

Université de Montréal

**VALIDATION DE L'ÉCHOGRAPHIE HAUTE
FRÉQUENCE POUR L'ÉVALUATION DES LÉSIONS
D'OSTÉOARTHROSE**

par

Mathieu SPRIET, DMV

Départements des 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

Août 2004

© Mathieu Spriet, 2004



SF

607

U54

2004

v. 027

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

VALIDATION DE L'ÉCHOGRAPHIE HAUTE FRÉQUENCE POUR
L'ÉVALUATION DES LÉSIONS D'OSTÉOARTHROSE

présenté par :

Mathieu SPRIET, DMV

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

André Bisailon, président-rapporteur

Sheila Laverty, directrice de recherche

Christiane Girard, codirectrice

Christine Théoret, membre du jury

Mémoire accepté le :

Résumé

La prévalence de l'ostéoarthrose, processus dégénératif induisant progressivement des lésions du cartilage et des autres structures articulaires, est en constante augmentation dans la population humaine. La validation de nouveaux traitements permettant de modifier l'évolution de l'ostéoarthrose représente donc un enjeu important. Ceci nécessite en parallèle la mise au point d'outils diagnostiques capables d'identifier précocément la maladie et de suivre son évolution. L'échographie haute fréquence semblerait répondre à ces critères. Nous avons évalué la capacité d'un système d'échographie haute fréquence à 40 MHz pour identifier les lésions précoces du cartilage, par comparaison avec les examens macroscopique et histologique, sur un modèle d'ostéoarthrose induite par section du ligament croisé cranial chez le lapin. De fortes sensibilité et spécificité de l'examen échographique pour l'identification de la fibrillation et de l'ulcération du cartilage ont été observées. Une haute corrélation a été obtenue entre le grade échographique et le grade histologique. L'échographie haute fréquence est donc un outil intéressant pour le diagnostic précoce et le suivi de l'évolution des lésions d'ostéoarthrose. L'association de ce système à des instruments d'arthroscopie permettrait un diagnostic précoce minimalement invasif chez l'homme et un suivi longitudinal sur les modèles expérimentaux.

Mots-clefs

Cartilage, ostéoarthrose, diagnostic, imagerie médicale, échographie, histologie.

Abstract

As osteoarthritis, a progressive degenerative disease of the joint, is increasing in incidence, there is a great deal of interest in the development of therapeutic agents to prevent the disease or retard its progression. Concurrently, there is a need to develop more sensitive diagnostic tools for the early identification of the disease and the follow up of the response to therapy. High frequency ultrasonography is an emerging technology that could be useful in this domain. We studied the capacity of high frequency ultrasound to detect a spectrum of osteoarthritic lesions of cartilage in an experimental animal model by comparing it to the recognised gold standard, histology, and to macroscopic evaluation. High sensitivity and specificity were observed for fibrillation and ulceration diagnosis with high frequency ultrasonography. A high correlation was found between ultrasonographic and histological grades. Our results suggest that high frequency ultrasonography is a valuable tool for the early diagnosis and follow up of osteoarthritis lesions. Coupling this system with arthroscopic tools will allow minimally invasive early clinical diagnosis in humans and chronological follow up of osteoarthritis in animal models.

Key-words

Cartilage, osteoarthritis, diagnosis, diagnostic imaging, ultrasonography, histology.

Table des Matières

<u>Résumé</u>	iii
<u>Abstract</u>	iv
<u>Table des Matières</u>	v
<u>Liste des tableaux</u>	vii
<u>Liste des figures</u>	viii
<u>Liste des sigles et des abréviations</u>	ix
<u>Remerciements</u>	x
<u>Introduction</u>	<u>1</u>
<u>1. Chapitre 1 : Recension de la Littérature</u>	<u>3</u>
<u>1.1. L'articulation synoviale</u>	<u>3</u>
1.1.1. <u>La membrane synoviale</u>	3
1.1.2. <u>Le liquide synovial</u>	4
1.1.3. <u>Le cartilage articulaire</u>	4
1.1.4. <u>Les autres structures articulaires</u>	11
<u>1.2. L'ostéoarthrose</u>	<u>12</u>
1.2.1. <u>Définition</u>	12
1.2.2. <u>Epidémiologie</u>	13
1.2.3. <u>Pathogénie</u>	15
1.2.4. <u>Pathologie</u>	19
1.2.5. <u>Modèles expérimentaux</u>	20
1.2.6. <u>Thérapies actuelles et perspectives</u>	21
<u>1.3. Diagnostic par l'imagerie des lésions d'ostéoarthrose</u>	<u>25</u>
1.3.1. <u>Radiographie</u>	25
1.3.2. <u>Tomodensitométrie</u>	28
1.3.3. <u>Imagerie par résonance magnétique</u>	28

1.3.4.	<u>Echographie</u>	30
2.	<u>Chapitre 2: Article</u>	<u>38</u>
2.1.	<u>Abstract</u>	40
2.2.	<u>Introduction</u>	41
2.3.	<u>Materials and methods</u>	43
2.3.1.	<u>Experimental animal model</u>	43
2.3.2.	<u>Surgical procedure</u>	43
2.3.3.	<u>Ultrasound biomicroscopy</u>	44
2.3.4.	<u>Macroscopic examination</u>	45
2.3.5.	<u>Histologic evaluation</u>	45
2.3.6.	<u>Statistical analysis</u>	46
2.4.	<u>Results</u>	47
2.4.1.	<u>UBM evaluation</u>	47
2.4.2.	<u>Macroscopic evaluation</u>	49
2.4.3.	<u>Histological examination</u>	50
2.4.4.	<u>Statistical analysis</u>	54
2.5.	<u>Discussion</u>	56
2.6.	<u>Acknowledgements</u>	61
2.7.	<u>References</u>	62
3.	<u>Chapitre 3 : Discussion et Conclusion</u>	<u>65</u>
3.1.	<u>Discussion</u>	65
3.2.	<u>Conclusion</u>	70
	<u>Bibliographie</u>	<u>71</u>

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau I

Score radiographique d'ostéoartrrose 26

Chapitre 2

Tableau I.

Ultrasonographic grade 43

Tableau II.

Macroscopic grade 44

Tableau III.

Histological grade 45

Tableau IV .

Ultrasonographic evaluation results 48

Tableau V.

Macroscopic evaluation results 49

Tableau VI.

Histological evaluation results 51

Tableau VII.

Cross tabulation ultrasonographic vs. histological grades 54

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1

Les différentes zones du cartilage 8

Figure 2

Lésions macroscopiques d'ostéarthrose 15

Chapitre 2

Figure 1

Ultrasound transverse scans of rabbit femoral condylar cartilage 47

Figure 2

Macroscopic specimens 48

Figure 3

Representative histological sections of femoral condyles stained with Safranin O Fast Green 50

Figure 4

Concurrent ultrasonographic, macroscopic and histologic examination of a femoral condyle from an ACLT joint, illustrating fibrillation 52

Figure 5

Concurrent ultrasonographic, macroscopic and histologic examination of a femoral condyle from an ACLT joint, illustrating ulceration 52

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1

Les différentes zones du cartilage 8

Figure 2

Lésions macroscopiques d'ostéoarthrose 15

Chapitre 2

Figure 1

Ultrasound transverse scans of rabbit femoral condylar cartilage 47

Figure 2

Macroscopic specimens 48

Figure 3

Representative histological sections of femoral condyles stained with Safranin O Fast Green 50

Figure 4

Concurrent ultrasonographic, macroscopic and histologic examination of a femoral condyle from an ACLT joint, illustrating fibrillation 52

Figure 5

Concurrent ultrasonographic, macroscopic and histologic examination of a femoral condyle from an ACLT joint, illustrating ulceration 52

Liste des sigles et des abréviations

DMOADs	<i>disease modifying osteoarthritis drugs</i> , médicament modifiant l'évolution de l'ostéoarthrose
IL	<i>interleukin</i> , interleukine
IRM	imagerie par résonance magnétique
MHz	<i>mega Hertz</i> , méga Hertz
μm	micromètre
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> , métalloprotéinase matricielle
NO	<i>nitric oxide</i> , oxyde nitrique
OA	<i>osteoarthritis</i> , ostéoarthrose
SMOADs	<i>symptom modifying osteoarthritis drugs</i> , médicament modifiant les symptômes de l'ostéoarthrose
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i> , facteur de croissance transformant- β
TNF- α	<i>tumor necrosis factor α</i> , facteur onconécrosant α
UBM	<i>ultrasound biomicroscopy</i> , biomicroscopie par ultrasons

Remerciements

A Dre Sheila Laverty,

Pour m'avoir encadré lors de ce travail de maîtrise et pour m'avoir transmis son enthousiasme pour la recherche.

A Dre Christiane Girard,

Pour sa participation à ce projet, sa disponibilité et ses encouragements.

A Dr André Bisailon,

Pour avoir accepté de présider notre jury.

A Dre Christine Théoret,

Pour avoir accepté de participer à notre jury.

Au Réseau Canadien de l'Arthrite,

Pour le financement du projet.

Introduction

L'ostéoarthrose regroupe un ensemble de modifications concernant non seulement le cartilage articulaire mais également l'articulation dans son ensemble et évoluant vers la perte de fonction de cet organe, responsable du mouvement. On estime à l'heure actuelle que 10% des adultes au Canada souffrent d'ostéoarthrose et cette prévalence a tendance à augmenter en raison du vieillissement de la population. En médecine vétérinaire, l'ostéoarthrose est responsable de pertes importantes chez les chevaux de course et de sport et représente une dominante pathologique en médecine des petits animaux avec l'allongement de la durée de vie de nos compagnons.

Les traitements actuellement disponibles contre l'ostéoarthrose se limitent à des thérapies capables de masquer les symptômes mais ne permettent pas de stopper ni de ralentir l'évolution de la maladie. L'amélioration des connaissances concernant la pathogénie a permis l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques. La recherche est particulièrement active dans l'étude de nouveaux traitements capables de modifier l'évolution de la maladie. La validation de tels traitements nécessite une confirmation clinique de leur efficacité. Des outils diagnostiques permettant une identification précoce de la maladie et un suivi de son évolution sont donc nécessaires. La radiographie reste l'outil de diagnostic de référence de l'ostéoarthrose mais souffre d'un manque de sensibilité dû notamment à son incapacité à identifier les lésions du cartilage. Le développement de nouveaux outils diagnostiques plus performants s'impose donc.

L'échographie est un mode d'imagerie qui permet la visualisation des tissus mous. Ses limites actuelles, concernant l'identification des lésions précoces du cartilage, sont dues à un manque d'accessibilité et de résolution. Il est possible en utilisant des transducteurs de plus haute fréquence d'améliorer la résolution. Des systèmes d'échographie haute fréquence ont été développés depuis une quinzaine d'années. Ils sont actuellement utilisés chez l'homme en dermatologie, en ophtalmologie et par voie intravasculaire. Quelques études expérimentales ont montré la capacité de tels systèmes à identifier des modifications au sein du cartilage. L'objet de notre étude est de vérifier

l'intérêt de l'utilisation de l'échographie haute fréquence pour l'identification des lésions précoces d'ostéoarthrose. Nous avons donc évalué, par échographie haute fréquence et examens macroscopique et histologique, les lésions d'ostéoarthrose sur un modèle chirurgical chez le lapin.

1. Chapitre 1 : Recension de la Littérature

1.1. L'articulation synoviale

L'articulation peut être considérée comme un organe, c'est à dire un groupe de cellules spécialisées qui fonctionnent ensemble pour accomplir une tâche. Le rôle d'une articulation est d'assurer à la fois la stabilité et la mobilité du squelette (Dewire and Einhorn 2001).

L'articulation synoviale, ou diarthrose, se distingue des autres types d'articulations, synarthroses et amphiarthroses, par sa grande amplitude de mouvement. Elle se caractérise par la présence d'une capsule articulaire fibreuse dont la face interne est recouverte par une membrane synoviale. Des ligaments viennent renforcer la contention assurée par la capsule et limitent le mouvement dans certaines directions. Les surfaces articulaires sont recouvertes par un cartilage hyalin et le mouvement est facilité par la présence du liquide synovial, qui se comporte comme un lubrifiant (Mow and Ratcliffe 1997).

1.1.1. La membrane synoviale

La membrane synoviale joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'articulation. Elle est responsable de la synthèse du liquide synovial et constitue un élément clef du système immunitaire de l'articulation. Son épaisseur est de 2 à 3 μm . Elle est constituée de deux couches : une couche interne ou intima et une couche profonde ou subintima. L'intima renferme trois types cellulaires nommés synoviocytes A, B et C se chevauchant en deux ou trois couches et soutenus par un réseau de fibrilles de collagène. Les synoviocytes A sont de type macrophagique et sont responsables de la phagocytose. Ils représentent un tiers des synoviocytes. Les synoviocytes de type B sont les plus nombreux et ressemblent à des fibroblastes, ils ont une fonction synthétique. Les synoviocytes de type C sont des cellules précurseurs des types A et B et représentent moins de 1% des synoviocytes. La subintima est composée de tissu adipeux et fibreux (Dewire and Einhorn 2001).

1.1.2. Le liquide synovial

Le liquide synovial est un ultrafiltrat du plasma produit par les synoviocytes de types B. Il joue un rôle fondamental à la fois dans la lubrification des surfaces articulaires et dans la nutrition des chondrocytes en servant de milieu de transport. On y retrouve la présence de petites protéines plasmatiques, notamment l'albumine, à une concentration d'environ un tiers de celle du plasma. Deux molécules sont propres au liquide synovial et ne se retrouvent pas dans le plasma, il s'agit de l'acide hyaluronique et de la lubricine. Ces deux composants sont responsables de la viscosité du liquide synovial. Les cellules présentes au sein du liquide synovial sont des lymphocytes, monocytes et macrophages. La cellularité normale est de 60 à 200 cellules mononucléées par millilitre (Dewire and Einhorn 2001)

1.1.3. Le cartilage articulaire

Le cartilage hyalin, malgré une épaisseur limitée à quelques millimètres chez l'homme, possède des propriétés uniques de résistance à la compression, d'élasticité, de répartition des charges et de faible usure malgré le frottement. Aucun matériel synthétique n'atteint un tel degré de performance (Buckwalter and Mankin 1998b). Ces propriétés sont liées à la structure du cartilage articulaire : une matrice extracellulaire entourant un seul type cellulaire, les chondrocytes, en l'absence de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses (Dewire and Einhorn 2001).

1.1.3.1. Les chondrocytes

Les chondrocytes représentent une faible part du volume du cartilage, environ 1% pour du cartilage humain adulte (Buckwalter and Mankin 1998b). Ils sont responsables de la synthèse et de l'entretien de la matrice extracellulaire.

Les chondrocytes proviennent de la différenciation de cellules mésenchymateuses (Poole 2001). Ils possèdent une activité métabolique élevée, orientée vers la synthèse de la matrice extracellulaire. L'apport de nutriments aux chondrocytes se fait par diffusion du liquide synovial à travers la matrice. Les mouvements induisant compression et relaxation du cartilage facilitent la diffusion des nutriments et sont donc nécessaires au maintien d'une activité métabolique adéquate. En raison de la faible

quantité d'oxygène disponible, le métabolisme du chondrocyte est essentiellement anaérobie (Dewire and Einhorn 2001).

Les chondrocytes sont entourés par la matrice qu'ils produisent et ne possèdent donc pas de contacts intercellulaires (Buckwalter and Mankin 1998b).

Ils sont capables de modifier leur activité métabolique en fonction de l'état de la matrice. Ils peuvent répondre à des signaux à la fois chimiques et mécaniques (Poole 2001; Deschner et al. 2003). Ces stimuli peuvent faire varier l'activité anabolique des chondrocytes mais peuvent également induire la synthèse d'enzymes provoquant la dégradation de la matrice (Dewire and Einhorn 2001; Deschner et al. 2003).

Avec le vieillissement, la capacité de synthèse des chondrocytes diminuent, entraînant un phénomène de dégénérescence du cartilage due à l'âge (Buckwalter and Mankin 1998b).

1.1.3.2. La matrice.

La matrice extracellulaire est constituée d'une trame de macromolécules et d'une phase liquide. Les interactions entre ces deux phases sont responsables des propriétés mécaniques du cartilage (Mow and Ratcliffe 1997).

- ***La phase liquide***

L'eau représente 80% du poids du cartilage. Cette phase liquide renferme également des petites molécules en suspension, telles que de l'oxygène, de petites protéines et de nombreux cations pour contrebalancer la charge négative des macromolécules de la matrice (Buckwalter and Mankin 1998b). Une partie de cette phase liquide peut entrer et sortir librement du cartilage ; la teneur en eau du cartilage dépend de la composition macromoléculaire de la matrice (Buckwalter and Mankin 1998b).

- ***Le collagène***

Le collagène est une protéine fibrillaire, principal constituant de la matrice extracellulaire. Il représente environ 60% du poids sec du cartilage (Buckwalter and Mankin 1998b). Son organisation en un réseau de fibrilles donne au cartilage sa forme et lui confère sa résistance à la compression (Buckwalter and Mankin 1998b; Poole 2001).

Différents types de collagène sont présents dans le cartilage articulaire. On retrouve les types II, VI, IX, X et XI (Poole 2001). Le collagène de type II est le constituant structurel principal des fibrilles, il représente 90 % du collagène présent dans le cartilage. Les types IX et XI sont étroitement associés aux macromolécules de type II, ils seraient responsables de l'assemblage et de la stabilisation des fibres de collagène (Mow and Ratcliffe 1997). Le collagène de type VI est rencontré dans l'environnement immédiat des chondrocytes, il permettrait l'ancrage des chondrocytes à la matrice extracellulaire. Le collagène de type X ne se retrouve qu'à proximité de la zone de cartilage calcifié, il jouerait donc un rôle dans la calcification du cartilage (Buckwalter and Mankin 1998b; Dewire and Einhorn 2001; Poole 2001).

Le collagène est synthétisé en différentes étapes, tout d'abord à l'intérieur des chondrocytes puis l'assemblage final a lieu dans la matrice extracellulaire. Le renouvellement du collagène est vraisemblablement très limité, en raison d'une faible synthèse par les chondrocytes dans le cartilage adulte (Poole 2001). La demi-vie du collagène dans un cartilage sain est estimée à plusieurs mois ou années (Dewire and Einhorn 2001).

- *Les protéoglycanes*

Les protéoglycanes sont le deuxième constituant principal de la matrice extracellulaire. Ils représentent environ un quart du poids sec du cartilage (Poole 2001). Ils sont composés de l'association d'un noyau protéique avec une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes. Les principaux glycosaminoglycanes présents dans le cartilage hyalin sont les chondroïtine sulfates, les kératane sulfates et les dermatane sulfates (Buckwalter and Mankin 1998b).

Les agrécane sont les principaux protéoglycanes présents dans le cartilage articulaire. Ils sont constitués d'un noyau protéique associé à plus de 100 chaînes de chondroïtine sulfates et 20 à 50 chaînes de kératane sulfates (Dewire and Einhorn 2001). Jusqu'à 200 molécules d'agrécane peuvent se combiner de manière non covalente avec une molécule d'acide hyaluronique afin de créer un agrégat. Ces macromolécules sont fortement chargées négativement ce qui leur confère un haut pouvoir hydrophile.

Les protéoglycanes sont donc responsables de la forte imbibition hydrique du cartilage (Dewire and Einhorn 2001).

Il existe une deuxième catégorie de protéoglycanes de poids moléculaire inférieur, il s'agit principalement des décorines, biglycanes et fibromodulines. Les décorines et fibromodulines s'associent au collagène de type II et contribuent à l'organisation et à la stabilisation du réseau de collagène. Les biglycanes se retrouvent proche des chondrocytes où ils interagiraient avec le collagène de type VI (Buckwalter and Mankin 1998b).

- *Les autres molécules*

Il existe un certain nombre d'autres molécules dans le cartilage articulaire, il s'agit principalement de protéines non collagéniques et de glycoprotéines (Mow and Ratcliffe 1997). Certaines aident à l'organisation de la structure macromoléculaire de la matrice, d'autres interviendraient dans la réponse du tissu lors d'arthrite ou d'ostéoarthrose. Toutes n'ont pas été identifiées et leur rôle reste à déterminer. (Buckwalter and Mankin 1998b).

L'anchorine CII aiderait à l'ancrage des chondrocytes à la matrice extracellulaire. La protéine oligomérique de cartilage (COMP) se retrouve à proximité des chondrocytes et peut être utilisée comme un marqueur du turn-over du cartilage (Buckwalter and Mankin 1998b).

L'acide hyaluronique a pour rôle d'immobiliser les agrécans au sein du réseau de collagène par la formation d'agrégats macromoléculaires (Poole 2001). Il interagirait également avec les chondrocytes par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques, les CD 44. Ce lien entre chondrocytes et acide hyaluronique permettrait aux cellules du cartilage de détecter des changements biochimiques ou mécaniques dans la matrice extracellulaire et de modifier leur métabolisme en conséquence (Mow and Ratcliffe 1997).

