



**HAL**  
open science

# Bases moléculaires et physiopathologiques de l'ostéochondrose équine

Clémence Desjardin

► **To cite this version:**

Clémence Desjardin. Bases moléculaires et physiopathologiques de l'ostéochondrose équine. Biologie animale. AgroParisTech, 2013. Français. NNT : 2013AGPT0060 . tel-01141646

**HAL Id: tel-01141646**

**<https://pastel.hal.science/tel-01141646v1>**

Submitted on 13 Apr 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## Doctorat ParisTech

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

## L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Science de l'animal

*présentée et soutenue publiquement par*

**Clémence DESJARDIN**

le 8 Octobre 2013

## Bases moléculaires et physiopathologiques de l'ostéochondrose équine

Directeur de thèse : **Edmond CRIBIU**  
Co-encadrement de la thèse : **Laurent SCHIBLER**

### Jury

**M. Francis BERENBAUM**, Pr, AP-HP Hôpital Saint Antoine  
**M. Daniel VAIMAN**, Dr INSERM  
**M. Benoit BOYER**, Dr, Clinique Vétérinaire de Genainville  
**M. Frédéric FLAMANT**, Dr, CNRS  
**M. Thomas HEAMS**, Dr, GABI, AgroParisTech  
**M. Eric PALMER**, Dr, Cryozoothec  
**M. Laurent SCHIBLER**, Dr, GABI, INRA  
**M. Edmond CRIBIU**, Dr, GABI, INRA

PUPH  
DR  
Vet  
DR  
MC  
IR  
CR1  
DR

## **RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS**

### **BASES MOLECULAIRES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DE L'OSTEOCHONDROSE EQUINE**

L'ostéochondrose (OC) est une affection ostéo-articulaire juvénile caractérisée par une perturbation locale de la maturation du cartilage créant des zones de fragilité. L'OC a été décrite chez de nombreuses espèces dont l'Homme, le Chien, le Porc, le Poulet et le Cheval. Chez le cheval les lésions s'installent progressivement, sans symptômes, avant l'âge d'un an et les manifestations cliniques ne se manifestent que tardivement, souvent à l'entraînement. L'OC affecte 10 à 30 % de la population équine représentant ainsi un souci majeur pour la filière tant sur le plan du bien être animal que sur le plan économique. Son étiologie, multifactorielle, est encore mal comprise et implique des composantes génétiques et environnementales ainsi que traumatiques.

Les objectifs des travaux présentés étaient d'améliorer la compréhension de la physiopathologie de l'OC équine et de mettre en évidence les processus biologiques perturbés. L'ensemble des résultats a permis de préciser la définition des différentes entités de l'OC et pourraient également être pertinentes dans l'amélioration du diagnostic et le développement de nouveaux traitements. Un défaut constitutif de l'os et du cartilage a été mis en évidence chez les individus atteints d'OC, notamment associé à une perturbation du métabolisme énergénique et un stress du reticulum endoplasmique. De plus, selon le type de lésions, des mécanismes moléculaires sous-jacents différents sont impliqués dans leur développement. D'autre part, les microARNs (miRNAs) semblent également jouer un rôle dans la physiopathologie de l'OC et certains d'entre eux pourraient constituer de bonnes cibles thérapeutiques ou être utilisés comme biomarqueurs diagnostics.

**MOTS CLES : Ostéochondrose équine, physiopathologie, Omics, mécanismes moléculaires, cartilage, hormones thyroïdiennes**

## RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS

### MOLECULAR AND PHYSIOPATHOLOGICAL BASIS OF EQUINE OSTEOCHONDROSIS

#### ABSTRACT

Osteochondrosis (OC) is a juvenile osteo-articular disease characterized by a focal failure of cartilage maturation leading to weak areas. OC has been described in several species including Human, Dog, Swine, Poultry and Horse. In horse, lesions develop gradually without symptoms before one year old and clinical manifestations occur tardily during training. OC affects 10 to 30% of equine population and constitutes a major concern in terms of animal welfare and economy. Its multifactorial etiology remains poorly understood and involved several factors including genetics, environment and traumas.

The aim of this current work was to improve the comprehension of equine OC physiopathology and highlight biological pathways disrupted. Taken together, our results made it possible to refine the definition of OC entities and our data could be relevant to improve diagnosis and develop new therapies. A constitutive defect was found in cartilage and bone of OC-affected horses and particularly a defective energy metabolism and a endoplasmic reticulum stress. Moreover, in function of lesion type, different underlying molecular mechanisms are involved in their development. Secondly, mircoRNAs (miRNAs) seem to take part in the OC physiopathology and some miRNAs could constitute a relevant therapeutic target or be used as diagnosis biomarkers.

**KEY WORDS :** Equine osteochondrosis, physiopathology, Omics, molecular mechanism, cartilage, thyroid hormone



## REMERCIEMENTS

On y est le plus difficile reste à écrire : les remerciements...

L'histoire a débutée il y a quatre ans lors de mon deuxième jour de stage de Master: « Rendez-vous lundi à trois heures du matin au labo pour aller à l'abattoir de Blois faire des prélèvements d'os et de cartilage et n'oublie pas de prendre des bottes ». Merci Laurent pour cette étape de bizutage passée plus ou moins avec courage et brio (plutôt moins d'ailleurs), mes bottes roses s'en souviennent encore ! Et, il va de soit, tout le monde se souvient de mes bottes roses, même ceux qui n'étaient pas présents à l'abattoir... Quelques mois plus tard, je me retrouve dans une salle devant une bonne dizaine chercheurs et autres professeurs : « vous avez dix minutes mademoiselle ! ». Je dois défendre mon projet de thèse. Comme à mon habitude je raconte mon histoire à toute vitesse puis les minutes s'étant écoulées arrive la question subsidiaire, la taille du génome du cheval. Et ce fût LA question (sans réponse de ma part...) qui me colla à la peau pendant les trois années suivantes... Cette question a bien failli me coûter très chère mais au final j'ai eu une bourse... Bref, j'ai eu une bourse de thèse et l'aventure a commencée ainsi.

Il s'en est passé des choses pendant ces trois années et il a forcément des petites anecdotes qu'on ne peut pas oublier. Mes bottes roses et la taille du génome du cheval en fond parti.

Je souhaite remercier tout d'abord Gérard Guérin, sans qui je n'aurai pas pu faire mon stage de Master au sein de l'équipe BIGE. Merci également à Laurent de m'avoir permis de faire cette thèse. Je sais que tu as eu beaucoup de sueurs froides à cause de mon archivage des données dans mon ordi, de ma façon de m'y prendre avec l'informatique en générale d'ailleurs et de ma capacité à faire disparaître des fichiers. Comme tout le sait, ce n'est pas de ma faute, c'est mon ordi qui ne comprend rien. Mais tu auras quand même réussi certaines missions impossibles dont m'apprendre à utiliser Access et me faire autopsier des chevaux. Tu as dépensé beaucoup d'énergie et de temps pour m'accompagner pendant ces trois années, je ne te remercierais jamais assez !

Merci aussi à Edmond d'avoir été mon directeur de thèse, de m'avoir soutenu et conseillé quotidiennement tant sur mon travail que sur un plan plus personnel. Merci également à Thomas Heams d'avoir accepté d'être mon tuteur pédagogique au cours de ces trois années.

Cette thèse, c'était aussi nos aventures lyonnaises dans la salle d'autopsie du petit bonhomme avec Julie, Mat, Xav et les Tagadas Pink (merci Laurent). Merci donc à Mathieu pour son rire communicatif dans les moments les plus durs (non pas la tête....!) et dans les moments plus sympas autour d'une salade pour moi, d'un verre de vin et de deux desserts au chocolat pour toi ! En revanche je ne vous remercie pas (toi et Xav) d'avoir balancé à tout le monde le surnom de « Poupoune ». Déjà que je suis blonde, alors une Poupoune blonde c'est encore moins crédible.

Merci aussi à Julie pour tous les bons moments passés à Lyon et sur les courses d'endurance, surtout à Corlay (spéciale dédicace). Ces journées passées à mesurer, peser et photographier des chevaux sous la pluie ou sous 35 degrés ça ne s'oublie pas. Ces longs moments d'attente, surtout à Uzès, n'auraient pas été aussi agréables sans Mailys et Caro et la visite mythique chez Haribo ! Merci pour tout Mailys, pour ta bonne humeur, pour nos discussions autour d'un café-vanille et pour avoir rangé mon bureau (je n'imagine pas ta tête si tu le voyais en ce moment). Merci aussi pour ton aide précieuse pour les manips, pour l'animalerie et pour tous les moments passés ensemble au labo, pendant les longs trajets en voiture ou au fin fond de la Bretagne en aspirant des chevaux. Merci aussi à Caro d'avoir été à mes côtés et de m'avoir remonté le moral pendant les périodes difficiles.

Mon séjour à L'INRA, c'était aussi les pauses cafés avec les blagues de Pascal, les histoires d'Edmond et les discussions chaussures, sacs et vernis avec Julie, Caro, Maily, Maria, Rachel et Anne (à qui j'ai promis mille fois d'aller courir avec elle...). Merci donc à vous toutes pour ces pauses revitalisantes et pour m'avoir écouté râler pour un oui ou pour un non. Maria, je te remercie aussi pour nos virées à Vélizy 2 et pour les bons plans de commande pour les fringues. Anne, un jour promis, j'irai faire un marathon avec toi mais à ma façon : je t'accompagne sur quelques kilomètres puis j'irai t'attendre à ligne d'arrivée pour te féliciter ! Merci aussi à Chechel de m'avoir écouté me plaindre (trop souvent) et pour les délicieux crumbles aux pommes de Normandie.

D'un point vue plus « manip » et pratique, je tiens à remercier ceux qui m'ont permis d'obtenir tous mes résultats. Merci donc aux BIGE's pour leur aide, leurs conseils et leur soutien sans faille. Merci aussi à Thierry de m'avoir accueilli au Moulon. La protéomique avec l'os et le cartilage ce n'était pas gagné d'avance mais grâce à ta persévérance on a réussi ! Merci à Stéfan, Julie et Caro pour la partie histo et pour les très (très) nombreuses lames scannées. Merci à Jérôme sans qui les analyses de transcriptome n'auraient pas été possibles. Un double merci même car tu as eu la patience (et le courage) de nous supporter Maily et moi dans un état de stress maximum face aux puces de microarray. Merci à Sophie (et Christine) pour les images de MET qui sont magnifiques (surtout le petit ours). Ce fût vraiment plaisir de travailler avec toi et de découvrir avec des yeux d'enfant émerveillé l'ultrastructure de l'os et du cartilage, la MET c'est juste incroyable !

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont apporté, à leur manière, une pierre à cet édifice doctoral ! Merci donc à Linda pour son aide précieuse dans la rédaction des articles, Johan pour avoir géré de main de maître mes souris, Rachel pour la bioinfo, Sean pour les miRNAs, Denis et Florence pour les Stats, Michel et Benoit pour les analyses de protéomique, Frédéric, Cyril et Laurence pour l'étude des souris mais également Abdel pour sa bonne humeur (et pour m'avoir fait peur au moins cent fois en entrant dans le labo !). Merci aussi à Patricia pour son accueil chaleureux dans son bureau, son écoute et ses ragots. Merci aussi Pat de m'avoir accompagné (de temps en temps) à la gym !

Merci aussi à Sabrina, Sandrine, Dorothée, tous les Doc'J : Bérénice, les deux Romain, Chris, Aude, Laure, Paul, Cédric, Michou mais aussi Alice et Natacha.

