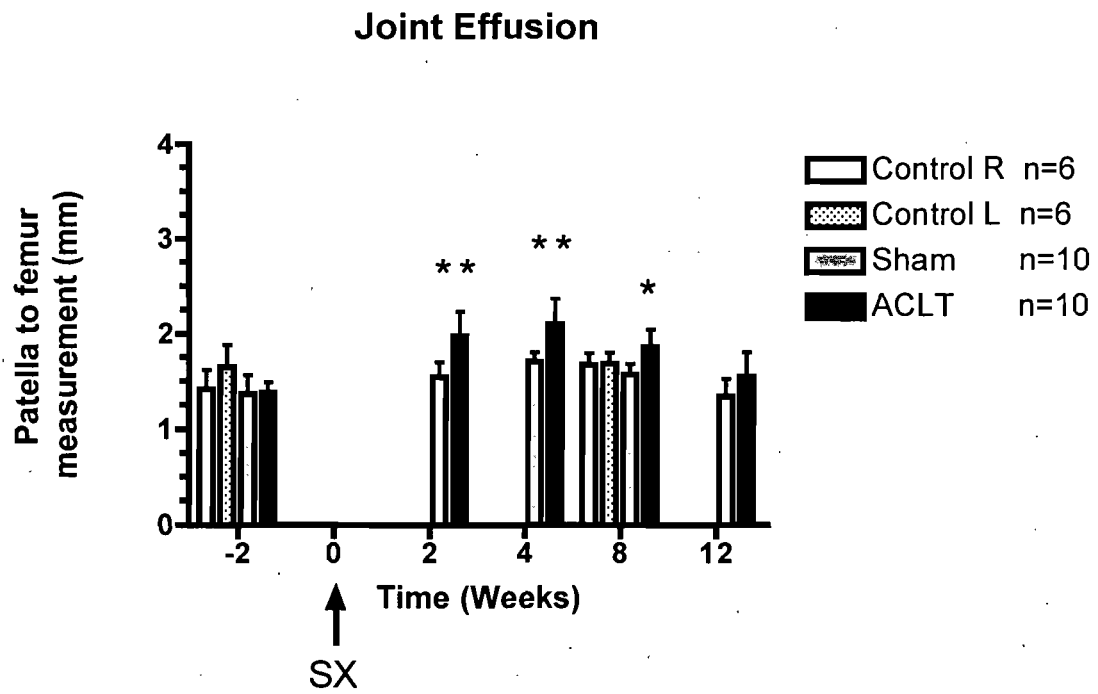
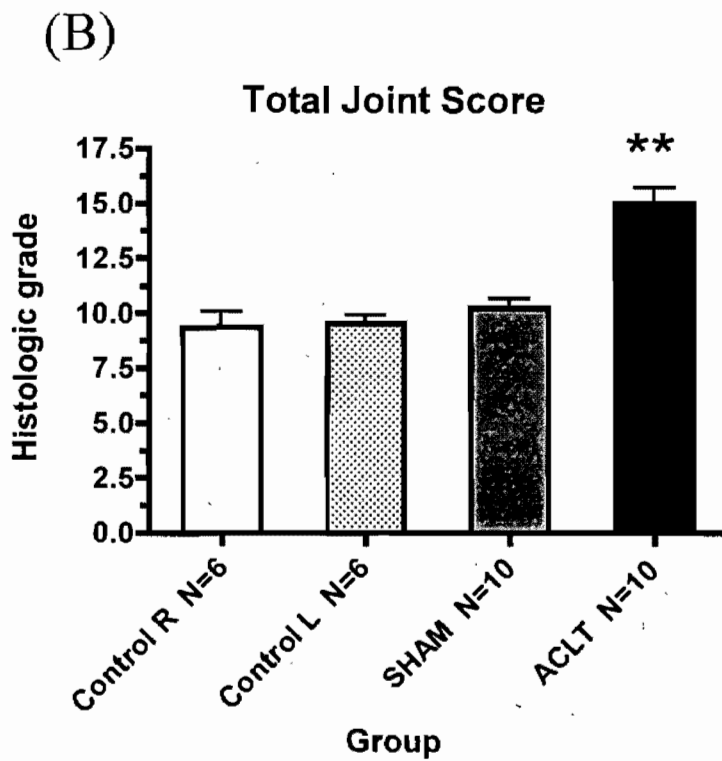
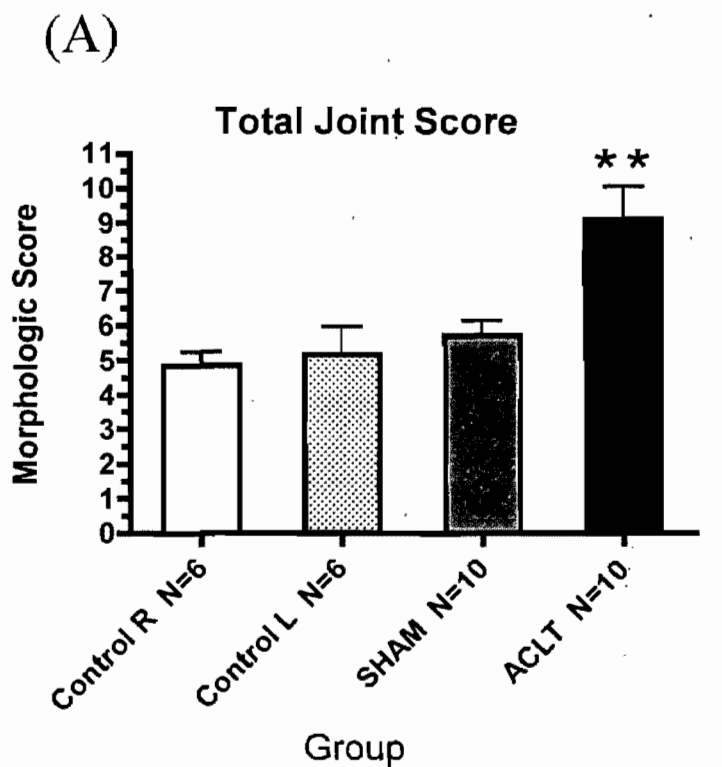
Fig.8 (Bouchgua et al.)

Fig.9 (Bouchgua et al.)



**Multimodality imaging in a rabbit model of osteoarthritis. Part II:
Bone mineral density assessment.**

Maria Bouchgua, DMV ‡
Kate Alexander, DMV, MSc, Dipl.ACVR ‡
Eric Norman Carmel, DMV ‡
Marc André d'Anjou, DMV, Dipl. ACVR ‡
Guy Beauchamp, PhD ‡
Hélène Richard ‡
Sheila Laverty, MVB, Dipl. ACVS, ECVS ‡

‡ Département de Sciences Cliniques,
† Département de Pathologie,
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada;

This work was funded by Aventis Pharma Deutschland GmbH and the Canadian
Arthritis Network.

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
CP 5000
Saint Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6
Tel: (450) 773-8521 #18267
Fax: (450) 778-8158
Email: [REDACTED]

Abstract

Objective: To assess bone mineral density (BMD) at different depths from the articular surface *in vivo* and temporally in a rabbit model of osteoarthritis (OA) using clinical computed tomography (CT) equipment.

Methods: The knee joints of rabbits (n=10 with anterior cruciate ligament transection (ACLT) and contralateral sham joints, and n = 6 unoperated controls) were scanned in a transverse image plane with a single-slice helical CT scanner. BMD was calculated at defined depths from the articular surface to the growth plate in the lateral (LFC) and medial (MFC) femoral condyles and tibial plateaus (LTP & MTP). Baseline BMD was measured at 2 weeks before surgery, and then repeated at weeks 2, 4 and 8 post-surgery in all 10 operated rabbits, and again at week 12 in 5 of the operated rabbits and at weeks -2 and 8 in the 6 control rabbits.

Results: In the control joints, BMD decreased with increasing distance into the epiphysis and remained stable over time within each depth. A significant reduction in BMD was observed at week 2 post-operatively in 3 compartments (LFC, MFC and MTP) in the ACLT joints and persisted to week 12. A modest reduction in BMD occurred in the LTP and MTP of the sham joints at week 12 alone.

Conclusion: Clinical CT equipment permitted rapid, repeated, *in vivo*, non-invasive BMD assessment in a rabbit model of OA. A marked BMD reduction was measured with progression of OA until the end point at 12 weeks.

Keywords: Bone mineral density, computed tomography, evolution, *in vivo*, osteoarthritis.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a complex disease involving all joint components, including the articular cartilage, subchondral bone, ligaments, menisci, synovial membrane and joint capsule. However, the tissue in which the earliest events of OA occur remains to be elucidated. In 1986, Radin studied the mechanical properties of the joint and suggested that subchondral bone played a role in the initiation and progression of cartilage damage [1]. Several studies subsequently assessed the involvement of subchondral bone in OA [1-10]. In humans, increased bone mineral density (BMD) is associated with knee OA [8]. Changes in BMD of tibial subchondral bone in humans can also be used as a predictor of the progression of knee OA [4]. Several reports in experimental animal models of OA have also identified the presence of bone remodelling in the development of OA [11-22].

The important role of the subchondral bone in OA is further demonstrated by recent animal studies evaluating the capacity of various compounds to alter the changes associated with OA. Bisphosphonates prevented a significant decrease in BMD and suppressed bone turnover in the subchondral region in canine [23] and rat models [24] of OA. Hyaluronan was also reported to protect against cartilage degradation by inducing more compliant subchondral bone [25]. In addition, glucosamine hydrochloride attenuated subchondral bone turnover, preventing the decrease in BMD that occurred in early stages of OA in rabbits with surgically-induced instability [26]. Furthermore, calcitonin, an inhibitor of osteoclastic bone resorption [27], also reduced subchondral trabecular bone loss in a canine model of OA [28, 29]. From the results of these studies, it would appear appropriate to assess

subchondral bone changes, in addition to articular cartilage changes, when assessing structure modifying effects of novel therapies for OA.

Histomorphometric evaluation allows the early detection of microscopic changes in subchondral bone architecture. However, because it is an *ex vivo* tool, histomorphometry is limited to postmortem assessment. An alternative non-destructive way to study the early impact of OA on bone is to measure BMD. BMD has been proven to be a good to excellent estimator of the mechanical properties of bone [30]. Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) is extensively used to evaluate BMD, notably for osteoporosis in humans [31]. DEXA has also been used in animal models of OA to assess changes in BMD with disease development [16, 20, 26, 32, 33]. However the decrease in BMD measured by DEXA has been shown not only to be a consequence of decreased BMD but also to a decrease in bone mass [16].

Quantitative computed tomography (qCT) (also known as osteoabsorptiometry) and micro-CT are more accurate than DEXA for the measurement of BMD in OA [34], allowing to separately estimate bone density in trabecular and cortical bone compartments. Furthermore, qCT is a repeatable technique for BMD assessment that can be used non-invasively to evaluate BMD *in vivo* in humans [35]. X-rays emitted by the CT scanner are attenuated by tissue, according to the tissue physical characteristics and X-ray beam energy. X-rays travelling beyond tissues are detected and converted into CT numbers or Hounsfield Units (HU), a numerical expression of tissue density, which is represented by different shades of grey on cross-sectional CT images. Indeed, a linear relationship exists between the HU and the mean linear attenuation coefficient in a given volume of tissue. CT has been previously used to assess BMD in animal models of OA [18, 21-23, 36] but the change in BMD both

temporally and at different depths in the subchondral bone has not yet been studied by CT *in vivo* in an animal model of OA.

The purpose of this study was to assess with clinical CT equipment the evolution over time of BMD at different depths in the subchondral bone in an *in vivo* experimental animal model of OA; and to compare it with a sham and a control group.