1.1.3.3. Organisation

La matrice extracellulaire peut être considérée comme un réseau composite solide constitué de fibres de collagène enchâssées dans un gel de protéoglycanes de haute concentration (Mow and Ratcliffe 1997; Poole 2001). La structure et la concentration du collagène et des protéoglycanes varient en fonction de la profondeur à l'intérieur du cartilage (Poole 2001). Quatre zones peuvent être distinguées d'un point de vue morphologique (Figure 1).

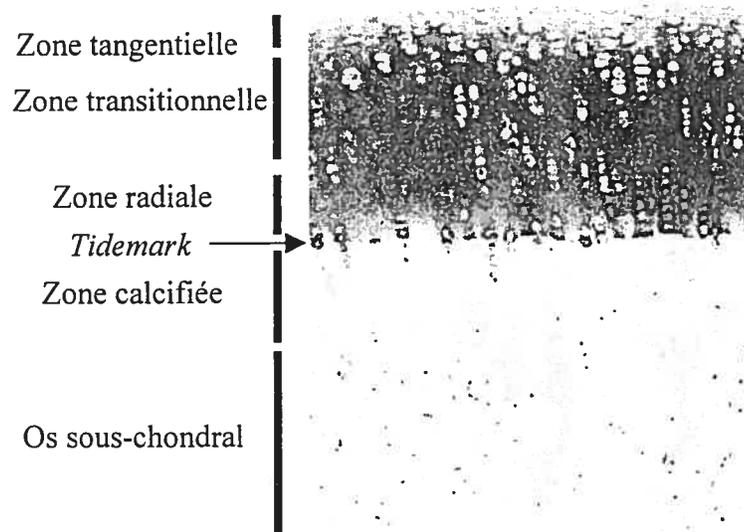


Figure 1 : Les différentes zones du cartilage. (Cartilage de fémur de lapin, coloration Safranine O Fast Green, photo M. Spriet)

La zone la plus profonde, au contact de l'os sous-chondral, est la zone de cartilage calcifié. Son rôle est de résister aux forces de cisaillement, elle est rattachée à l'os sous-chondral par de larges fibres de collagène, perpendiculaires à la surface articulaire (Dewire and Einhorn 2001). La zone suivante est la zone radiale ou profonde, qui doit son nom à l'orientation de ses fibres perpendiculaires à la surface articulaire. Elle occupe environ 30% de l'épaisseur du cartilage articulaire (Mow and Ratcliffe 1997). Elle est séparée du cartilage calcifié par la « tidemark ». Dans cette zone les chondrocytes sont sphéroïdes et alignés en colonne, les fibres de collagène sont épaisses

et traversent la tidemark (Buckwalter and Mankin 1998b). Dans la zone transitionnelle ou moyenne, les fibres prennent une orientation oblique, marquant la « transition » entre la zone radiale et la zone tangentielle. La zone transitionnelle représente 40 à 60% de l'épaisseur du cartilage (Mow and Ratcliffe 1997). La zone la plus superficielle est la zone tangentielle, cette zone ne constitue que 10 à 20 % de l'épaisseur du cartilage (Mow and Ratcliffe 1997). Les fibres de collagène y sont parallèles à la surface articulaire et perpendiculaires entre elles. Elles sont maintenues sous tension par la pression hydrostatique de la matrice sous-jacente. Les chondrocytes y sont aplatis, ellipsoïdaux, et produisent une matrice avec forte concentration de collagène et peu de protéoglycanes par comparaison avec les autres zones (Buckwalter and Mankin 1998b; Poole 2001).

1.1.3.4. Propriétés biomécaniques du cartilage

Grâce à son organisation structurelle, le cartilage possède des propriétés mécaniques lui permettant de répartir et d'absorber les charges ainsi que de limiter les frottements sur les surfaces articulaires (Poole 2001).

- ***Mécanisme de gonflement du cartilage***

Dans le cartilage, les protéoglycanes sont immobilisés et contenus par le réseau de collagène (Poole 2001). Les protéoglycanes occupent un cinquième du volume qu'ils occuperaient s'ils étaient libres en solution (Mow and Ratcliffe 1997). Cette forte propension à l'expansion est due au grand nombre de charges négatives portées par les chaînes de glycosaminoglycanes. La présence de ces charges entraînent le développement de forces de répulsion électrostatiques entre les molécules chargées. Ces forces électrostatiques sont donc en partie responsables du gonflement du cartilage. Le second mécanisme expliquant le gonflement du cartilage est l'attraction par ces charges négatives de nombreux cations créant ainsi un gradient osmotique, appelé pression osmotique de Donnan, responsable d'un appel d'eau vers le cartilage (Mow and Ratcliffe 1997).

- ***Résistance à la traction de la matrice solide***

La résistance à la traction est plus importante dans la couche superficielle du cartilage en raison d'un alignement préférentiel des fibres de collagène. La présence de

fibrillation et d'ostéoarthrose entraîne une perte de résistance du cartilage. La concentration en protéoglycanes n'affecte pas les propriétés de résistance à la traction de la matrice. Il y a une corrélation positive importante entre le ratio collagène/protéoglycanes et la résistance à la traction du cartilage. Le réseau de collagène est donc responsable des propriétés de résistance à la traction du cartilage (Mow and Hung 2003).

- ***Résistance à la compression de la matrice solide***

La résistance à la compression du cartilage humain sain possède une forte corrélation négative avec sa teneur en eau et une corrélation positive avec sa teneur en protéoglycanes. En revanche, il n'existe pas de corrélation entre la résistance à la compression et la teneur en collagène. Les protéoglycanes sont donc responsables de la résistance à la compression du cartilage. Il a d'ailleurs été remarqué que les zones du cartilage articulaire exposées à de plus fortes charges ont généralement une concentration plus élevée en protéoglycanes et sont donc plus résistantes à la compression. Une déplétion en protéoglycanes du cartilage entraîne une diminution de la résistance à la compression (Mow and Ratcliffe 1997).

- ***Propriétés de cisaillement de la matrice solide***

La résistance au cisaillement de la matrice provient essentiellement de la résistance à la traction des fibres de collagène. De plus, l'interaction des protéoglycanes avec le collagène permet le maintien d'une orientation adéquate des fibres de collagène, conférant au cartilage sa force et sa résistance à la déformation (Mow and Hung 2003).

- ***Propriétés viscoélastiques du cartilage en compression***

Sous l'application d'une contrainte constante, le cartilage présente une déformation progressive jusqu'à l'atteinte d'un équilibre. Ceci correspond à un comportement viscoélastique reposant sur la composition biphasique du cartilage : lors de mise en compression, l'écoulement de liquide à travers la matrice entraîne des forces de friction conférant à la phase liquide une part du support de la charge totale et minimisant ainsi la contrainte supportée par la matrice solide. La capacité de charge de chaque phase dépend du rapport entre les forces de friction dues à l'écoulement du liquide interstitiel et à la résistance élastique de la matrice (Mow and Ratcliffe 1997).

En raison de la faible perméabilité de la matrice, il existe d'importantes forces de friction lors de l'écoulement du liquide interstitiel ce qui confère au cartilage sa résistance à la compression. Lorsque la matrice est altérée, la perméabilité augmente entraînant une augmentation de la déformation sous la contrainte et donc une diminution de la résistance à la compression (Mow and Hung 2003).

- ***Lubrification du cartilage***

Les surfaces articulaires sont soumises à de nombreux mouvements et variations de charge sans présenter d'importante usure due au frottement. Ceci témoigne de l'existence d'un système de lubrification très performant. Deux systèmes de lubrification coexistent au sein d'une articulation synoviale (Frankel 1998). Le premier dit de « lubrification limite » consiste en la présence d'une couche de macromolécules liées aux surfaces articulaires et empêchant donc le contact direct entre celles-ci. Ceci est permis grâce à la présence d'une glycoprotéine spécifique du liquide synovial, la lubricine (Simkin 2003). Le deuxième mécanisme, dit lubrification hydrodynamique, repose sur la présence d'un film liquide entre les deux surfaces articulaires (Frankel 1998; Simkin 1998). La pression développée dans le film lubrifiant supporte les charges (Frankel 1998). Un tel film est généré lors du mouvement grâce à l'hydratation et la compressibilité de la matrice (Simkin 2003). La viscosité du liquide synovial, due notamment à l'acide hyaluronique, améliore la lubrification hydrodynamique (Frankel 1998).

1.1.4. Les autres structures articulaires

1.1.4.1. La capsule articulaire

La capsule articulaire est une couche de tissu conjonctif dense composé de fibres de collagène et de fibres élastiques délimitant l'articulation synoviale. Elle est tapissée par la membrane synoviale à sa face interne et joue un rôle dans la contention de l'articulation et la limitation des mouvements (Dewire and Einhorn 2001).

1.1.4.2. Les ligaments

Les ligaments sont des faisceaux de fibres de collagène de type I dont le rôle est d'empêcher les mouvements inappropriés (Simkin 1998). Ils s'insèrent sur les structures

osseuses de part et d'autre de l'articulation. Ils se situent généralement à l'extérieur de l'articulation en renfort de la capsule articulaire mais quelques ligaments se trouvent dans l'espace articulaire; c'est notamment le cas des ligaments croisés dans l'articulation fémoro-tibiale.

1.1.4.3. Les ménisques

Les ménisques sont des structures fibrocartilagineuses denses, présentes dans certaines articulations notamment le genou. Leur rôle est d'augmenter la congruité articulaire, de répartir la charge, d'absorber les chocs, de limiter les mouvements de translation, de faciliter le roulement et d'améliorer la lubrification (Dewire and Einhorn 2001).

1.2. L'ostéoarthrose

1.2.1. Définition

Le terme « osteoarthritis » est l'expression la plus fréquemment retrouvée dans la littérature scientifique anglophone pour désigner les maladies dégénératives articulaires. En français, le terme « arthrose » est couramment employé mais il désigne au sens premier du terme l'articulation synoviale en elle-même. Son emploi pour désigner un processus pathologique est donc contestable. Le terme « ostéoarthrite », traduction exacte de « osteoarthritis », serait donc plus adéquat mais la connotation inflammatoire du suffixe « -ite » est critiquable. Nous utiliserons « ostéoarthrose » pour désigner les maladies dégénératives articulaires.

Une définition consensuelle de l'ostéoarthrose a été établie en 1994 lors d'un atelier intitulé « New Horizons in Osteoarthritis » (Sharma 2001; Flores and Hochberg 2003):

« L'ostéoarthrose est le résultat d'événements mécaniques et biologiques qui perturbent *l'équilibre entre dégradation et synthèse du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral*. Bien que l'ostéoarthrose puisse être induite par différents facteurs (génétique, congénital, métabolique ou traumatique), elle évolue vers une implication de tous les tissus de l'articulation synoviale. Elle se manifeste par des modifications

morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques concernant à la fois les cellules et la matrice et conduisant au ramollissement, à la fibrillation, l'ulcération puis la perte de cartilage ainsi qu'à la sclérose et l'éburnation de l'os sous-chondral, au développement d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Lorsqu'elle se manifeste cliniquement, l'ostéoarthrose se caractérise par de la douleur articulaire, de la sensibilité, une limitation de mouvements, des craquements, une éventuelle effusion et un degré variable d'inflammation sans effet systémique. » (Traduit de Flores et al. 2003)

L'ostéoarthrose a été considérée comme une maladie « d'usure » causée par des contraintes mécaniques. Il apparaît cependant aujourd'hui que si des lésions mécaniques peuvent être rencontrées lors d'ostéoarthrose, la plupart des constatations pathologiques liées à l'ostéoarthrose sont le résultat d'une réponse inadéquate ou inappropriée aux lésions des tissus affectés (Pritzker 2003).

1.2.2. Epidémiologie

1.2.2.1. Classification et facteurs de risque

L'ostéoarthrose peut être séparée en deux classes : l'ostéoarthrose primaire ou idiopathique et l'ostéoarthrose secondaire (Cooper 1998). Cette classification repose sur la présence ou non de facteurs causals. Les facteurs déclenchant l'ostéoarthrose secondaire reposent soit sur des anomalies des tissus articulaires, notamment du cartilage, soit sur des anomalies biomécaniques et résultant en une augmentation des contraintes. Ces principaux facteurs sont les traumatismes (aigus ou chroniques), les anomalies congénitales ou de développement et les maladies métaboliques et endocrines (Flores and Hochberg 2003). L'ostéoarthrose idiopathique peut être localisée à une articulation ou généralisée. Les articulations les plus souvent atteintes chez l'homme sont les genoux, les hanches, les articulations des mains et de la colonne vertébrale (Dieppe 1998). Le vieillissement et l'obésité sont des facteurs prédisposants de l'ostéoarthrose idiopathique (Sharma 2001; Felson 2004).

1.2.2.2. Prévalence chez l'homme

L'ostéoarthrose est la maladie articulaire la plus fréquente chez l'homme (Cooper 1998; Felson 2003). La prévalence diffère selon les études en raison de

variations dans les critères utilisés. Il existe en effet une mauvaise corrélation entre les signes radiographiques et les symptômes cliniques (Felson 2003; Felson 2004). La prévalence augmente avec l'âge : la majorité des personnes âgées de 65 ans et plus souffrent d'ostéoarthrose (Cooper 1998; Felson 2004). L'ostéoarthrose est la principale cause d'invalidité de longue durée dans cette catégorie de la population (Buckwalter et al. 2000). La prévalence est plus élevée chez les femmes que chez les hommes, surtout après 50 ans, laissant présager une influence hormonale (Sharma 2001).

Environ 10% des Canadiens adultes souffrent d'ostéoarthrose. L'ostéoarthrose arrive en tête des maladies articulaires au Canada. Ces maladies représentent un fardeau économique estimé à 4,4 milliards de dollars pour la société canadienne en 1998, les invalidités de longue durée représentant 80% du coût estimé (Badley and DesMeules 2003).

Une augmentation de plus de 50% de la prévalence de l'ostéoarthrose entre les années 1990 et 2020 est attendue, ceci étant principalement lié au vieillissement de la population (Felson 2003).

1.2.2.3. Prévalence chez l'animal

L'ostéoarthrose est également une préoccupation importante en médecine vétérinaire. Les problèmes de boiterie sont en effet de loin la première cause d'arrêt d'entraînement et de compétition chez le cheval de course (Jeffcott et al. 1982; Rosedale et al. 1985). Les lésions articulaires représentent une part importante des causes de boiterie (Trotter and McIlwraith 1996). Une étude rapporte une implication de dommages articulaires chez 42% des chevaux présentés pour boiterie dans un centre de référence (Todhunter and Lust 1990). La prévalence de l'ostéoarthrose est également élevée chez les animaux de compagnie, 20% de la population canine âgée de plus de 1 an souffrirait d'ostéoarthrose selon une étude réalisée auprès de praticiens en 1996 (Johnston 1997). La principale cause acquise d'ostéoarthrose chez le chien est la rupture du ligament croisé cranial (Martinez and Coronado 1997). Les autres causes acquises sont liées aux fractures articulaires, notamment les fractures de condyle huméral et de la tête fémorale, et aux luxations (Martinez and Coronado 1997). Les anomalies congénitales responsables du développement d'ostéoarthrose chez le chien incluent les

lésions d'ostéochondrite disséquante (OCD), la dysplasie du coude (fragmentation du processus coronoïde médial, non-union du processus anconé et OCD du coude), la dysplasie de la hanche et les luxations patellaires (Martinez 1997).

1.2.3. Pathogénie

Les lésions d'ostéoarthrose observées à l'échelle tissulaire consistent en une perte de cartilage articulaire, un remodelage de l'os sous-chondral ainsi que la formation d'ostéophytes (Buckwalter et al. 2000) (Figure 2). Il existe actuellement une controverse concernant la pathogénie : certains considèrent que les lésions cartilagineuses sont la conséquence du durcissement de l'os sous-chondral, d'autres suggèrent que la dégénérescence du cartilage entraîne une augmentation des contraintes exercées sur l'os sous-chondral, ce qui provoquerait son remaniement (Buckwalter and Mankin 1998a).

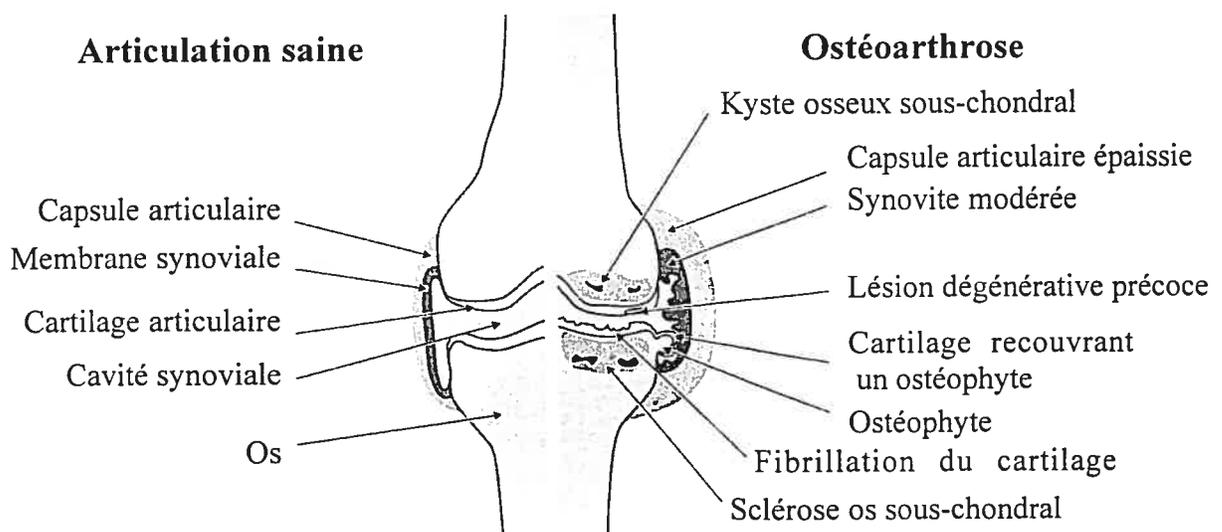


Figure 2 : Lésions macroscopiques d'ostéoarthrose. D'après (Poole and Howell 2001).

1.2.3.1. Modification de l'os sous-chondral

Un remodelage important de l'os sous-chondral, détectable par scintigraphie (Poole and Howell 2001), a lieu dès les premiers stades d'ostéoarthrose (Pritzker 2003). Des analyses biochimiques confirment ces modifications scintigraphiques : une

augmentation de synthèse de collagène de type I, de phosphatase alcaline et de MMP-2 a été rapportée (Bailey and Mansell 1997). Une néovascularisation se développe avec la résorption osseuse, conduisant à la pénétration de capillaires sanguins à travers l'os sous-chondral jusqu'au cartilage calcifié (Hough 2001; Pritzker 2003). L'augmentation de la résorption osseuse induit dans un premier temps une diminution du volume de l'os sous-chondral (Hayami et al. 2004). Par la suite, une formation osseuse accrue produit l'augmentation du volume osseux (sclérose) (Hayami et al. 2004). Le tissu osseux nouvellement formé présente un moindre degré de minéralisation, mais du fait du volume augmenté, la densité apparente de la plaque sous-chondrale est augmentée (Burr 2004).

Une diminution de la vascularisation de l'os sous-chondral, secondairement à la sclérose, a été rapportée (Imhof et al. 2000). Cette diminution de la perfusion pourrait avoir des répercussions sur le métabolisme du cartilage (Imhof et al. 2000).

Le remodelage osseux conduit à la modification de la forme de l'articulation, ce qui peut entraîner instabilité articulaire et déformation du membre (Buckwalter et al. 2000).

Le développement d'ostéophytes accompagne fréquemment le remodelage osseux (Buckwalter et al. 2000). Les ostéophytes sont constitués de tissu fibrocartilagineux recouvrant une base osseuse en remaniement actif. Ils se forment par ossification endochondrale (Poole 1999). Ils pourraient avoir pour rôle de stabiliser une articulation devenue instable et de tenter de préserver ainsi le cartilage articulaire (Poole 1999). Ils se retrouvent principalement à la périphérie des surfaces articulaires, chaque articulation présentant des sites préférentiels pour le développement d'ostéophytes (Buckwalter et al. 2000). Leur croissance serait liée à la présence de cytokines anaboliques, notamment le TGF-beta₁ (Poole 1999).

1.2.3.2. Modification du cartilage articulaire

Les modifications du cartilage articulaire se produisent en trois phases qui se chevauchent : d'abord une altération de la matrice extracellulaire, ensuite la réponse des chondrocytes à ces lésions tissulaires puis le déclin de la réponse chondrocytaire (Buckwalter et al. 2000).

Le premier signe visible d'ostéoarthrose à la surface du cartilage est l'apparition de fibrillation (Buckwalter and Mankin 1998a). Ceci se présente sous la forme de fissures, initialement plus ou moins parallèles à la surface articulaire, puis pénétrant le cartilage plus en profondeur (Poole 1999).