Un merci tout particulier à ma famille et à Mauricio. Merci pour ton soutien, tes encouragements, ta patience, ton courage et tout le reste... Me supporter tous les jours n'est pas chose facile ! Merci à vous d'avoir cru en moi et de m'avoir aidé à surmonter des moments difficiles. Merci également à mes amis d'être toujours là pour moi. Les contraintes de la thèse ont fait que pour certains on ne s'est pas trop vu ces trois dernières années mais promis, on se rattrapera ! Bien évidemment je ne peux pas terminer ces remerciements (personnels) sans remercier mes chevaux et Chuck. Si l'on fait un très grand bon en arrière, c'est grâce (ou à cause) de ma rencontre avec mon premier poney que j'ai fait cette thèse. Merci donc à ma Poupoune (la vraie, la seule et l'unique !), mon Fafir et ma Prim d'avoir été (et d'être encore) mon oxygène le soir après le labo et de m'apporter tant de bonheur le week-end en concours.

Bien évidemment je n'aurai pas pu réaliser ma thèse sans financements. Merci donc à l'Agence Nationale de la Recherche d'avoir financé le projet Biocart.

Enfin, un grand merci aux rapporteurs de mon manuscrit, le Dr Daniel Vaiman et le Pr Francis Berenbaum et aux membres de mon jury : le Dr Benoit Boyer, le Dr Frédéric Flamant, le Dr Eric Palmer, le Dr Thomas Heams, le Dr Laurent Schibler et le Dr Edmond Cribiu.

Voilà, la fin de l'aventure est toute proche. Pour résumer, faire une thèse c'est beaucoup d'énergie, de persévérance, de remise en question et un peu de folie aussi. C'est

aussi un énorme enrichissement personnel et une grande satisfaction. Le chemin parcouru aura été long et sinueux mais si c'était à refaire, je le referai, c'était que du bonheur !

# AVANT-PROPOS

## Unité d'accueil

Département de Génétique Animale (GA) de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique (INRA)

Unité Mixte de Recherche 1313 de Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI)

Equipe Biologie Intégrative et Génétique Equine (BIGE)

## Encadrement

Directeur de thèse: Docteur Edmond Paul CRIBIU

Co-Encadrant : Docteur Laurent Schibler

## Cadre et financement

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une bourse de l'Ecole Doctorale ABIES (AgroParisTech). Les travaux ont été en grande partie financés par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du projet Biocart (ANR-09-GENM-006).

## TABLE DES MATIERES

RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS .....	1
RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS .....	2
REMERCIEMENTS .....	3
AVANT-PROPOS .....	6
TABLE DES MATIERES .....	7
LISTE DES ABREVIATIONS .....	9
INTRODUCTION .....	10
1. Structure et développement des os long des vertébrés. ....	10
1.1. Anatomie des os longs .....	10
1.2. Le cartilage hyalin .....	11
1.2.1. Les chondrocytes.....	11
1.2.2. La matrice extracellulaire.....	13
1.3. La plaque de croissance. ....	16
1.4. Le cartilage articulaire. ....	17
1.5. Le tissu osseux.....	19
1.5.1. Les ostéoblastes (OB).....	19
1.5.2. Les ostéoclastes (OC).....	19
1.5.3. Formation de l'os. ....	21
1.6. Croissance des os long.....	22
2. Régulation de l'ossification endochondrale .....	24
2.1. Régulation endocrine de la plaque de croissance .....	24
2.1.1. Mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes.....	26
2.1.2. Rôle des hormones thyroïdiennes dans le développement du squelette .....	27
2.2. La voie IHH/PTHrP .....	29
2.3. Les Fibroblast Growth Factors (FGF).....	31
2.4. Les BMP (Bone Morphogenetic Protein).....	31
2.5. La voie WNT.....	34
2.6. Les facteurs de transcription .....	35
3. Pathogénie et physiopathologie de l'ostéochondrose. ....	35
3.1. Définition de l'OC chez le cheval.....	36
3.2. Diagnostic et traitements.....	37
3.2.1. Signes cliniques et radiologiques .....	37
3.2.2. Sites de prédilections.....	37
3.2.3. Classification des lésions.....	37
3.2.4. Marqueurs biologiques .....	38
3.2.5. Traitements.....	38
3.3. Etiologie.....	39

3.3.1.	Facteurs génétiques : hérabilité, prévalence et gènes candidats .....	40
3.3.2.	Croissance, corpulence et facteurs endocriniens .....	40
3.3.3.	Alimentation .....	40
3.3.4.	Stress mécaniques et traumatiques .....	41
3.4.	Physiopathologie de l'OC : différents modèles proposés.....	41
3.4.1.	Modèle d'une fragilité du cartilage et/ou de l'os .....	41
3.4.2.	Modèle d'une dyschondroplasie initiale .....	41
3.4.3.	Modèle d'une nécrose de l'os sous-chondral .....	42
3.4.4.	Modèle d'une nécrose ischémique du cartilage de croissance .....	42
3.4.5.	Mécanismes moléculaires .....	43
	RESULTATS .....	44
4.	Processus biologiques impliqués dans la physiopathologie de l'ostéochondrose équine. 44	
4.1.	Développement d'une méthode d'analyse protéomique de l'os et du cartilage	46
4.2.	Etude protéomique comparative de l'os sous-chondral et du cartilage épiphysaire de chevaux sains et atteints d'OC.....	52
4.3.	Etude transcriptomique comparative de l'os sous-chondral et du cartilage épiphysaire de chevaux sains et atteints d'OC.....	71
4.4.	Tentative de validation interrassiale des hypothèses biologiques émises par nos études intégratives.....	90
5.	Rôle des hormones thyroïdiennes dans la maturation du cartilage : rôle potentiel dans la physiopathologie de l'OC .....	111
5.1.	Présentation de la stratégie expérimentale.....	111
5.2.	Obtention de souris transgéniques TR $\alpha$ 1 <sup>L400R</sup> Crecol2a1 <sup>+/-</sup> et TR $\alpha$ 1 <sup>L400R</sup> Crecol1 <sup>+/-</sup>	111
5.3.	Etudes des modèles de souris TR $\alpha$ 1 <sup>L400R</sup> Crecol2a1 <sup>+/-</sup> et TR $\alpha$ 1 <sup>L400R</sup> Crecol1 <sup>+/-</sup>	112
	DISCUSSION GENERALE .....	113
	INTRODUCTION.....	141
1.	Vers une redéfinition de l'ostéochondrose (OC) équine ? .....	141
2.	Eclairage sur les mécanismes physiopathologiques.....	143
3.	Vers des applications directes pour la filière équine : Biomarqueurs et nouvelles thérapies .....	146
	CONCLUSION GENERALE .....	147
	LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	149
	BIBLIOGRAPHIE.....	150

## LISTE DES ABREVIATIONS

AOAJ : Affections osteo-articulaires juvéniles  
AS-OCF: Fragments ostéochondraux à la surface articulaire  
BMP : Bone Morphogenetic Protein  
BMPR : Bone Morphogenetic Protein Receptor  
COMP : Cartilage OligoMeric Protein  
DOD: Developmental Orthopaedic Disease  
FGF : Fibroblast Growth Factor  
Fzd : Frizzled  
GAGs : Glycosaminoglycanes  
HES: Hématoxyline-Eosine-Safranine  
IFCE : Institut Français du Cheval et de l'Équitation  
IHH : Indian Hedgehog  
JSBC : Kystes ostéochondraux juvéniles  
MEC : Matrice Extracellulaire Cartilagineuse  
MMP: Matrix Metalloproteinase  
OC : Ostéochondrose  
OCD : Ostéochondrose disséquante  
PA-OCF : Fragments ostéochondraux péri-articulaire  
PGs : Protéoglycanes  
PKC : protéine kinase C  
Ptc : Patched-1  
PTHrP: Parathyroid Hormone Related Protein  
QTL : Quantitative Trait Loci  
RISC: RNA-induced silencing complex  
TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

## INTRODUCTION

Le cheval est aujourd'hui essentiellement un animal de sport ou de loisir dont l'utilisation est directement liée à l'intégrité de son système locomoteur. Les articulations des chevaux sont soumises à de nombreuses contraintes biomécaniques et sont le siège de pathologies pouvant apparaître au cours du développement, pendant la croissance ou plus tard à l'entraînement. Parmi les pathologies articulaires courantes chez le cheval, les affections ostéo-articulaires juvéniles (AOAJ), définies comme un ensemble d'entités pathologiques diverses affectant le poulain en croissance, constituent un problème majeur tant sur un plan économique que sur le plan du bien être animal. La prévalence des AOAJ varie selon la race et l'âge des chevaux mais les différentes études menées en France ont établi une prévalence variant de 15 à 35% [1-3]. Parmi les AOAJ, l'ostéochondrose (OC) affecte 10 à 30 % de la population équine selon les races de chevaux et les articulations lésées.

Cette pathologie, affectant des articulations diarthrodiales immatures, a été décrite chez de nombreuses espèces dont l'Homme, le Chien, le Porc, le Poulet et le Cheval. Les individus atteints présentent des lésions ostéoarticulaires d'importance variable. Chez le cheval, plusieurs types de lésions cartilagineuses ont été décrits, dont des fragments cartilagineux ou flaps (ostéochondrite disséquante (OCD) et des kystes osseux sous-chondraux. Une classification histologique des lésions basée sur une échelle allant de 0 (cartilage normal) à 6 (présence d'une souris articulaire libre) a été proposée par Van de Lest et al. en 2004.[4] Cependant, cette classification ne distingue pas clairement ni les différents types de lésions et leur grande variabilité phénotypique, ni leur localisation, ce qui rend difficile toute étude comparée avec l'homme ou d'autres espèces.

Malgré les nombreuses études menées au cours des quinze dernières années chez le cheval, la pathogénie de l'OC demeure incertaine, et diverses hypothèses, qui seront développées par la suite, ont été suggérées. Une origine multifactorielle est communément admise et parmi les facteurs impliqués, citons une prédisposition génétique, des déséquilibres alimentaires, une croissance rapide, des traumatismes et des dérèglements endocriniens (hormone de croissance, insuline, IGF1, hormones thyroïdiennes).

Etant donné l'incidence majeure de l'ostéochondrose dans la population équine, le but de ma thèse était d'améliorer la compréhension de la pathogénie et de mettre en évidence les processus biologiques perturbés afin de faciliter le clonage positionnel des gènes de prédisposition à l'OC. Pour cela, j'ai développé deux approches distinctes : 1) une analyse intégrative des mécanismes moléculaires impliqués dans la prédisposition à l'OC, en combinant histologie, protéomique, métabolomique et transcriptomique du cartilage et de l'os sous-chondral de chevaux sains et atteints et 2) une analyse détaillée du rôle des hormones thyroïdiennes dans la maturation du cartilage à l'aide d'un modèle de souris transgénique présentant une mutation du récepteur TR $\alpha$ .