Material and methods

Experimental OA

Sixteen healthy, skeletally mature, male New Zealand White rabbits aged (mean \pm SD) 8 ± 0.5 months and weighing 4.01 ± 0.47 kg, were used in the study. Surgical transection of the anterior cruciate ligament (ACL) of a randomly-assigned knee joint was performed to experimentally induce OA in ten rabbits (ACLT group). The contralateral knee joint was sham-operated (skin, joint capsule and synovial membrane incised, ACL left intact) (sham group). The surgical procedure has been previously described [37]. The remaining six rabbits constituted a control group to identify possible changes in normal animals over time. No surgery was performed on these individuals. All procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal.

Computed tomographic procedure

The rabbits were positioned in right lateral recumbency with the hindlimbs in a plexiglass mould to standardize positioning throughout the study. Because HU is influenced by the scanning energy used and individual scanner properties, the HU cannot be directly compared from one CT scanner to another, or from one scan acquisition to another [38]. Therefore, in order to standardize BMD measurements, the hindlimbs were placed longitudinally on a solid dipotassium phosphate reference phantom (13002 Model 3 CT Calibration Phantom, Mindways Software, Inc, San Francisco, California, United States). The phantom is composed of 5 parallel rods of different reference materials: water, K_2HPO_4 in concentrations of 50, 100, 200 mg/ml,

and a high density polyethylene. Both knee joints and the phantom were scanned simultaneously within the same field of view, in an axial (transverse) image plane with a single-slice helical CT scanner (HiSpeed ZXi, General Electric, Mississauga, Ontario, Canada). The following protocol was used: helical scan of 1mm slice thickness, pitch of 1, 25 cm display field-of-view (DFOV) to include the BMD phantom in its entirety, 120 kVp, 120 mAs, and 512 X 512 matrix.

BMD measurements

A circular 150 mm² region of interest (ROI) was placed by a single evaluator in each phantom rod. The HU measured within each rod was converted into mineral density values by linear regression ($\mu_{ROI} = \rho_{water} + \sigma_{ref} \cdot \rho_{K_2HPO_4} + \beta_{ref}$) [39]. An oval 10 mm² ROI was placed in each joint compartment: lateral femoral condyle (LFC), medial femoral condyle (MFC), lateral tibial plateau (LTP), and medial tibial plateau (MTP). This ROI was placed mid-distance between cranial and caudal in each compartment (Fig 1). ROI measurement was repeated at multiple depths in each compartment, gathering data on the subchondral bone plate and extending into the epiphysis. In the femur, the BMD was calculated in the medial and lateral distal epiphysis, up to the growth plate, at depths of 1, 2, 3, 4, 5 and 6 mm from the articular surface (Fig. 2). In the medial and lateral proximal tibial epiphysis, BMD was calculated at depths of 1, 2 and 3 mm (Fig. 2). The mean HU values of the phantom were compared to the HU values for each depth of each femoral and tibial compartment and converted with linear regression ($\mu_{ROI} = \rho_{water} + \sigma_{ref} \cdot \rho_{K_2HPO_4} + \beta_{ref}$) [39] into dipotassium phosphate equivalent BMD values (mg/ml).

Baseline BMD was measured 2 weeks before surgery, and repeated at weeks 2, 4 and 8 post-surgery for all ten ACLT/sham rabbits, and also at week 12 for 5 of the ACLT/sham rabbits. BMD was measured at weeks -2 and 8 in the six control rabbits to detect changes related to time.

Statistical analysis

The evolution of BMD over time between groups and differences between depths, and compartments (LFC vs MFC, and LTP vs MTP) were assessed using repeated-measures linear models with combinations of depth, compartment and time treated as within-subject factors. A priori contrasts were used to compare density at different levels of the independent variables. Analyses were performed with SAS version 9.1 (Cary, N.C.). Statistical significance was set at $p < 0.05$ throughout.

Results

Control group

Figure 3 illustrates BMD at various depths in all 4 compartments (LFC, MFC, LTP, MTP,) for both right and left control joints. There was a significant effect of depth on BMD in all compartments for both right and left control joints ($p \leq 0.0001$) over time (week -2 and week 8). BMD decreased with increasing distance from the articular surface, with two exceptions: for week -2 and week 8, BMD was significantly greater at the 2 mm depth when compared to the 1 mm depth in the LFC ($p = 0.02$) and LTP ($p < 0.0001$) in the left joint.

The majority of BMD measurements remained stable over time. An exception occurred in the left MFC at 1 mm ($p = 0.048$): there was a greater BMD recorded at week 8 when compared to week -2. Similar exceptions were observed at 2 ($p = 0.0007$) and 3 mm ($p < 0.0001$) in the left MTP.

When compartment (MFC, LFC, MTP, LTP) BMD measurements were compared within the same control joint, significant differences were identified and they varied depending on whether the joint was right or left. In the right joints, the MFC had a significantly higher BMD than the LFC at depths 3-6 mm (inclusively) at both weeks -2 ($p = 0.0019-0.05$) and week 8 ($p = 0.0047-0.043$). Conversely, in the left joints, differences were observed in the tibia, where BMD measurements in the MTP at 1 mm depth at week -2 ($p = 0.01$) and more marginally at week 8 ($p = 0.05$) were higher than those recorded in the LTP. However the LTP had a higher BMD than the MTP at both depths of 2 mm ($p = 0.02$) and 3 mm ($p = 0.0007$) at week -2. This difference was also observed at 3 mm at week 8 ($p = 0.002$).

Because significant differences in BMD at the various depths were identified when left and right control joints were compared, BMD evolution following surgery in the ACLT and sham joints was assessed by comparisons with each joint's baseline measurements (internal control), rather than by comparison with the control group.

ACLT and sham group

The time course variation in BMD in the ACLT and sham joints at all depths and in all compartments is illustrated in Figures 4 and 5. Statistically significant changes and the direction of changes (increase or decrease), relative to pre-surgery measurements, are illustrated in Table 1. Of the significant changes occurring, 81% (35/43) were detected in the ACLT limbs and the majority were highly significant ($p < 0.001$). A decrease in BMD over time was the change that occurred the most frequently in ACLT limbs, with only 1 exception (LFC, week 4, at 2 mm). This decrease was observed by week 2 post-operatively in 3 (LFC, MFC and MTP) out of 4 compartments in the ACLT joints, but not in the sham joints. The greatest number and most significant BMD decreases compared to baseline were observed at week 8 in the MFC and MTP in the ACLT joints (Table 1). BMD in the MFC decreased by a difference of up to 140.8 mg/ml (4 mm depth) when compared with baseline. In the MTP, BMD decreased by up to 250.8 mg/ml (2 mm depth). At week 12, a significant decrease in BMD persisted in all 4 compartments but not at all depths of the ACLT joints.

The decrease in BMD occurred to the greatest depth in the MFC of ACLT joints. This was observed at weeks 4, 8 and 12, with the decrease measured at all 6 depths at week 8. By comparison, these changes were restricted to depths of 1 and 2 mm in the

LFC. At week 8 in the LTP and MTP, the decreases were observed at all 3 depths, but overall they were of greater statistical significance in the MTP.

Nineteen percent of significant changes occurred in the sham joints, and most consisted of a decrease in BMD in the tibial plateaus. A more modest decrease was observed in the LTP ($p = 0.047$) and MTPs ($p < 0.024$) of the sham joints.

Discussion

This study reports a significant decrease in subchondral bone mineral density associated with the early progression of OA in an animal model. To our knowledge, this is the first study that evaluates the temporal changes in BMD at different depths in the femur and the tibia *in vivo* and non-destructively in a rabbit model of OA using clinical CT equipment.

In the control animals, BMD decreased from the articular surface to the deeper zones of the epiphysis in both the femur and the tibia, reflecting epiphyseal bone structure: the trabeculae are more compact near the articular surface when compared to deeper in the bone. Because there were few significant temporal variations in BMD values in the control group, it was appropriate to compare BMD evolution over time to pre-surgery measurements in the ACLT and sham joints. We could assume that changes identified would be due to induction of OA.

The differences in BMD between the right and left control joints are difficult to explain. We suspect that the observed differences in BMD between the right and left control animal knees in the study herein may be due to limb position in the gantry. Although a mould was used to standardize the position of the knee throughout the study, the right limb had a more consistent and straighter position than the left limb as it lay against the table. A mild degree of rotation and varus deformity was subjectively noted in the left limb, making it more difficult to draw an ROI at exactly the same site at all time points in the left limbs. To our knowledge, no study has reported the influence of limb or position on BMD values measured with CT.

BMD decreased temporally in the ACLT limbs, and this was observed from very early in the study (2 weeks post-surgery) until its termination (12 weeks). This finding is consistent with other investigations that reported decreased subchondral BMD in experimental animal models of OA. In ACLT rabbit models of OA, a decrease in BMD has been previously observed at 4 [18] and 8 [18, 26] weeks but not at 12 weeks. In a canine ACLT model, similar changes to those we observed were identified as early as 3 [36] and 4 [23] weeks post-surgery and persisted until 12 weeks post-ACLT [36]. In a menisectomized model of OA in rabbits, which creates less severe lesions than the ACLT model, a decrease in BMD was observed at 13 and up to 40 weeks post-surgery [20]. Likewise, in a menisectomized sheep model of OA, which has a slower progression of disease, a BMD decrease was measured at 6 months post-surgery (one time point measurement in the study) in the medial femoral condyle and medial tibial plateau [33].

Other studies have shown a biphasic change in BMD, characterized by an initial decrease, followed by an increase later in the course of the disease. Spontaneous OA in Dunkin-Hartley guinea pigs, which are commonly used for OA studies, revealed a BMD decrease at 9 weeks of age and a later BMD increase at 24 and 36 weeks of age compared to unaffected Bristol strain 2 animals [11]. In Dunkin-Hartley guinea pigs with a partial medial menisectomy, a similar pattern of early decrease in BMD was observed at week 4 post-surgery, followed by an increase after 12 weeks [16]. Similarly, in dogs with naturally occurring OA (hip dysplasia), BMD was higher than in non-osteoarthritis affected dogs [22].

This biphasic change in BMD was observed using micro-CT *ex vivo* in a previous collaborative study from our laboratory, where an initial decrease in BMD was

followed by an increase at 12 weeks [18]. In the current study using the same rabbit ACLT-transection model, BMD values were decreased at week 12 at more superficial depths, whereas deeper in the bone, values had returned to pre-surgery levels. An explanation for these differences between the studies at 12 weeks could be that the animals in the current study had overall less severe histological cartilage lesions [37] than in the previous study. We attributed this to the use of younger animals in the current study (8 months old vs 2 years old [18]) and also a change in animal cages between both studies.

The differences between our study and others can be explained by differences in the animal model used, the measurement time points and the depths at which BMD was measured. It is probable that, had we evaluated the animals over a longer period of time, BMD would eventually have increased. Indeed in human OA, when BMD is measured, the disease is often in an advanced stage and BMD is increased.

The mechanisms explaining the early decrease in BMD that occurs in these experimental animal models of OA are still unclear. An increased rate of bone resorption and/or a decreased rate of bone formation lead to demineralization and decreased BMD. The equilibrium between subchondral bone formation and bone resorption is highly dependent on osteoclastic activity [40]. Subchondral bone remodelling can be influenced by mechanical, metabolic and other systemic and/or local factors [3]. Hypotheses based on three factors (mechanical, local inflammatory and blood flow) could explain the BMD decrease observed in early experimental OA. According to Wolff's law, below a certain mechanical stress level, bone resorption occurs due to osteoclast activation, leading to a decrease in BMD. Because of the initial acute instability and immediate discomfort induced by the ACLT surgical

procedure and the mechanical characteristics of quadrupeds, load is likely transferred from ACLT and sham joints to the forelimbs. Although no force plate analyses were performed, subjective observations of the animals indicated that they were less active in their cages in the first 2 weeks after surgery, which likely leads to a disuse of the operated limb and consequently reduced mechanical stress. Minor alterations of mechanical stress could therefore explain the differences in BMD values observed between baseline and operated joints. Reduced weight bearing occurred in a canine ACLT model of OA: loading on the ACLT joint was reduced to 35% of pre-ACLT values 2 weeks after surgery and progressively increased to 50-60% within 6-12 weeks [41, 42]. In a rabbit model of joint instability (ACLT and medial collateral ligament transection), the injured joint carried only 31% of the total hindlimb load [43]. An *in vivo* kinematic study of the rabbit knee reported a significant decrease in knee flexion 4 weeks after an ACLT and an anterior displacement of the tibia at week 4 and 8 post-ACLT but not at week 12 compared to control rabbits [44]. Combined, these observations further support the hypothesis of early-altered joint loads after ACLT that could contribute to reduce BMD in injured knees.