Accompagnant ou même précédant la fibrillation, des modifications de structure et du contenu de la matrice extracellulaire apparaissent (Buckwalter et al. 2000). Une diminution de concentration et de taille des protéoglycanes, s'accompagnant d'une augmentation de la teneur en eau du cartilage, se produit suite à l'action d'enzymes produites par les chondrocytes (Buckwalter et al. 2000). Ceci est à l'origine de l'œdème dans les couches les plus superficielles du cartilage (Pritzker 2003). En conséquence, la perméabilité de la matrice extracellulaire augmente, ce qui entraîne une diminution de la résistance du cartilage à la compression (Mow and Hung 2003) et une augmentation du risque de dommages mécaniques (Pritzker 2003).

Les chondrocytes sont capables de répondre à cette hyperhydratation de la matrice extracellulaire en augmentant leur activité anabolique et catabolique, et en se divisant (Buckwalter et al. 2000). L'augmentation de la synthèse de protéoglycanes entraîne une hypertrophie du cartilage à ce stade (Pritzker 2003). La formation de chondrones, groupes de chondrocytes issus de la division d'une même cellule, est une autre caractéristique de cette phase de réponse chondrocytaire (Buckwalter et al. 2000).

La présence de fragment de fibronectine et d'autres molécules due aux lésions tissulaires stimule la production d'interleukine-1 (IL-1) par les chondrocytes (Buckwalter et al. 2000). Il y a également augmentation de la production du facteur onconécrosant- α (TNF- α) (Poole and Howell 2001). IL-1 et TNF- α augmentent la production d'oxyde nitrique (NO) (Poole and Howell 2001), qui stimule l'activité des métalloprotéinases (MMPs) de la matrice (Buckwalter et al. 2000). Les MMPs sont des protéines présentes dans la matrice sous forme de proenzymes latentes et qui, lorsqu'activées, sont responsables de la dégradation du collagène et des protéoglycanes. Ces MMPs incluent notamment la collagénase-1 (MMP-1), la collagénase-2 (MMP-8), la collagénase-3 (MMP-13), la stromelysin-1 (MMP-3) et les gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) (Poole 1999). Il existe également des cytokines anti-inflammatoires,

qualifiées d'inhibitrices, telles IL-4, IL-10, IL-11 et l'interféron- γ , qui s'opposent à l'action des cytokines cataboliques (Goldring 2000). D'autres molécules sont considérées comme des facteurs anaboliques majeurs du cartilage, il s'agit du facteur de croissance transformant- β (TGF- β), du facteur de croissance insulino-mimétique de type-I et des facteurs de croissance fibroblastiques (Goldring 2000). Ainsi l'évolution des lésions dépend de l'équilibre entre les facteurs activateurs et inhibiteurs de la dégradation du cartilage (Buckwalter et al. 2000).

La dégradation des collagènes de type IX et XI ainsi que des autres molécules qui stabilisent le réseau de fibres de collagène de type II, va désorganiser ce réseau et permettre l'expansion des aggrégates et l'augmentation de la teneur en eau du cartilage, diminuant encore sa résistance (Buckwalter and Mankin 1998a). Le collagène de type II peut lui même être dégradé par la collagénase-3 (Poole and Howell 2001), conduisant à une désorganisation totale de la matrice.

Cette phase de réponse cellulaire est donc une phase d'activité intense pour les chondrocytes avec la mise en place de cercles vicieux, notamment avec la stimulation autocrine et paracrine de l'IL-1 et du TNF- α pour leur propre expression ainsi que pour l'expression d'autres cytokines (Poole and Howell 2001). Cette phase peut durer des années si un équilibre entre anabolisme et catabolisme est atteint. En revanche, si l'aspect catabolique l'emporte, ceci conduit à la destruction progressive du cartilage et à l'apoptose des chondrocytes, phase finale de l'ostéoarthrose (Buckwalter et al. 2000).

1.2.3.3. Modification des tissus périarticulaires

La perte du cartilage articulaire induit des modifications de la membrane synoviale, des ligaments et des muscles (Buckwalter et al. 2000).

Un certain degré d'inflammation est visible dans la membrane synoviale. Cette inflammation diffère, par la nature de l'infiltrat et par sa sévérité, de l'inflammation rencontrée lors d'arthrite rhumatoïde chez l'homme, mais son existence demeure indéniable (Hough 2001). Des fragments libres de cartilage articulaire peuvent se fixer et se développer dans les villosités synoviales (Buckwalter et al. 2000).

Les ligaments, la capsule et les muscles finissent par présenter une contracture du fait de la diminution de l'utilisation de l'articulation. Une atrophie musculaire est également fréquemment visible (Buckwalter et al. 2000).

1.2.4. Pathologie

1.2.4.1. Examen macroscopique

Les premières modifications du cartilage visibles macroscopiquement consistent en l'apparition d'une surface irrégulière et d'un ramollissement (Palmer 1993). Lorsque la surface devient encore plus irrégulière en raison de l'apparition de fissures, on parle de fibrillation. Des fragments de cartilage peuvent être amenés à se détacher. L'érosion désigne une perte partielle d'épaisseur du cartilage, l'ulcération consiste en une perte pleine épaisseur du cartilage non calcifié et on évoque l'éburnation lorsque l'os sous-chondral est mis à nu et remodelé (Rosenberg 1999).

L'utilisation d'encre de Chine, afin de faciliter le diagnostic macroscopique de fibrillation, a été rapportée (Meachim 1972).

1.2.4.2. Examen histologique

- ***Colorations***

Différentes colorations sont utilisées pour l'examen histologique du cartilage et de l'os sous-chondral. La coloration hématoxyline et éosine est couramment utilisée comme coloration standard mais il est conseillé de compléter l'examen en utilisant des colorations spécifiques des protéoglycanes et du collagène. La Safranine O est le colorant le plus souvent utilisé pour l'évaluation des protéoglycanes de la matrice. Des systèmes d'évaluation semi-quantitative du contenu en protéoglycanes ont été développés par mesure spectrométrique sur des lames colorées avec la Safranine O (Mainil-Varlet et al. 2003). Le Bleu de Toluidine et le Bleu d'Alcian peuvent également être utilisés comme colorant spécifique des protéoglycanes. La coloration spécifique du collagène fait appel au Trichrome de Masson, au Trichrome de Mallory ou au Rouge Sirius. L'observation de ces colorations en lumière polarisée permet de visualiser l'orientation des fibres de collagène (Mainil-Varlet et al. 2003).

- ***Systèmes d'évaluation***

Plusieurs systèmes de gradation du cartilage ostéoarthritique ont été proposés. Le plus couramment utilisé est le score de Mankin (Mankin et al. 1971). Ce système offre un score évoluant de 0 (cartilage sain) à 14 (lésions les plus sévères) résultant de la somme des scores de l'évaluation de quatre paramètres : la structure du cartilage, les anomalies cellulaires, la coloration par la Safranine O et l'intégrité de la tidemark (Mankin et al. 1971). Ce système a été critiqué pour son manque de reproductibilité (Ostergaard et al. 1999) et pour ses difficultés à distinguer les lésions intermédiaires (van der Sluijs et al. 1992) mais aucun autre système ne fait l'unanimité à l'heure actuelle. En 2002, l'International Cartilage Repair Society a tenté de parvenir à un consensus sur un système applicable à des biopsies afin d'évaluer la réparation du cartilage. Six critères ont été retenus : l'évaluation de la surface, de la matrice, de la répartition et de la viabilité des cellules, les modifications de l'os sous chondral et du cartilage calcifié (Mainil-Varlet et al. 2003).

1.2.5. Modèles expérimentaux

Au vu de la complexité des changements pathologiques, de la longue durée du développement et de la multiplicité des facteurs intervenants, il semble impossible qu'un modèle expérimental d'ostéoarthrose puisse refléter exactement l'évolution naturelle de l'ostéoarthrose chez l'homme (Smith and Ghosh 2001). Néanmoins, afin de clarifier le processus pathologique depuis ses modifications les plus précoces et surtout afin de valider le développement de nouvelles thérapies, les modèles expérimentaux sont essentiels (Oegema and Visco 1999; Smith and Ghosh 2001; Griffiths and Schrier 2003). Différents modèles ont donc été développés.

1.2.5.1. Les modèles spontanés d'ostéoarthrose

Certaines lignées de cochons d'Inde, de souris, de rats, de chiens et de primates développent spontanément des lésions d'OA. Ces modèles présentent l'avantage d'avoir de nombreuses similitudes dans leur pathogénie avec l'OA humaine. Leur inconvénient est leur expression variable et la lenteur de leur évolution (Oegema and Visco 1999). Le modèle cochon d'Inde est l'un des plus utilisés, il est notamment très intéressant pour

étudier les modifications osseuses intervenant dans la pathogénie de l'ostéoarthrose, assez évidentes dans ce modèle (Griffiths and Schrier 2003).

1.2.5.2. Les modèles d'ostéoarthrose induits chimiquement

Plusieurs molécules peuvent être utilisées en injection intra-articulaire afin d'induire des lésions semblables aux lésions d'ostéoarthrose. Des injections répétées de saline physiologique, de fortes doses de corticoïdes ou d'iodoacétate monosodique ont été utilisées. Des enzymes protéolytiques sélectives telles que la papaïne, la trypsine, les hyaluronidases ou collagénases ont été administrées à souris, rats et lapins. L'utilisation de cytokines spécifiques, telle l'interleukine 1 est également rapportée (Smith and Ghosh 2001).

1.2.5.3. Les modèles chirurgicaux d'ostéoarthrose

La section du ligament croisé cranial chez le chien est considérée comme la technique de référence (Oegema and Visco 1999). L'utilisation de lapins offre l'avantage d'une apparition plus rapide des lésions et d'un coût réduit. La ménisectomie partielle ou totale a été décrite dans différentes espèces (cochon d'Inde, lapin, chien, mouton). Ce modèle est considéré comme moins sévère que la section du ligament croisé cranial (Smith and Ghosh 2001). Les quatre principaux avantages de ces modèles sont une incidence lésionnelle de 100%, un délai d'apparition connu, des sites lésionnels définis et une évolution rapide (Oegema and Visco 1999).

1.2.5.4. Les modèles d'ostéoarthrose induits par manipulation génétique

Deux modèles ont été récemment développés par transfert de gène de MMP-13 et TGF- β . Ces modèles offrent l'avantage de pouvoir cibler les effets d'un mécanisme spécifique lors du développement de l'OA (Griffiths and Schrier 2003).

1.2.6. Thérapies actuelles et perspectives

A l'heure actuelle, il n'existe pas de thérapie capable de stopper l'évolution de l'OA. Les objectifs principaux de la gestion du patient souffrant d'ostéoarthrose sont donc un contrôle adéquat de la douleur, une optimisation de la fonction et une réduction

du handicap (Manek and Lane 2001). Des mesures préventives, notamment le contrôle de l'obésité et le maintien d'une activité physique raisonnable, sont recommandables (Manek and Lane 2001). La recherche est actuellement particulièrement active dans le but de développer des traitements capables de ralentir voir d'arrêter la progression de l'OA. Ces traitements sont couramment évoqués dans la littérature anglophone sous le terme de « DMOADs » pour « disease modifying osteoarthritis drugs », par opposition aux « SMOADs », « symptoms modifying osteoarthritis drugs ».

1.2.6.1. Traitement médical

- ***Traitements modifiant les symptômes (« SMOADs »)***

Les analgésiques systémiques représentent la principale classe pharmacologique utilisée pour le traitement de l'ostéoarthrose (Simon and Strand 2001).

Médecine humaine

Le Paracétamol (Acétaminophen) est couramment utilisé en première ligne du fait de sa large disponibilité, son faible coût, sa bonne tolérance et son efficacité (Bradley 2003; Altman 2004b). Bien que son mécanisme d'action reste hypothétique, le Paracétamol est un excellent analgésique et antipyrétique mais ne possède pas d'activité anti-inflammatoire (Gramas and Lane 1995; Simon and Strand 2001).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont largement utilisés chez les patients souffrant d'ostéoarthrose (Lozada and Altman 2001b; Simon and Strand 2001; Bradley 2003; Altman 2004b). Ils ont des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques (Simon and Strand 2001). L'acide salicylique a été découvert en 1763. Aujourd'hui une vingtaine de molécules différentes sont disponibles sur le marché, réparties en sept classes dont les principales sont les acides carboxyliques (aspirine et dérivés), les acides propioniques (Ibuprofène, Kétoprofène...), les dérivés de l'acide acétique (Indométhacine, Diclofénac...) et les fénamates (Méclofénamate...). Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la cyclooxygénase (COX), réduisant ainsi la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines. Ils possèdent des effets secondaires non négligeables, représentés principalement par une toxicité gastrointestinale (irritations, ulcères, hémorragies...) et hématologique (diminution de l'agrégation plaquettaire) (Gramas and Lane 1995; Simon and Strand 2001). Cette

toxicité est principalement due à l'inhibition de la COX 1. L'utilisation d'une nouvelle classe COX 2 spécifique permettrait de diminuer ces effets secondaires (Lozada and Altman 2001b; Bradley 2003).

Le Tramadol est un analgésique non AINS et non opioïde, bien qu'il se lie au récepteur opioïde μ . Il peut être utilisé lors de douleur récalcitrante aux AINS (Lozada and Altman 2001b; Simon and Strand 2001; Altman 2004b).

Dans certains cas où la douleur ne peut être contrôlée par les traitements précédemment cités et où l'option chirurgicale n'est pas envisageable, le recours aux analgésiques opioïdes peut être envisagé (Simon and Strand 2001).

Les traitements intra-articulaires par injection de corticostéroïdes ou d'acide hyaluronique représentent une option intéressante, réalisée conjointement aux thérapeutiques systémiques (Gramas and Lane 1995; Simon and Strand 2001).

Médecine vétérinaire

Chez le cheval, l'AINS le plus utilisé est la phénylbutazone. Les autres molécules disponibles sont la flunixin méglumine, l'acide méclofénamique, le naproxène, le kétoprofène et le carprofène. Le recours aux injections intra-articulaires de corticostéroïdes est fréquent dans l'espèce équine. Des effets délétères de l'acétate de méthylprednisolone dose dépendants ont été démontrés (Frisbie et al. 1998). En revanche la bétaméthasone et l'acétate de triamcinolone auraient un effet chondroprotecteur (Foland et al. 1994; Kawcak et al. 1998). L'acide hyaluronique intra-articulaire est également couramment employé. Malgré un mécanisme d'action spécifique indéterminé, l'acide hyaluronique permettrait une amélioration nette des symptômes (Howard and McIlwraith 1996). Les glycosaminoglycanes polysulfatés, la glucosamine et le sulfate de chondroïtine sont utilisés. Il existe une controverse quant à un éventuel effet anabolique pour le cartilage mais une inhibition de la dégradation enzymatique de la matrice cartilagineuse semble confirmée (Caron and Genovese 2003).

- ***Traitements modifiant la maladie (« DMOADs »)***

Les traitements modifiant la maladie lors d'ostéoarthrose sont définis comme des agents capables de prévenir, ralentir, arrêter ou faire régresser les modifications structurelles des tissus de l'articulation (Lozada and Altman 2001a; Ghosh 2003). Les

conditions nécessaires à la découverte de telles thérapies consistent en une meilleure compréhension des modifications les plus précoces du cartilage et de l'os sous-chondral lors d'ostéoarthrose et en l'existence d'outils diagnostiques permettant le suivi de l'évolution de la maladie (Brandt et al. 2003b).

Seulement quelques études cliniques chez l'homme ont cherché à démontrer le potentiel de certaines molécules pour modifier l'évolution de l'ostéoarthrose. Ces études concernaient les glycosaminoglycanes polysulfatés, la diacerein (un inhibiteur potentiel de l'interleukine-1 β) et le sulfate de glucosamine (Altman 2004a). La recherche s'oriente à l'heure actuelle vers l'inhibition spécifique de cytokines, notamment IL-1 β et TNF- α , ou d'enzymes dégradant la matrice, comme les métalloprotéinases (Brandt 2003). La possibilité d'intervenir sur le métabolisme osseux pour modifier l'évolution de l'ostéoarthrose a été évoquée. Ainsi plusieurs bisphosphonates sont actuellement à l'étude pour une éventuelle utilisation en tant que DMOADs (Brandt 2003; Hayami et al. 2004).

1.2.6.2. Traitement chirurgical

Médecine humaine

Quatre options chirurgicales relatives au traitement de l'ostéoarthrose existent : l'ostéotomie, le débridement, l'arthrodèse et l'arthroplastie (Goldberg 2001).

L'ostéotomie est un réalignement des surfaces articulaires afin de redistribuer les charges. Elle s'applique principalement à des patients jeunes et actifs, présentant un cartilage articulaire peu altéré (Goldberg 2001).

Le débridement consiste à lisser les surfaces articulaires, retirer des fragments libres et réaliser l'exérèse de membrane synoviale inflammée. Les résultats sont variables et très dépendants de la sélection des cas (Goldberg 2001).

L'arthrodèse est une fusion des surfaces articulaires. Elle est très intéressante pour les vertèbres cervicales ou lombaires en cas de non réponse à la gestion médicale. C'est également le dernier recours lors de l'échec d'une arthroplastie (Goldberg 2001).

L'arthroplastie consiste au remplacement de l'articulation atteinte par une prothèse articulaire (Goldberg 2001). Elle est « l'option finale » réservée aux patients

présentant une douleur persistante et un handicap important pour l'individu ne répondant pas aux thérapies conservatrices (Brandt et al. 2003a).

Médecine vétérinaire

Le traitement chirurgical en médecine vétérinaire est assez limité. Chez le cheval, un débridement peut être réalisé par arthroscopie mais présente peu d'intérêt outre d'interrompre transitoirement l'inflammation locale. Dans les cas sévères, une arthrodèse chirurgicale peut être envisagée (Caron and Genovese 2003). L'arthroplastie de la hanche est utilisée chez le chien (Olmstead 1987).

1.3. Diagnostic par l'imagerie des lésions d'ostéoarthrose

Au vu des limites actuelles concernant le traitement de l'ostéoarthrose (voir 1.2.6), il apparaît nécessaire d'avoir des outils diagnostiques capables d'identifier le plus précocément possible les lésions d'ostéoarthrose et de suivre leur évolution, à la fois pour permettre la mise en place d'un traitement précoce et pour contrôler son efficacité. A l'heure actuelle, la recherche s'intéresse au développement de nouveaux traitements capables de modifier l'évolution de l'ostéoarthrose (Brandt 2003; Ghosh 2003), la validation de ces traitements nécessite un suivi précis de l'évolution (Abadie et al. 2004; Altman 2004a). La radiographie demeure l'examen le plus utilisé pour évaluer les lésions articulaires (Rovati 1999; Watt and Doherty 2003; Gupta et al. 2004). Toutefois elle présente un manque de sensibilité concernant le diagnostic précoce et le suivi de l'évolution qui incite à s'intéresser à d'autres modalités d'imagerie des articulations (Martel et al. 1991; Peterfy 2002; Tan et al. 2003).

1.3.1. Radiographie

Les critères radiographiques de diagnostic d'ostéoarthrose ont été décrits chez l'homme par Kellgren et Lawrence en 1957. Ces critères sont les suivants : la formation d'ostéophytes sur le bord des surfaces articulaires, la diminution de l'espace articulaire, la sclérose de l'os sous-chondral, la présence de kystes dans l'os sous-chondral et la modification du contour osseux des épiphyses (Kellgren and Lawrence 1957). Ces

paramètres ont été repris dans de nombreuses études (Altman et al. 1986; Cooper et al. 1992; Dieppe et al. 1995; Dieppe et al. 1997).

Un score basé sur leur reconnaissance a été proposé :

Score 0	Normal
Score 1	Diminution de l'espace articulaire douteux et suspicion de soulignement ostéophytique
Score 2	Présence d'ostéophytes et suspicion de diminution de l'espace articulaire
Score 3	Multiplés ostéophytes de taille moyenne, diminution évidente de l'espace articulaire, sclérose, déformation possible du contour osseux
Score 4	Grands ostéophytes, diminution sévère de l'espace articulaire, sclérose importante et déformation du contour osseux

Tableau I: Score radiographique d'ostéoarthrose (Kellgren and Lawrence 1957).