## 1. Structure et développement des os long des vertébrés.

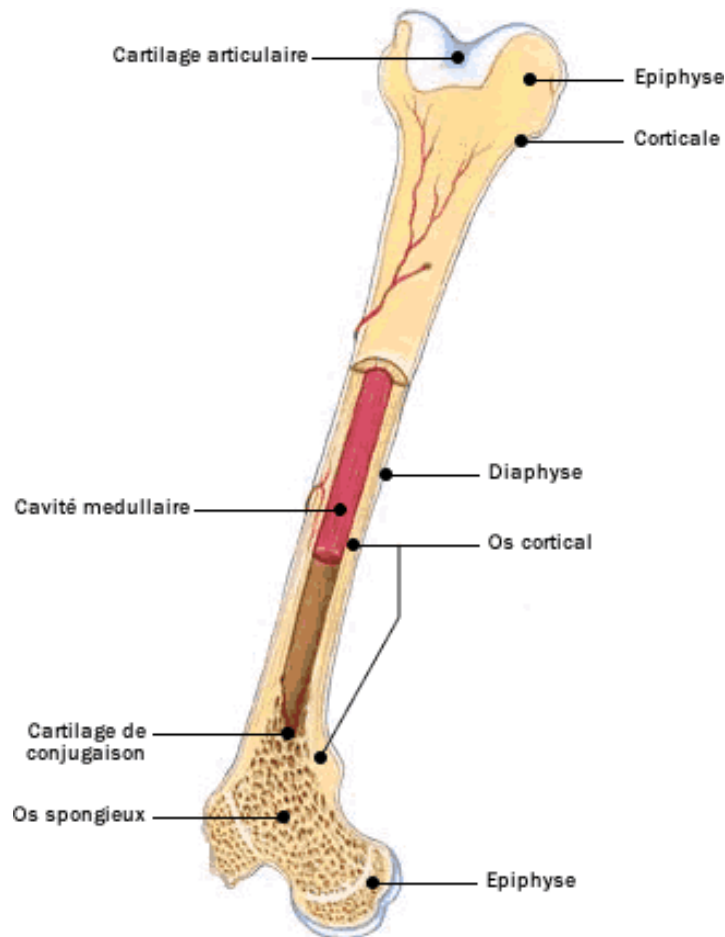
### 1.1. Anatomie des os longs

Les os longs des mammifères sont constitués d'une partie centrale, la diaphyse, cylindre creux limité par une couche épaisse d'os compact (porosité de 5 à 30 %) et dont la cavité médullaire centrale est composée de moelle rouge et de moelle jaune. Les épiphyses, localisées aux deux extrémités de la diaphyse, sont constituées d'os trabéculaire (porosité de 30 à 50 %) recouvert d'une fine couche d'os compact (figure 1). L'ensemble de l'os est recouvert par une membrane de tissu conjonctif doté d'un potentiel ostéogénique appelée périoste. Les zones de jonctions situées entre la diaphyse et les épiphyses constituent les



métaphyses et comportent durant la période de croissance une région de cartilage de conjugaison appelé également cartilage de croissance. Ce cartilage, responsable de la croissance en longueur des os longs, s'organise selon une structure particulière appelée plaque de croissance [5]. La surface de l'articulation est recouverte par du cartilage articulaire.

**Figure 1 : Anatomie d'un os long**



## 1.2. Le cartilage hyalin

Les cartilages de croissance et articulaire sont constitués de cartilage hyalin, un tissu composé de chondrocytes enchâssés dans une abondante matrice extracellulaire (MEC) lui conférant élasticité et solidité.

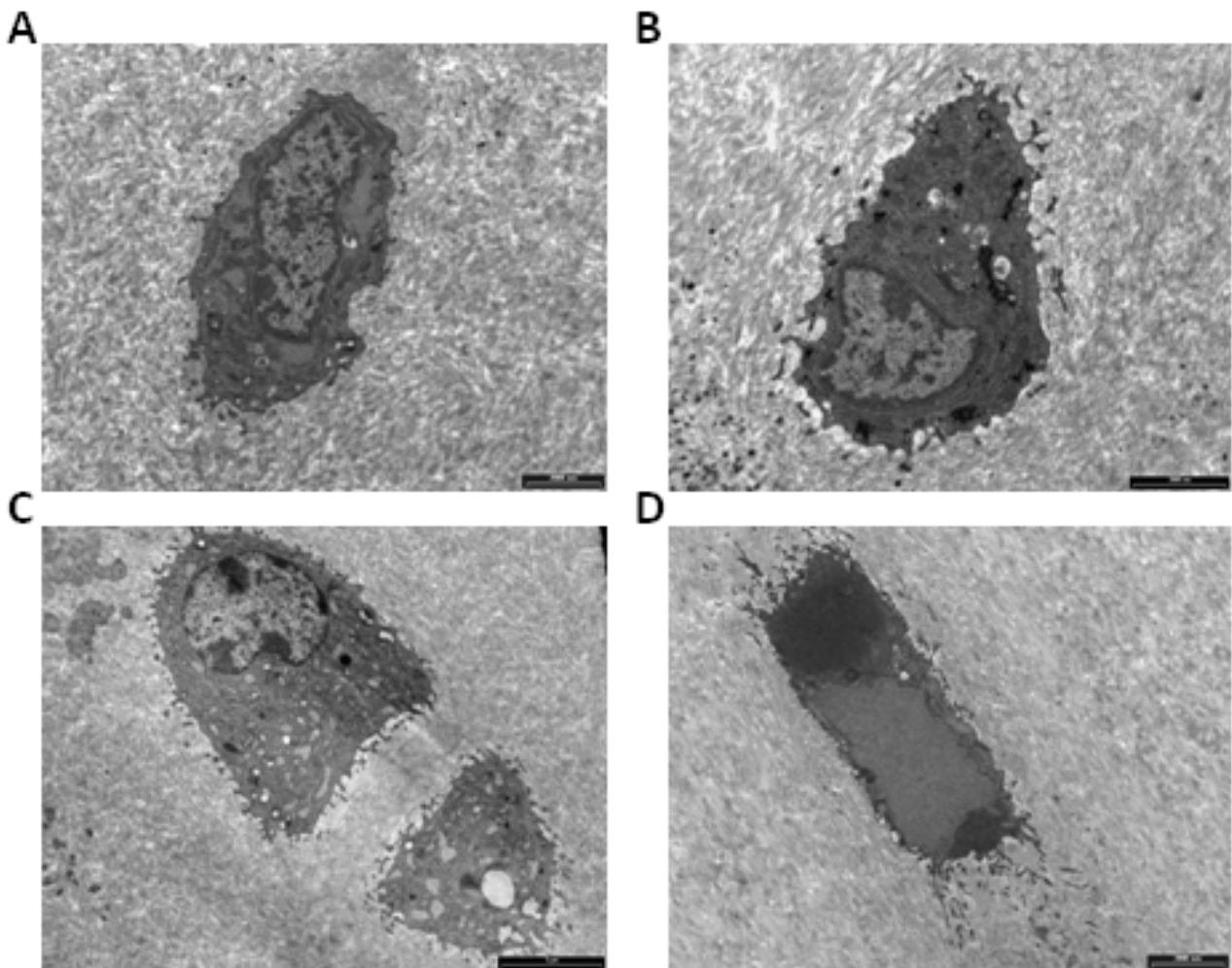
### 1.2.1. Les chondrocytes

D'origine mésenchymateuse, ils dérivent de cellules souches pluripotentes communes aux ostéoblastes, fibroblastes, myocytes et adipocytes. Ce sont des cellules sphériques constituées d'un noyau volumineux et d'un cytoplasme basophile riche en réticulum endoplasmique granuleux, en lipides et en glycogène, avec un appareil de Golgi développé et de nombreux lysosomes et mitochondries, traduisant un rôle sécrétoire majeur. Ils occupent environ 10% du volume total du cartilage et jouent un rôle dans le maintien de

l'intégrité de la matrice extracellulaire (MEC), en particulier en réponse aux contraintes biomécaniques auxquelles sont soumises les articulations. En effet, les chondrocytes synthétisent les principaux composants de la MEC ou participent à sa dégradation *via* la production de métalloprotéases (MMPs, TIMP1, cathepsines), de hyaluronidases ou de collagénases. Les chondrocytes ont également un rôle autocrine et paracrine *via* la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance tels le VEGF.

Les chondrocytes subissent un processus de maturation, qui se traduit par des modifications morphologiques (figure 2) et fonctionnelle, donnant naissance à des régions distinctes au sein du cartilage (zone de réserve, proliférative et hypertrophique). Ces régions seront décrites par la suite dans le paragraphe détaillant l'organisation de la plaque de croissance.

**Figure 2 : Morphologie des différents types de chondrocytes**



*Images de chondrocytes obtenues par microscopie électronique à transmission (MET).  
Grossissement x 3000.*

*A : Chondrocyte de réserve ; B : chondrocyte prolifératif ; C : chondrocytes hypertrophiques ;  
D : chondrocyte dégénératif*

## 1.2.2. La matrice extracellulaire

La MEC est principalement composée d'eau (65-80%), de fibres de collagènes (55% du poids sec), de protéines non collagéniques (12% du poids sec) et de glycosaminoglycanes (GAGs, 20% du poids sec). Le réseau de collagènes confère la résistance à la traction du cartilage, alors que les GAGs et les protéoglycanes sont responsables de sa viscosité et de ses propriétés élastiques.

- Les collagènes

Chaque molécule de collagène est composée de trois chaînes peptidiques combinées en homotrimères ou en hétérotrimères. Les collagènes II, VI, IX, X et XI sont les principaux collagènes du cartilage, le collagène II étant le plus abondant (~80%). Les collagènes IX et XI constituent respectivement 3% et 10%, les 7% restant étant constitués des collagènes VI et X.

Le collagène II forme la structure de base des fibrilles du cartilage qui sont organisées en un réseau tridimensionnel. Le collagène XI, lié de façon covalente au collagène II, est retrouvé à l'intérieur des fibrilles alors que le collagène de type IX est localisé à l'extérieur de celles-ci. Le collagène VI est principalement localisé à la surface du cartilage articulaire ainsi que dans l'espace péri-cellulaire, suggérant un rôle dans l'adhérence des chondrocytes à la MEC. Le collagène de type X est uniquement présent autour des chondrocytes hypertrophiques, formant ainsi un tapis autour de ceux-ci [6].

- Les GAGs et les protéoglycanes

Les GAGs sont constitués de longues chaînes linéaires disaccharidiques, composées de la répétition d'un diholoside de base (glucosamine ou galactosamine) et d'un autre ose (acide glucuronique, galactose). Les principaux GAGs sont l'acide hyaluronique (non sulfaté et non fixé à une protéine centrale), (figure 3-A), le chondroïtine sulfate, le kératane sulfate et l'héparane sulfate.

Mis à part l'acide hyaluronique, les GAGs sont branchés sur des protéines axiales porteuses (« core protéine ») pour former des protéoglycanes (PG) (figure 3-B) comportant un ou plusieurs GAGs. Ces monomères de PG viennent se brancher sur une longue chaîne d'acide hyaluronique pour former des polymères de PG de poids moléculaire de plusieurs millions. Cet amarrage est stabilisé par des protéines de liaison.

Les protéoglycanes, *via* les charges négatives portées par les GAG, peuvent capter les ions  $Ca^{++}$  et  $Na^{+}$  et retenir l'eau dans le cartilage, lui conférant ainsi ses propriétés mécaniques. L'aggrécane (220 kDa), le principal PG du cartilage, forme des agrégats et joue un rôle prépondérant dans la régulation de la pression osmotique. Des protéoglycans de petite taille, dont le syndécan, le glypican, la décorine, la fibromoduline et le perlecan jouent également un rôle dans la chondrogenèse et la maturation du cartilage.