A second hypothesis to explain the initial decrease in BMD in the rabbit ACLT model of OA is an effect of inflammation on the remodelling of the subchondral bone. Surgery (ACLT and sham) induces an acute inflammatory reaction. Inflammatory cells such as leukocytes and macrophages are sources of cytokines [45], including interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor, that stimulate osteoclast formation [46] and promote resorption. Synovial fluid from OA patients added to murine calvarial bone cultures induced bone resorption [47], indicating that OA synovial fluid has the potential to induce subchondral bone

remodelling. Therefore, these early immediate inflammatory events could explain the BMD decrease observed as early as 2 weeks post-surgery. This theory is further supported by the fact that early changes in BMD were seen at depths (1 mm) closest to the articular surface.

A third hypothesis is based on changes in blood flow in the subchondral bone, which could be induced either by mechanical or inflammatory factors. Subchondral blood flow was higher (76% at 14 weeks and 44% at 48 weeks) in knee joints where instability was induced by ACLT when compared to sham joints in a rabbit model of OA [48]. Increased blood flow may stimulate osteoclastic activity [49] and thereby contribute to increased bone resorption.

In conclusion, CT permitted an *in vivo* and rapid non-invasive temporal assessment of BMD in a rabbit model of OA. As clinical CT equipment is able to rapidly and easily detect BMD variation in this experimental animal model of OA, it should be a useful tool to evaluate the efficacy of novel therapies on the subchondral bone which is involved in the pathogenesis of OA.

Acknowledgements

The authors wish to thank, Geneviève Rouleau, Anne-Marie Martel, Suzie Lachance and Marie Lecocq for their technical assistance.

References

1. Radin EL, Rose RM. Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 34-40.
2. Li B, Aspden RM. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 1997; 56: 247-254.
3. Lajeunesse D, Hilal G, Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7: 321-322.
4. Bruyere O, Dardenne C, Lejeune E, Zegels B, Pahaut A, Richy F, et al. Subchondral tibial bone mineral density predicts future joint space narrowing at the medial femoro-tibial compartment in patients with knee osteoarthritis. *Bone* 2003; 32: 541-545.
5. Amir G, Pirie CJ, Rashad S, Revell PA. Remodelling of subchondral bone in osteoarthritis: a histomorphometric study. *J Clin Pathol* 1992; 45: 990-992.
6. Sicard GK, Markel MD, Manley PA. Histomorphometric analysis of the proximal portion of the femur in dogs with moderate osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2005; 66: 150-155.
7. Bailey AJ, Mansell JP. Do subchondral bone changes exacerbate or precede articular cartilage destruction in osteoarthritis of the elderly? *Gerontology* 1997; 43: 296-304.
8. Stewart A, Black AJ. Bone mineral density in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2000; 12: 464-467.

9. Dieppe P, Cushnaghan J, Young P, Kirwan J. Prediction of the progression of joint space narrowing in osteoarthritis of the knee by bone scintigraphy. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 557-563.
10. Carlson CS, Loeser RF, Purser CB, Gardin JF, Jerome CP. Osteoarthritis in cynomolgus macaques. III: Effects of age, gender, and subchondral bone thickness on the severity of disease. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1209-1217.
11. Anderson-MacKenzie JM, Quasnicka HL, Starr RL, Lewis EJ, Billingham ME, Bailey AJ. Fundamental subchondral bone changes in spontaneous knee osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 224-236.
12. Ding M, Danielsen CC, Hvid I. Age-related three-dimensional microarchitectural adaptations of subchondral bone tissues in guinea pig primary osteoarthrosis. *Calcif Tissue Int* 2006; 78: 113-122.
13. Quasnicka HL, Anderson-MacKenzie JM, Bailey AJ. Subchondral bone and ligament changes precede cartilage degradation in guinea pig osteoarthritis. *Biorheology* 2006; 43: 389-397.
14. Pastoureau P, Leduc S, Chomel A, De Ceuninck F. Quantitative assessment of articular cartilage and subchondral bone histology in the meniscectomized guinea pig model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 11: 412-423.
15. Huebner JL, Hanes MA, Beekman B, TeKoppele JM, Kraus VB. A comparative analysis of bone and cartilage metabolism in two strains of guinea-pig with varying degrees of naturally occurring osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 758-767.
16. Pastoureau PC, Chomel AC, Bonnet J. Evidence of early subchondral bone changes in the meniscectomized guinea pig. A densitometric study using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; 7: 466-473.

17. Batiste DL, Kirkley A, Laverty S, Thain LM, Spouge AR, Gati JS, et al. High-resolution MRI and micro-CT in an ex vivo rabbit anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 614-626.
18. Batiste DL, Kirkley A, Laverty S, Thain LM, Spouge AR, Holdsworth DW. Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 986-996.
19. Fahlgren A, Messner K, Aspenberg P. Meniscectomy leads to an early increase in subchondral bone plate thickness in the rabbit knee. *Acta Orthop Scand* 2003; 74: 437-441.
20. Messner K, Fahlgren A, Ross I, Andersson B. Simultaneous changes in bone mineral density and articular cartilage in a rabbit meniscectomy model of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 197-206.
21. Boyd SK, Muller R, Matyas JR, Wohl GR, Zernicke RF. Early morphometric and anisotropic change in periarticular cancellous bone in a model of experimental knee osteoarthritis quantified using microcomputed tomography. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2000; 15: 624-631.
22. Chalmers HJ, Dykes NL, Lust G, Farese JP, Burton-Wurster NI, Williams AJ, et al. Assessment of bone mineral density of the femoral head in dogs with early osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2006; 67: 796-800.
23. Agnello KA, Trumble TN, Chambers JN, Seewald W, Budsberg SC. Effects of zoledronate on markers of bone metabolism and subchondral bone mineral density in dogs with experimentally induced cruciate-deficient osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1487-1495.

24. Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, et al. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1193-1206.
25. Ding M, Christian Danielsen C, Hvid I. Effects of hyaluronan on three-dimensional microarchitecture of subchondral bone tissues in guinea pig primary osteoarthrosis. *Bone* 2005; 36: 489-501.
26. Wang SX, Lavery S, Dumitriu M, Plaas A, Grynblas MD. The effects of glucosamine hydrochloride on subchondral bone changes in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1537-1548.
27. Poole RA, Guilak F, Abramson SB. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis*:27-49.
28. Behets C, Williams JM, Chappard D, Devogelaer JP, Manicourt DH. Effects of calcitonin on subchondral trabecular bone changes and on osteoarthritic cartilage lesions after acute anterior cruciate ligament deficiency. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 1821-1826.
29. Manicourt DH, Altman RD, Williams JM, Devogelaer JP, Druetz-Van Egeren A, Lenz ME, et al. Treatment with calcitonin suppresses the responses of bone, cartilage, and synovium in the early stages of canine experimental osteoarthritis and significantly reduces the severity of the cartilage lesions. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1159-1167.
30. Les CM, Keyak JH, Stover SM, Taylor KT, Kaneps AJ. Estimation of material properties in the equine metacarpus with use of quantitative computed tomography. *J Orthop Res* 1994; 12: 822-833.
31. Watts NB. Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Osteoporos Int* 2004; 15: 847-854.

32. Calvo E, Castaneda S, Largo R, Fernandez-Valle ME, Rodriguez-Salvanes F, Herrero-Beaumont G. Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15: 69-77.
33. Cake MA, Read RA, Appleyard RC, Hwa SY, Ghosh P. The nitric oxide donor glyceryl trinitrate increases subchondral bone sclerosis and cartilage degeneration following ovine meniscectomy. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 974-981.
34. Adams J, Alsop C, Harrison E, Lernbass I, Davies M, Cann C, et al. Quantitative Computed Tomography (QCT): the forgotten gold standard? *Journal of Bone Mineral Research* 2000; 15:S 169.
35. Leppala J, Kannus P, Natri A, Pasanen M, Sievanen H, Vuori I, et al. Effect of anterior cruciate ligament injury of the knee on bone mineral density of the spine and affected lower extremity: a prospective one-year follow-Up study. *Calcif Tissue Int* 1999; 64: 357-363.
36. Boyd SK, Matyas JR, Wohl GR, Kantzas A, Zernicke RF. Early regional adaptation of periarticular bone mineral density after anterior cruciate ligament injury. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2359-2364.
37. Bouchgua M, Alexander K, d'Anjou M, Carmel EN, Beauchamp G, Richard H, et al. Multimodality imaging of osteoarthritis lesions in a rabbit model of osteoarthritis. PartII. Submitted in. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007.
38. Cann CE. Quantitative CT for determination of bone mineral density: a review. *Radiology* 1988; 166: 509-522.
39. CT Calibration Phantom User's Guide. In: Mindways Software I Ed. San Francisco 2002.

40. Baron R, Ravesloot J-H, Neff L, Chakraborty M, Chatterjee D, Lomri A, et al. Cellular and molecular biology of the osteoclast. In: Cellular and molecular biology of bone, Noda M Ed. San Diego: Academic Press Limited 1993:445-495.
41. Korvick DL, Pijanowski GJ, Schaeffer DJ. Three-dimensional kinematics of the intact and cranial cruciate ligament-deficient stifle of dogs. *J Biomech* 1994; 27: 77-87.
42. O'Connor BL, Visco DM, Heck DA, Myers SL, Brandt KD. Gait alterations in dogs after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1142-1147.
43. Bray RC, Shrive NG, Frank CB, Chimich DD. The early effects of joint immobilization on medial collateral ligament healing in an ACL-deficient knee: a gross anatomic and biomechanical investigation in the adult rabbit model. *J Orthop Res* 1992; 10: 157-166.
44. Mansour JM, Wentorf FA, Degoede KM. In vivo kinematics of the rabbit knee in unstable models of osteoarthritis. *Ann Biomed Eng* 1998; 26: 353-360.
45. Ghosh P, Cheras PA. Vascular mechanisms in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15: 693-709.
46. Yoneda T. Cytokines in bone: local translators in cell-to-cell communications. In: Cellular and molecular biology of bone, Noda M Ed. San Diego: Academic Press Limited 1993:375-412.
47. Andersson MK, Lundberg P, Ohlin A, Perry MJ, Lie A, Stark A, et al. Effects on osteoclast and osteoblast activities in cultured mouse calvarial bones by synovial fluids from patients with a loose joint prosthesis and from osteoarthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: R18.

48. Judex S, Gross TS, Bray RC, Zernicke RF. Adaptation of bone to physiological stimuli. *J Biomech* 1997; 30: 421-429.
49. Gong JK, Burgess E, Bacalao P. Accretion and exchange of strontium-85 in trabecular and cortical bones. *Radiat Res* 1966; 28: 753-765.

Figure legends

Figure.1: Regions of interest for the measurement of bone mineral density in each femoral condyle (a, c) and tibial plateau (b, d) on the axial (transverse) CT sections. The phantom is composed of 5 parallel rods of different reference materials: water, K_2HPO_4 in concentrations of 50, 100, 200 mg/ml, and a high density polyethylene. Key: HU=Hounsfield units.