Ce score a été critiqué pour accorder trop d'importance aux ostéophytes (Brandt et al. 1991), certains considérant que la présence d'ostéophytes, en l'absence d'autres lésions, peut être due à un processus de vieillissement indépendamment de l'ostéoarthrose (Danielsson and Hernborg 1970; Hernborg and Nilsson 1973). Un autre score basé sur la diminution de l'espace articulaire a été proposé (Brandt et al. 1991). La mesure de l'espace articulaire nécessite la prise de radiographies lorsque le membre est à l'appui (Leach et al. 1970). Une bonne corrélation a été identifiée entre la mesure de l'espace articulaire et la mesure de l'épaisseur du cartilage par arthrographie double contraste pour le compartiment fémoro-tibial médial sur des patients atteints d'ostéoarthrose (Buckland-Wright et al. 1994). Cependant malgré des efforts de standardisation de la technique, une grande variabilité existe dans la mesure de l'espace articulaire fémoro-tibial (Mazzuca et al. 1997; Peterfy 2002). De plus, une mauvaise corrélation entre la diminution de l'espace articulaire fémoro-tibial et les lésions du cartilage visualisées à l'échographie a été constatée (Fife et al. 1991). La mesure de l'espace articulaire coxo-fémoral semble en revanche bien reproductible et serait le meilleur paramètre pour prédire la nécessité d'une arthroplastie totale de la hanche (Block 2002).

La radiographie est donc considérée comme peu efficace pour le diagnostic précoce et le suivi de l'évolution des lésions d'ostéoarthrose (Mazzuca et al. 1997). La mauvaise corrélation entre l'évolution des lésions radiographiques et les symptômes cliniques (Dieppe et al. 1997) est un autre facteur limitant de son utilisation.

La mesure de variation d'épaisseur de l'espace articulaire reste toutefois l'outil de référence pour les études cliniques des nouveaux traitements susceptibles de modifier l'évolution de l'ostéoarthrose (Abadie et al. 2004; Altman 2004a).

L'amélioration de la technique radiographique par l'utilisation de la diffraction permet d'obtenir un meilleur contraste autorisant la visualisation du cartilage (Muehleman et al. 2002; Li et al. 2003). Cet outil encore en développement pourrait s'avérer très intéressant.

1.3.2. Tomodensitométrie

La tomodensitométrie, comme la radiographie, fait appel aux rayons X comme source d'énergie mais se distingue par sa nature tomographique, c'est à dire l'obtention d'image en coupe, évitant ainsi les problèmes de distorsion, magnification et superposition liés aux techniques d'imagerie de projection comme la radiographie (Peterfy 1998). La tomodensitométrie est très intéressante pour déterminer les anomalies du contour osseux, la sclérose de l'os sous-chondral, les modifications de l'os trabéculaire et la localisation des ostéophytes (Martel et al. 1991). Cette technique permet également la réalisation de mesures quantitatives de densité osseuse (Martel et al. 1991; Patel et al. 2003). Ses applications à l'imagerie des articulations restent limitées par le contraste insuffisant obtenu au sein des tissus mous. L'exposition importante à des radiations ionisantes est un autre inconvénient de cette technique (Peterfy 1998; Tan et al. 2003).

1.3.3. Imagerie par résonance magnétique

Le développement de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) depuis une vingtaine d'année représente un réel progrès de l'imagerie médicale. Cette technique tomographique permet l'acquisition d'images en section dans tous les plans de l'espace.

De plus l'IRM permet la visualisation des tissus mous et n'a pas recours à des radiations ionisantes (Martel et al. 1991; Peterfy 1998).

L'IRM est particulièrement bien adaptée à l'imagerie des articulations ostéoarthritiques car en plus d'offrir une très bonne visualisation des différentes structures anatomiques, elle renseigne sur la composition biochimique et sur certains paramètres mécaniques des structures imagées (Martel et al. 1991; Loeuille et al. 1998; Peterfy 2003; Tan et al. 2003; Wayne et al. 2003). L'IRM est capable de mettre en évidence l'existence d'oedème dans la moelle osseuse qui est associé à la présence de douleur lors d'ostéoarthrose du genou chez l'homme (Felson et al. 2001).

L'IRM est basée sur le comportement magnétique naturel des noyaux d'hydrogène (protons) particulièrement abondants dans l'eau et le tissu adipeux. Le principe général consiste à aligner les moments magnétiques de chaque proton en les soumettant à un champ magnétique de haute intensité puis à mesurer leur réponse sous forme de courant électrique suite à l'exposition à des ondes électromagnétiques, dites de radiofréquence (rf), perpendiculaires au champ magnétique principal. Les signaux renvoyés par les tissus dépendront de la densité de protons ainsi que de leur environnement. L'analyse de ces signaux par un système informatique faisant appel aux transformées de Fourier permet la production d'une image en deux dimensions dont le contraste entre les différents tissus peut être modifié en faisant varier les paramètres des ondes de radiofréquences (Peterfy and Genant 2001). La suppression sélective de certains signaux, notamment des hypersignaux provenant du tissu adipeux permet d'améliorer la visualisation des structures d'intérêt (Peterfy 2003). L'utilisation de produit de contraste, tel le gadolinium, permet de détecter les zones présentant une déplétion de protéoglycanes (Trattinig et al. 1999; Wayne et al. 2003).

Les limites actuelles de l'IRM du cartilage sont liées principalement à un défaut de résolution. L'utilisation d'un champ magnétique principal de plus haute fréquence permet d'améliorer la résolution spatiale tout en conservant des temps d'acquisition raisonnables (Peterfy and Genant 2001; Wachsmuth et al. 2003). Des systèmes utilisant des champs magnétiques allant jusqu'à 7 Tesla sont actuellement utilisés en recherche (Faure et al. 2003; Wachsmuth et al. 2003).

L'IRM présente donc un potentiel très intéressant pour l'évaluation des lésions d'ostéoarthrose et devrait supplanter la radiographie dans ce domaine (Loeuille et al. 1998). Toutefois une validation est encore nécessaire afin que l'IRM puisse être utilisée de manière standardisée dans des études cliniques longitudinales afin de confirmer ou non l'intérêt de potentiels DMOADs (Abadie et al. 2004; Altman 2004a).

1.3.4. Echographie

L'échographie est une technique d'imagerie ayant recours à l'utilisation d'ultrasons. Elle permet l'acquisition d'images tomographiques en temps réel.

1.3.4.1. *L'image échographique* (Bushberg et al. 2002)

- *Physique des ultrasons*

L'onde ultrasonore

L'onde ultrasonore est une onde mécanique. Elle nécessite donc un milieu pour se propager. Elle se caractérise par une fréquence (f). Les ondes ultrasonores ont une fréquence de l'ordre du méga Hertz (MHz), ce qui les différencie des ondes sonores de plus basse fréquence. L'onde se propage dans un milieu matériel à une certaine vitesse, également appelée vitesse (c), dépendant de ce milieu. La longueur d'onde (λ) est le ratio de la vitesse par la fréquence. ($\lambda = c / f$). De nombreuses propriétés de l'onde ultrasonore dépendent de λ .

Les interactions avec le milieu

L'onde ultrasonore interagit avec les particules du milieu dans lequel elle se propage. Ces particules sont capables de capter une partie de l'énergie mécanique pour la transformer en chaleur, c'est l'absorption. Les particules de dimension inférieure à la longueur d'onde peuvent capter l'énergie mécanique pour ensuite la redistribuer dans toutes les directions de l'espace. Ce phénomène s'appelle la diffusion. Absorption et diffusion sont les deux constituants de l'atténuation qui correspond à la perte d'énergie mécanique lors de la propagation. L'atténuation augmente lorsque la longueur d'onde diminue, limitant ainsi la pénétration dans les tissus.

Lorsque l'onde ultrasonore change de milieu, elle peut subir le phénomène de réflexion, c'est à dire la modification de la direction de propagation du faisceau d'ultrasons. La réflexion dépend de la différence d'impédance entre deux milieux, l'impédance étant la facilité que possède un milieu à former des ondes mécaniques. L'impédance est le produit de la vitesse et de la densité locale. Lorsque la taille de l'interface est supérieure à la longueur d'onde, la réflexion est dite spéculaire, le faisceau réfléchi formant alors avec le faisceau incident un angle dont la bissectrice est perpendiculaire à l'interface au site de réflexion. Lorsque la taille de l'interface est inférieure à la longueur d'onde, la réflexion est diffuse, les ondes ultrasonores réfléchies se répartissant dans toutes les directions de l'espace.

- *Construction de l'image (Mode B)*

Le principe de l'échographie en mode B est d'envoyer des ultrasons dans un tissu et de construire une image en fonction des ultrasons réfléchis par ce tissu. Le transducteur est un objet capable de transformer l'énergie électrique en énergie mécanique, et vice versa. Il est donc à la fois responsable de l'émission et de la réception des ultrasons. Les ultrasons réfléchis sont analysés en fonction de leur amplitude et de la durée entre leur émission et leur réception, appelée « temps de vol ». A l'aide de la vitesse, il est alors possible de déterminer la distance séparant le transducteur de l'interface ayant réfléchi les ultrasons. En fonction de l'amplitude des ultrasons reçus, une brillance est accordée au point situé à la distance de l'interface. Grâce à un système de balayage, une image en deux dimensions peut ainsi être construite, ceci correspond à l'échographie en mode B.

- *Caractéristiques de l'image*

L'image est caractérisée par sa profondeur qui correspond à la distance maximale de pénétration des ultrasons dans le milieu. La profondeur est donc limitée par l'atténuation, la profondeur diminue donc avec la longueur d'onde. La résolution est la plus petite distance séparant deux points discernables sur l'image. On distingue la résolution axiale et la résolution latérale. Toutes deux dépendent également de la longueur d'onde, la résolution étant meilleure lorsque la longueur d'onde diminue.

Il est donc nécessaire de choisir la longueur d'onde offrant le meilleur compromis entre profondeur et résolution pour l'application voulue.

1.3.4.2. L'échographie « standard »

L'échographie du système musculosquelettique utilise généralement des transducteurs ayant une fréquence de 3 à 10 MHz (Benson 1991; Myers 2003). Les applications les plus fréquentes sont la recherche de lésions tendineuses ou musculaires et la localisation de collection de liquide ou de corps étrangers (Benson 1991; Hashimoto et al. 1999). Cartilage et contour osseux peuvent également être examinés (Adler 1999; Grassi et al. 1999). Le cartilage est représenté sur l'image échographique par une bande hypoéchogène, lisse et régulière recouvrant l'os sous chondral (Grassi et al. 1999; Disler et al. 2000; Myers 2003). La principale limite à l'exploration par échographie du cartilage articulaire est le manque d'accessibilité (Benson 1991; Adler 1999). Le cartilage articulaire des condyles fémoraux est accessible chez l'homme lorsque le genou est en flexion (Aisen et al. 1984). L'irrégularité de l'interface superficiel, la diminution d'épaisseur voire l'absence de cartilage sont les signes détectés à l'échographie en présence de lésions d'ostéoarthrose (Aisen et al. 1984; Grassi et al. 1999).

L'échographie standard reste néanmoins peu sensible pour la détection des lésions précoces d'ostéoarthrose en raison d'un manque de résolution (Disler et al. 2000). L'utilisation de transducteurs de haute fréquence permet d'améliorer la résolution (Harris et al. 1991). De tels systèmes ont été récemment développés.

1.3.4.3. L'échographie haute fréquence

- ***Matériel***

L'échographie haute fréquence est basée sur l'utilisation de transducteurs capables d'émettre des ondes de fréquence de 20 à 100 MHz. Ces fréquences permettent d'atteindre des résolutions axiales et latérales inférieures à 100 μm (Sherar et al. 1987; Sherar et al. 1989). En revanche, l'atténuation est très importante et la profondeur d'image est limitée à quelques millimètres (Sherar et al. 1989; Foster et al. 2000). Les principales applications de cette technique sont la dermatologie, l'ophtalmologie et

l'utilisation intravasculaire (Foster et al. 2000). L'utilisation de cette technique pour le cartilage articulaire nécessite une approche invasive, contrairement à l'échographie standard. En raison de la faible profondeur d'image et de la forte atténuation, l'examen ne peut se réaliser à travers la peau et la capsule articulaire. Un système conçu pour l'échographie intravasculaire a été utilisé pour identifier par échographie intra-articulaire des déchirures de ménisques sur un cadavre humain (McDonnell et al. 1992).

L'évaluation du cartilage articulaire par échographie haute fréquence reste à l'heure actuelle du domaine expérimental. Plusieurs études ont été menées *in vitro*, utilisant soit l'interprétation d'une image échographique (Mode B), soit uniquement des paramètres quantitatifs.

- ***Echographie en Mode B***

L'utilisation d'un transducteur de 50 MHz, pour évaluer le cartilage immature de grassets de porcs, a permis de mettre en évidence une organisation de la structure interne du cartilage en trois couches d'échogénicité différente, en zone de surface articulaire non portante, chez le porcelet de vingt semaines (Kim et al. 1995). Des interruptions dans l'os sous-chondral, attribuées au passage de vaisseaux sanguins, ont également été notées. Les auteurs concluent donc à la capacité de l'échographie haute fréquence à apprécier la structure profonde du cartilage articulaire.

Des échantillons de cartilage articulaire de fémurs humains sains et atteints d'ostéoarthrose ont été évalués par échographie à 25 MHz (Myers et al. 1995). Les images de cartilage normal montrent un interface lisse et échogène et une matrice hypoéchogène. Le cartilage atteint de fibrillation présente à l'échographie une irrégularité et une augmentation de l'épaisseur de l'interface de surface, proportionnelle à la profondeur de fibrillation avec une corrélation de 0,78 (Myers et al. 1995).

Une autre étude s'est intéressée au suivi des modifications du cartilage articulaire et de l'os sous chondral de patellas de rats, par échographie à 50 MHz *in vitro*, suite à l'injection intra-articulaire de monoiodoacétate, modèle chimique d'ostéoarthrose (Saied et al. 1997). Les modifications du cartilage articulaire de la rotule visibles à l'échographie consistent en une augmentation initiale de l'échogénicité de la matrice et une irrégularité de l'interface de surface. Un amincissement du cartilage dans un premier

temps ainsi qu'une discontinuité de l'interface cartilage os sous-chondral sont également rapportés (Saied et al. 1997).

Des images de rotules de bovins prélevées à l'abattoir ainsi que de grassets de porcs ayant subi une greffe autologue de chondrocytes ont été réalisées à l'aide d'un système muni d'un transducteur de 20 MHz (Laasanen et al. 2003b). Une irrégularité et une diminution de l'échogénicité de l'interface de surface ont été constatées lors de dégénérescence du cartilage des patellas bovines. La technique employée a également permis une bonne délimitation des lésions dans le cartilage et l'os sous-chondral des grassets porcins.

L'échographie en mode B permet donc d'identifier des modifications du cartilage dues à la maturation ou à la dégénérescence naturelle ou chimique.

- *Echographie quantitative*

Des évaluations quantitatives, précisant les modifications observées subjectivement en mode B, ont été développées.

Evaluation de la surface du cartilage

Une variation de l'amplitude de réflexion, attribuée à l'irrégularité de la surface, a été constatée entre différents échantillons de cartilage (Senzig et al. 1992). Ces variations ont été quantifiées en étudiant la distribution angulaire du champ réfléchi d'un faisceau d'ultrasons de 30 MHz, en faisant varier l'angle d'incidence (Adler et al. 1992), puis en observant l'amplitude du faisceau réfléchi, toujours en faisant varier l'angle d'incidence (Chiang et al. 1994; Chiang et al. 1997). Lorsque la rugosité augmente, la réflexion diffuse augmente par rapport à la réflexion spéculaire. Quand l'angle d'incidence augmente, l'amplitude du signal réfléchi vers le transducteur est donc plus importante lorsque la surface est irrégulière, grâce à la composante diffuse (Chiang et al. 1994; Chiang et al. 1997). Un coefficient de réflexion, mesuré en utilisant une incidence normale, défini comme le ratio entre l'amplitude réfléchie et l'amplitude totale atteignant la surface du cartilage (Toyras et al. 1999), a été couramment utilisé (Cherin et al. 1998; Toyras et al. 1999; Cherin et al. 2001; Nieminen et al. 2002; Pellaumail et al. 2002; Toyras et al. 2002; Jaffre et al. 2003; Laasanen et al. 2003a; Saarakkala et al. 2003). Une diminution de ce coefficient a été observée sur du cartilage de patella de rats

suite à l'injection dans le grasset de monoiodoacétate (Cherin et al. 1998) et suite à l'action de zymosan (Jaffre et al. 2003). En revanche, l'action de la hyaluronidase, provoquant une diminution de 50% du contenu en protéoglycanes, ne provoque pas de diminution du coefficient de réflexion (Pellaumail et al. 2002). Cette variation serait donc due à une dégradation du réseau de collagène (Cherin et al. 1998), qui entraîne la présence de fibrillation en surface, confirmée à l'histologie (Jaffre et al. 2003). D'autres travaux renforcent cette hypothèse en mettant en évidence une diminution du coefficient de réflexion, sur du cartilage bovin, suite à l'action de la collagénase (Toyras et al. 1999; Toyras et al. 2002) et de la trypsine (Nieminen et al. 2002), mais pas de la chondroïtinase ABC (Toyras et al. 1999; Toyras et al. 2002). Ces diminutions du coefficient de réflexion sont attribuées à des modifications du réseau de collagène induites par les enzymes (Toyras et al. 1999; Nieminen et al. 2002). Cette technique est considérée comme très sensible pour la détection des modifications d'organisation du réseau de collagène de la zone superficielle du cartilage (Nieminen et al. 2002). Des différences significatives de coefficient de réflexion ont été mesurées entre des échantillons de cartilage considérés macroscopiquement comme sains ou atteints d'ostéoartrrose (Saarakkala et al. 2003). De plus, une variation importante du coefficient de réflexion d'échantillons de cartilage considéré comme sain macroscopiquement, corrélée avec une variation des propriétés mécaniques, confirme que la sensibilité de la technique est supérieure à celle de l'examen visuel pour la détection précoce de lésions d'ostéoartrrose (Saarakkala et al. 2003).

Mesure d'échogénicité

Les variations d'échogénicité du cartilage observées subjectivement en mode B ont été explorées par des études quantitatives. Une diminution de l'échogénicité du cartilage a été observée chez le rat lors de la maturation (Cherin et al. 1998; Cherin et al. 2001). En revanche, une tendance à une augmentation transitoire de l'échogénicité a été rapportée suite à l'injection de monoiodoacétate (Cherin et al. 1998) ou de zymosan (Jaffre et al. 2003) dans des grassets de rats. L'action de la chondroïtinase sur du cartilage de bovin conduit également à une augmentation de l'échogénicité (Toyras et al. 1999). Ces augmentations sont dues à des modifications de composition du cartilage ou d'organisation de la matrice (Cherin et al. 1998). L'hypothèse que cette augmentation

soit due à une diminution des protéoglycanes a été avancée mais cependant la digestion de cartilage de rat par la hyaluronidase, conduisant à une diminution de 50% du contenu en protéoglycanes de la matrice, ne provoque pas de variation significative de l'échogénicité (Pellaumail et al. 2002).

Mesure de vitesse et d'atténuation

Des variations de vitesse et d'atténuation ont été constatées au sein du cartilage. L'atténuation augmente suite à l'action d'élastase pancréatique de porc (Agemura et al. 1990), de papaïne (Joiner et al. 2001), d'IL-1 (Joiner et al. 2001) ou de trypsine (Nieminen et al. 2002). Ces résultats suggèrent donc que l'atténuation est dépendante de l'organisation du réseau de collagène (Agemura et al. 1990; Joiner et al. 2001; Nieminen et al. 2002).

La vitesse varie en fonction de l'orientation du faisceau d'ultrasons par rapport aux fibres de collagène (Agemura et al. 1990). Une diminution de la vitesse de propagation du son a été rapportée dans le cartilage présentant des lésions d'ostéoarthrose (Myers et al. 1995), ainsi que dans le cartilage soumis à l'action de la collagénase (Toyras et al. 1999), de la papaïne (Joiner et al. 2001), de la trypsine (Nieminen et al. 2002) ou de l'IL-1 (Joiner et al. 2001). En revanche, la chondroïtinase n'entraîne pas de variation significative (Toyras et al. 1999). Ces études sont donc en faveur de l'existence d'un rôle déterminant de l'organisation du réseau de collagène sur la vitesse. Une première étude n'était pas parvenue à mettre en évidence de corrélation significative entre la vitesse et la teneur en eau ou la concentration du cartilage en acide uronique ou en hydroxyproline, marqueurs respectifs des protéoglycanes et du collagène (Myers et al. 1995). Par la suite, une corrélation de la vitesse du son a été mise en évidence avec la teneur en eau, la concentration en acide uronique et en hydroxyproline, certaines propriétés mécaniques et le score histologique (Toyras et al. 2003).

Vitesse et atténuation sont donc également des paramètres permettant d'évaluer l'état du cartilage. Il est néanmoins recommandé de comparer les valeurs mesurées à un contrôle en raison de variations significatives de l'atténuation (Senzig et al. 1992) et de la vitesse (Yao and Seedhom 1999; Toyras et al. 2003) en fonction du site anatomique.