- Les autres constituants de la MEC

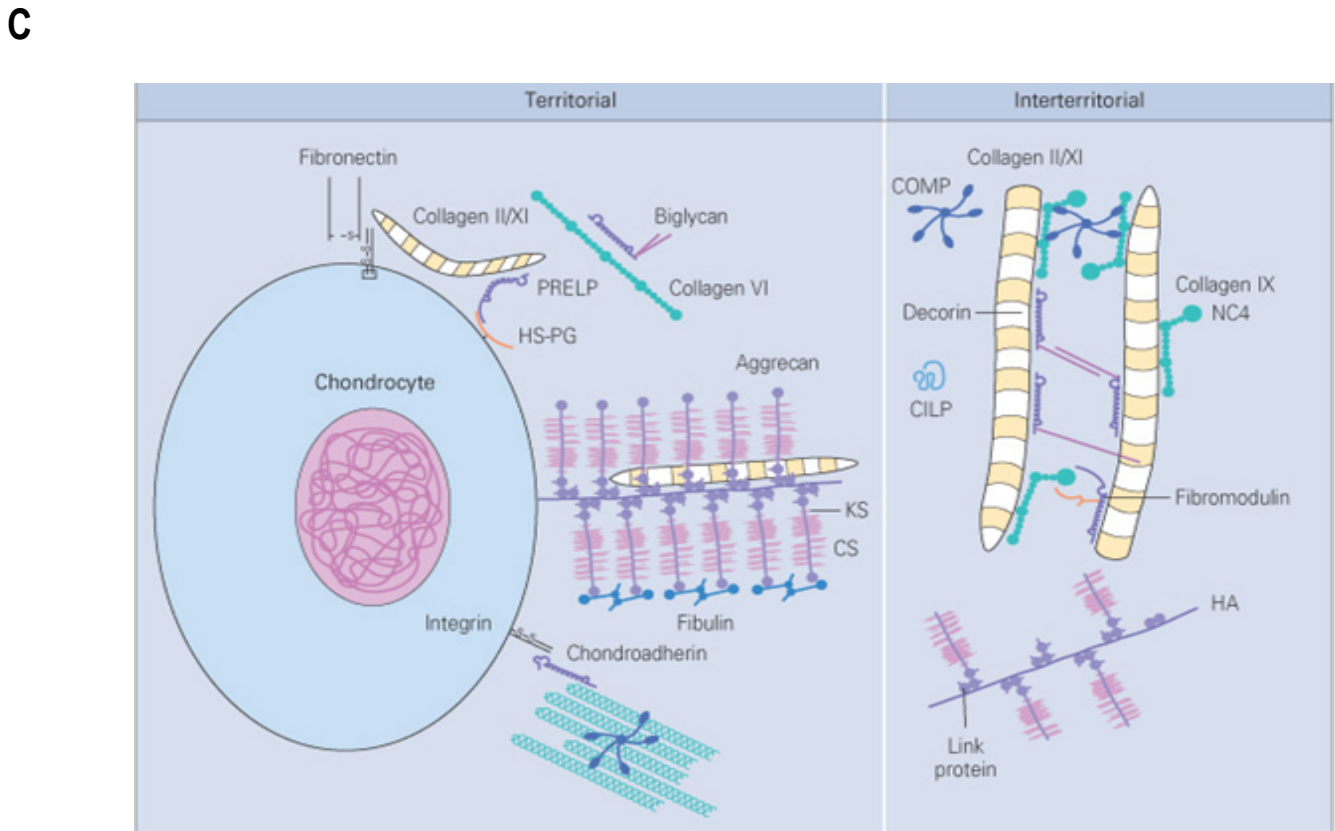
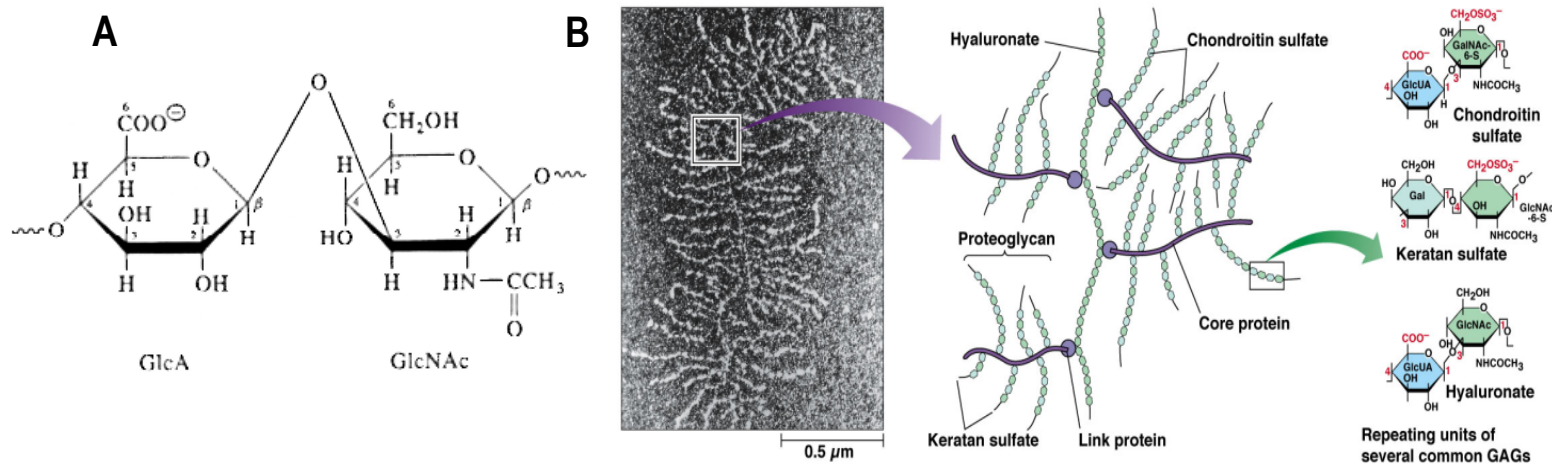
La MEC est également constituée de protéines non collagéniques appartenant à la famille des protéines d'adhérence comprenant notamment l'Annexine V, retrouvée à la surface des chondrocytes, la COMP (Cartilage Oligo Meric Protein), un marqueur de renouvellement de la MEC, la Thrombospondine, la Fibronectine et des Intégrines. En conditions physiologiques, la synthèse de ces protéines est modeste mais peut considérablement augmenter en conditions pathologiques. Ces protéines jouent un rôle important dans les interactions matrice-chondrocytes et chondrocytes-chondrocytes ainsi que dans les phénomènes d'adhésion et de migration des chondrocytes.

Les constituants de la MEC interagissent entre eux et avec d'autres molécules pour conférer à l'ensemble sa cohésion et sa résistance (figure 3-C). Les PG interagissent avec d'autres molécules telles que les collagènes, les glycoprotéines et l'acide hyaluronique. Ces interactions non covalentes sont de trois types : protéine - protéine, chaîne de GAG -

protéine, et entre les chaînes de GAG. Les petits PG, tels la décorine et la fibromoduline, s'associent aux fibres de collagène et en régulent la taille et le diamètre.

Globalement, la MEC constitue un support, module la biodisponibilité de divers facteurs de croissance essentiels à la maturation du cartilage et permet au cartilage de supporter les contraintes biomécaniques. Les interactions avec la MEC, notamment via des intégrines, permet également aux chondrocytes d'obtenir des informations sur leur environnement afin de maintenir l'homéostasie du tissu [7].

**Figure 3 : Composition et organisation de la Matrice Extracellulaire**



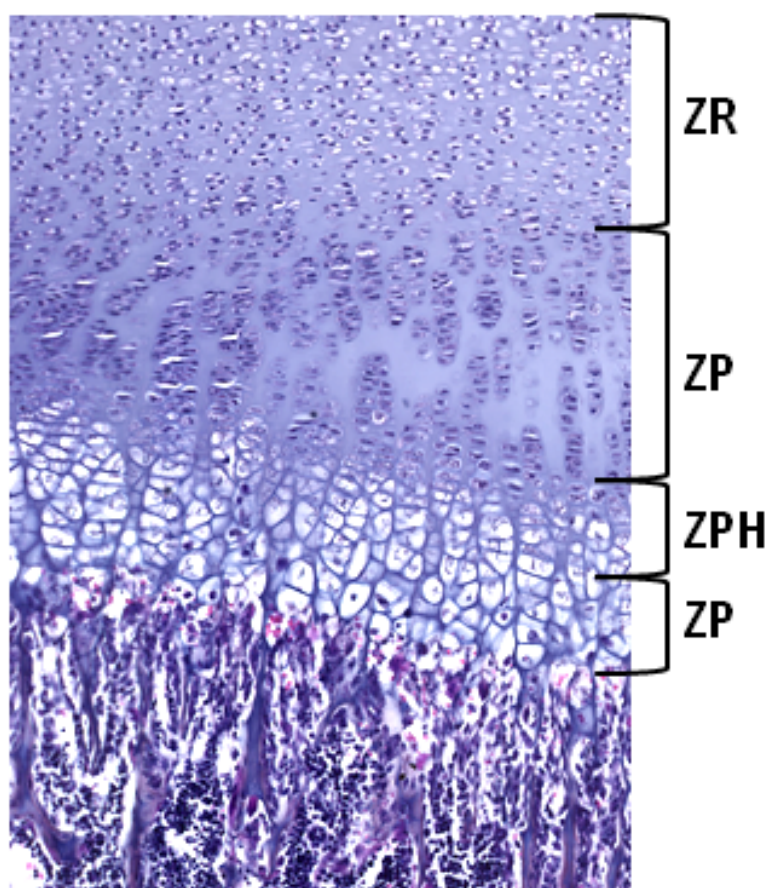
- A. Structure et composition des GAGs.** L'acide hyaluronique est un polymère d'environ 5000 unités disaccharidiques, composées d'un enchaînement d'acide glucuronique (GlcA) et de N-acétylglucosamine (GlcNac)
- B. Structure d'un protéoglycane et polymérisation des protéoglycanes :** les PGs sont composées d'un ou plusieurs GAGs branchés sur une protéine axiale (core protein). Les PGs sont branchés sur des molécules d'acides hyaluronique via des protéines de liaison (link protein)
- C. Organisation générale de la matrice extra-cellulaire.** Selon la distance par rapport aux chondrocytes (espace péri-cellulaire, territorial, interterritorial), la MEC est organisée de façon différente



### 1.3. La plaque de croissance.

La plaque de croissance comporte des chondrocytes à différents stades de différenciation, définissant 3 zones principales (figure4) :

**Figure 4 : Structure et organisation de la plaque de croissance**



*Coupe longitudinale de l'épiphyse fémorale d'une souris âgée de 8 jours.  
Coloration HES (Hématoxyline-Eosine-Safranine) grossissement X100.*

*La plaque de croissance est organisée en quatre zones : zone de réserve (ZR), zone proliférative (ZP), zone pré-hypertrophique (ZPH), zone hypertrophique (ZH).*

La zone de **réserve**, localisée près de l'épiphyse, est composée de chondrocytes immatures, de petite taille, isolés ou associés par deux et dispersés au sein d'une matrice abondante. La matrice contient du collagène de type II réparti sans orientation particulière et des vésicules contenant des protéoglycanes en amas. La concentration en calcium est basse et la pression partielle en oxygène y est faible.

La zone **proliférative**, est caractérisée par un empilement de chondrocytes prolifératifs formant des groupes isogéniques. Les chondrocytes apparaissent plus aplatis et sont organisés en colonnes longitudinales au sein d'une matrice moins abondante. Ils synthétisent majoritairement du collagène de type II, de l'agrécan et en plus faible quantité du collagène de type IX et XI ainsi que des protéines non collagéniques (cartilage oligomeric

matrix protein (COMP), matriline, chondroadherine, fibromoduline...). Au sein de la MEC, le taux de protéoglycanes est le plus élevé de la plaque de croissance, conséquence d'un taux de synthèse et d'un turnover important. La concentration en calcium est basse et les protéoglycanes inhibent la minéralisation de la MEC. La fréquence des divisions conditionne en grande partie la vitesse de croissance : chaque mitose allonge la colonne de 7  $\mu\text{m}$  et chaque nouvelle cellule synthétise 2000  $\mu\text{m}^3$  de matrice.

La zone **hypertrophique** est subdivisée en 3 zones dites de maturation, d'hypertrophie et de minéralisation. Elle est caractérisée par l'accroissement de la taille et du volume des chondrocytes, contribuant ainsi fortement à la croissance osseuse. Les chondrocytes synthétisent du collagène de type X et initient la minéralisation de la matrice extracellulaire par sécrétion de vésicules riches en phosphatase alcaline.