Figure.2: Coronal (dorsal) CT image illustrating the depths at which bone mineral density was measured in the distal femoral and proximal tibial epiphyses.

Figure. 3: Evolution of bone mineral density over time in each compartment and for each depth for the control group.

Key: BMD= Bone mineral density, SD= Standard Deviation, LFC= Lateral femoral condyle, MFC= Medial femoral condyle, LTP=Lateral tibial plateau, MTP=Medial tibial plateau, R= Right, L=Left.

Figure. 4: Temporal variation of bone mineral density measurements at various depths from the articular surface in the anterior cruciate ligament transection (ACLT) joints.

Key: BMD= Bone mineral density, SD= Standard Deviation, LFC= Lateral Femoral Condyle, MFC= Medial Femoral Condyle, LTP=Lateral Tibial Plateau, MTP= Medial Tibial Plateau, ACLT= Anterior Cruciate Ligament Transection, SX= Surgery.

Figure. 5: Temporal variation of bone mineral density measurements at various depths from the articular surface in each joint compartment in the sham group.

Key: BMD= Bone mineral density, SD= Standard Deviation, LFC= Lateral Femoral Condyle, MFC= Medial Femoral Condyle, LTP= Lateral Tibial Plateau, MTP= Medial Tibial Plateau, SX= Surgery.

Table 1: Summary of ANOVA results for the comparisons of BMD in ACLT and sham operated knees relative to baseline measurements. Significant differences relative to baseline measurements are indicated with an arrow, its direction indicating whether BMD significantly increased (\uparrow) or decreased (\downarrow). - = no significant change, *= $p<0.05$, **= $p\leq 0.01$, ***= $p\leq 0.001$, LFC= Lateral Femoral Condyle, MFC= Medial Femoral Condyle, LTP= Lateral Tibial Plateau, MTP= Medial tibial Plateau.

LFC								
Weeks	2		4		8		12	
Depth (mm)	ACLT	Sham	ACLT	Sham	ACLT	Sham	ACLT	Sham
1	\downarrow ***	-	\downarrow ***	-	\downarrow ***	-	\downarrow ***	-
2	-	-	\uparrow **	-	\downarrow ***	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
MFC								
1	\downarrow *	-	-	-	\downarrow ***	-	\downarrow **	-
2	-	-	\downarrow ***	\uparrow *	\downarrow ***	-	\downarrow **	-
3	-	-	\downarrow **	-	\downarrow *	\uparrow *	\downarrow **	-
4	-	-	\downarrow ***	-	\downarrow ***	-	\downarrow **	-
5	-	-	\downarrow **	-	\downarrow **	-	-	-
6	-	-	-	-	\downarrow *	-	-	-
LTP								
1	-	-	-	-	\downarrow ***	-	\downarrow ***	\downarrow *
2	-	-	-	-	\downarrow **	-	\downarrow ***	-
3	-	-	\downarrow *	-	\downarrow **	-	-	-
MTP								
1	\downarrow **	-	\downarrow *	-	\downarrow ***	-	\downarrow ***	\downarrow *
2	-	-	\downarrow **	-	\downarrow ***	\downarrow *	-	-
3	-	-	\downarrow ***	\downarrow *	\downarrow ***	\downarrow **	-	\downarrow *

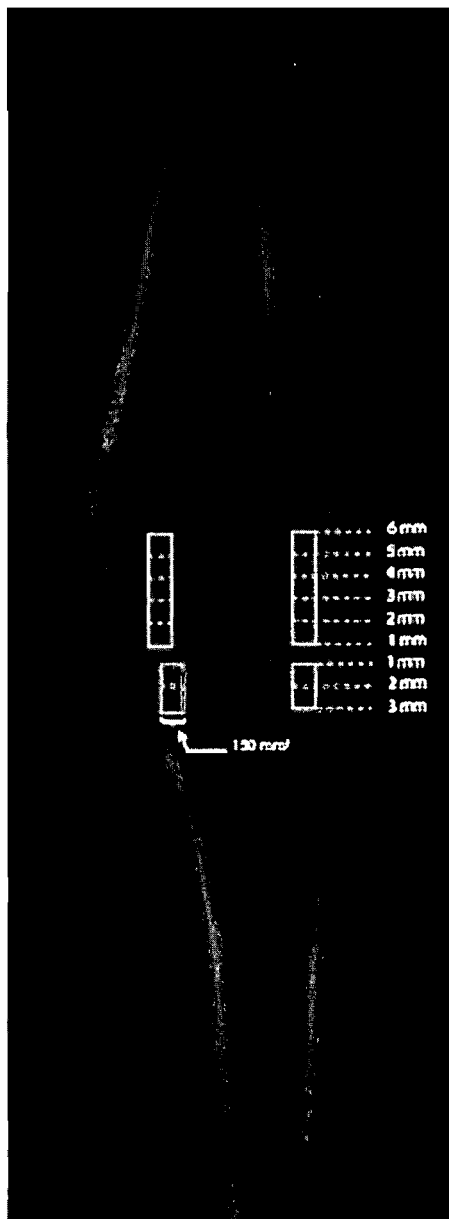


Fig.2.

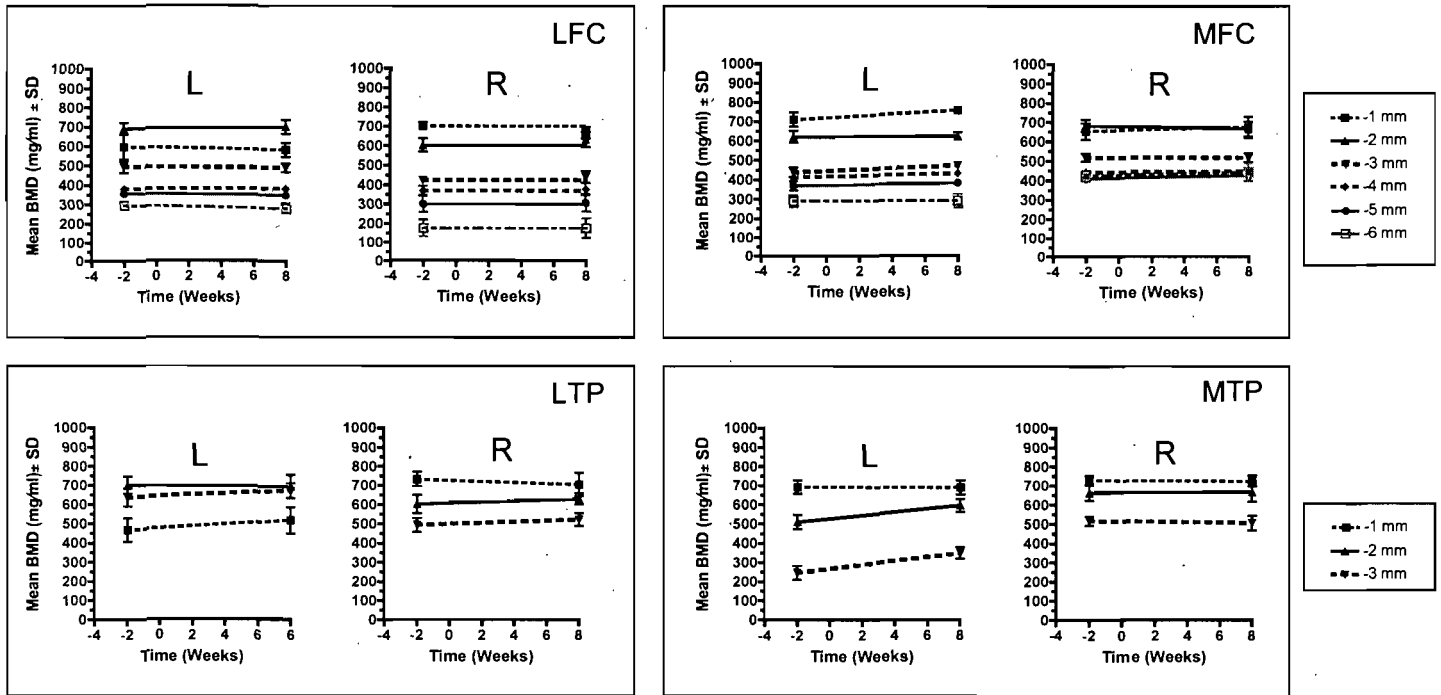


Fig.3.

Chapitre 3: Discussion et conclusion

3-1- Discussion

L'imagerie multimodale [radiographie numérique ou computed radiography (CR), tomographie assistée par ordinateur ou computed tomography (CT) et résonance magnétique à 1.5 Tesla (IRM)] nous a permis dans ce modèle d'ostéoarthrose par section du ligament croisé crânial du genou chez le lapin, d'évaluer de façon quantitative et semi-quantitative plusieurs lésions reflétant l'atteinte des différentes composantes de l'articulation du genou. En effet, l'ostéophytose (CR, CT, IRM), les lésions de la moëlle osseuse (IRM), les variations de densité minérale osseuse (CT), l'espace articulaire latéral (CR, CT, IRM) et l'épanchement articulaire (CR, CT, IRM) ont pu être évalués. En revanche les lésions du cartilage articulaire, la sclérose de l'os sous-chondral et l'espace articulaire médial n'ont pu être appréciés de façon fiable dans cette étude. L'articulation du genou de lapin étant de petite taille, l'utilisation de champ magnétique plus important aboutissant à un ratio signal/bruit plus élevé pourrait permettre de détecter des petites lésions du cartilage articulaire. Avec un champ magnétique à 1.5 Tesla tel qu'utilisé dans des conditions cliniques et pour une si petite articulation, il aurait fallu utiliser des séquences à temps d'acquisition trop long. Ceci est acceptable sur des modèles expérimentaux *ex vivo*. En effet l'augmentation du temps d'acquisition des images implique un temps d'anesthésie plus long et par conséquent une augmentation du risque de complications induit par l'anesthésie. De plus les coûts d'utilisation de la machine et du personnel technique seraient plus élevés. Un temps d'acquisition d'images plus élevé implique aussi une diminution du nombre d'animaux qui peuvent être évalués. L'objectif de cette étude

est d'utiliser l'imagerie multimodale non invasive *in vivo* avec un protocole qui soit applicable dans des conditions cliniques.

L'os

Les ostéophytes ou ostéophytose

La modalité d'imagerie la plus sensible et la plus spécifique pour évaluer les ostéophytes dans cette étude est la tomodensitométrie (coupes dorsales). Les premiers ostéophytes ont été mis en évidence deux semaines post-chirurgie dans le groupe ACLT (Anterior Cruciate Ligament Transection ou section du ligament croisé crânial) contrairement à d'autres études pour lesquels les premiers ostéophytes ont été observés plus tard. Cette différence peut s'expliquer en partie par les premiers temps d'évaluations qui sont différents entre les études. En effet, dans l'étude de Batiste (Batiste *et al.* 2004b) utilisant le même modèle expérimental que le nôtre, les premiers ostéophytes ont été détectés par micro-tomodensitométrie 4 semaines post-chirurgie, période qui correspondait au premier temps d'évaluation des lésions dans cette étude.