Mesure d'épaisseur

L'échographie permet une mesure non invasive de l'épaisseur du cartilage articulaire (Rushfeldt et al. 1981; Modest et al. 1989; Jurvelin et al. 1995). La technique consiste à mesurer le « temps de vol », durée entre l'émission des ultrasons et leur retour vers le transducteur (Modest et al. 1989; Myers et al. 1995). Le produit du temps de vol par la vitesse du son dans les milieux traversés permet de connaître la distance parcourue (Modest et al. 1989). Il est donc nécessaire de connaître la vitesse du son dans le cartilage et de la considérer constante (Jurvelin et al. 1995). Une étude affirme que la vélocité varie de manière trop importante pour que la mesure d'épaisseur du cartilage par échographie puisse être fiable (Yao and Seedhom 1999). D'autres auteurs considèrent que les différences de vélocité entre différents sites anatomiques (Toyras et al. 2003) ou entre cartilage sain et dégénéré (Nieminen et al. 2002; Toyras et al. 2003), ne sont pas suffisamment importantes pour nuire à la mesure de l'épaisseur par échographie en utilisant une vitesse constante (Toyras et al. 2003). L'échographie ne peut donc pas être considérée comme une méthode de référence pour la mesure de l'épaisseur (Jurvelin et al. 1995), mais son caractère non invasif et sa bonne corrélation avec les méthodes de référence (Toyras et al. 1999) la rendent néanmoins très intéressante (Toyras et al. 2003).

Ainsi l'échographie haute fréquence est un outil capable d'identifier des modifications de la composition et/ou de la structure du cartilage. Quelques études ont démontré sa capacité à identifier des lésions de dégénérescence du cartilage mais l'échographie haute fréquence n'a jamais été utilisée sur un modèle chirurgical d'ostéoarthrose afin d'étudier les différents stades lésionnels du cartilage. Le but de notre étude a donc été de valider l'utilisation de l'échographie haute fréquence, par comparaison avec les examens macroscopique et histologique, sur un modèle de section du ligament croisé cranial chez le lapin.

2. Chapitre 2: Article

Présentation sous forme d'article.

Article soumis à Osteoarthritis and Cartilage le 5 Mai 2004.

Article révisé le 19 août 2004.

**Validation of a 40 MHz B-scan ultrasound biomicroscope for the
evaluation of osteoarthritis lesions in an animal model**

Mathieu P. Spriet, DVM ‡
Christiane A. Girard, DVM, MSc, Dipl. ACVP †
Stuart F. Foster, Ph.D. δ
Kasia Harasiewicz δ
David W. Holdsworth, Ph.D. φ
Sheila Laverty, MVB, Dipl. ACVS, ECVS ‡

‡ Département de Sciences Cliniques,
† Département de Pathologie,
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada;
δ Department of Medical Biophysics and Sunnybrook and Women's College Health
Sciences Centre, University of Toronto, Ontario, Canada;
φ Imaging Research Laboratory, Robarts Research Institute,
Department of Diagnostic Radiology & Nuclear Medicine,
Department of Medical Biophysics,
University of Western Ontario, London, Ontario, Canada

Revised manuscript (August, 19th 2004)

In preparation for submission to *Osteoarthritis and Cartilage* (Research Article)

This work was made possible with support from the Canadian Arthritis Network.

Address correspondence to:

Dr. Sheila Laverty

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 x8267

Fax: (450) 778-8102



2.1. Abstract

Objective: To evaluate high frequency (40 MHz) B-mode ultrasound for the detection of osteoarthritis lesions of varying severity in an animal model of osteoarthritis.

Design: Ultrasound biomicroscopy was performed on the femoral articular surface of adult rabbits with unilateral transection of the anterior cruciate ligament at 4, 8 and 12 weeks post surgery and on control rabbits. The articular cartilage was examined and graded macroscopically and histologically for osteoarthritis lesions. Histological examination was used as a reference to determine sensitivity and specificity of ultrasonographic and macroscopic examination regarding fibrillation and ulceration of articular cartilage.

Results: Identification of slight surface irregularities was made possible with ultrasound biomicroscopy. The sensitivity and specificity of ultrasound biomicroscopy were 92.3% and 96.4% respectively to detect histological fibrillation and 90.9% and 97.6% to identify histological ulceration. By comparison macroscopic examination using India Ink had a sensitivity and specificity of 80.0% and 96.4% respectively for fibrillation and 90.9% and 90.5% for ulceration when compared to histology. A high correlation ($r_{sp} = 0.90$) was found between ultrasonographic and histological scores.

Conclusions: Ultrasound biomicroscopy of articular cartilage reflects its histological structure and can accurately detect early changes such as fibrillation. Ultrasound biomicroscopy has the potential to be a valuable tool for the *in vivo* identification of early lesions of osteoarthritis and for monitoring the disease or efficacy of novel therapy if it can be packaged in a minimally invasive format suitable for intra-articular imaging.

Keywords: Ultrasound biomicroscopy, histology, osteoarthritis, cartilage.

Running Headline: Ultrasound biomicroscopy and osteoarthritis.

2.2. Introduction

Osteoarthritis (OA) is a heavy burden to society both because of the disability endured by patients and the cost of treatment and work loss. With the current ageing population, the extent of these problems will increase in the coming years (Santé Canada 2003). An improved understanding of OA pathophysiology (Buckwalter and Mankin 1998a; Hough 2001; Poole and Howell 2001; Pritzker 2003) has opened a landscape for new therapeutic targets and drug discovery (Ghosh 2003). Most current treatments for OA aim at decreasing pain but do not affect the evolution of the disease process (Simon and Strand 2001; Bradley 2003). Currently, increasing research is aimed at validating drugs which may modify disease in OA (Lozada and Altman 2001a). Consequently, there is a pressing unmet need for tools to diagnose OA early and monitor its evolution and response to therapy, in both humans and animals, in a cost effective way (Brandt et al. 2003b). Histological examination is an accurate means for assessing the severity of osteoarthritic lesions in humans and animals (Mainil-Varlet et al. 2003; Pritzker 2003). Unfortunately, its use *in vivo* requires a biopsy on patients, which is an invasive procedure. Furthermore, it provides information about a focal area of the joint alone, which might not be representative of the whole joint, as the severity of OA lesions vary throughout the joint, depending on site and stage of the disease. In experimental animal models of OA, histological examination necessitates sacrifice of the animal and destruction of the joint, which prevents further follow-up on the evolution of the disease process and adds to cost. Ideally, a method to assess the histological structure of cartilage *in vivo*, without creating damage to the joint, would enhance understanding of the disease and facilitate less costly and more rapid drug discovery for OA.

By increasing the resolution of diagnostic imaging tools, such as ultrasound, the microscopic structure of articular cartilage could be assessed. High frequency (100 MHz) ultrasound systems have been developed to obtain resolution as high as 17.5 μm (Sherar et al. 1987; Sherar et al. 1989). Initially these systems found application in imaging of internal structures of living tumour spheroids (Sherar et al. 1987; Sherar et al. 1989). Other systems with 40 to 60 MHz transducers have since been developed and

have been successfully used for medical imaging in ophthalmology, dermatology and intravascular fields (Foster et al. 2000). High frequency ultrasound systems have been used *ex vivo* to study intact and maturing cartilage (Kim et al. 1995), osteoarthritic cartilage (Myers et al. 1995; Saied et al. 1997; Cherin et al. 1998) and repair cartilage (Laasanen et al. 2003b). Ultrasound quantitative measurements have also been developed to assess cartilage properties (Agemura et al. 1990; Senzig et al. 1992; Cherin et al. 1998; Toyras et al. 1999; Cherin et al. 2001; Joiner et al. 2001; Laasanen et al. 2002; Nieminen et al. 2002; Toyras et al. 2002; Laasanen et al. 2003a; Hattori et al. 2004). These studies have shown the ability of such systems to image changes in the surface and the internal structure of articular cartilage. However the ultrasonographic assessment of the different stages of OA in a classic articular trauma induced OA model, commonly used for drug development, have never been performed.

We hypothesised that ultrasound biomicroscopy (UBM) should accurately detect histological lesions of OA. The aim of this study was to evaluate the capacity of 40 MHz UBM to detect the spectrum of histological lesions encountered in OA using a standard surgical model of osteoarthritis in rabbits with anterior cruciate ligament transection.

2.3. Materials and methods

2.3.1. Experimental animal model

Thirty five adult New Zealand White (NZW) male rabbits (approximately 2.5 years old) weighing 4.6 ± 0.4 kg were used in the study. Surgical transection of the anterior cruciate ligament (ACLT) in the left femorotibial joint (24 rabbits) was performed to induce OA. The remaining eleven rabbits were used as controls. ACLT rabbits were scheduled for euthanasia at 4 weeks (8 rabbits), 8 weeks (8 rabbits) or 12 weeks (8 rabbits) post-surgery and control animals at 4 (5 rabbits) or 12 weeks (6 rabbits). Euthanasia was performed by injection of T-61 (Bimeda-MTC Santé Animale Inc., Cambridge, Ontario) (1.5 mL IV) in the lateral auricular vein, following sedation with acepromazine (Ayerst Veterinary Laboratories, Guelph, Ontario) (0.4 mg/kg IM).

All procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal. This study was part of a larger project investigating many novel imaging modalities for detection of OA in a rabbit ACLT model (Batiste, in press for *Osteoarthritis and Cartilage*).

2.3.2. Surgical procedure

The surgery was performed under aseptic conditions. An antibiotic, Enrofloxacin (Bayer Inc., Animal Health, Toronto, Ontario), was administered (15 mg/kg, SC) pre-operatively and for 2 days post-operatively. Rabbits were pre-medicated with glycopyrrolate (Sabex Inc., Boucherville, Quebec) (0.01 mg/kg, IM) and anaesthesia was induced with ketamine (Bionicahe, Animal Health Canada inc, Belleville, Ontario) (25-35 mg/kg, IM) and xylazine (Bayer Inc., Animal Health, Toronto, Ontario) (5 mg/kg, IM) and maintained with isoflurane (Baxter Corporation, Toronto, Ontario) (1-2 %) via an oro-tracheal tube. A medial parapatellar incision was made and the patella was reflected laterally in order to expose the anterior cruciate ligament which was subsequently transected. The incision was sutured in a routine fashion. An analgesic, Buprenorphine (Schering-Plough Ltd, Welwyn Garden City, Hertfordshire, UK) (0.05 mg/kg, SC, BID), was administered for two days post operatively. Following surgery,

free movement was allowed in separate cages for the duration of the experimental period.

2.3.3. Ultrasound biomicroscopy

The basic concept and design of UBM have been previously reported (Sherar et al. 1987; Sherar et al. 1989). A VisualSonics (Toronto, Canada) VS40 UBM system was used to perform all imaging. This system was equipped with a 40 MHz transducer operating with a 93 % bandwidth, a 2.0 f-number and a 6.0 mm focal distance. The receive parameters were kept constant during the entire study with a receive gain of 22.0 dB, a RF Highpass filter of 5 MHz and a RF Lowpass filter of 70 MHz. These settings had been previously chosen to enable rapid, high quality reproducible imaging of rabbit femoral articular cartilage. This system provided axial and lateral resolutions of 40 and 70 μ m respectively. The scan rate was four frames per second and the field of view 8 x 8 mm. During the scanning procedure, the femoral condyles, following dissection of the joints, were immersed in a physiologic saline solution. The entire surface of both femoral condyles was scanned. Several transverse scans were recorded for each condyle (medial femoral condyle (MFC) and lateral femoral condyle (LFC)). A grading system was developed (Table 1) to permit semi-quantitative evaluation of the scans. The ultrasound grade for each femoral condyle was scored twice blindly and independently at a two week interval by the same author (MS). For each condyle all the available scans were reviewed, the highest grade observed (most severe lesion) was attributed to the condyle.

Sharp and bright superficial interface	1
Bright but less sharp superficial interface	2
Irregular superficial interface with loss of brightness	3
Partial cartilage thickness defect	4
Full cartilage thickness defect	5
Deep interface irregularity	6

Table I: Ultrasonographic grade

2.3.4. Macroscopic examination

The articular surfaces of the femoral condyles were then stained with India Ink, diluted in physiologic saline solution, to enhance detection of fibrillation as described previously (Meachim 1972). Medial and lateral condyles were examined independently for gross morphologic changes of the articular cartilage and graded (SL) as described previously in the rabbit ACLT model (Table II) (Yoshioka et al. 1996). The lesions were also documented using a digital D1 Nikon camera (Tokyo, Japan).

Intact surface (No ink staining)	1
Small focal areas of light ink uptake	2
Large intense black patches of ink uptake	3
Exposure of subchondral bone	4

Table II: Macroscopic grade

2.3.5. Histologic evaluation

The distal part of the femur was fixed in 10% neutral buffered formalin. The specimens were then cut with an ISOMET saw (Buehler, Illinois, USA) with a 15 HC diamond blade (10.2 mm x 0.3mm). Two transverse sections were obtained in each femoral condyle through the weight bearing regions of the femoral condyles. The tissue blocks were decalcified for 2 weeks with 14% EDTA solution (Fisher Scientific, Nepean, Ontario), dehydrated through graded alcohols and cleared with toluol prior to being embedded in paraffin. 4 μ m sections were cut and stained with Safranin O fast green.

Two histological sections from each femoral condyle were evaluated using a histological grade designed for this study (Table III). The highest grade (most severe lesion) from the two evaluated sections was attributed to the condyle. The histological grades were determined independently by two authors (MS and CG), one of the two being a specialist in veterinary pathology (CG).

Ultrasonographic, macroscopic and histological grades were determined independently from each other and blind as to the surgical intervention.

Normal	0
Slight superficial reduction of Safranin O staining	1
Slight surface irregularity	2
Severe surface irregularity and /or clefts	3
Partial hyaline cartilage thickness loss	4
Full uncalcified cartilage thickness loss	5
Calcified cartilage loss	6

Table III: Histological grade

2.3.6. Statistical analysis

Weighted kappa coefficients were calculated to assess the intra-observer agreement for ultrasonographic grades and the inter-observer agreement for histological grades. For further analyses, the ultrasonographic grades of the second reading and the histological grades of the veterinary pathologist were used. Sensitivity and specificity of high frequency ultrasonography and macroscopic evaluation for detection of fibrillation and ulceration were calculated, based on the results of the 64 examined condyles, using histological examination results as a reference. A Spearman's rank correlation was used to evaluate the association between the ultrasonographic grades and the corresponding histological section grades.

2.4. Results

Two rabbits in the 4 week ACLT group and one in the 8 week ACLT group died during the study period due to gastrointestinal illness unrelated to surgery leaving twenty-one ACLT rabbits and eleven control rabbits included in the study.

2.4.1. UBM evaluation

Six different grades could be distinguished upon UBM scan examination. Grade 1 ultrasonographic scans were characterised by two sharp parallel hyperechoic lines, delimiting a hypoechoic area (Figure 1a). The superficial sharp hyperechoic line was the interface between the saline solution and articular cartilage surface. The hypoechoic area between the two bright interfaces represented the hyaline cartilage. Two different echogenicities could however be distinguished inside this area: a superficial more echogenic layer and a deep less echogenic layer. The deep interface appearance was similar to the superficial one. Maximal brightness and sharpness of both interfaces were obtained in the central area where the ultrasound beam was perpendicular to the interfaces due to the curvature of the condyle.

With grade 2, the superficial interface remained bright but lost its sharp delimiting appearance. The cartilage layer in grade 2 was similar to grade 1, presenting two layers of different echogenicity (Figure 1b).

Grade 3 was attributed when the superficial interface lost its brightness and became irregular but no cartilage thickness loss was encountered (Figure 1c). Grade 4 had surface characteristics similar to grade 3 but, in addition, presented focal partial cartilage thickness loss (Figure 1d, 4a). Grade 5 described a complete loss of the cartilage layer, but the deep interface remained regular and bright (Figure 1e, 5a). When the deep interface lost its sharpness or expected shape (flattening occurred), this was considered as a grade 6 (Figure 1f).

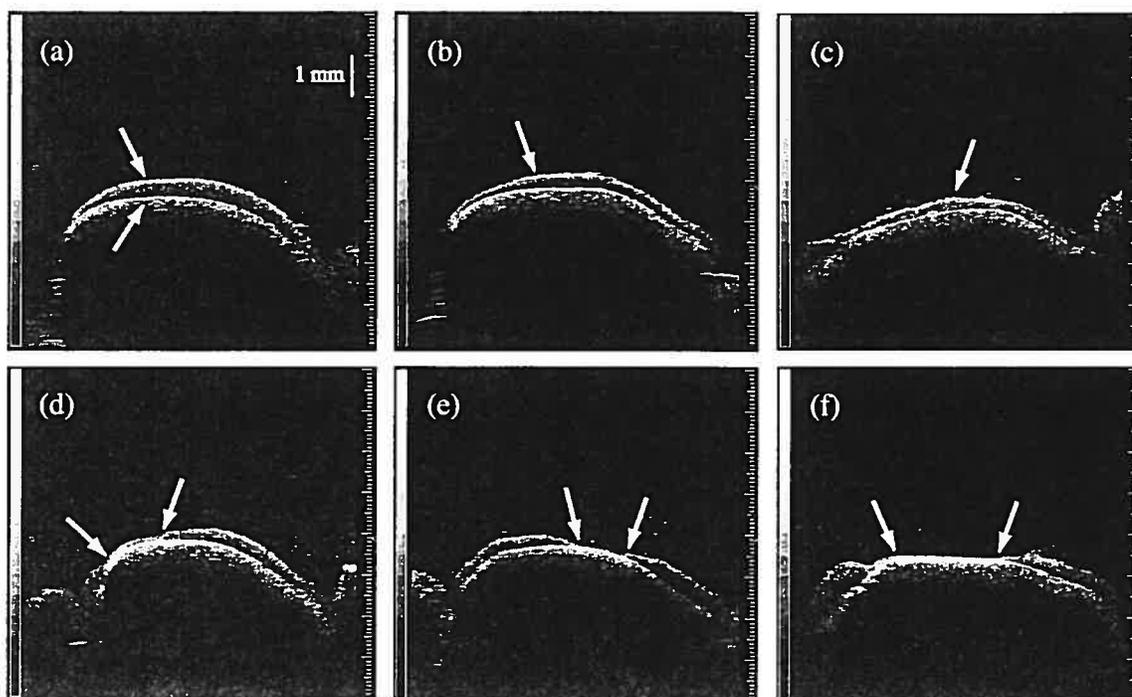


Figure 1: Ultrasound transverse scans of rabbit femoral condylar cartilage illustrating the grading system designed for the study. (a) Grade 1: Two bright and sharp interfaces (arrows) are clearly visible. Two layers of different echogenicity can be seen between these interfaces. (b) Grade 2: The superficial interface remains bright but loses its sharpness (arrow). (c) Grade 3: The superficial interface becomes irregular and loses its brightness (arrow). (d) Grade 4: A partial focal loss of cartilage thickness (between arrows) is observed. (e) Grade 5: Full thickness focal loss of articular cartilage is evident (between arrows) but the deep interface stays regular. (f) Grade 6: Full thickness loss of articular cartilage is accompanied with modification of the deep interface. Flattening of the deep interface is illustrated on this scan (between arrows).

All condyles from control rabbits had an ultrasonographic grade of either 1 or 2 except for one animal with a cartilage erosion which was graded 5 on the medial femoral condyle. The majority of ACLT joint condyles had higher ultrasonographic grades (grade 3 and over) when compared to the control rabbits. The grades observed are indicated in table 4. Considering that several control rabbits had a ultrasonographic grade 2, this grade was interpreted as a slight variation from normal and, after cross-checking with histological data at the completion of the grading procedure, ultrasonographic grade 3 was considered as the first evident pathological grade.

Category		Ultrasonographic grade					
		1	2	3	4	5	6
Control (n = 22)		9	12	0	0	1	0
ACLT 4 weeks (n = 12)		0	2	3	5	0	2
ACLT 8 weeks (n = 14)		0	0	3	2	2	7
ACLT 12 weeks (n = 16)		1	4	0	2	1	8
Total		10	18	6	9	4	17

Table IV : Ultrasonographic evaluation results

2.4.2. Macroscopic evaluation

Representative macroscopic grades following India Ink application are illustrated in figure 2. An intact articular surface with no ink staining was characteristic of grade 1 (Figure 2a). Small focal areas of light ink uptake were evident with grade 2 (Figure 2b). Grade 3 had larger intense black patches of ink uptake (Figure 2c, 4b), whereas the underlying subchondral bone was exposed with grade 4 (Figure 2d, 5b).