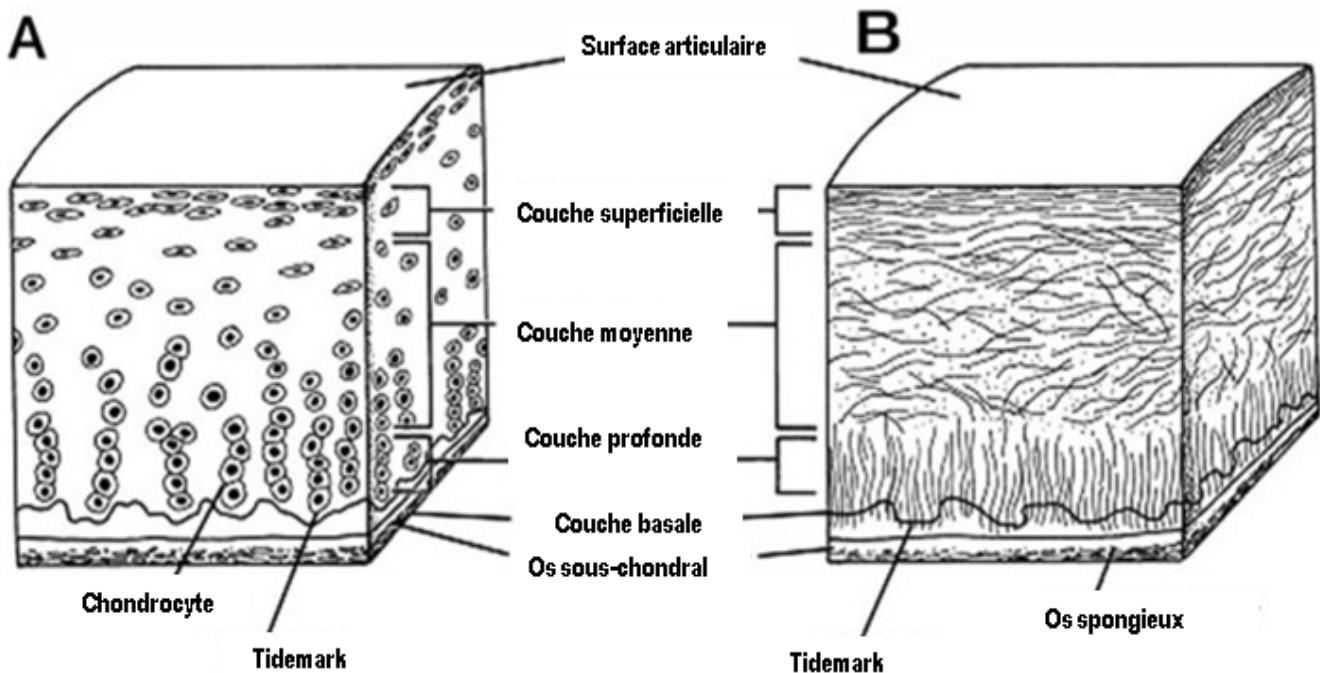
Les chondrocytes hypertrophiques en différenciation terminale sécrètent des métalloprotéinases (MMP9 et MMP13) qui vont de pré-dégrader la MEC et faciliter l'invasion vasculaire. Des facteurs comme IHH vont recruter les ostéoblastes tandis que la sécrétion du facteur de croissance endothélial (VEGF) a pour rôle d'initier l'invasion vasculaire et le recrutement des ostéoclastes. Les chondrocytes finissent par dégénérer au niveau du **front d'ossification**, selon un processus actuellement controversé. De nombreux auteurs ont décrit une disparition par apoptose, sur la base de la détection de cassure double brin de l'ADN ou d'autres caractéristiques moléculaires. De nouvelles études, basées sur des observations ultrastructurales suggèrent que les chondrocytes meurent en se désintégrant par un processus distinct de l'apoptose [8].

## 1.4. Le cartilage articulaire.

Le cartilage articulaire recouvre les deux extrémités épiphysaires des os et joue un rôle primordial dans la réalisation des mouvements. En effet, il assure une fonction dynamique en association avec le liquide synovial, permettant un bon glissement entre les pièces osseuses articulaires. Il assure également une fonction statique lui permettant d'assurer la transmission, la répartition et l'amortissement des différentes contraintes biomécaniques subies par les articulations (compression, cisaillement et étirement). Blanc nacré et lisse, il présente des variations d'épaisseur en fonction des articulations (supérieure pour les articulations des membres inférieurs) et des contraintes biomécaniques exercées. Les forces biomécaniques appliquées au niveau du cartilage articulaire se traduisent par des modifications physicochimiques notamment dans l'espace péri-cellulaire lui permettant, dans des conditions physiologiques, de maintenir son intégrité et ses fonctions [26]. Il a également été montré que ces différentes contraintes biomécaniques jouent un rôle majeur dans la maturation du cartilage et dans le turn-over de la MEC. Ainsi, les contraintes physiologiques permanentes entraînent une augmentation de l'anabolisme. A l'inverse, des charges biomécaniques trop importantes entraînent une diminution des synthèses, notamment des protéoglycanes, et peuvent conduire à la formation de fissurations du réseau collagénique.

Les chondrocytes présentent une organisation stratifiée, définissant quatre couches (figure 5) :

**Figure 5 : Représentation schématique de la structure et de l'organisation du cartilage articulaire**



*A. Organisation cellulaire selon les différentes couches ; B. Architecture des fibres de collagènes selon les différentes couches*

*D'après Alice J. Sophia Fox et al., 2009*

Au niveau de la couche superficielle (5-10% de l'épaisseur totale), les fibres de collagène de type II sont parallèles à la surface et orientées dans le sens des mouvements de l'articulation. Elles confèrent la résistance aux forces de cisaillement. Quelques chondrocytes de réserve sont présents, contraints d'adopter une forme ovale et aplatie dans les espaces inter-fibrillaires.

Dans la couche moyenne (50% de l'épaisseur), les fibres de collagènes sont enchevêtrées et orientées obliquement par rapport à la surface articulaire. Les chondrocytes de cette zone ont une forme plus arrondie. La quantité de protéoglycanes présentes dans cette zone est plus importante.

Dans la couche profonde (40% de l'épaisseur), l'organisation principale des fibres de collagène se fait perpendiculairement à la surface. Les chondrocytes montrent les signes d'activité cellulaire sans mitoses, souvent alignés en colonnettes perpendiculairement à la surface et entourés de halos fibreux, les chondrons, qui assurent la protection des chondrocytes face aux pressions.

Enfin, au niveau de la couche basale (3% de l'épaisseur), la matrice cartilagineuse calcifiée se démarque de la couche profonde par une ligne visible en histologie après coloration (la « tidemark ») qui correspond au front de calcification. Les chondrocytes conservent la



disposition en colonnettes et la jonction entre la couche basale et l'os sous-chondral est irrégulière, permettant l'ancrage du cartilage à la plaque osseuse.

Contrairement au cartilage de croissance où le processus de maturation est très actif, la maturation des chondrocytes articulaires est extrêmement lente, permettant toutefois de préserver l'épaisseur de cartilage[6].

## 1.5. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé, constitué de cellules dispersées dans une matrice extracellulaire abondante. Cette matrice osseuse est composée principalement de fibres de collagène de type I, de protéines non collagéniques (ostéonectine, ostéopontine, ostéocalcine) et d'hydroxyapatite de calcium conférant à l'os sa dureté et sa résistance. Deux types cellulaires principaux contribuent à sa formation et son maintien : les ostéoblastes et les ostéoclastes.

### 1.5.1. Les ostéoblastes (OB).

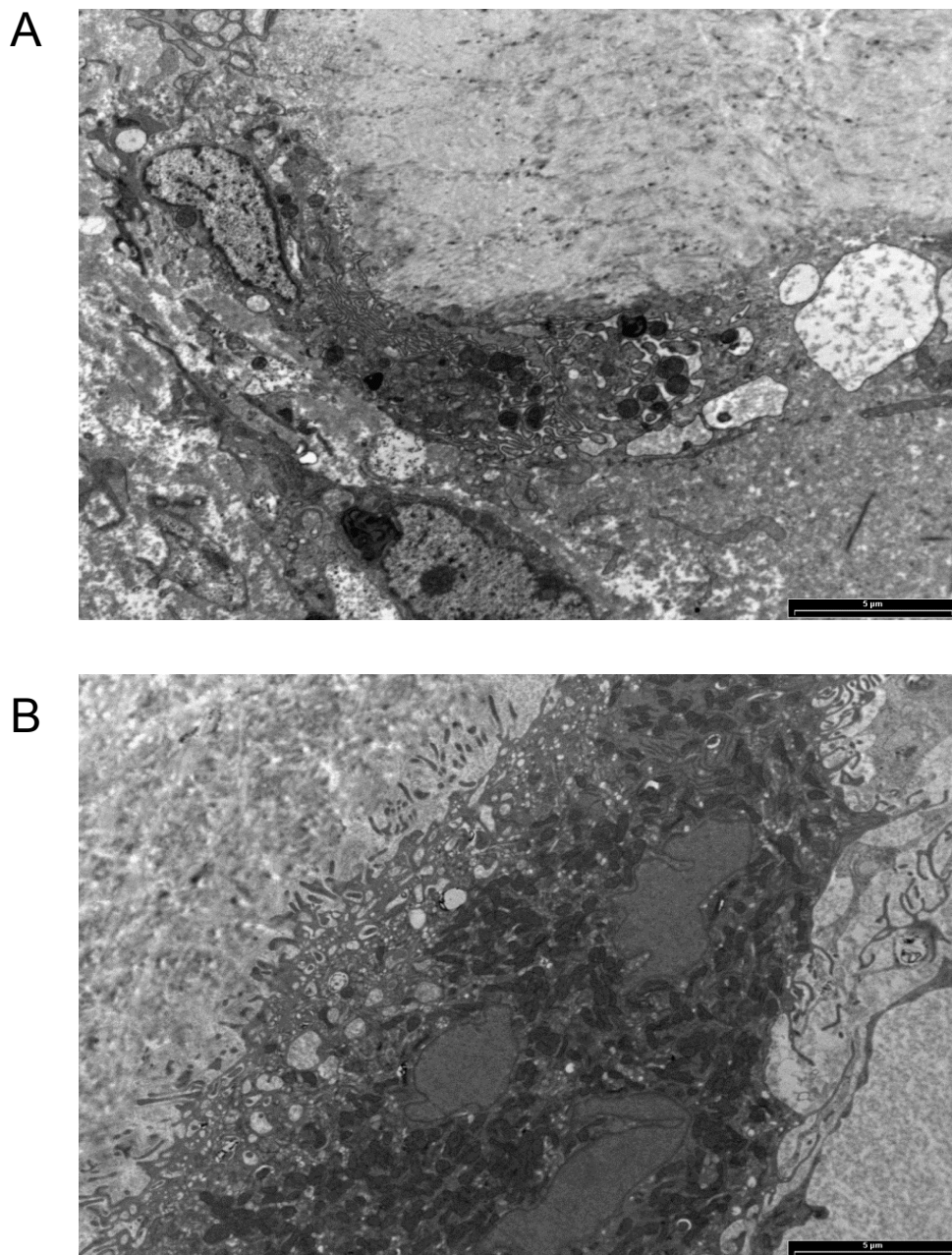
De forme allongée ou cuboïdale, les ostéoblastes tapissent la surface osseuse en cours de formation (Figure 6-A). Un abondant réticulum endoplasmique granuleux, un appareil de Golgi très développé et de nombreuses mitochondries témoignent d'une synthèse protéique importante. Leur fonction principale est de synthétiser la matrice (collagène de type I, ostéocalcine, ostéopontine) et de participer à sa minéralisation (phosphatases alcalines). Sous l'action de facteurs de croissance et de transcription, les cellules ostéoprogénitrices se transforment en ostéoblastes que l'on retrouve à la surface externe et interne du tissu osseux en croissance. Ils déposent la matrice organique non minéralisée de l'os, l'ostéoïde, le long du front de minéralisation. La minéralisation de cette matrice est initiée par les ostéoblastes eux-mêmes *via* le dépôt de cristaux calciques (hydroxyapatite) au niveau des sites de nucléation des fibrilles de tropocollagène.