Bien que la tomodensitométrie fut la plus spécifique et la plus sensible des modalités d'imagerie dans nos conditions expérimentales, l'IRM 1.5 Tesla a également permis de mettre en évidence les ostéophytes dès la deuxième semaine post-chirurgie. En revanche, une controverse existe dans la littérature concernant encore une fois le premier temps de mise en évidence des ostéophytes. L'évaluation des ostéophytes, par IRM avec un champ magnétique de 7.1 Tesla, avant la chirurgie et 2, 4, 8 et 12 semaines post-chirurgie n' a permis de détecter les premiers ostéophytes qu'au temps 8 semaines post-chirurgie (Wachsmuth *et al.* 2003). Une

autre étude utilisant l'IRM à 4.7 Tesla n'a pas mis en évidence l'ostéophytose démontrée lors de l'examen morphologique de l'articulation du genou 6 semaines post-chirurgie (Calvo *et al.* 2001). Ces différences entre études s'expliquent par de multiples facteurs qui, dans un protocole de résonance magnétique, sont des éléments clés pour obtenir des images diagnostiques. Parmi ces facteurs, les séquences choisies influencent fortement la visualisation des lésions. De plus, les séquences utilisées dans notre étude ciblaient plus particulièrement l'évaluation de l'épanchement articulaire, le cartilage articulaire et les lésions de la moëlle osseuse. Une séquence écho de gradient pondérée en T1 aurait été encore plus appropriée pour mettre en évidence les ostéophytes (d'Anjou *et al.*).

Sclérose de l'os sous-chondral

La sclérose de l'os sous-chondral est une lésion caractéristique et notoire d'ostéoarthrose avancée chez l'humain. Dans notre étude, à aucun des temps, ni le CT ni le CR n'a permis d'évaluer de façon fiable la sclérose de l'os sous-chondral. Par conséquent, nous supposons que les temps auxquels la sclérose de l'os sous-chondral a été évaluée étaient trop précoces par rapport au développement de cette lésion.

Densité minérale osseuse

A notre connaissance, c'est la première étude qui évalue les changements de densité minérale osseuse à la fois au cours du temps et à différentes profondeurs au sein du fémur et du tibia de façon non invasive et *in vivo* dans un modèle d'ostéoarthrose induit par la section du ligament croisé crânial chez le lapin.

La sclérose de l'os sous-chondral et la densité minérale osseuse sont deux paramètres reflétant les variations de densité minérale de l'os. Cependant l'évaluation de la densité minérale osseuse en tant que telle est plus sensible et représente les variations de densité de l'os de façon quantitative contrairement à la sclérose qui reste un paramètre évalué de manière qualitative et par conséquent moins précis et dépendant plus de l'évaluateur.

La diminution de densité minérale osseuse observée chez nos animaux contrôles, depuis la surface articulaire jusque dans les parties les plus profondes de l'os sous-chondral, s'explique par la structure épiphysaire de l'os: les trabécules osseuses les plus proches de la surface articulaire sont plus compactes que celles situées en profondeur. Etant donné la stabilité des valeurs de densité minérale osseuse au cours du temps pour une même profondeur d'os sous-chondral dans le groupe contrôle, nous avons estimé que l'analyse de l'évolution de la densité minérale pour chacun des groupes opérés pouvait se faire en utilisant chacun des groupes comme sa propre référence dans le temps.

Les différences observées entre le membre droit et gauche dans le groupe contrôle sont difficiles à expliquer. Nous supposons que ces différences entre droite et gauche seraient dues à la façon de délimiter manuellement la région d'intérêt entre les deux membres. En effet, le membre gauche présentait un léger degré de rotation et de varus étant donné sa position moins stable que le membre droit qui était situé contre la table tout au long de l'étude. Cependant, la littérature ne rapporte pas d'influence d'un membre ou de son positionnement sur les valeurs de densité minérale mesurées par tomодensitométrie.

La densité minérale osseuse diminue au cours du temps dès la deuxième semaine post-chirurgie jusqu'à la fin de l'étude dans le groupe de lapins ayant subi une section du ligament croisé crânial du genou. Cette diminution de densité minérale osseuse a également été observée dans des études précédentes chez le lapin à 4 (Batiste *et al.* 2004b) et 8 (Batiste *et al.* 2004b; Wang *et al.* 2007) semaines post-chirurgie, mais pas à 12 semaines post-chirurgie. Dans un modèle d'ostéoarthrose induit par ménisectomie chez le lapin, la diminution de densité minérale osseuse a été observée à partir de la semaine 13 jusque la semaine 40 post-chirurgie (Messner *et al.* 2000). De la même façon dans le modèle par ménisectomie chez le mouton, cette diminution de densité minérale osseuse a été mesurée 6 mois après induction d'ostéoarthrose (Coke *et al.* 2004).

Au contraire, d'autres études rapportent une variation biphasique de la densité minérale osseuse au cours du temps dans des modèles d'ostéoarthrose. Cette variation biphasique est caractérisée par une diminution initiale de la densité minérale osseuse, suivie par une augmentation de cette dernière dans les stades plus avancés de la maladie. Dans le modèle spontané d'ostéoarthrose chez la lignée Dunkin-Hartley du cochon d'inde, une diminution de la densité minérale osseuse est mesurée à 9 semaines d'âge, suivie d'une augmentation à 24 et 36 semaines d'âge comparé à la lignée Bristol strain 2 qui n'est pas affectée par l'ostéoarthrose (Anderson-MacKenzie *et al.* 2005). La même évolution biphasique se retrouve chez la lignée Dunkin-Hartley du cochon d'inde ayant subi une ménisectomie médiale partielle supplémentaire: diminution de la densité minérale osseuse 4 semaines post-ménisectomie, puis augmentation 12 semaines post-chirurgie (Pastoureau *et al.* 1999).

Cette variation biphasique a été mesurée par micro-tomodensitométrie sur le même modèle que le nôtre lors d'une étude précédemment réalisée en collaboration avec notre laboratoire. Une diminution initiale de la densité minérale osseuse a été relevée, suivie par une augmentation 12 semaines post-section du ligament croisé crânial du genou (Batiste *et al.* 2004b). Cependant, il est important de noter que dans notre étude, utilisant le même modèle que l'étude citée précédemment, les valeurs de densité minérale osseuse mesurées continuaient à diminuer dans les couches superficielles de l'os sous-chondral alors que dans les couches plus profondes, les valeurs étaient à nouveau égales à celles mesurées avant la chirurgie. Les différences observées à la semaine 12 entre notre étude et cette dernière citée, pourraient être dues à des lésions du cartilage articulaire histologiquement moins sévères dans notre étude. Nous supposons que cette sévérité moindre des lésions du cartilage articulaire serait due à l'utilisation d'animaux plus jeunes (8 mois *versus* 2 ans d'âge) dans notre étude mais également à l'emploi de cages ayant une surface d'adhérence à moindre risque traumatique que les cages utilisées dans l'étude précédente.

Ainsi, la discordance entre les différentes études concernant l'évolution de la densité minérale osseuse pourrait être expliquée par différents facteurs, notamment le modèle animal employé, les temps auxquels les mesures ont été réalisées, et également la profondeur à laquelle la densité minérale osseuse a été mesurée. On ne peut exclure l'éventualité qu'une augmentation de densité minérale osseuse aurait pu être observée plus tard dans le temps. En effet, lorsque l'augmentation de densité minérale est évaluée chez l'humain atteint d'ostéoarthrose, le patient se trouve en général à un stade plus avancé de la maladie.

L'équilibre entre la formation de l'os sous-chondral et la résorption osseuse dépend fortement de l'activité ostéoclastique (Baron *et al.* 1993). Ce remodelage de l'os sous-chondral peut être influencé par des facteurs mécaniques, métaboliques et d'autres facteurs locaux et/ou systémiques (Lajeunesse *et al.* 1999). Pour expliquer la diminution de densité minérale osseuse observée dans notre étude, nous avons émis plusieurs hypothèses basées sur ces différents facteurs.

Tout d'abord, selon la loi de Wolff, sous un certain seuil de stress mécanique imposé à une articulation, les ostéoclastes sont activés induisant une résorption osseuse et par conséquent une diminution de la densité minérale osseuse. Bien qu'une analyse des forces par plaque n'ait pas été réalisée dans cette étude pour évaluer la démarche des lapins suite à l'induction de l'ostéoarthrose, nous avons remarqué que les lapins étaient moins actifs les deux semaines suivant la chirurgie. Par conséquent, les moindres déplacements des lapins engendrent moins de stress sur leurs articulations opérées. Ainsi toute modification, même mineure, de stress mécanique induit sur les articulations opérées pourrait expliquer les différences de densité minérale osseuse observées au cours du temps. Ces altérations de charge sur les membres suite à une section du ligament croisé crânial du genou sont rapportées dans la littérature. Chez le chien, une diminution de port de charge de 35% est rapportée deux semaines post-chirurgie pour progressivement retourner vers un port de charge de 50-60% six à douze semaines post-chirurgie (Korvick *et al.* 1994; O'Connor *et al.* 1989). Une étude chez le lapin révèle une diminution de 31% de la charge totale sur le membre opéré (Bray *et al.* 1992).

L'inflammation induite lors de la chirurgie serait la seconde hypothèse pouvant expliquer la diminution de densité minérale osseuse observée. Les cellules

inflammatoires telles que les leucocytes et les macrophages sont des sources de cytokines (Ghosh and Cheras 2001) comprenant des interleukines 1 et des interleukines 6 qui stimulent la formation des ostéoclastes (Yoneda 1993) et par conséquent favorisent la résorption osseuse. Une étude rapporte que le liquide synovial de patients atteints d'ostéoarthrose induit une résorption osseuse lorsque mis en contact avec des cultures osseuses de souris (Andersson *et al.* 2007). Par conséquent le processus inflammatoire induit par la chirurgie pourrait expliquer la diminution de densité minérale osseuse observée dès la deuxième semaine post-opératoire. Cette théorie est d'autant plus plausible que ces changements sont observés aux profondeurs les plus proches de la surface articulaire.

La troisième hypothèse pouvant expliquer cette diminution de densité minérale osseuse est basée sur les variations de la vascularisation de l'os sous-chondral engendrées par les facteurs inflammatoires ou biomécaniques. La littérature rapporte, dans un modèle d'ostéoarthrose du genou chez le lapin, que l'irrigation vasculaire de l'os sous-chondral est supérieure (76% à 14 semaines et 44% à 48 semaines post-chirurgie) dans les articulations rendues instables suite à une section du ligament croisé crânial comparé aux genoux où seules la capsule articulaire et la membrane synoviale ont été incisées (Judex *et al.* 1997). De plus, il a été montré que l'augmentation du flux sanguin favorise de manière indirecte la résorption osseuse par stimulation de l'activité des ostéoclastes (Gong *et al.* 1966).

Lésions de la moëlle osseuse

A notre connaissance, la littérature n'a pas encore rapporté de lésions de la moëlle osseuse lors de section du ligament croisé crânial chez le lapin comme modèle

d'ostéoarthrose. Dans cette étude, les lésions de la moëlle osseuse ont été mises en évidence dès la deuxième semaine après la chirurgie, et essentiellement dans le groupe de lapins ayant subi la section du ligament croisé crânial. Des observations précédentes, avec pour modèle d'ostéoarthrose le chien, décrivaient également les premières lésions de la moëlle osseuse deux semaines après section du ligament croisé crânial du genou (Baird *et al.* 1998). En revanche, dans d'autres études utilisant toujours le chien comme modèle expérimental, le moment de détection des lésions de la moëlle osseuse est variable allant de 4 (Martig *et al.* 2007; Nolte-Ernsting *et al.* 1996) à 6 (Libicher *et al.* 2005) semaines après induction de l'ostéoarthrose. La discordance entre ces différents temps de mise en évidence des lésions de la moëlle osseuse pourrait être expliquée par de multiples facteurs influençant le ratio signal/bruit en résonance magnétique, tels que la puissance du champ magnétique et les antennes utilisées, mais également le choix des séquences qui est primordial dans la visualisation ou non d'une caractéristique tissulaire. La littérature rapporte que les séquences les plus sensibles pour détecter les lésions de la moëlle osseuse sont les séquences «Fast spin echo pondérée en T2 avec suppression des gras», et «Short-tau inversion recovery ou STIR» (Peterfy *et al.* 2006).