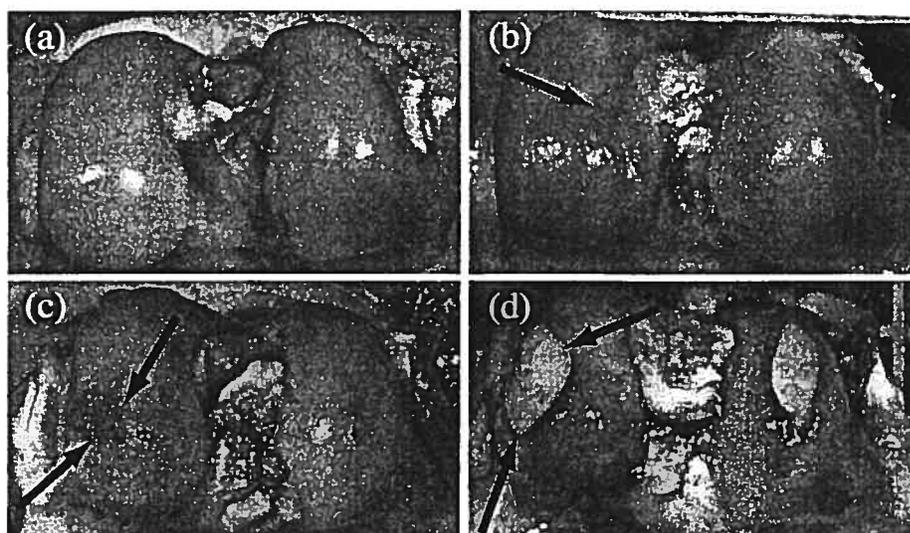


Figure 2: Macroscopic specimens, stained with India Ink, representative of different macroscopic grades. (a) Grade 1: Intact surface with no focal increased uptake of India Ink (b) Grade 2: Intact surface with small focal areas of light ink uptake (arrow). (c) Grade 3: Irregular surface with large intense black patches of ink uptake (between arrows). (d) Grade 4: Subchondral bone exposure (between arrows).

Results of macroscopic evaluation are presented in table V. All but one control rabbit were graded as 2 or lower on the macroscopic examination. One rabbit had a complete cartilage erosion on the medial femoral condyle (grade 4). All ACLT rabbits had their ACL completely transected upon post mortem examination and had macroscopic scores ranging from 1 to 4, which provided a complete spectrum of characteristic OA lesions, from early to advanced, for validation purposes.

The lesions which were scored as 3 and over were considered relevant OA lesions, as they were never found in control rabbits.

		Macroscopic grade			
		1	2	3	4
Category	Control (n = 22)	16	5	0	1
	ACLT 4 weeks (n = 12)	2	1	5	4
	ACLT 8 weeks (n = 14)	0	2	2	10
	ACLT 12 weeks (n = 16)	0	3	4	9
	Total	18	11	11	24

Table V: Macroscopic evaluation results

2.4.3. Histological examination

All histological stages of OA previously described in the ACLT rabbit model (Vignon et al. 1987; Yoshioka et al. 1996) were detected in our study. Grade 0 was judged to be normal cartilage, with homogeneous safranin O coloration and a perfectly regular surface (Figure 3a). Grades 1 and 2 were interpreted as slight variations in normal cartilage. Grade 1 histological slides had a very slight loss of safranin O staining in the most superficial layer (Figure 3b) and grade 2 had, in addition, a very mild surface irregularity (Figure 3c). Evident surface irregularities associated with clefts in the superficial half of the cartilage thickness were characteristic of grade 3 (Figure 3d). With grade 4, clefts extending deep into the cartilage or severe surface irregularities,

associated with a loss of Safranin O staining, were present (Figure 3e, 4c). A complete non-calcified cartilage thickness loss was observed with grade 5, but the calcified cartilage remained intact (Figure 3f, 5c) whereas with grade 6, calcified cartilage was eroded and the subchondral bone exposed (Figure 3g).

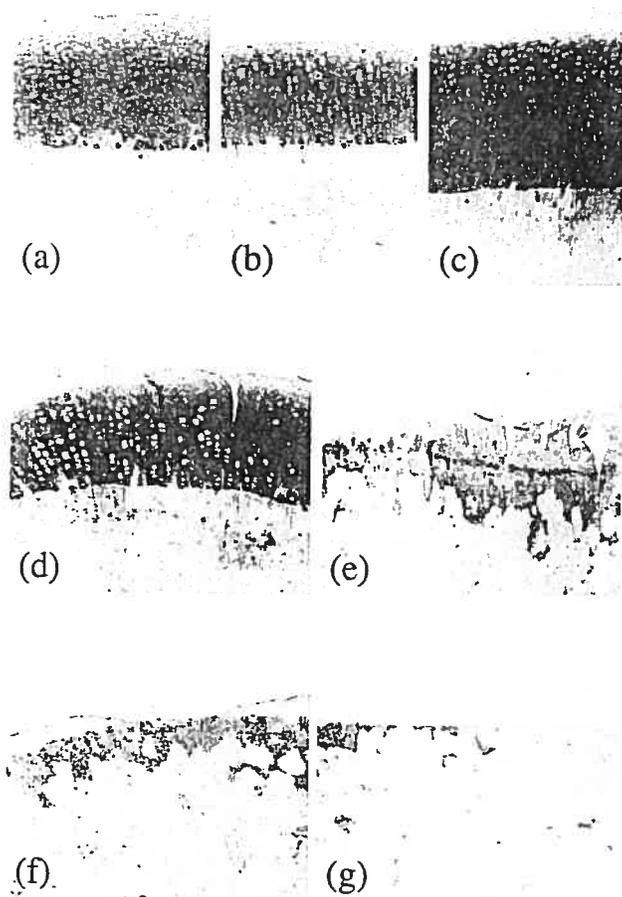


Figure 3: Representative histological sections of femoral condyles stained with Safranin O Fast Green (original magnification 100x). (a) Grade 0: All the articular cartilage is homogeneously coloured by Safranin O. (b) Grade 1: Loss of Safranin O staining in the most superficial part of articular cartilage but the surface remains intact. (c) Grade 2: Very slight irregularities of the articular surface are present. (d) Grade 3: Severe surface irregularities associated with clefts in the superficial half of the cartilage thickness are present. (e) Grade 4: Clefts extending deep into the cartilage and associated with a loss of Safranin O staining are characteristic findings. (f) Grade 5: A full cartilage thickness loss is seen but the calcified cartilage remains intact. (g) Grade 6: The calcified cartilage is eroded and the subchondral bone exposed.

Histological examination results are presented in table VI. All control rabbits were graded as having a histological score of 2 and lower except the one previously mentioned as having macroscopic lesion which was graded 4 on the medial condyle. ACLT rabbits grades ranged from 0 to 6. Grouping both samples (control and ACLT), histological examination identified 28 condyles with normal cartilage (score 0, 1 and 2), 14 condyles with fibrillation (score 3 and 4) and 22 condyles with full cartilage thickness loss (score 5 and 6).

Category		Histological grade						
		0	1	2	3	4	5	6
Control (n = 22)		1	15	5	0	1	0	0
ACLT 4 weeks (n = 12)		0	0	2	2	5	0	3
ACLT 8 weeks (n = 14)		0	1	0	1	3	2	7
ACLT 12 weeks (n = 16)		2	1	1	1	1	5	5
Total		3	17	8	4	10	7	15

Table VI: Histological evaluation results

Cartilage was judged to have hallmark OA lesions when graded as 3 and over. Grades 3 and 4 were considered as fibrillation lesions and grade 5 and 6 as ulceration lesions.

2.4.4. Statistical analysis

2.4.4.1. Intra- and interobserver repeatability

The intra-observer repeatability for UBM grading of the cartilage was high (weighted kappa = 0.88). A strong agreement was also found between the two observers regarding histological examination of the sections (weighted kappa = 0.90).

2.4.4.2. UBM sensitivity and specificity

Both for ultrasonographic and macroscopic sensitivity and specificity calculation, references for fibrillation was histological grade 3 and 4 and, for ulceration, histological scores 5 and 6. The ultrasonographic diagnosis was considered positive for fibrillation with a grade of 3 and 4 and positive for ulceration with a grade of 5 and 6. UBM sensitivity was 92.3% for identifying fibrillation and 90.9% for ulceration diagnosis using histological examination as a reference. Its specificity was 96.4% for fibrillation and 97.6% for ulceration of the articular cartilage.

2.4.4.3. Macroscopic examination sensitivity and specificity

Macroscopic grade 3 was considered as a positive diagnosis for fibrillation and grade 4 a positive diagnosis for ulceration. Macroscopic examination using India Ink had a sensitivity of 80.0% for detection of histological fibrillation and 90.9% for detection of ulceration of articular cartilage. Its specificity was 96.4% for fibrillation and 90.5% for ulceration.

ulceration. (ACLT = Anterior Cruciate Ligament transection; LFC = Lateral Femoral Condyle; MFC = Medial Femoral Condyle)

2.4.4. Statistical analysis

2.4.4.1. Intra- and interobserver repeatability

The intra-observer repeatability for UBM grading of the cartilage was high (weighted kappa = 0.88). A strong agreement was also found between the two observers regarding histological examination of the sections (weighted kappa = 0.90).

2.4.4.2. UBM sensitivity and specificity

Both for ultrasonographic and macroscopic sensitivity and specificity calculation, references for fibrillation was histological grade 3 and 4 and, for ulceration, histological scores 5 and 6. The ultrasonographic diagnosis was considered positive for fibrillation with a grade of 3 and 4 and positive for ulceration with a grade of 5 and 6. UBM sensitivity was 92.3% for identifying fibrillation and 90.9% for ulceration diagnosis using histological examination as a reference. Its specificity was 96.4% for fibrillation and 97.6% for ulceration of the articular cartilage.

2.4.4.3. Macroscopic examination sensitivity and specificity

Macroscopic grade 3 was considered as a positive diagnosis for fibrillation and grade 4 a positive diagnosis for ulceration. Macroscopic examination enhanced by India Ink staining of cartilage had a sensitivity of 80.0% for detection of histological fibrillation and 90.9% for detection of ulceration of articular cartilage. Its specificity was 96.4% for fibrillation and 90.5% for ulceration.

2.4.4.4. Histological and ultrasonographic correlation (Table VII)

A highly significant positive correlation was found between the UBM and histological grades ($r_{sp} = 0.90, p < 0.001$).

		Ultrasonographic grade						Total
		1	2	3	4	5	6	
Histological grade	0	1	2	0	0	0	0	3
	1	7	9	1	0	0	0	17
	2	2	6	0	0	0	0	8
	3	0	1	2	1	0	0	4
	4	0	0	3	6	1	0	10
	5	0	0	0	1	2	4	7
	6	0	0	0	1	1	13	15
Total		10	18	6	9	4	17	64

Table VII: Cross tabulation ultrasonographic vs. histological grades.

2.5. Discussion

The anterior cruciate ligament transection (ACLT) model of osteoarthritis in the rabbit provided a spectrum of focal histological lesions of the femoral condyles, similar to those occurring in human OA, and permitted validation of ultrasound biomicroscopy sensitivity and specificity in the diagnosis of OA lesions *ex vivo*. The histological abnormalities included decreased Safranin O staining, presence of clefts, chondrocyte cluster formation, erosion of cartilage and eburnation of bone, all hallmark histological lesions of human OA (Pritzker 2003). However undulation or duplication of the tidemark which also occurs in human OA (Mankin et al. 1971; Pritzker 2003) was not observed in this study. Only one ACLT rabbit had blood vessels crossing the tidemark, a feature encountered in human OA.

Healthy cartilage had a characteristic ultrasonographic appearance which was well defined between two bright interfaces, which is in agreement with other studies (Kim et al. 1995; Myers et al. 1995; Saied et al. 1997; Laasanen et al. 2003b). Although the superficial interface represents the surface of the cartilage, controversy surrounds the source of the deep interface in the literature. In a study comparing articular cartilage thickness measured with both an optical microscope and an ultrasound system, it was concluded that this interface was located between the non calcified and calcified cartilage (Modest et al. 1989). However, subsequent reports attributed this interface to the cartilage/sub-chondral bone boundary (Disler et al. 2000), and used the encompassing term “articular cartilage-calcified cartilage/bone interface” (Myers et al. 1995; Saied et al. 1997; Toyras et al. 1999) or suggested both possibilities (Kim et al. 1995). Our impression is that the brightness and sharpness of the deep interface we observed in the rabbits mirrors the regular boundary (or tidemark) between the non-calcified and calcified cartilage. The histological appearance of the calcified cartilage/bone interface is more irregular and undulating and therefore less specular or mirror like. We would therefore anticipate that a boundary contoured like this would not create a bright and sharp interface. Furthermore, calcified cartilage is even more mineralised and denser than subchondral bone (Burr 2004) and so a greater impedance

difference, responsible for the reflection, may exist between non-calcified and calcified cartilage rather than between calcified cartilage and subchondral bone. Further support for this hypothesis is provided by the scans where the deep interface is exposed and intact, and the corresponding section reveals the persistence of calcified cartilage (Figure 5). A previous study however has reported that the deep interface was irregular, less smooth and less echoic than the superficial interface (Saied et al. 1997), which conflicts with our findings and those of others (Myers et al. 1995; Laasanen et al. 2003b). This discrepancy in results could be explained by species and/or age differences. The authors used young rats whose calcified cartilage may not yet have been mineralised and the deep interface could therefore represent the undulating cartilage/subchondral bone boundary described earlier. In the present study adult rabbits were used and the deep cartilage was calcified.

We also observed, in addition to the two clear interfaces, two distinct echogenic layers in healthy cartilage: a superficial layer which was more echogenic than a deep layer. Previous observations using high frequency ultrasonography of normal rat patellar articular cartilage (Saied et al. 1997) yielded similar images with higher echogenicity described in the upper two thirds of cartilage. Articular cartilage has a heterogenic histological structure where several layers can be distinguished (Mow and Ratcliffe 1997; Dewire and Einhorn 2001). Ultrasound propagation in cartilage has been shown to be highly dependent on collagen fibril orientation (Agemura et al. 1990). Thus the higher echogenicity in the superficial zone of cartilage, composed of both the tangential and transitional layers, where collagen fibrils are parallel or oblique to the surface respectively, may be explained as many of the fibrils are perpendicular to the ultrasound beam and reflect the ultrasound beam towards the transducer. In contrast, in the deeper part of articular cartilage, the radial layer, collagen fibrils are orientated perpendicular to the articular surface and therefore parallel to the ultrasound beam, which explains its hypoechogenicity as ultrasound is reflected less by these fibrils. A trilaminar echogenic pattern in immature porcine articular cartilage with hypoechoic, hyperechoic and anechoic layers from superficial to deep has been reported in the non-weight bearing area in 20-week old pigs (Kim et al. 1995). The apparent differences in observations are most likely due to age related changes as our animals were skeletally mature adults.

The earliest abnormality of ACLT rabbit femoral condylar cartilage identified was a loss of brightness and sharpness of the superficial interface (ultrasonographic grade 3). These findings concur with results of a recent report where bovine patellar cartilage with naturally occurring OA was scanned with a high-resolution B-mode imaging system (Laasanen et al. 2003b). This change is caused by the roughening of the cartilage surface due to early fibrillation and it consequently reflects and scatters the ultrasound in a random direction, as opposed to a perfect (specular) reflection from the smooth surface of healthy cartilage (Adler et al. 1992; Senzig et al. 1992; Chiang et al. 1994).

An increase in echogenicity which tended to give a homogenous pattern throughout the cartilage was often observed in combination with irregularities of the superficial interface. A similar increase in echogenicity was observed previously in rat patellar cartilage following experimental induction of cartilage degeneration with mono iodo-acetate (Saied et al. 1997). Whether or not this change is due to biochemical modification of the cartilage matrix or macromolecular organisation alteration has not been fully elucidated. Quantitative echogenic changes in cartilage have been correlated to the biochemical composition of cartilage. A significant increase in echogenicity was reported following degradation of cartilage with Chondroitinase ABC, whereas collagenase digestion had no significant effect on echogenicity (Toyraas et al. 1999), suggesting that a decrease in proteoglycan concentration is responsible for the increased echogenicity within the cartilage.

Histological examination is currently considered to be the gold standard in assessing the severity of osteoarthritis lesions in the rabbit ACLT model. Nevertheless no universally accepted histological scoring system exists (Ostergaard et al. 1999; Mainil-Varlet et al. 2003). The most famous and most widely used is the histologic-histochemical grading system (Mankin et al. 1971), often referred to as the "Mankin score". Such a system would have been difficult to use in this study to establish a correlation with ultrasound backscatter microscopy. Summing different histological parameters, as performed in the Mankin score, would lead to a loss of relevant information. We therefore designed a grading system, based on two parameters evaluated in the Mankin score (Structure and Safranin O staining) and the integrity of

the calcified cartilage. The use of these parameters lead us to differentiate seven histological categories or grades. We did not include cellular evaluation, as used in the Mankin score, as we believed it would not allow to distinguish supplementary grades. Assessment of the tidemark integrity was not considered relevant as only one rabbit in the study had modification of the tidemark. This grading system proved to be very reliable as we had a good interobserver repeatability.

Ultrasound biomicroscopy accurately detected both fibrillation and, not surprisingly, ulceration lesions. However very good sensitivity and specificity values were also obtained for the macroscopic examination. The macroscopic evaluation accuracy was increased compared to naked eye evaluation because of the use of India Ink to accentuate fibrillation lesions, which is not applicable to *in vivo* evaluation of articular cartilage. The sensitivity and specificity of ultrasonography regarding fibrillation were excellent, as only one false negative and one false positive occurred. These two false diagnostic results could be explained by the subjective nature of interpreting the sharpness and brightness of the superficial interface. Use of quantitative measures such as reflection coefficient, as reported by others (Cherin et al. 1998; Toyras et al. 1999; Nieminen et al. 2002), could be useful to increase the accuracy of the diagnosis.

The sensitivity and specificity results depend on the selected cut-off values. Grade 3 ultrasonographic scans had clearly defined surface interface irregularity and so were considered as a pathologic variation and used as a threshold value for fibrillation. The choice of the threshold value for ulceration was grade 5 as it was defined as a full thickness loss of non-calcified cartilage. In the macroscopic examination, grade 2 described “minimal fibrillation” (Meachim 1972), however in our study, all but one of the eleven condyles graded macroscopically as 2 had a histological grade of 2 and lower, which lead us to conclude that macroscopic grade 2 was a variation in normal cartilage and evident disease was grade 3 or higher. Thus grade 3 was chosen as the threshold value for fibrillation. Macroscopic grade 4 was by definition the threshold value for ulceration.

The excellent correlation between the ultrasonographic and histological grades ($r_{sp} = 0.90$) suggests that UBM provides data similar to the selected histological

parameters, this precluding the need for biopsy. However the high frequency transducer which was used to obtain such a resolution is attenuated rapidly in tissue necessitating a close proximity with the cartilage without any highly attenuating tissue, such as the skin, intervening. This technique will therefore require arthroscopic adaptation if it is to be successful. An arthroscopic implementation is currently under development.

It is important to note that, due to the laws of reflection and to the convex shape of the femoral condyles, only the central part of the scan can be accurately evaluated. When the ultrasound beam is not perpendicular to the cartilage surface, the superficial interface loses its sharpness and brightness. To have a complete accurate evaluation of the whole articular surface, it would be important to scan all areas following the curvature of the articular surface.

In conclusion, UBM could prove to be a valuable tool for the evaluation of osteoarthritis lesions as it permits an accurate evaluation of the cartilage surface and detection of histologic fibrillation, a hallmark of the early stage of OA. It allows an “in depth” evaluation of the cartilage as an alternative to biopsy or destruction of the joint. Coupling this system to needle or standard arthroscopic instrumentation for articular cartilage assessment in osteoarthritic patients or animal models *in vivo* may permit the early diagnosis of osteoarthritis and monitoring of the disease or the assesement of chondro-protection of novel treatments in longitudinal studies.

2.6. Acknowledgements

The authors would like to thank Guy Beauchamp for statistical assistance.

Dr Sheila Laverty, Stuart Foster and David Holdsworth are funded by the Canadian Arthritis Network and Sheila Laverty by the Groupe de Recherche en Médecine Equine du Québec (GREMEQ).

2.7. References

1. Santé Canada. L'arthrite au Canada, une bataille à gagner. Ottawa: Santé Canada, 2003.
2. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998; 47:487-504.
3. Hough AJ. Pathology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management*, Goldberg VM, ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:69-99.
4. Poole AR, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management*, Goldberg VM, ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:29-47.
5. Pritzker KP. Pathology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis*, Lohmander LS, ed. New York: Oxford university press, 2003:49-58.
6. Ghosh P. Disease modifying osteoarthritis drugs (DMOADs), The biological perspective. In: *Osteoarthritis*, Lohmander LS, ed. New York: Oxford university press, 2003:395-401.
7. Simon LS, Strand V. The pharmacologic treatment of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management*, Goldberg VM, ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:371-391.
8. Bradley JD. Management of osteoarthritis, Sytemic analgesics. In: *Osteoarthritis*, Lohmander LS, ed. New York: Oxford university press, 2003:243-249.
9. Lozada CJ, Altman RD. New and investigational therapies for osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management*, Goldberg VM, ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:447-456.
10. Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS. Pharmacological modification of joint breakdown in OA: Do we need it, can we do it, can we prove it, is it good? In: *Osteoarthritis*, Lohmander LS, ed. New York: Oxford university press, 2003:393-394.
11. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, et al. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 2:45-57.
12. Sherar MD, Noss MB, Foster FS. Ultrasound backscatter microscopy images the internal structure of living tumour spheroids. *Nature* 1987; 330:493-5.
13. Sherar MD, Starkoski BG, Taylor WB, Foster FS. A 100 MHz B-scan ultrasound backscatter microscope. *Ultrason Imaging* 1989; 11:95-105.