Environ 10 à 15% des ostéoblastes matures finissent « emmurés » dans la matrice minéralisée et perdent une grande quantité de leurs organites, formant des cellules étoilées, les ostéocytes, qui communiquent entre eux *via* de nombreux prolongements cytoplasmiques. D'autres s'aplatissent et deviennent des cellules bordantes recouvrant les surfaces osseuses en phase quiescente. Différents rôles leur sont attribués : participation au réseau de communication intercellulaire, source de cellules ostéoblastiques de réserve, modulation de l'activité ostéoclastique *via* des substances chimiotactiques.

### 1.5.2. Les ostéoclastes (OC).

Ils dérivent de précurseurs circulants, apparentés à la lignée monocytaire. Les préostéoclastes mononucléés fusionnent pour former des ostéoclastes matures, cellules géantes multinucléées (Figure 6-B). Ils sont caractérisés par la présence de phosphatase acide tartrate résistante (TRAP) dans leurs nombreux lysosomes et par leur capacité à résorber la matrice osseuse minéralisée. L'ostéoclaste est visible au fond des lacunes de résorption, au contact de la matrice osseuse calcifiée. La zone de contact est caractérisée par la présence de nombreuses vacuoles intra-cytoplasmiques et d'une bordure plissée. L'ostéoclaste acidifie le milieu extra cellulaire grâce à une pompe à protons ( $H^+$  - ATPase), ce qui permet de solubiliser la fraction minérale. Leur cytoplasme est riche en mitochondries produisant en grande quantité l'ATP nécessaire. La digestion de la trame organique s'effectue ensuite sous l'action des enzymes protéolytiques contenues dans les lysosomes, notamment la cathepsine K.

**Figure 6 : Morphologies des cellules de l'os**



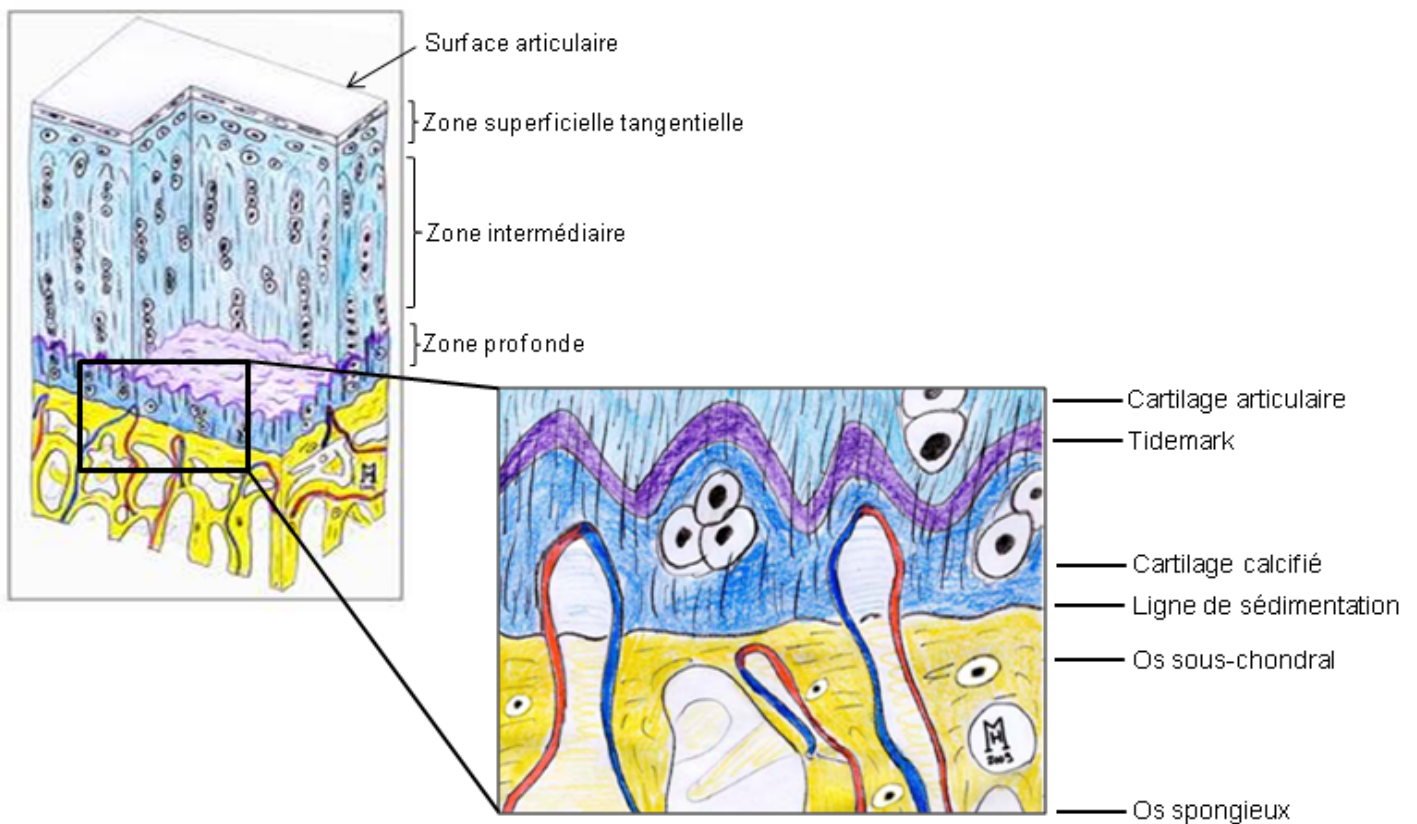
*Images d'ostéoblaste (A) et d'ostéoclaste (B) obtenues par microscopie électronique à transmission (MET). Grossissement x 3000.*

### 1.5.3. Formation de l'os.

L'ossification primaire enchondrale s'effectue au niveau du front de minéralisation par destruction de la MEC par les OC et synthèse d'os par les OB. Cet os primaire est activement remodelé (ossification secondaire enchondrale) pour donner naissance à l'os spongieux sous-chondral surplombant la cavité médullaire [9]. Ce tissu osseux spongieux, également appelé os trabéculaire, se caractérise par sa structure poreuse, alvéolaire, semblable à un nid d'abeille, avec des lamelles osseuses sans direction et des cavités contenant la moelle rouge ou moelle osseuse hématopoïétique. Différentes études menées chez l'homme ont montré que la structure de la région sous-chondrale (figure 7) est variable en termes d'épaisseur, de densité et de composition des différentes couches selon la localisation au sein des articulations suggérant une corrélation entre la structure de la région sous-chondrale et l'environnement biomécanique [10, 11]. La région sous-chondrale constitue un composant intégral et dynamique de l'articulation qui absorbe et atténue la grande majorité des forces mécaniques exercées sur les articulations diarthrodiales. Elle assure ainsi une fonction de support et de protection au cartilage articulaire. L'altération des propriétés biomécaniques de l'os sous-chondral pourrait affecter le tissu cartilagineux et inversement, d'autant que l'os sous-chondral est également impliqué dans la régulation du cartilage articulaire (pour revue voir [12]).

Plus bas, au niveau de parois diaphysaires, le tissu évolue en os compact ou os lamellaire, constitué d'ostéons composés chacun de lamelles osseuses concentriques entourant un canal vasculaire (canal haversien orienté selon le grand axe de l'os).

**Figure 7 : Anatomie du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral**

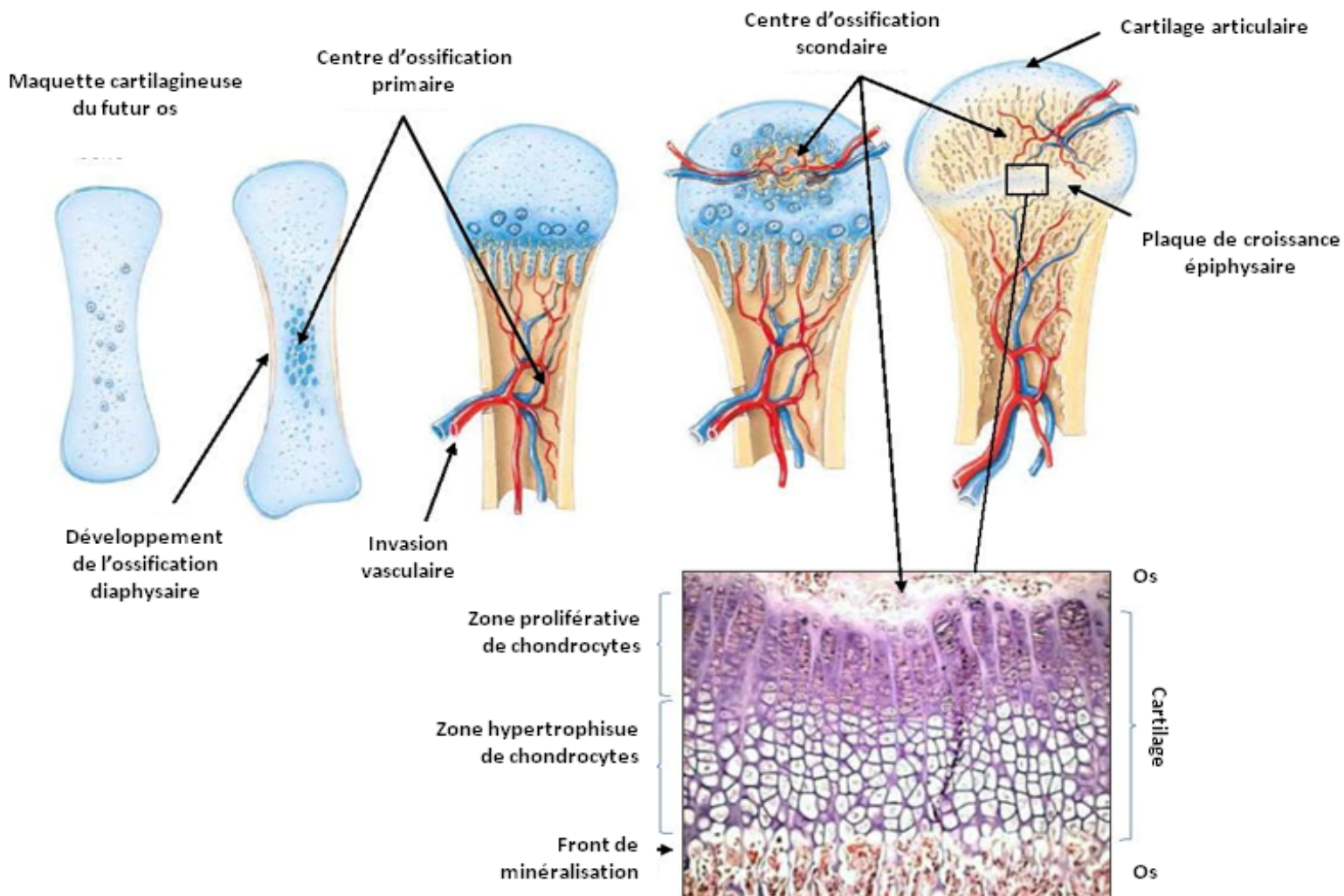


*Adapté d'après Henning Mandry et al., 2010*

## 1.6. Croissance des os long.

Les os longs des vertébrés se développent par ossification endochondrale, à partir d'une maquette cartilagineuse mise en place au cours de la vie fœtale. Les cellules mésenchymateuses au centre de la maquette se différencient en chondrocytes prolifératifs qui évoluent en chondrocytes hypertrophiques, permettant la calcification de la maquette et contribuant à la croissance en longueur de l'ébauche. Sous l'action de divers facteurs angiogéniques, des bourgeons conjonctivo-vasculaires accompagnés de cellules ostéoprogénitrices pénètrent dans la diaphyse, formant le centre d'ossification primaire qui s'étend en direction des deux épiphyses. Au niveau des métaphyses, les plaques de croissance permettent la croissance en longueur des os longs. D'autre part, au niveau du front de minéralisation, la matrice cartilagineuse est progressivement dégradée et remplacée par de l'os primaire sous l'action des ostéoblastes. Cet os est ensuite remodelé en os spongieux (ossification secondaire) par les ostéoclastes et ostéoblastes, donnant naissance à la cavité médullaire (figure 8).