De façon surprenante, dans cette étude, la séquence-duelle en densité de protons et T2 avec saturation des gras (PD/T2-FS) sur la coupe dorsale a montré 2 semaines avant la chirurgie, une lésion de la moëlle osseuse dans le condyle fémoral latéral chez un lapin du groupe opéré pour section du ligament croisé crânial du genou. Cette même lésion n'a pu être observée 2 semaines après la chirurgie, mais en revanche elle s'est retrouvée encore aux temps 4 et 8 semaines post-chirurgie. Une trouvaille identique à la nôtre a également été décrite avant l'induction de lésions

d'ostéoarthrose dans le modèle canin (Martig *et al.* 2007). Chez l'humain, des lésions similaires de la moëlle osseuse ont été observées chez des patients ne souffrant pas de douleur du genou (Baranyay *et al.* 2007), ainsi que chez des joueurs de basket-ball (Lohman *et al.* 2001) et chez des marathoniens (Krampla *et al.* 2001) ne présentant pas de symptôme d'ostéoarthrose. Ces lésions sont attribuées à des micro-fractures des trabécules osseuses (Lohman *et al.* 2001; Mink and Deutsch 1989; Yao and Lee 1988). Cependant, les lapins utilisés dans cette étude étaient en cage. Par conséquent, un trauma tel que celui que pourrait subir un athlète ne peut être extrapolé à ces lapins pour expliquer l'observation de ces lésions en hypersignal de la moëlle osseuse.

Nous n'avons observé des lésions de la moëlle osseuse qu'au niveau du fémur, et plus fréquemment dans le condyle fémoral latéral. Des observations, précédentes pour le même modèle d'ostéoarthrose mais réalisé chez le chien, décrivaient également des lésions de la moëlle osseuse sur le condyle fémoral latéral (Nolte-Ernsting *et al.* 1996) les quatre premiers mois post-chirurgie. Des lésions du condyle fémoral médial ont été observées plus tard sur le même modèle à partir du quatrième mois post-chirurgie et ce jusqu'à la fin de leur dernière évaluation, soit 13 mois post-chirurgie (Martig *et al.* 2007). En revanche, d'autres études ont montré la présence de lésions de la moëlle osseuse au niveau du plateau tibial médial (Baird *et al.* 1998; Libicher *et al.* 2005; Nolte-Ernsting *et al.* 1996) mais aussi de la partie caudale de l'éminence tibiale (Martig *et al.* 2007). Nous supposons donc que ces lésions de la moëlle osseuse peuvent se produire en différents sites anatomiques de l'articulation du genou et que certaines de ces lésions régressent au cours du temps (Garnero *et al.* 2005; Phan *et al.* 2006). La discordance entre les différentes études concernant les localisations anatomiques et également les temps d'apparitions des

lésions est probablement due à des variations inter-espèces de biomécanique, biomécanique articulaire du genou qui est d'autant plus altérée par la section du ligament croisé crânial. De plus, la dernière évaluation des lésions dans notre étude fut réalisée à 12 semaines post-chirurgie. Nous ne pouvons donc pas exclure que si l'évaluation avait été faite encore plus tard dans le temps, nous n'aurions pas observé d'autres lésions en d'autres sites anatomiques du genou.

L'espace articulaire minimal

L'évaluation de l'espace articulaire est une manière indirecte de juger de l'épaisseur et de l'intégrité du cartilage articulaire et sert de mesure de progression de l'ostéoarthrose du genou. Chez l'humain, une diminution, voire une disparition, de cet espace reflète une diminution de l'épaisseur du cartilage articulaire ou une lésion de ce dernier (Bruyere *et al.* 2007; Nevitt *et al.* 2007). Cependant, la mesure de cet espace articulaire dans l'évaluation de l'ostéoarthrose comporte certaines limites: les variations de mesures temporelles et inter-observateurs et l'imprécision de mesure en raison de la variabilité dans le positionnement de l'articulation lors de mesures répétées par exemple. En effet, chez nos animaux le positionnement de l'articulation du genou lors de la prise d'images est plus difficile car ils sont en non-appui. De plus, une diminution de cet espace peut être créée par une lésion méniscale sans pour autant avoir une atteinte du cartilage articulaire (Peterfy 2002). Dans notre étude, la modalité d'imagerie présentant la plus faible variabilité inter-observateur est l'IRM. Une corrélation significative entre les trois modalités d'imagerie étudiées, n'a été observée que pour le compartiment latéral de l'articulation du genou. La tension induite lors du positionnement des membres pelviens dans le moule lors de la prise

d'images pourrait avoir augmenté l'espace articulaire latéral et expliquerait donc cette corrélation significative observée uniquement du côté latéral.

L'augmentation de l'espace articulaire latéral du genou est mesurée dans le groupe ayant subi la section du ligament croisé crânial dès la quatrième semaine post-chirurgie et ce jusque la fin de l'étude expérimentale, soit à douze semaines. Cette augmentation peut être attribuée à plusieurs facteurs: la prise de mesures sur des genoux n'étant pas en position d'appui et l'augmentation de l'épanchement articulaire. Cependant, il est à remarquer que l'épanchement articulaire était toujours présent mais de manière plus significative 12 semaines post-chirurgie comparée aux valeurs avant chirurgie. Un autre paramètre pouvant contribuer à l'augmentation de l'espace articulaire est l'hypertrophie du cartilage articulaire. L'hypertrophie du cartilage articulaire a été rapportée dans plusieurs modèles animaux d'ostéoarthrose: le lapin (Calvo *et al.* 2001; Calvo *et al.* 2004), le chien (Adams and Brandt 1991; Braunstein *et al.* 1990) et le cochon d'inde Dunkin-Hartley (Watson *et al.* 1996). Cependant dans notre étude, l'hypertrophie du cartilage articulaire du lapin ne pourrait expliquer l'augmentation aussi élevée de l'espace articulaire estimée à 0.3mm. De plus, les mesures histologiques du cartilage articulaire à 8 ou 12 semaines n'ont pas montré d'augmentation significative de l'épaisseur du cartilage qui aurait pu suggérer une hypertrophie de celui-ci.

L'épanchement articulaire

Dans notre modèle, à la fois la tomодensitométrie et la résonance magnétique à 1.5 Tesla ont permis de quantifier l'épanchement articulaire. L'augmentation significative de ce paramètre a été mesurée, dans le groupe de lapins opérés, dès la

deuxième semaine post-chirurgie. Une observation similaire a été rapportée dans un modèle d'ostéoarthrose chez le lapin en utilisant la résonance magnétique à 7.1 Tesla (Wachsmuth *et al.* 2003). Cette augmentation significative d'épanchement articulaire relevée chez le groupe ayant subi une section du ligament croisé crânial du genou mais pas chez le groupe «sham» (incision de la capsule articulaire et de la membrane synoviale seulement) pourrait s'expliquer par un degré d'inflammation post-opératoire plus important dans le premier groupe. De plus, en conséquence de la chirurgie, la laxité ligamentaire et les lésions du cartilage articulaire pourraient contribuer à l'exacerbation de la cascade inflammatoire intra-articulaire chez les individus de ce groupe.

Le cartilage articulaire

La résonance magnétique est l'unique modalité d'imagerie dans cette étude permettant de visualiser de façon directe, non-invasive et *in vivo* l'entière du cartilage articulaire. L'objectif de notre étude étant d'évaluer l'articulation du genou atteinte d'ostéoarthrose en développant un protocole clinique, l'optimisation de la visualisation des différents paramètres évalués aurait nécessité avec notre appareil et notre modèle animal une augmentation remarquable du temps d'acquisition des images. Par conséquent notre machine à 1.5 Tesla présente, avec ce protocole, une faible sensibilité et spécificité dans la détection des lésions du cartilage articulaire du genou chez le lapin. Une sensibilité de 78.3% et une spécificité de 95.3% de détection des lésions du cartilage articulaire ont été rapportées dans un modèle d'ostéoarthrose *ex vivo* chez le lapin avec un appareil de résonance magnétique à 4 Tesla (Batiste *et al.* 2004b).

En théorie, un champ magnétique de plus haute amplitude permettrait de détecter les lésions du cartilage articulaire. Cependant, une étude utilisant un IRM de 7.1 Tesla dans un modèle d'ostéoarthrose *ex vivo* chez le lapin n'a pas pu mettre en évidence de façon fiable les lésions du cartilage articulaire en raison d'une résolution spatiale et d'un contraste insuffisant fournis par le protocole bidimensionnel (2D) choisi (Wachsmuth *et al.* 2003). Une acquisition des images en trois dimensions (3D) permettrait d'améliorer ces facteurs tout en conservant le même temps d'acquisition d'images. En effet le codage spatial en 3D, rajoutant un codage de phase dans la troisième dimension par rapport aux codages de phase et de fréquence utilisées en 2D, et une augmentation du nombre d'excitations accroît la résolution spatiale. Cette acquisition d'images en 3D associées à l'utilisation de séquences d'écho de gradient 'rapides' (Gradient Recalled Echo GRE) avec un temps de relaxation (TR) court permet donc de conserver le même temps d'acquisition d'images. L'utilisation d'antennes de réception/émission du signal de résonance influence également la qualité de l'image diagnostique. Le choix d'une antenne appropriée et ayant un contact le plus étroit possible avec la région anatomique à évaluer est par conséquent primordial.

L'épaisseur du cartilage articulaire constitue également un facteur limitant l'obtention d'images diagnostiques obtenues par résonance magnétique. En effet, le cartilage articulaire de l'espèce canine est plus épais et par conséquent l'IRM 1.5 Tesla a permis de mettre en évidence des lésions de celui-ci (Brandt *et al.* 1991a; Widmer *et al.* 1994b).

Ainsi, ayant utilisé une séquence permettant l'évaluation du cartilage articulaire, nous pourrions possiblement améliorer la sensibilité et la spécificité de notre appareil de

résonance magnétique à 1.5 Tesla à détecter les lésions du cartilage articulaire dans notre modèle animal en développant une antenne de réception/émission du signal de résonance parfaitement adaptée à l'articulation du genou de lapin.

La faible sensibilité et spécificité de notre appareil IRM 1.5 Tesla à détecter les lésions du cartilage articulaire dans ce modèle d'ostéoarthrose, peut également s'expliquer par les lésions histologiques peu sévères du cartilage articulaire obtenues dans notre étude.

3-2- Conclusion

L'imagerie multimodale combinant l'utilisation de la tomодensitométrie et de la résonance magnétique à 1.5 Tesla a permis l'évaluation au cours du temps et *in vivo* de plusieurs paramètres caractéristiques d'ostéoarthrose du genou chez le lapin : l'ostéophytose, les lésions de la moëlle osseuse, l'épanchement artulaire, l'évaluation de l'espace artulaire latéral et de la densité minérale osseuse. Par conséquent ces paramètres pourront être évalués avec confiance par tomодensitométrie et IRM 1.5 Tesla afin de mesurer leurs changements et progression au cours du temps lors d'ostéoarthrose. Cette technique d'imagerie multimodale permettrait également d'évaluer dans le futur l'efficacité de nouvelles thérapies dans ce modèle *in vivo* d'ostéoarthrose chez le lapin. En revanche, la tomодensitométrie et la résonance magnétique à 1.5 Tesla n'ont pas permis dans ce modèle-ci une évaluation fiable de la sclérose de l'os sous-chondral, de l'espace artulaire du compartiment médial et du cartilage artulaire. Cependant, la tomодensitométrie a permis une évaluation indirecte de la sclérose de l'os sous-chondral de manière plus précise en mesurant les variations de densité minérale osseuse.