14. Foster FS, Pavlin CJ, Harasiewicz KA, Christopher DA, Turnbull DH. Advances in ultrasound biomicroscopy. *Ultrasound Med Biol* 2000; 26:1-27.
15. Kim HK, Babyn PS, Harasiewicz KA, Gahunia HK, Pritzker KP, Foster FS. Imaging of immature articular cartilage using ultrasound backscatter microscopy at 50 MHz. *J Orthop Res* 1995; 13:963-70.
16. Myers SL, Dines K, Brandt DA, Brandt KD, Albrecht ME. Experimental assessment by high frequency ultrasound of articular cartilage thickness and osteoarthritic changes. *J Rheumatol* 1995; 22:109-16.
17. Cherin E, Saied A, Laugier P, Netter P, Berger G. Evaluation of acoustical parameter sensitivity to age-related and osteoarthritic changes in articular cartilage using 50-MHz ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1998; 24:341-54.
18. Saied A, Cherin E, Gaucher H, et al. Assessment of articular cartilage and subchondral bone: subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro. *J Bone Miner Res* 1997; 12:1378-86.
19. Laasanen MS, Toyras J, Vasara AI, et al. Mechano-acoustic diagnosis of cartilage degeneration and repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85-A Suppl 2:78-84.
20. Agemura DH, O'Brien WD, Jr., Olerud JE, Chun LE, Eyre DE. Ultrasonic propagation properties of articular cartilage at 100 MHz. *J Acoust Soc Am* 1990; 87:1786-91.
21. Cherin E, Saied A, Pellaumail B, et al. Assessment of rat articular cartilage maturation using 50-MHz quantitative ultrasonography. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9:178-86.
22. Joiner GA, Bogoch ER, Pritzker KP, Buschmann MD, Chevrier A, Foster FS. High frequency acoustic parameters of human and bovine articular cartilage following experimentally-induced matrix degradation. *Ultrason Imaging* 2001; 23:106-16.
23. Laasanen MS, Saarakkala S, Toyras J, et al. Ultrasound indentation of bovine knee articular cartilage in situ. *J Biomech* 2003; 36:1259-67.
24. Laasanen MS, Toyras J, Hirvonen J, et al. Novel mechano-acoustic technique and instrument for diagnosis of cartilage degeneration. *Physiol Meas* 2002; 23:491-503.
25. Toyras J, Nieminen HJ, Laasanen MS, et al. Ultrasonic characterization of articular cartilage. *Biorheology* 2002; 39:161-9.
26. Toyras J, Rieppo J, Nieminen MT, Helminen HJ, Jurvelin JS. Characterization of enzymatically induced degradation of articular cartilage using high frequency ultrasound. *Phys Med Biol* 1999; 44:2723-33.
27. Senzig DA, Forster FK, Olerud JE. Ultrasonic attenuation in articular cartilage. *J Acoust Soc Am* 1992; 92:676-81.

28. Hattori K, Takakura Y, Morita Y, Takenaka M, Uematsu K, Ikeuchi K. Can ultrasound predict histological findings in regenerated cartilage? *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43:302-5.
29. Nieminen HJ, Toyras J, Rieppo J, et al. Real-time ultrasound analysis of articular cartilage degradation in vitro. *Ultrasound Med Biol* 2002; 28:519-25.
30. Meachim G. Light microscopy of Indian ink preparations of fibrillated cartilage. *Ann Rheum Dis* 1972; 31:457-64.
31. Yoshioka M, Coutts RD, Amiel D, Hacker SA. Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4:87-98.
32. Vignon E, Bejui J, Mathieu P, et al. Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis. *J Rheumatol* 1987; 14 Spec No:104-6.
33. Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. 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* 1971; 53:523-37.
34. Modest VE, Murphy MC, Mann RW. Optical verification of a technique for in situ ultrasonic measurement of articular cartilage thickness. *J Biomech* 1989; 22:171-6.
35. Disler DG, Raymond E, May DA, Wayne JS, McCauley TR. Articular cartilage defects: in vitro evaluation of accuracy and interobserver reliability for detection and grading with US. *Radiology* 2000; 215:846-51.
36. Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12 Suppl A:S20-30.
37. Dewire P, Einhorn TA. The joint as an organ. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management*, Goldberg VM, ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:49-68.
38. Mow VC, Ratcliffe A. Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: *Basic Orthopaedic Biomechanics*, Hayes WC, ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997:113-177.
39. Adler RS, Dedrick DK, Laing TJ, et al. Quantitative assessment of cartilage surface roughness in osteoarthritis using high frequency ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1992; 18:51-8.
40. Chiang EH, Adler RS, Meyer CR, Rubin JM, Dedrick DK, Laing TJ. Quantitative assessment of surface roughness using backscattered ultrasound: the effects of finite surface curvature. *Ultrasound Med Biol* 1994; 20:123-35.

3. Chapitre 3 : Discussion et Conclusion

3.1. Discussion

La section du ligament croisé cranial chez le lapin est un bon modèle d'ostéoarthrose. En effet ce modèle expérimental a fourni un large spectre de lésions sur les condyles fémoraux et a donc permis l'évaluation *ex vivo* de la sensibilité et de la spécificité de notre système d'échographie haute fréquence. Les modifications histologiques présentes incluaient un manque de coloration par la Safranine, la présence de fissures, la formation de chondrones, l'érosion et l'ulcération du cartilage et l'éburnation de l'os, toutes ces lésions étant similaires à celles rapportées lors d'ostéoarthrose chez l'homme (Pritzker 2003). En revanche, l'ondulation et la duplication de la tidemark, rapportées chez l'homme (Mankin et al. 1971; Pritzker 2003), n'ont pas été observées dans cette étude. Seul un lapin présentait un franchissement de la tidemark par des vaisseaux sanguins, lésion rapportée chez l'homme.

Le cartilage sain apparaît à l'échographie nettement délimité par deux interfaces régulières et hyperéchogènes, ce qui est en accord avec les données précédemment rapportées dans la littérature (Kim et al. 1995; Myers et al. 1995; Saied et al. 1997; Cherin et al. 1998). L'interface superficielle représente la surface du cartilage ; en revanche, une controverse existe dans la littérature concernant l'origine de l'interface profonde. Une étude comparant les mesures d'épaisseurs par microscopie optique et par échographie a conclu que l'interface profonde provenait de la limite entre le cartilage non calcifié et le cartilage calcifié (Modest et al. 1989). Cependant d'autres études ont par la suite attribué cet interface à la limite entre le cartilage et l'os sous-chondral (Disler et al. 2000), ont désigné cette interface de manière imprécise évoquant la limite entre cartilage articulaire, cartilage calcifié et os sous-chondral (Myers et al. 1995; Saied et al. 1997; Toyras et al. 1999) ou ont évoqué les deux possibilités (Kim et al. 1995). La brillance et la netteté de l'interface profonde observées dans cette étude suggèrent qu'elle provient de la réflexion spéculaire des ultrasons sur une limite régulière entre

deux milieux d'impédances différentes. La démarcation entre le cartilage calcifié et le cartilage non calcifié présente ces caractéristiques à l'histologie, contrairement à la limite cartilage calcifié / os sous-chondral qui apparaît irrégulière et ondulante. Nous supposons donc que l'interface profonde est due à la réflexion des ultrasons sur la tidemark. De plus, une étude récente par microscopie électronique a montré que le cartilage calcifié était plus minéralisé et donc plus dense que l'os sous-chondral (Burr 2004). Ainsi, une plus grande différence d'impédance existe entre le cartilage non calcifié et le cartilage calcifié qu'entre le cartilage calcifié et l'os sous-chondral. Il est donc plus logique que la réflexion ait lieu entre le cartilage non calcifié et le cartilage calcifié. Une confirmation de cette hypothèse est apportée par les images échographiques où l'interface profonde est exposée mais reste intacte : les lames histologiques correspondantes révèlent la persistance du cartilage calcifié (Figure 5).

Une étude précédente avait rapporté que l'interface profonde était irrégulière, moins lisse et moins échogène que l'interface superficielle (Saied et al. 1997), ce qui est en désaccord avec d'autres résultats (Myers et al. 1995; Laasanen et al. 2003b) ainsi que les nôtres. La discordance entre ces résultats pourrait être expliquée par une différence d'espèce et/ou d'âge. Saied et al. (1997) avaient utilisé de jeunes rats chez qui la zone profonde du cartilage n'était peut être pas encore minéralisée et l'interface profonde provenait alors de la limite irrégulière entre le cartilage et l'os sous-chondral. Dans notre étude, des lapins adultes ont été utilisés et la région profonde du cartilage était calcifiée.

Sur les images échographiques de cartilage sain, la zone entre les deux interfaces hyperéchogènes présente deux couches d'échogénicité différente : la couche superficielle est plus échogène que la couche profonde. Des observations précédentes sur du cartilage de rotule de rats décrivaient également une échogénicité plus importante dans les deux tiers supérieurs du cartilage (Saied et al. 1997). Le cartilage articulaire possède une structure histologique hétérogène où plusieurs zones peuvent être distinguées (Mow and Ratcliffe 1997; Dewire and Einhorn 2001). La propagation des ultrasons dans le cartilage est fortement influencée par l'orientation des fibres de collagène (Agemura et al. 1990). Ainsi, l'échogénicité plus importante du cartilage dans sa partie superficielle peut s'expliquer par l'orientation des fibres de collagène parallèles ou obliques à la surface du cartilage : certaines de ces fibres sont donc perpendiculaires

au faisceau d'ultrasons et les reflètent vers le transducteur en grand nombre. Dans la partie plus profonde, les fibres de collagène sont perpendiculaires à la surface articulaire et donc parallèles aux ultrasons et ne peuvent donc pas les réfléchir vers le transducteur. Une organisation en trois couches d'échogénicité distincte, hypoéchogène, hyperéchogène puis anéchogène de la surface vers la profondeur, a été rapportée dans la région non portante de cartilage de grasset de porcs âgés de 20 semaines (Kim et al. 1995). Cette variation est probablement liée à l'âge des animaux. Nos animaux possédaient un squelette mature et ne présentaient pas ce type d'organisation.

Il est important de noter qu'en raison des lois de la réflexion et de la forme convexe des condyles fémoraux, seule la partie centrale de l'image peut être évaluée avec exactitude. En effet, lorsque le faisceau ultrasonore n'est pas perpendiculaire à la surface articulaire, l'interface superficielle perd sa netteté et sa brillance. Pour avoir une évaluation précise et complète de toute la surface articulaire, il est donc nécessaire de balayer toute la surface en respectant son rayon de courbure.

La modification échographique la plus précoce rencontrée sur le cartilage des lapins ayant subi la section du ligament croisé cranial est une perte de brillance et de netteté de l'interface de surface (grade échographique 3). Ce résultat confirme ceux d'une autre étude où du cartilage de rotule de bovin présentant des lésions naturelles d'ostéoarthrose révélait la même modification à l'échographie haute fréquence (Laasanen et al. 2003b). Ce changement est dû à la fibrillation qui rend la surface du cartilage rugueuse. Ainsi au lieu d'obtenir une réflexion spéculaire des ultrasons, la réflexion est diffuse, les ultrasons étant renvoyés dans des directions aléatoires (Senzig et al. 1992; Chiang et al. 1997; Adler 1999).

Une augmentation d'échogénicité ainsi qu'une disparition de l'organisation en deux zones d'échogénicité différente sont souvent constatées en association avec les irrégularités de l'interface superficielle. Une augmentation d'échogénicité similaire a été précédemment rapportée sur du cartilage de rotule de rat suite à l'injection de monoiodoacétate dans le grasset (Saied et al. 1997). Ce changement d'échogénicité peut être dû soit à une variation de la composition biochimique soit à une modification de la structure macromoléculaire. Une augmentation significative de l'échogénicité du

cartilage a été rapportée suite à la dégradation par la chondroïtinase ABC, en revanche, la collagénase n'entraîne pas de variation significative de l'échogénicité (Toyraş et al. 1999). Ainsi l'augmentation d'échogénicité serait due à une diminution de la concentration du cartilage en protéoglycanes.

L'examen histologique est actuellement considéré comme l'outil de référence pour déterminer la sévérité des lésions d'ostéoarthrose. Il n'existe cependant pas de système d'évaluation faisant l'unanimité. Le score histologique le plus couramment utilisé est le « score de Mankin » (Mankin et al. 1971). Ce système permet d'attribuer un score global résultant de l'addition de scores évalués pour quatre paramètres (structure, coloration, cellularité et intégrité de la tidemark). Un tel système s'avérait peu adéquat afin d'évaluer la corrélation avec l'examen échographique haute fréquence. Ainsi nous avons créé notre propre système distinguant sept grades histologiques axés principalement sur l'évaluation de deux des paramètres utilisés dans le système de Mankin (structure et coloration) et sur l'intégrité du cartilage calcifié. Ce système n'est pas un système de gradation histologique parfait puisqu'il ne prend pas en considération les caractéristiques cellulaires du cartilage mais, il s'est avéré pratique pour évaluer les corrélations avec le système de gradation échographique et très fiable puisqu'une bonne répétabilité entre évaluateurs a été observée.

L'échographie haute fréquence permet de diagnostiquer avec précision la fibrillation et l'ulcération du cartilage. La sensibilité et la spécificité de l'examen échographique concernant le diagnostic de fibrillation sont excellentes puisque seulement un faux négatif et un faux positif sont apparus. Ces deux erreurs diagnostiques peuvent s'expliquer par l'interprétation subjective de la netteté et de la brillance de l'interface de surface. L'utilisation de mesures quantitatives, tel le coefficient de réflexion utilisé dans d'autres études (Cherin et al. 1998; Toyraş et al. 1999; Nieminen et al. 2002), pourrait être utile pour améliorer davantage l'exactitude du diagnostic. De très bonnes sensibilité et spécificité ont également été obtenues pour l'examen macroscopique. L'exactitude de l'examen macroscopique a été améliorée par l'utilisation d'encre de Chine qui aide à l'identification des lésions précoces de fibrillation.

La sensibilité et la spécificité des résultats dépendent du choix des valeurs critiques. Le grade échographique 3 représente clairement une interface superficielle irrégulière et fut donc considéré comme une variation pathologique. Il représente donc la valeur seuil pour un diagnostic de fibrillation. Le choix de la valeur seuil pour l'ulcération s'est porté sur le grade 5 puisqu'il représente l'exposition de l'interface profonde et donc une perte complète de cartilage non calcifié. Concernant l'examen macroscopique, le grade 2 est décrit comme une « fibrillation minimale » (Meachim 1972). Néanmoins, dans notre étude tous les onze condyles gradés 2, sauf un, possédaient un score histologique de 2 ou moins, grades histologiques représentant du cartilage sain. Ainsi, nous avons conclu que le grade macroscopique 2 était une variation du cartilage normal et que les lésions véritables ne concernaient que les grades 3 et plus. Le grade macroscopique 3 a donc été considéré comme la valeur de référence pour la fibrillation, le grade 4 pour l'ulcération.

L'excellente corrélation entre les grades échographique et histologique ($r_{sp} = 0.90$) suggère que l'échographie haute fréquence apporte des renseignements proches de ceux de l'examen histologique, sans nécessiter le recours à la biopsie. Cependant, le transducteur de haute fréquence, utilisé pour atteindre une telle résolution, impose un accès à proximité immédiate du cartilage et l'absence de structure atténuante, telle la peau. Ainsi cette technique nécessite une adaptation couplée à du matériel d'arthroscopie afin de permettre une approche minimalement invasive.

3.2. Conclusion

L'échographie haute fréquence s'avère être un outil fort utile pour l'évaluation des lésions d'ostéoarthrose puisqu'elle permet une évaluation précise de la surface du cartilage avec la détection des lésions de fibrillation, signe histologique des stades précoces d'ostéoarthrose. Elle permet en outre une évaluation en profondeur du cartilage sans nécessiter de biopsie ou de destruction de l'articulation. L'association de ce système avec des outils d'arthroscopie permettrait une évaluation précise du cartilage articulaire chez le patient humain ou sur des modèles animaux pour permettre un diagnostic précoce de l'ostéoarthrose ou vérifier l'activité chondroprotectrice de nouveaux traitements lors d'études expérimentales longitudinales.

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**, 263-8.
- Adler, R.S. (1999) Future and new developments in musculoskeletal ultrasound. *Radiol Clin North Am* **37**, 623-31.
- Adler, R.S., Dedrick, D.K., Laing, T.J., Chiang, E.H., Meyer, C.R., Bland, P.H. and Rubin, J.M. (1992) Quantitative assessment of cartilage surface roughness in osteoarthritis using high frequency ultrasound. *Ultrasound Med Biol* **18**, 51-8.
- Agemura, D.H., O'Brien, W.D., Jr., Olerud, J.E., Chun, L.E. and Eyre, D.E. (1990) Ultrasonic propagation properties of articular cartilage at 100 MHz. *J Acoust Soc Am* **87**, 1786-91.
- Aisen, A.M., McCune, W.J., MacGuire, A., Carson, P.L., Silver, T.M., Jafri, S.Z. and Martel, W. (1984) Sonographic evaluation of the cartilage of the knee. *Radiology* **153**, 781-4.
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., Christy, W., Cooke, T.D., Greenwald, R., Hochberg, M. and et al. (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* **29**, 1039-49.
- Altman, R.D. (2004a) Measurement of structure (disease) modification in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **12 Suppl A**, S69-76.
- Altman, R.D. (2004b) Pain relief in osteoarthritis: the rationale for combination therapy. *J Rheumatol* **31**, 5-7.
- Badley, E. and DesMeules, M. L'arthrite au Canada, une bataille à gagner. Ottawa: Santé Canada; 2003.
- Bailey, A.J. and Mansell, J.P. (1997) Do subchondral bone changes exacerbate or precede articular cartilage destruction in osteoarthritis of the elderly? *Gerontology* **43**, 296-304.
- Benson, C.B. (1991) Sonography of the musculoskeletal system. *Rheum Dis Clin North Am* **17**, 487-504.
- Block, J.A. (2002) Radiographic joint space width (JSW): A marker of disease progression in OA of the hip. In: *The many faces of osteoarthritis*. KE Kuettner, editor. Birkäuser, Basel. pp 363-7.

- Bradley, J.D. (2003) Management of osteoarthritis, Systemic analgesics. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 243-9.
- Brandt, K.D. (2003) Disease modifying osteoarthritis drugs (DMOADs), The clinical perspective. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 401-9.
- Brandt, K.D., Doherty, M. and Lohmander, L.S. (2003a) Management of osteoarthritis, Introduction: the comprehensive approach. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 237-41.
- Brandt, K.D., Doherty, M. and Lohmander, L.S. (2003b) Pharmacological modification of joint breakdown in OA: Do we need it, can we do it, can we prove it, is it good? In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 393-4.
- Brandt, K.D., Fife, R.S., Braunstein, E.M. and Katz, B. (1991) 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**, 1381-6.
- Buckland-Wright, J.C., Macfarlane, D.G., Jasani, M.K. and Lynch, J.A. (1994) Quantitative microfocal radiographic assessment of osteoarthritis of the knee from weight bearing tunnel and semiflexed standing views. *J Rheumatol* **21**, 1734-41.
- Buckwalter, J.A. and Mankin, H.J. (1998a) Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* **47**, 487-504.
- Buckwalter, J.A. and Mankin, H.J. (1998b) Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* **47**, 477-86.
- Buckwalter, J.A., Martin, J. and Mankin, H.J. (2000) Synovial joint degeneration and the syndrome of osteoarthritis. *Instr Course Lect* **49**, 481-9.
- Burr, D.B. (2004) Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthrosis. *Osteoarthritis Cartilage* **12 Suppl A**, S20-30.
- Bushberg, J.T., Seibert, J.A., Leidholdt, E.M. and Boone, J.M. (2002) Ultrasound. In: *The essential physics of medical imaging* 2nd edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 469-553.
- Caron, J.P. and Genovese, R.L. (2003) Principles and practices of joint disease treatment. In: *Diagnosis and management of lameness in the horse*. S Dyson, editor. Saunders, Philadelphia. pp 746-64.
- Cherin, E., Saied, A., Laugier, P., Netter, P. and Berger, G. (1998) Evaluation of acoustical parameter sensitivity to age-related and osteoarthritic changes in articular cartilage using 50-MHz ultrasound. *Ultrasound Med Biol* **24**, 341-54.
- Cherin, E., Saied, A., Pellaumail, B., Loeuille, D., Laugier, P., Gillet, P., Netter, P. and Berger, G. (2001) Assessment of rat articular cartilage maturation using 50-MHz quantitative ultrasonography. *Osteoarthritis Cartilage* **9**, 178-86.