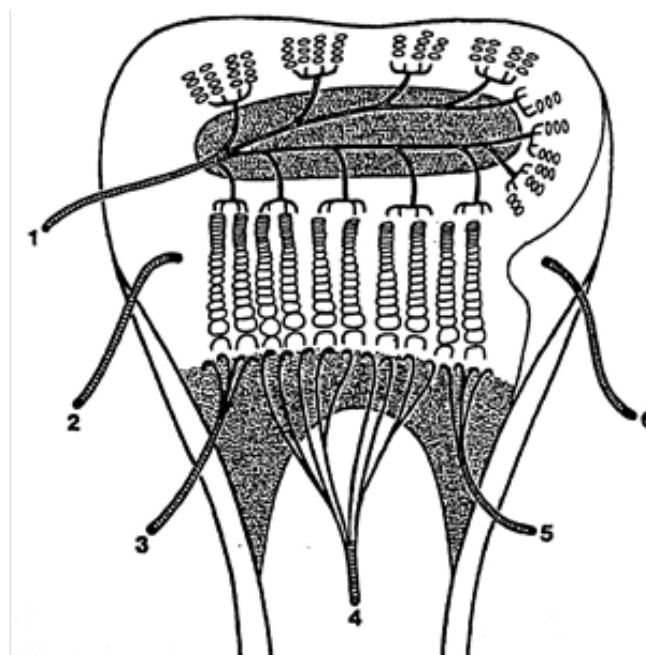
**Figure 8 : Processus d'ossification endochondrale**



Un processus semblable se déroule plus tardivement au niveau des épiphyses qui comportent une zone de cartilage articulaire périphérique et une zone centrale de cartilage de croissance où apparaîtra le noyau d'ossification épiphysaire secondaire [13]. Ce cartilage de croissance fonctionne de façon centrifuge pour permettre l'élargissement de la structure. Des canaux intrachondraux apparaissent dans les épiphyses cartilagineuses au cours de seconde moitié de la période embryonnaire (12<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'homme, 130<sup>ème</sup> jour chez le cheval) [14]. L'apparition de ces canaux constitue une étape majeure dans la mise en place des centres d'ossification secondaires. En effet, ils permettent la mise en place d'un système vasculaire complexe assurant la vascularisation de la matrice cartilagineuse et constituant un réservoir de cellules souches permettant la chondrogénèse péricanalaire [15, 16]. Lors de la croissance, les canaux qui n'ont pas été incorporés au centre d'ossification secondaire dégèrent par un processus de régression physiologique ou chondrification. Chez le cheval, il a été montré que cette régression se déroule de façon topographique : vers l'âge de trois mois pour l'épiphyse distale du tibia, à 5 mois pour les condyles fémoraux [17]. Différentes études ont montré que l'interruption de ces canaux entraîne une ischémie locale et un défaut du processus d'ossification endochondrale pouvant conduire à des pathologies [14, 18].

Au sein du complexe métaphyso-épiphysaire, les structures vasculaires sont distribuées selon trois réseaux, épiphysaire, diaphysaire et métaphysaire, apportant à des degrés divers, l'oxygène et les éléments nutritifs nécessaires (Figure 9). Dans la région sous-chondrale se situe un grand nombre de vaisseaux sanguins s'étendant du cartilage calcifié jusqu'à la plaque osseuse sous-chondrale *via* des canaux. Ils permettent la circulation de nutriments au niveau des chondrocytes de la zone de cartilage calcifié suggérant qu'il existe des échanges entre l'os spongieux, l'os sous-chondrale et le cartilage articulaire [19]. Plusieurs études menées chez l'homme ont également montré que la distribution et la morphologie des canaux de la région sous-chondrale varient selon l'épaisseur de la zone et sa localisation dans l'articulation. Ces observations suggèrent ainsi un rôle de ces canaux dans la réponse au stress biomécanique [20].

**Figure 9 : Vascularisation du cartilage de croissance**



*Vascularisation du cartilage de croissance. 1 : artère épiphysaire ; 2 et 6 : artères périchondrales ; 3 et 5 : artères métaphysaires ; 4 : artère nourricière*



Toutefois, il n'y a pas de pénétration des vaisseaux d'origine diaphysaire dans le cartilage de croissance. Ainsi, l'ensemble de la zone pré et hypertrophique et la portion adjacente des cellules de la zone proliférative ne sont pas vascularisés.

De même, le cartilage articulaire est avasculaire. Les échanges nutritifs reposent sur la diffusion à partir du liquide synovial au niveau de la surface articulaire ou à partir de l'os sous-chondral. De ce fait, la totalité du métabolisme des chondrocytes s'effectue en hypoxie (10% O<sub>2</sub> au niveau de la couche la plus supérieure du cartilage et moins de 1% au niveau des couches les plus profondes), le faible apport d'oxygène étant assuré par imbibition du liquide synovial. Une particularité des chondrocytes est que leur métabolisme est en permanence influencé par les conditions physico-chimiques qui règnent dans leur espace péricellulaire. Le métabolisme de base des chondrocytes varie donc selon leur localisation au sein du tissu. Toutefois, il a été montré que la production d'énergie repose en grande majorité sur le métabolisme oxydatif, l'autophagie et sur la glycolyse pour la synthèse d'ATP [21].

À la naissance, l'essentiel de la maquette cartilagineuse est transformée en os. Seuls les cartilages de conjugaison et épiphysaire persistent jusqu'à la fin de la croissance. Ce processus est finement régulé par de multiples facteurs tels des facteurs de croissance ou de signalisation, les interactions cellule-matrice, l'hypoxie ou le stress mécanique. L'ossification périostée se poursuit également afin d'augmenter la circonférence de la diaphyse et l'épaisseur de l'os cortical, ce qui contribue à renforcer la résistance de l'os. À la puberté, sous l'effet des modifications hormonales, la croissance s'arrête et les cartilages de croissance se ferment. Les os atteignent leur taille définitive et seuls persistent les cartilages articulaires à l'extrémité des épiphyses. L'os lamellaire est remodelé (ossification tertiaire) tout au long de la vie, processus modulé par de nombreux facteurs physiques (charge mécanique) et hormonaux, permettant l'équilibre entre résorption et reconstruction osseuse.

## 2. Régulation de l'ossification endochondrale

Le processus d'ossification endochondrale est finement régulé par l'interaction de différentes hormones et de facteurs de croissance, dont l'action peut être directe ou indirecte [22], et met en jeu diverses voies de signalisation et facteurs de transcription (figure 10).

### 2.1. Régulation endocrine de la plaque de croissance

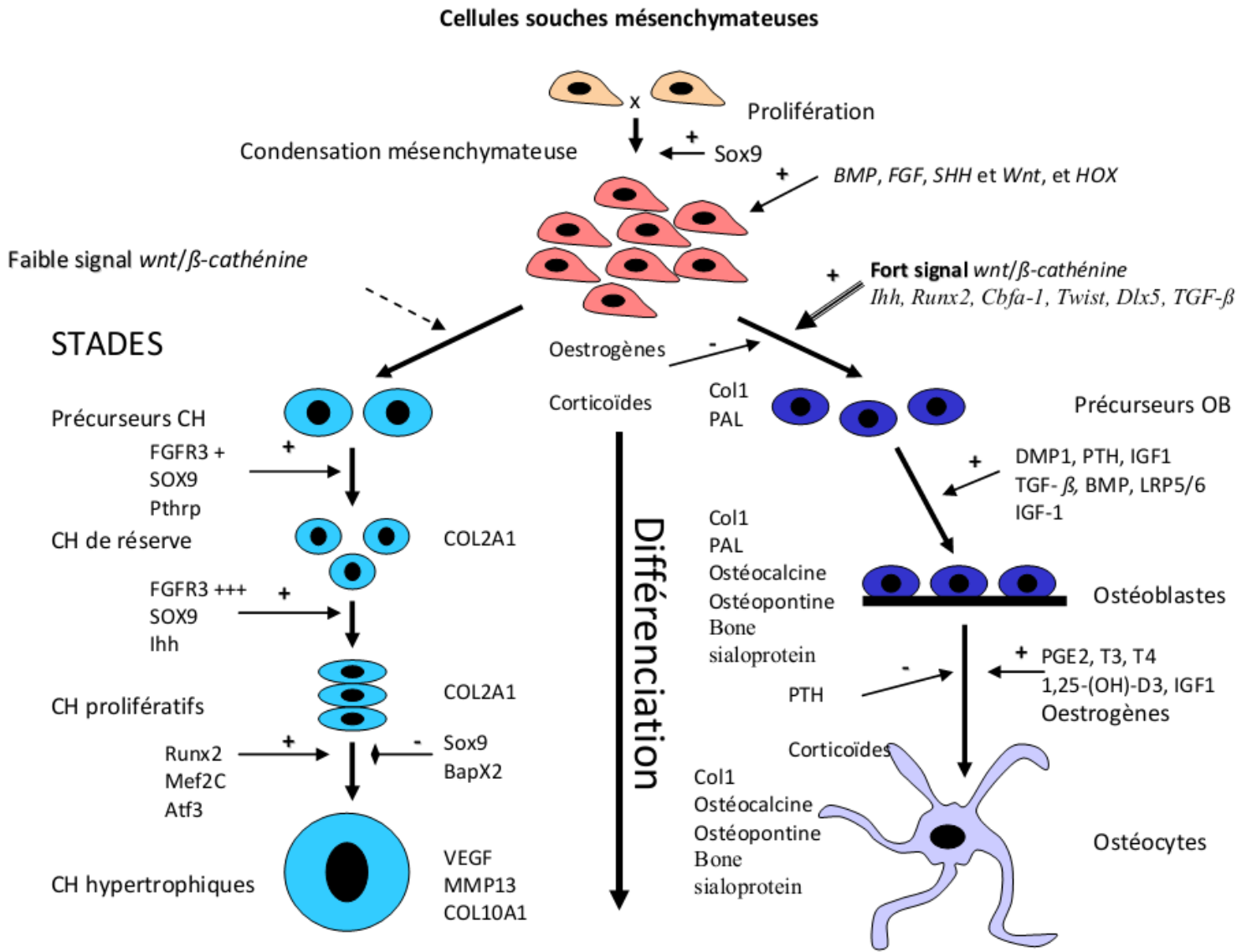
L'hormone de croissance jouerait un rôle direct sur le recrutement des chondrocytes de réserve et le déclenchement de la prolifération. Elle stimulerait ensuite indirectement la division cellulaire au niveau de la zone proliférative *via* une action sur la synthèse d'IGF1 circulante produite par le foie et/ou une action locale *via* l'augmentation de la synthèse d'IGF1 par les chondrocytes (action autocrine/paracrine). Toutefois, des expériences chez la souris suggèrent une action de la GH et de l'IGF1 sur l'hypertrophie.

Les glucocorticoïdes inhibent la croissance des os longs par une action directe sur la prolifération des chondrocytes, probablement *via* une réduction de la synthèse locale d'IGF1. Un effet indirect *via* une modulation de la GH est également évoqué.