Bibliographie :

- Abadie, E., Ethgen, D., Avouac, B., Bouvenot, G., Branco, J., Bruyere, O., Calvo, G., Devogelaer, J.P., Dreiser, R.L., Herrero-Beaumont, G., Kahan, A., Kreutz, G., Laslop, A., Lemmel, E.M., Nuki, G., Van De Putte, L., Vanhaelst, L. and Reginster, J.Y. (2004) Recommendations for the use of new methods to assess the efficacy of disease-modifying drugs in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 263-268.
- Adams, J.G., McAlindon, T., Dimasi, M., Carey, J. and Eustace, S. (1999) Contribution of meniscal extrusion and cartilage loss to joint space narrowing in osteoarthritis. *Clin Radiol* **54**, 502-506.
- Adams, M.E. and Brandt, K.D. (1991) Hypertrophic repair of canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transection. *The Journal of rheumatology* **18**, 428-435.
- Altman, R.D., Hochberg, M., Murphy, W.A., Jr., Wolfe, F. and Lequesne, M. (1995) Atlas of individual radiographic features in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **3 Suppl A**, 3-70.
- Amin, S., LaValley, M.P., Guermazi, A., Grigoryan, M., Hunter, D.J., Clancy, M., Niu, J., Gale, D.R. and Felson, D.T. (2005) The relationship between cartilage loss on magnetic resonance imaging and radiographic progression in men and women with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **52**, 3152-3159.
- Anderson-MacKenzie, J.M., Quasnicka, H.L., Starr, R.L., Lewis, E.J., Billingham, M.E. and Bailey, A.J. (2005) Fundamental subchondral bone changes in spontaneous knee osteoarthritis. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 224-236.
- Andersson, M.K., Lundberg, P., Ohlin, A., Perry, M.J., Lie, A., Stark, A. and Lerner, U.H. (2007) Effects on osteoclast and osteoblast activities in cultured mouse calvarial bones by synovial fluids from patients with a loose joint prosthesis and from osteoarthritis patients. *Arthritis research & therapy* **9**, R18.
- Baird, D.K., Hathcock, J.T., Kincaid, S.A., Rumph, P.F., Kammermann, J., Widmer, W.R., Visco, D. and Sweet, D. (1998) Low-field magnetic resonance imaging of early subchondral cyst-like lesions in induced cranial cruciate ligament deficient dogs. *Vet Radiol Ultrasound* **39**, 167-173.
- Baranyay, F.J., Wang, Y., Wluka, A.E., English, D.R., Giles, G.G., Sullivan, R.O. and Cicuttini, F.M. (2007) Association of bone marrow lesions with knee structures and risk factors for bone marrow lesions in the knees of clinically healthy, community-based adults. *Seminars in arthritis and rheumatism* **37**, 112-118.

- Baron, R., Ravesloot, J.-H., Neff, L., Chakraborty, M., Chatterjee, D., Lomri, A. and Horne, W. (1993) Cellular and molecular biology of the osteoclast. In: *Cellular and molecular biology of bone*, Ed: M. Noda, Academic Press Limited, San Diego. pp 445-495.
- Batiste, D.L., Kirkley, A., Lavery, S., Thain, L.M., Spouge, A.R., Gati, J.S., Foster, P.J. and Holdsworth, D.W. (2004a) High-resolution MRI and micro-CT in an ex vivo rabbit anterior cruciate ligament transection model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 614-626.
- Batiste, D.L., Kirkley, A., Lavery, S., Thain, L.M., Spouge, A.R. and Holdsworth, D.W. (2004b) Ex vivo characterization of articular cartilage and bone lesions in a rabbit ACL transection model of osteoarthritis using MRI and micro-CT. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 986-996.
- Benske, J., Schunke, M. and Tillmann, B. (1988) Subchondral bone formation in arthrosis. Polychrome labeling studies in mice. *Acta Orthop Scand* **59**, 536-541.
- Boyd, S.K., Matyas, J.R., Wohl, G.R., Kantzas, A. and Zernicke, R.F. (2000) Early regional adaptation of periarticular bone mineral density after anterior cruciate ligament injury. *J Appl Physiol* **89**, 2359-2364.
- Bradley, J.D. (2003) Systemic analgesic. In: *Osteoarthritis*, Ed: L.S.Lohmander, New York. pp 243-249.
- Brandt, K.D. (2003) Disease modifying osteoarthritis drugs (DMOADs). The clinical perspective. In: *Osteoarthritis*, Ed: L.S. Lohmander, New York. pp 401-409.
- Brandt, K.D., Braunstein, E.M., Visco, D.M., O'Connor, B., Heck, D. and Albrecht, M. (1991a) Anterior (cranial) cruciate ligament transection in the dog: a bona fide model of osteoarthritis, not merely of cartilage injury and repair. *The Journal of rheumatology* **18**, 436-446.
- Brandt, K.D., Fife, R.S., Braunstein, E.M. and Katz, B. (1991b) Radiographic grading of the severity of knee osteoarthritis: relation of the Kellgren and Lawrence grade to a grade based on joint space narrowing, and correlation with arthroscopic evidence of articular cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* **34**, 1381-1386.
- Braunstein, E.M., Brandt, K.D. and Albrecht, M. (1990) MRI demonstration of hypertrophic articular cartilage repair in osteoarthritis. *Skeletal radiology* **19**, 335-339.
- Bray, R.C., Shrive, N.G., Frank, C.B. and Chimich, D.D. (1992) The early effects of joint immobilization on medial collateral ligament healing in an ACL-

deficient knee: a gross anatomic and biomechanical investigation in the adult rabbit model. *J Orthop Res* **10**, 157-166.

- Bruyere, O., Genant, H., Kothari, M., Zaim, S., White, D., Peterfy, C., Burlet, N., Richy, F., Ethgen, D., Montague, T., Dabrowski, C. and Reginster, J.Y. (2007) Longitudinal study of magnetic resonance imaging and standard X-rays to assess disease progression in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **15**, 98-103.
- Buckwalter, J.A. and C.Mow, V. (1992) Cartilage repair in osteoarthritis. In: *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management 2nd edition*, Ed: Saunders, Philadelphia. pp 71-107.
- Buckwalter, J.A. and Mankin, H. (1998) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures* **47**, 477-486.
- Buckwalter, J.A., Mankin, H.J. and Grodzinsky, A.J. (2005) Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* **54**, 465-480.
- Buckwalter, K.A., Rydberg, J., Kopecky, K.K., Crow, K. and Yang, E.L. (2001) Musculoskeletal imaging with multislice CT. *AJR Am J Roentgenol* **176**, 979-986.
- Burr, D.B. (2003) Subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. Mechanical aspects. In: *Osteoarthritis*, 2nd edn., Ed: L.S. Lohmander, New York. pp 125-133.
- Cake, M.A., Read, R.A., Appleyard, R.C., Hwa, S.Y. and Ghosh, P. (2004) The nitric oxide donor glyceryl trinitrate increases subchondral bone sclerosis and cartilage degeneration following ovine meniscectomy. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **12**, 974-981.
- Calvo, E., Palacios, I., Delgado, E., Ruiz-Cabello, J., Hernandez, P., Sanchez-Pernaute, O., Egido, J. and Herrero-Beaumont, G. (2001) High-resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **9**, 463-472.
- Calvo, E., Palacios, I., Delgado, E., Sanchez-Pernaute, O., Largo, R., Egido, J. and Herrero-Beaumont, G. (2004) Histopathological correlation of cartilage swelling detected by magnetic resonance imaging in early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **12**, 878-886.
- Cann, C.E. (1988) Quantitative CT for determination of bone mineral density: a review. *Radiology* **166**, 509-522.

- Chan, W.P., Lang, P., Stevens, M.P., Sack, K., Majumdar, S., Stoller, D.W., Basch, C. and Genant, H.K. (1991) Osteoarthritis of the knee: comparison of radiography, CT, and MR imaging to assess extent and severity. *AJR Am J Roentgenol* **157**, 799-806.
- 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.
- Cicuttini, F.M., Wluka, A.E., Forbes, A. and Wolfe, R. (2003) Comparison of tibial cartilage volume and radiologic grade of the tibiofemoral joint. *Arthritis Rheum* **48**, 682-688.
- Cooper, C. (1998) Osteoarthritis and related disorders. In: *Rheumatology*, 2nd edn., Eds: J.H. Klippel and P.A. Dieppe. pp 1-8.
- d'Anjou, M.A., Moreau, M., Troncy, E., Martel-Pelletier, J., Abram, F., Raynauld, J.P. and Pelletier, J.P. Osteophytosis, subchondral bone sclerosis, joint effusion and soft tissue thickening in canine experimental stifle osteoarthritis: a comparison between 1.5 T MRI and computed radiography. *Veterinary surgery*. *In press*.
- Dewire, P. and Einhorn, T.A. (2001) The joint as an organ. In: *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management*, Ed: Saunders, Philadelphia. pp 49-68.
- Dieppe, P.A. (1995) Recommended methodology for assessing the progression of osteoarthritis of the hip and knee joints. *Osteoarthritis Cartilage* **3**, 73-77.
- DiMicco, M.A., kim, Y.J. and Grodzinsky, A.J. (2003) Response of the chondrocyte to mechanical stimuli. In: *Osteoarthritis*, 2nd edn., Ed: L.S. Lohmander, New York. pp 112-120.
- Eckstein, F., Milz, S., Anetzberger, H. and Putz, R. (1998) Thickness of the subchondral mineralised tissue zone (SMZ) in normal male and female and pathological human patellae. *J Anat* **192 (Pt 1)**, 81-90.
- Fassler, R., Schnegelsberg, P.N., Dausman, J., Shinya, T., Muragaki, Y., McCarthy, M.T., Olsen, B.R. and Jaenisch, R. (1994) Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5070-5074.
- Felson, D.T. (2003) Epidemiology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis*, 2nd edition edn., Ed: L.S. Lohmander, Oxford University Press, New york. pp 9-16.
- Felson, D.T. (2004) An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiologic clinics of North America* **42**, 1-9, v.

- Flores, R.H. and Hochberg, M.C. (2003) Definition and classification of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis*, 2nd edn. pp 1-8.
- Garnero, P., Peterfy, C., Zaim, S. and Schoenharting, M. (2005) Bone marrow abnormalities on magnetic resonance imaging are associated with type II collagen degradation in knee osteoarthritis: a three-month longitudinal study. *Arthritis and rheumatism* **52**, 2822-2829.
- Ghosh, P. (2003) Disease modifying osteoarthritis drugs (DMOADs). In: *Osteoarthritis* 2nd edition edn., Ed: L.S. Lohmander, New York. pp 395-401.
- Ghosh, P. and Cheras, P.A. (2001) Vascular mechanisms in osteoarthritis. *Best practice & research* **15**, 693-709.
- Gong, J.K., Burgess, E. and Bacalao, P. (1966) Accretion and exchange of strontium-85 in trabecular and cortical bones. *Radiation research* **28**, 753-765.
- Hough, A.J. (2001) Pathology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management*, 3th edition edn., Ed: R. Zorab, Philadelphia. pp 70-99.
- Johnston, S.A. (1997) Osteoarthritis Joint anatomy, physiology, and pathology. In: *The veterinary clinics of north america small animal practice*, Ed: J. Vassallo, Philadelphia. pp 699-724.
- Judex, S., Gross, T.S., Bray, R.C. and Zernicke, R.F. (1997) Adaptation of bone to physiological stimuli. *Journal of biomechanics* **30**, 421-429.
- Kalscheur, V.L. (2001) Bone and cartilage changes in osteoarthritis: a proteoglycan stain. *Histologic-Sakura Technical Bulletin* **34**, 14-15.
- Kellgren, J.H. and Lawrence, J.S. (1957) Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* **16**, 494-502.
- Korvick, D.L., Pijanowski, G.J. and Schaeffer, D.J. (1994) Three-dimensional kinematics of the intact and cranial cruciate ligament-deficient stifle of dogs. *Journal of biomechanics* **27**, 77-87.
- Krampla, W., Mayrhofer, R., Malcher, J., Kristen, K.H., Urban, M. and Hruby, W. (2001) MR imaging of the knee in marathon runners before and after competition. *Skeletal radiology* **30**, 72-76.
- Lajeunesse, D., Hilal, G., Pelletier, J.P. and Martel-Pelletier, J. (1999) Subchondral bone morphological and biochemical alterations in osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **7**, 321-322.