- Chiang, E.H., Adler, R.S., Meyer, C.R., Rubin, J.M., Dedrick, D.K. and Laing, T.J. (1994) Quantitative assessment of surface roughness using backscattered ultrasound: the effects of finite surface curvature. *Ultrasound Med Biol* **20**, 123-35.
- Chiang, E.H., Laing, T.J., Meyer, C.R., Boes, J.L., Rubin, J.M. and Adler, R.S. (1997) Ultrasonic characterization of in vitro osteoarthritic articular cartilage with validation by confocal microscopy. *Ultrasound Med Biol* **23**, 205-13.
- Cooper, C. (1998) Osteoarthritis and related disorders: Epidemiology. In: *Rheumatology* 2nd edn. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 8.2.1-8.2.8.
- Cooper, C., Cushnaghan, J., Kirwan, J.R., Dieppe, P.A., Rogers, J., McAlindon, T. and McCrae, F. (1992) Radiographic assessment of the knee joint in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **51**, 80-2.
- Danielsson, L. and Hernborg, J. (1970) Clinical and roentgenologic study of knee joints with osteophytes. *Clin Orthop* **69**, 302-12.
- Deschner, J., Hofman, C.R., Piesco, N.P. and Agarwal, S. (2003) Signal transduction by mechanical strain in chondrocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **6**, 289-93.
- Dewire, P. and Einhorn, T.A. (2001) The joint as an organ. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 49-68.
- Dieppe, P. (1998) Osteoarthritis and related disorders: Introduction and history. In: *Rheumatology* 2nd edn. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 8.1.-8.1.2.
- Dieppe, P., Brandt, K.D., Lohmander, S. and Felson, D.T. (1995) Detecting and measuring disease modification in osteoarthritis. The need for standardized methodology. *J Rheumatol* **22**, 201-3.
- Dieppe, P.A., Cushnaghan, J. and Shepstone, L. (1997) The Bristol 'OA500' study: progression of osteoarthritis (OA) over 3 years and the relationship between clinical and radiographic changes at the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* **5**, 87-97.
- Disler, D.G., Raymond, E., May, D.A., Wayne, J.S. and McCauley, T.R. (2000) Articular cartilage defects: in vitro evaluation of accuracy and interobserver reliability for detection and grading with US. *Radiology* **215**, 846-51.
- Faure, P., Doan, B.T. and Beloeil, J.C. (2003) *In-vivo* high resolution three-dimensional MRI studies of rat joints at 7 T. *NMR Biomed.* **16**, 484-93.
- Felson, D.T. (2003) Epidemiology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 9-16.
- Felson, D.T. (2004) An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* **42**, 1-9, v.
- Felson, D.T., Chaisson, C.E., Hill, C.L., Totterman, S.M., Gale, M.E., Skinner, K.M., Kazis, L. and Gale, D.R. (2001) The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis. *Ann Intern Med* **134**, 541-9.
- Fife, R.S., Brandt, K.D., Braunstein, E.M., Katz, B.P., Shelbourne, K.D., Kalasinski, L.A. and Ryan, S. (1991) Relationship between arthroscopic evidence of cartilage

- damage and radiographic evidence of joint space narrowing in early osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* **34**, 377-82.
- Flores, R.H. and Hochberg, M.C. (2003) Definition and classification of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 1-8.
- Foland, J.W., McIlwraith, C.W., Trotter, G.W., Powers, B.E. and Lamar, C.H. (1994) Effect of betamethasone and exercise on equine carpal joints with osteochondral fragments. *Vet Surg* **23**, 369-76.
- Foster, F.S., Pavlin, C.J., Harasiewicz, K.A., Christopher, D.A. and Turnbull, D.H. (2000) Advances in ultrasound biomicroscopy. *Ultrasound Med Biol* **26**, 1-27.
- Frankel, V.H. (1998) Biomechanics. In: *Rheumatology* 2nd edn. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 1.11.1-8.
- Frisbie, D.D., Kawcak, C.E., Baxter, G.M., Trotter, G.W., Powers, B.E., Lassen, E.D. and McIlwraith, C.W. (1998) Effects of 6alpha-methylprednisolone acetate on an equine osteochondral fragment exercise model. *Am J Vet Res* **59**, 1619-28.
- Ghosh, P. (2003) Disease modifying osteoarthritis drugs (DMOADs), The biological perspective. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 395-401.
- Goldberg, V.M. (2001) Surgical considerations in osteoarthritis: General considerations, indications and outcomes. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 459-68.
- Goldring, M.B. (2000) Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* **2**, 459-65.
- Gramas, D.A. and Lane, N.E. (1995) Osteoarthritis. In: *Treatment of the Rheumatic Diseases*. ME Weinblatt, editor. Saunders Company, Philadelphia. pp 286-311.
- Grassi, W., Lamanna, G., Farina, A. and Cervini, C. (1999) Sonographic imaging of normal and osteoarthritic cartilage. *Semin Arthritis Rheum* **28**, 398-403.
- Griffiths, R.J. and Schrier, D.J. (2003) Advantages and limitations of animal models in the discovery and evaluation of novel disease-modifying osteoarthritis drugs (DMOADs). In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 411-6.
- Gupta, K.B., Duryea, J. and Weissman, B.N. (2004) Radiographic evaluation of osteoarthritis. *Radiol Clin North Am* **42**, 11-41, v.
- Harris, R.A., Follett, D.H., Halliwell, M. and Wells, P.N. (1991) Ultimate limits in ultrasonic imaging resolution. *Ultrasound Med Biol* **17**, 547-58.
- Hashimoto, B.E., Kramer, D.J. and Wiitala, L. (1999) Applications of musculoskeletal sonography. *J Clin Ultrasound* **27**, 293-318.

- Hattori, K., Takakura, Y., Morita, Y., Takenaka, M., Uematsu, K. and Ikeuchi, K. (2004) Can ultrasound predict histological findings in regenerated cartilage? *Rheumatology (Oxford)* **43**, 302-5.
- Hayami, T., Pickarski, M., Wesolowski, G.A., McLane, J., Bone, A., Destefano, J., Rodan, G.A. and Duong le, T. (2004) 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* **50**, 1193-206.
- Hernborg, J. and Nilsson, B.E. (1973) The relationship between osteophytes in the knee joint, osteoarthritis and aging. *Acta Orthop Scand* **44**, 69-74.
- Hough, A.J. (2001) Pathology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 69-99.
- Howard, R.D. and McIlwraith, C.W. (1996) Hyaluronan and its use in the treatment of equine joint disease. In: *Joint disease in the horse*. GW Trotter, editor. WB Saunders, Philadelphia.
- Imhof, H., Sulzbacher, I., Grampp, S., Czerny, C., Youssefzadeh, S. and Kainberger, F. (2000) Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol* **35**, 581-8.
- Jaffre, B., Watrin, A., Loeuille, D., Gillet, P., Netter, P., Laugier, P. and Saied, A. (2003) Effects of antiinflammatory drugs on arthritic cartilage: a high-frequency quantitative ultrasound study in rats. *Arthritis Rheum* **48**, 1594-601.
- Jeffcott, L.B., Rosedale, P.D., Freestone, J., Frank, C.J. and Towers-Clark, P.F. (1982) An assessment of wastage in Thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine vet. J.* **14**, 185-98.
- Johnston, S.A. (1997) Osteoarthritis. Joint anatomy, Physiology, and Pathobiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **27**, 699.
- Joiner, G.A., Bogoch, E.R., Pritzker, K.P., Buschmann, M.D., Chevrier, A. and Foster, F.S. (2001) High frequency acoustic parameters of human and bovine articular cartilage following experimentally-induced matrix degradation. *Ultrason Imaging* **23**, 106-16.
- Jurvelin, J.S., Rasanen, T., Kolmonen, P. and Lyyra, T. (1995) Comparison of optical, needle probe and ultrasonic techniques for the measurement of articular cartilage thickness. *J Biomech* **28**, 231-5.
- Kawcak, C.E., Norrdin, R.W., Frisbie, D.D., Trotter, G.W. and McIlwraith, C.W. (1998) Effects of osteochondral fragmentation and intra-articular triamcinolone acetate treatment on subchondral bone in the equine carpus. *Equine Vet J* **30**, 66-71.
- Kellgren, J.H. and Lawrence, J.S. (1957) Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* **16**, 494-502.
- Kim, H.K., Babyn, P.S., Harasiewicz, K.A., Gahunia, H.K., Pritzker, K.P. and Foster, F.S. (1995) Imaging of immature articular cartilage using ultrasound backscatter microscopy at 50 MHz. *J Orthop Res* **13**, 963-70.

- Laasanen, M.S., Saarakkala, S., Toyras, J., Hirvonen, J., Rieppo, J., Korhonen, R.K. and Jurvelin, J.S. (2003a) Ultrasound indentation of bovine knee articular cartilage in situ. *J Biomech* **36**, 1259-67.
- Laasanen, M.S., Toyras, J., Hirvonen, J., Saarakkala, S., Korhonen, R.K., Nieminen, M.T., Kiviranta, I. and Jurvelin, J.S. (2002) Novel mechano-acoustic technique and instrument for diagnosis of cartilage degeneration. *Physiol Meas* **23**, 491-503.
- Laasanen, M.S., Toyras, J., Vasara, A.I., Hyttinen, M.M., Saarakkala, S., Hirvonen, J., Jurvelin, J.S. and Kiviranta, I. (2003b) Mechano-acoustic diagnosis of cartilage degeneration and repair. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 2**, 78-84.
- Leach, R.E., Gregg, T. and Siber, F.J. (1970) Weight-bearing radiography in osteoarthritis of the knee. *Radiology* **97**, 265-8.
- Li, J., Zhong, Z., Lidtke, R., Kuettner, K.E., Peterfy, C., Aliyeva, E. and Muehleman, C. (2003) Radiography of soft tissue of the foot and ankle with diffraction enhanced imaging. *J Anat* **202**, 463-70.
- Loeuille, D., Olivier, P., Mainard, D., Gillet, P., Netter, P. and Blum, A. (1998) Review: Magnetic resonance imaging of normal and osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* **41**, 963-75.
- Lozada, C.J. and Altman, R.D. (2001a) New and investigational therapies for osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 447-56.
- Lozada, C.J. and Altman, R.D. (2001b) Management of osteoarthritis. In: *Arthritis and allied conditions* 14th edn. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 2246-63.
- Mainil-Varlet, P., Aigner, T., Brittberg, M., Bullough, P., Hollander, A., Hunziker, E., Kandel, R., Nehrer, S., Pritzker, K., Roberts, S. and Stauffer, E. (2003) Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 2**, 45-57.
- Manek, N.J. and Lane, N.E. (2001) Baseline program. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 361-70.
- 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**, 523-37.
- Martel, W., Adler, R.S., Chan, K., Niklason, L., Helvie, M.A. and Jonsson, K. (1991) Overview: New Methods in Imaging Osteoarthritis. *Journal of Rheumatology* **18**, 32-7.
- Martinez, S.A. (1997) Congenital conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **27**, 735-58.
- Martinez, S.A. and Coronado, G.S. (1997) Acquired conditions that lead to osteoarthritis in the dog. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **27**, 759-75.

- Mazzuca, S.A., Brandt, K.D. and Katz, B.P. (1997) Is conventional radiography suitable for evaluation of a disease-modifying drug in patients with knee osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* **5**, 217-26.
- McDonnell, C.H., 3rd, Jeffrey, R.B., Jr., Bjorkengren, A.G. and Li, K.C. (1992) Intraarticular sonography for imaging the knee menisci: evaluation in cadaveric specimens. *AJR Am J Roentgenol* **159**, 573-4.
- Meachim, G. (1972) Light microscopy of Indian ink preparations of fibrillated cartilage. *Ann Rheum Dis* **31**, 457-64.
- Modest, V.E., Murphy, M.C. and Mann, R.W. (1989) Optical verification of a technique for in situ ultrasonic measurement of articular cartilage thickness. *J Biomech* **22**, 171-6.
- Mow, V.C. and Ratcliffe, A. (1997) Structure and function of articular cartilage and meniscus. In: *Basic Orthopaedic Biomechanics* 2nd edn. WC Hayes, editor. Lippincott-Raven, Philadelphia. pp 113-77.
- Mow, V.C. and Hung, C.T. (2003) Mechanical properties of normal and osteoarthritic articular cartilage, and the mechanobiology of chondrocytes. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 102-12.
- Muehleman, C., Mollenhauer, J.A., Aurich, M.F., Kuettner, K.E., Zhong, Z., Cole, A. and Chapman, D. (2002) Diffraction enhanced x-ray imaging of articular cartilage. In: *The many faces of osteoarthritis*. KE Kuettner, editor. Birkäuser, Basel. pp 351-4.
- Myers, S.L. (2003) Ultrasonography. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 462-8.
- Myers, S.L., Dines, K., Brandt, D.A., Brandt, K.D. and Albrecht, M.E. (1995) Experimental assessment by high frequency ultrasound of articular cartilage thickness and osteoarthritic changes. *J Rheumatol* **22**, 109-16.
- Nieminen, H.J., Toyras, J., Rieppo, J., Nieminen, M.T., Hirvonen, J., Korhonen, R. and Jurvelin, J.S. (2002) Real-time ultrasound analysis of articular cartilage degradation in vitro. *Ultrasound Med Biol* **28**, 519-25.
- Oegema, T.R. and Visco, D.M. (1999) Animal models of osteoarthritis. In: *Animal models in orthopaedic research*. RJ Friedman, editor. CRC Press, Boca Raton. pp 349-67.
- Olmstead, M.L. (1987) Total hip replacement. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **17**, 943-55.
- 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**, 208-13.
- Palmer, N. (1993) Diseases of joints. In: *Pathology of domestic animals* 4th edn. N Palmer, editor. Academic Press Inc., San Diego. pp 138-81.
- 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.

- Pellaumail, B., Watrin, A., Loeuille, D., Netter, P., Berger, G., Laugier, P. and Saied, A. (2002) Effect of articular cartilage proteoglycan depletion on high frequency ultrasound backscatter. *Osteoarthritis Cartilage* **10**, 535-41.
- Peterfy, C.G. (1998) Imaging techniques. In: *Rheumatology* 2nd edn. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 14.1-8.
- Peterfy, C.G. (2002) Imaging cartilage changes in osteoarthritis. In: *The many faces of osteoarthritis*. KE Kuettner, editor. Birkäuser, Basel. pp 329-50.
- Peterfy, C.G. (2003) Magnetic resonance imaging. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 433-51.
- Peterfy, C.G. and Genant, H.K. (2001) Magnetic resonance imaging in arthritis. In: *Arthritis and allied conditions* 14th edn. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 118-54.
- Poole, A.R. (1999) An introduction to the pathophysiology of osteoarthritis. *Front Biosci* **4**, D662-70.
- Poole, A.R. (2001) Cartilage in health and disease. In: *Arthritis and allied conditions* 14th edn. WJ Koopman, editor. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. pp 226-84.
- Poole, A.R. and Howell, D.S. (2001) Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 29-47.
- Pritzker, K.P. (2003) Pathology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 49-58.
- Rosenberg, A. (1999) Bones, joints, and soft tissue tumors. In: *Pathologic basis of disease* 6th edn. T Collins, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 1215- 68.
- Rossdale, P.D., Hopes, R., Wingfield Digby, N.J. and Offord, K. (1985) Epidemiological study of wastage among racehorses 1982 and 1983. *Veterinary Record* **116**, 66-9.
- Rovati, L.C. (1999) Radiographic assessment. Introduction: existing methodology. *Osteoarthritis Cartilage* **7**, 427-9.
- Rushfeldt, P.D., Mann, R.W. and Harris, W.H. (1981) Improved techniques for measuring in vitro the geometry and pressure distribution in the human acetabulum--I. Ultrasonic measurement of acetabular surfaces, sphericity and cartilage thickness. *J Biomech* **14**, 253-60.
- Saarakkala, S., Laasanen, M.S., Jurvelin, J.S., Torronen, K., Lammi, M.J., Lappalainen, R. and Toyras, J. (2003) Ultrasound indentation of normal and spontaneously degenerated bovine articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **11**, 697-705.
- Saied, A., Cherin, E., Gaucher, H., Laugier, P., Gillet, P., Floquet, J., Netter, P. and Berger, G. (1997) Assessment of articular cartilage and subchondral bone: subtle and progressive changes in experimental osteoarthritis using 50 MHz echography in vitro. *J Bone Miner Res* **12**, 1378-86.

- Santé Canada. L'arthrite au Canada, une bataille à gagner. Ottawa: Santé Canada; 2003.
- Senzig, D.A., Forster, F.K. and Olerud, J.E. (1992) Ultrasonic attenuation in articular cartilage. *J Acoust Soc Am* **92**, 676-81.
- Sharma, L. (2001) Epidemiology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 3-27.
- Sherar, M.D., Noss, M.B. and Foster, F.S. (1987) Ultrasound backscatter microscopy images the internal structure of living tumour spheroids. *Nature* **330**, 493-5.
- Sherar, M.D., Starkoski, B.G., Taylor, W.B. and Foster, F.S. (1989) A 100 MHz B-scan ultrasound backscatter microscope. *Ultrason Imaging* **11**, 95-105.
- Simkin, P.A. (1998) The musculoskeletal system. In: *Rheumatology* 2nd edn. PA Dieppe, editor. Mosby, London. pp 1.9.1-12.
- Simkin, P.A. (2003) Synovial physiology in the context of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 155-61.
- Simon, L.S. and Strand, V. (2001) The pharmacologic treatment of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 371-91.
- Smith, M.M. and Ghosh, P. (2001) Experimental models of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis, Diagnosis and Medical/Surgical management* 3rd edn. VM Goldberg, editor. W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 171-99.
- Tan, A.L., Wakefield, R.J., Conaghan, P.G., Emery, P. and McGonagle, D. (2003) Imaging of the musculoskeletal system: magnetic resonance imaging, ultrasonography and computed tomography. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **17**, 513-28.
- Todhunter, R.J. and Lust, G. (1990) Pathophysiology of synovitis: clinical signs and Examination in horses. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* **12**, 980-92.
- Toyras, J., Rieppo, J., Nieminen, M.T., Helminen, H.J. and Jurvelin, J.S. (1999) Characterization of enzymatically induced degradation of articular cartilage using high frequency ultrasound. *Phys Med Biol* **44**, 2723-33.
- Toyras, J., Laasanen, M.S., Saarakkala, S., Lammi, M.J., Rieppo, J., Kurkijarvi, J., Lappalainen, R. and Jurvelin, J.S. (2003) Speed of sound in normal and degenerated bovine articular cartilage. *Ultrasound Med Biol* **29**, 447-54.
- Toyras, J., Nieminen, H.J., Laasanen, M.S., Nieminen, M.T., Korhonen, R.K., Rieppo, J., Hirvonen, J., Helminen, H.J. and Jurvelin, J.S. (2002) Ultrasonic characterization of articular cartilage. *Biorheology* **39**, 161-9.
- Trattng, S., Mlynarik, V., Breitenseher, M., Huber, M., Zembsch, A., Rand, T. and Imhof, H. (1999) MRI visualization of proteoglycan depletion in articular cartilage via intravenous administration of Gd-DTPA. *Magn Reson Imaging* **17**, 577-83.

- Trotter, G.W. and McIlwraith, C.W. (1996) Clinical features and diagnosis of equine joint disease. In: *Joint disease in the horse*. T G.W., editor. Saunders, Philadelphia. pp 120-45.
- van der Sluijs, J.A., Geesink, R.G., van der Linden, A.J., Bulstra, S.K., Kuyper, R. and Drukker, J. (1992) The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *J Orthop Res* **10**, 58-61.
- Vignon, E., Bejui, J., Mathieu, P., Hartmann, J.D., Ville, G., Evreux, J.C. and Descotes, J. (1987) Histological cartilage changes in a rabbit model of osteoarthritis. *J Rheumatol* **14 Spec No**, 104-6.
- 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.
- Watt, I. and Doherty, M. (2003) Plain radiographic features of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis* 2nd edn. LS Lohmander, editor. Oxford university press, New York. pp 211-25.
- Wayne, J.S., Kraft, K.A., Shields, K.J., Yin, C., Owen, J.R. and Disler, D.G. (2003) MR imaging of normal and matrix-depleted cartilage: correlation with biomechanical function and biochemical composition. *Radiology* **228**, 493-9.
- Yao, J.Q. and Seedhom, B.B. (1999) Ultrasonic measurement of the thickness of human articular cartilage in situ. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 1269-71.
- Yoshioka, M., Coutts, R.D., Amiel, D. and Hacker, S.A. (1996) Characterization of a model of osteoarthritis in the rabbit knee. *Osteoarthritis Cartilage* **4**, 87-98.