- Libicher, M., Ivancic, M., Hoffmann, M. and Wenz, W. (2005) Early changes in experimental osteoarthritis using the Pond-Nuki dog model: technical procedure and initial results of in vivo MR imaging. *European radiology* **15**, 390-394.
- Lohman, M., Kivisaari, A., Vehmas, T., Kallio, P., Malmivaara, A. and Kivisaari, L. (2001) MRI abnormalities of foot and ankle in asymptomatic, physically active individuals. *Skeletal radiology* **30**, 61-66.
- Mandalia, V., Fogg, A.J., Chari, R., Murray, J., Beale, A. and Henson, J.H. (2005) Bone bruising of the knee. *Clin Radiol* **60**, 627-636.
- Mankin, H.J., Dorfman, H., Lippiello, L. and Zarins, A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* **53**, 523-537.
- Mankin, J.H. and Brandt, K.D. (1992) Biochemistry and metabolism of articular cartilage in osteoarthritis. In: *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management, 2nd edition*, Ed: Saunders, Philadelphia. pp 109-154.
- Martig, S., Boisclair, J., Konar, M., Sreng, D. and Lang, J. (2007) MRI characteristics and histology of bone marrow lesions in dogs with experimentally induced osteoarthritis. *Veterinary radiology and ultrasound* **48**, 105-112.
- Martinez, S.A. and Coronado, G.S. (1997) Acquired conditions that lead to osteoarthritis in the dog. In: *The Veterinary Clinics Of North America Small Animal Practice*, Ed: Saunders, Philadelphia. pp 759-775.
- McHughes, M. and Lipman, A.G. (2006) Managing osteoarthritis pain when your patient fails simple analgesics and NSAIDs and is not a candidate for surgery. *Curr Rheumatol Rep* **8**, 22-29.
- Messner, K., Fahlgren, A., Ross, I. and Andersson, B. (2000) Simultaneous changes in bone mineral density and articular cartilage in a rabbit meniscectomy model of knee osteoarthrosis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **8**, 197-206.
- Mink, J.H. and Deutsch, A.L. (1989) Occult cartilage and bone injuries of the knee: detection, classification, and assessment with MR imaging. *Radiology* **170**, 823-829.
- Nevitt, M.C., Peterfy, C., Guermazi, A., Felson, D.T., Duryea, J., Woodworth, T., Chen, H., Kwok, K. and Harris, T.B. (2007) Longitudinal performance

- evaluation and validation of fixed-flexion radiography of the knee for detection of joint space loss. *Arthritis and rheumatism* **56**, 1512-1520.
- Newberry, W.N., Zukosky, D.K. and Haut, R.C. (1997) Subfracture insult to a knee joint causes alterations in the bone and in the functional stiffness of overlying cartilage. *J Orthop Res* **15**, 450-455.
- Nolte-Ernsting, C.C., Adam, G., Buhne, M., Prescher, A. and Gunther, R.W. (1996) MRI of degenerative bone marrow lesions in experimental osteoarthritis of canine knee joints. *Skeletal radiology* **25**, 413-420.
- O'Connor, B.L., Visco, D.M., Heck, D.A., Myers, S.L. and Brandt, K.D. (1989) Gait alterations in dogs after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis and rheumatism* **32**, 1142-1147.
- Ostergaard, K., Andersen, C.B., Petersen, J., Bendtzen, K. and Salter, D.M. (1999) Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann Rheum Dis* **58**, 208-213.
- Outerbridge, R.E. (1961) The etiology of chondromalacia patellae. *The Journal of bone and joint surgery* **43-B**, 752-757.
- Ozdemir, F., Tukenmez, O., Kokino, S. and Turan, F.N. (2005) How do marginal osteophytes, joint space narrowing and range of motion affect each other in patients with knee osteoarthritis. *Rheumatol Int*, 1-7.
- Pastoureau, P.C., Chomel, A.C. and Bonnet, J. (1999) Evidence of early subchondral bone changes in the meniscectomized guinea pig. A densitometric study using dual-energy X-ray absorptiometry subregional analysis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **7**, 466-473.
- Patel, V., Issever, A.S., Burghardt, A., Laib, A., Ries, M. and Majumdar, S. (2003) MicroCT evaluation of normal and osteoarthritic bone structure in human knee specimens. *J Orthop Res* **21**, 6-13.
- Pearle, A.D., Warren, R.F. and Rodeo, S.A. (2005) Basic science of articular cartilage and osteoarthritis. *Clin Sports Med* **24**, 1-12.
- Peterfy, C.G. (2002) Imaging of the disease process. *Current opinion in rheumatology* **14**, 590-596.
- Peterfy, C.G. (2003) Magnetic Resonance Imaging. In: *Osteoarthritis*, 2nd edn., Ed: L.S. Lohmander, Oxford University Press, New York. pp 433-451.
- Peterfy, C.G., Gold, G., Eckstein, F., Cicuttini, F., Dardzinski, B. and Stevens, R. (2006) MRI protocols for whole-organ assessment of the knee in

osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **14 Suppl A**, A95-111.

- Peterfy, C.G., Guermazi, A., Zaim, S., Tirman, P.F., Miaux, Y., White, D., Kothari, M., Lu, Y., Fye, K., Zhao, S. and Genant, H.K. (2004) Whole-Organ Magnetic Resonance Imaging Score (WORMS) of the knee in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 177-190.
- Phan, C.M., Link, T.M., Blumenkrantz, G., Dunn, T.C., Ries, M.D., Steinbach, L.S. and Majumdar, S. (2006) MR imaging findings in the follow-up of patients with different stages of knee osteoarthritis and the correlation with clinical symptoms. *European radiology* **16**, 608-618.
- Poole, A. (2001) Cartilage in health and disease. In: *Arthritis and allied conditions.*, 14th edn., Ed: W. Koopman, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia. pp 226-284.
- Poole, A.R. (1997) Cartilage in health and disease. In: *Arthritis and Allied Conditions*, 13th edn. pp 226-284.
- Poole, A.R., Kobayashi, M., Yasuda, T., Lavery, S., Mwale, F., Kojima, T., Sakai, T., Wahl, C., El-Maadawy, S., Webb, G., Tchetina, E. and Wu, W. (2002) Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **61 Suppl 2**, ii78-81.
- Pritzker, K.P.H. (2003) Pathology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis*, 2nd edn., Ed: L.S. Lohmander, New York. pp 49-58.
- Radin, E.L. (1973) The Physiology and degeneration of joints. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* **2**, 245-257.
- Rhee, D.K., Marcelino, J., Baker, M., Gong, Y., Smits, P., Lefebvre, V., Jay, G.D., Stewart, M., Wang, H., Warman, M.L. and Carpten, J.D. (2005) The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest* **115**, 622-631.
- Rovati, L.C. (1999) Radiographic assessment. Introduction: existing methodology. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 427-429.
- Sandell, L.J. and Hering, T.M. (2001) Biochemistry and molecular and cell biology of articular cartilage in osteoarthritis. In: *Osteoarthritis: Diagnosis and medical/surgical management*, 3rd edn., Saunders, Philadelphia. pp 115-143.
- Sharma, L. (2001) Epidemiology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management*, Ed: Saunders, Philadelphia. pp 4-28.

- Simon, L.S. and Strand, V. (2001) The pharmacologic treatment of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management*, 3th edn., Ed: Saunders, Philadelphia. pp 371-391.
- Simon, S.R., Radin, E.L., Paul, I.L. and Rose, R.M. (1972) The response of joints to impact loading. II. In vivo behavior of subchondral bone. *J Biomech* **5**, 267-272.
- Stevens, A. and Lowe, J. (1997) Musculoskeletal system. In: *Human Histology*, 2nd edition, Ed: L. Cook, Mosby, Philadelphia. pp 248-250.
- Tapprest, J. and Radier, C. (2002) Principes et applications de l'imagerie par résonance magnétique chez le cheval. *Pratique vétérinaire équine* **34**, 49-55.
- Thomson, C.E. (1993) Magnetic resonance imaging- a general overview of principles and examples in veterinary neurodiagnosis. *Veterinary Radiology and ultrasound* **34**, 2-17.
- Todhunter, J.R. (1996) Anatomy and physiology of synovial joints. In: *Joint disease in the horse*, Ed: Saunders, Philadelphia. pp 1-28.
- Tsou, I.Y.Y., Yegappan, M., Ong, W.S., Ghosh, P. and Tan, J.L. (2006) Cartilage injury and repair: assessment with magnetic resonance imaging. *Singapore Med J* **47**, 80-88.
- Verstraete, K.L., Almqvist, F., Verdonk, P., Vanderschueren, G., Huysse, W., Verdonk, R. and Verbrugge, G. (2004) Magnetic resonance imaging of cartilage and cartilage repair. *Clin Radiol* **59**, 674-689.
- Wachsmuth, L., Keiffer, R., Juretschke, H.P., Raiss, R.X., Kimmig, N. and Lindhorst, E. (2003) In vivo contrast-enhanced micro MR-imaging of experimental osteoarthritis in the rabbit knee joint at 7.1T1. *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 891-902.
- Wang, S.X., Lavery, S., Dumitriu, M., Plaas, A. and Gryn timer, M.D. (2007) The effects of glucosamine hydrochloride on subchondral bone changes in an animal model of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* **56**, 1537-1548.
- Watson, P.J., Carpenter, T.A., Hall, L.D. and Tyler, J.A. (1996) Cartilage swelling and loss in a spontaneous model of osteoarthritis visualized by magnetic resonance imaging. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **4**, 197-207.
- Watt, I. and Doherty, M. (2003) Plain radiographic features of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis*, 2nd edn., Eds: K.D. Brandt, M. Doherty and L.S. Lohmander, Oxford University Press, New York. pp 211-225.

- Weisbrode, S.E. and Doidge, C.E. (2001) Bone and joints. In: *Thomson's special veterinary pathology*, Eds: M.D. Mc Gavin, W.W. Carlton and J.F. Zachary, Missouri. pp 499-536.
- Westacott (2003) Subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. Biological effects. In: *Osteoarthritis*, Ed: L.S. Lohmander, New York. pp 133-142.
- Widmer, W.K., Buckwalter, K.A., Braunstein, E.A., Hill, M.A., O'Connor, B.L. and Visco, D.M. (1994a) Radiographic and magnetic resonance imaging of the stifle joint in experimental osteoarthritis of dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound* **35**, 371-383.
- Widmer, W.R., Buckwalter, K.A., Braunstein, E.M., Hill, M.A., O'Connor, B.L. and Visco, D.M. (1994b) Radiographic and magnetic resonance imaging of the stifle joint in experimental osteoarthritis of dogs. *Veterinary radiology and ultrasound* **35**, 371-383.
- Woo, S.L.Y., Kwan, M.K., Coutts, R.D. and Akeson, W.H. (1992) Biomechanical considerations. In: *Osteoarthritis Diagnosis and Medical/Surgical Management*. pp 191-211.
- Yao, L. and Lee, J.K. (1988) Occult intraosseous fracture: detection with MR imaging. *Radiology* **167**, 749-751.
- Yoneda, T. (1993) Cytokines in bone: local translators in cell-to-cell communications. In: *Cellular and molecular biology of bone*, Ed: M. Noda, Academic Press Limited, San Diego. pp 375-412.
- Yulish, B.S., Montanez, J., Goodfellow, D.B., Bryan, P.J., Mulopulos, G.P. and Modic, M.T. (1987) Chondromalacia patellae: assessment with MR imaging. *Radiology* **164**, 763-766.