Œstrogènes et testostérone ont une action bi-phasique. Avant la puberté, les taux faibles stimulent la croissance en interagissant avec l'axe somatotrope et la sécrétion de GH. En fin de puberté, les taux élevés accélèrent la maturation du cartilage et conduisent à la fermeture des plaques épiphysaires et à l'ossification complète, mettant fin à la croissance staturale.

Les hormones thyroïdiennes T3 et T4 sont essentielles au développement normal du squelette et à la maintenance de la structure des os chez l'adulte.

**Figure 10 : Schéma récapitulatif des différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation chondrocytaire et ostéoblastique**

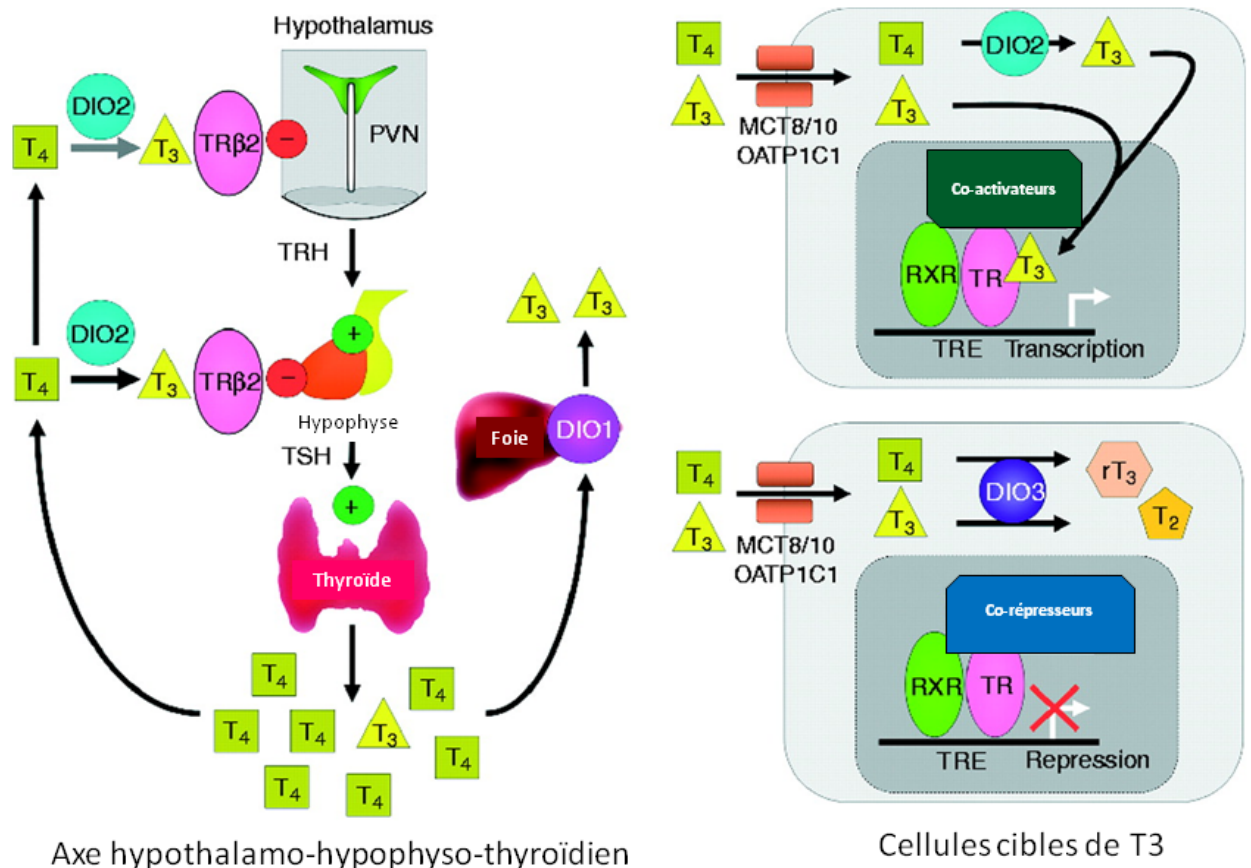


### 2.1.1. Mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes.

Les taux systémiques des hormones thyroïdiennes circulantes sont finement régulés par une boucle de retrocontrôle négative au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire (HHT). Les neurones médians du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus synthétisent la TRH (thyrotropin-releasing hormone) qui va elle-même stimuler la synthèse de la TSH (thyrotropine) au niveau des glandes hypophysaires. La TSH stimule ensuite la synthèse et la sécrétion par la thyroïde de la thyroxine (T<sub>4</sub>), qui est convertie localement dans les cellules cibles en triiodothyronine (T<sub>3</sub>) active [23].

L'action cellulaire de T<sub>3</sub> est médiée par des récepteurs nucléaires fonctionnant comme des facteurs de transcription inductibles régulant l'expression de gènes cibles hormono-sensibles [24]. Les récepteurs de T<sub>3</sub> (TRs) α et β sont codés par les gènes THRA et THRB. Le gène THRA code pour deux récepteurs fonctionnels TRα<sub>1</sub> et TRα<sub>2</sub>, exprimés constitutivement dans la plupart des tissus. TRα<sub>2</sub> ne lie pas T<sub>3</sub> et sa fonction demeure inconnue. Le gène THRB code quant à lui pour deux protéines fonctionnelles, TRβ<sub>1</sub> et TRβ<sub>2</sub>. TRβ<sub>1</sub> est largement exprimé dans les tissus alors que l'expression de TRβ<sub>2</sub> est restreinte à l'hypothalamus et à la glande pituitaire (figure 11). Bien que TRα<sub>1</sub> et TRβ<sub>1</sub> soient largement exprimés, leurs taux d'expression varient de façon spatio-temporelle. Ainsi, TRα est majoritairement exprimé dans l'os et le cartilage, à des niveaux 10 fois plus élevés que TRβ [25].

**Figure 11 : Régulation et mécanisme d'action des hormones thyroïdiennes : l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien**



Adapté d'après Nicholls J J et al. *J Endocrinol*, 2012



Dans le noyau, les TRs forment préférentiellement des hétérodimères avec les récepteurs X de l'acide rétinoïque (RXR) mais peuvent également formés des homodimères. Les hétérodimères RXR-TR non liés à un ligand se fixent au niveau des éléments de réponses thyroïdiens (TREs) et induisent une répression transcriptionnelle via un complexe de corépresseurs NCoR (corépresseur de récepteur nucléaire) ou SMRT (médiateur inhibiteur des récepteurs de l'acide rétinoïque et TR) possédant une activité de dé-acétylation des histones. La fixation de T3 conduit à la dissociation du complexe corépresseur et au recrutement d'un complexe coactivateur des récepteurs stéroïdiens (p160/SRCs). Ces mécanismes entraînent ainsi un remodelage de la chromatine. Afin de permettre la transcription des gènes cibles, des protéines associées aux récepteurs thyroïdiens (TRAPs) sont également recrutées (figure 11).

### 2.1.2. Rôle des hormones thyroïdiennes dans le développement du squelette

Chez l'enfant, l'hypothyroïdie induit un retard majeur de croissance et d'ossification endochondrale, alors que l'hyperthyroïdie les accélère [26]. L'hypothyroïdie, chez l'homme comme dans différents modèles de rongeurs, est associée à une diminution de la taille des zones prolifératives et hypertrophiques, une baisse de prolifération, une anomalie d'hypertrophie et un retard d'invasion vasculaire [27]. De plus, l'organisation de la plaque de croissance est perturbée [28]. Les patients présentent un remodelage osseux ralenti avec diminution des marqueurs biochimiques tels que l'ostéocalcine ou le collagène de type I [29].

L'hyperthyroïdie (thyrotoxicose) chez l'enfant est associée à une accélération de la croissance et à une avance d'âge osseux. Dans la grande majorité des cas, les patients souffrant d'un syndrome de résistance aux hormones thyroïdiennes présentent des mutations du gène THRB [30-33]. Dans les cas les plus sévères, les patients sont de petite taille et présentent une crâniosynostose résultant d'une fermeture prématurée des plaques de croissance et des sutures crâniennes (pour revue voir [34]). Les adultes atteints de thyrotoxicose présentent une altération du métabolisme phosphocalcique et une perte osseuse (ostéoporose). On observe ainsi chez ces patients une augmentation importante du remodelage osseux avec une hyperactivité ostéoclastique et ostéoblastique en association avec une augmentation des marqueurs biochimiques du remodelage osseux [35].

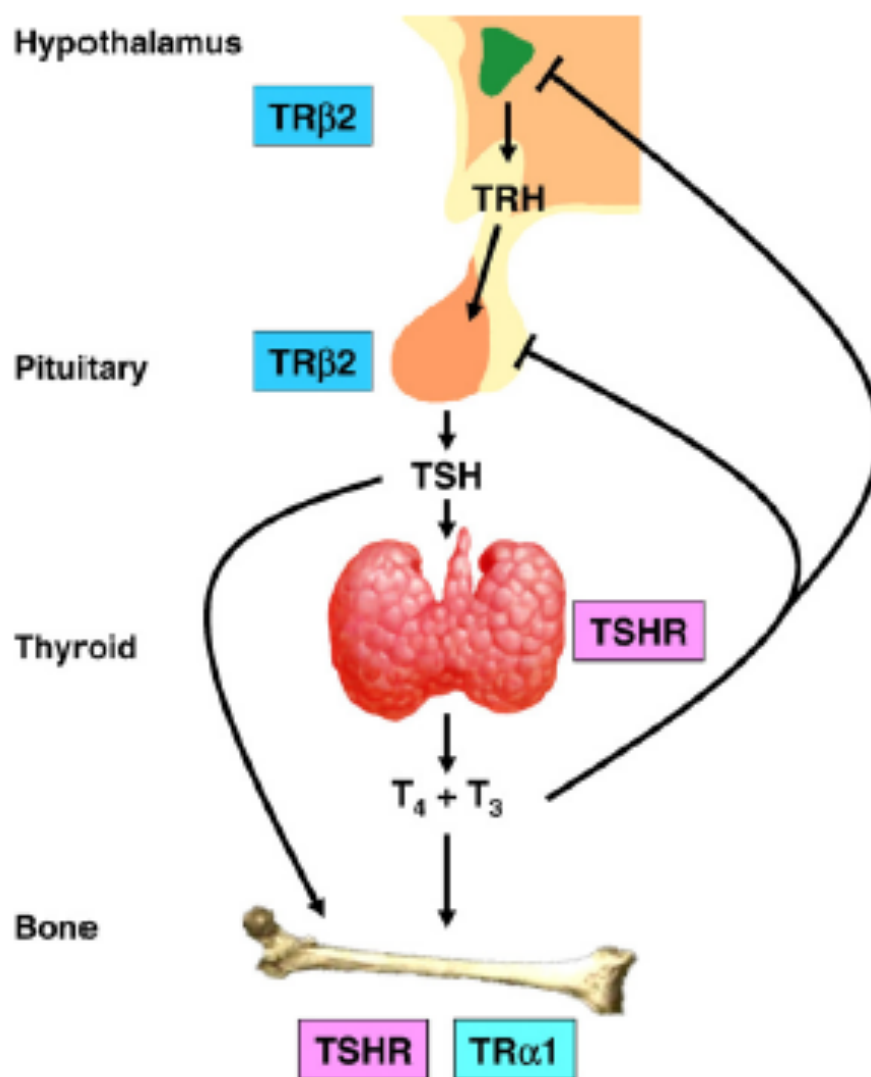
Au cours des dix dernières années, les recherches se sont focalisées sur l'identification des mécanismes d'actions de T3 dans la maturation du cartilage et l'ossification et la compréhension du rôle de chacun des récepteurs (figure 12). L'expression de TR $\alpha$ 1 et TR $\beta$ 1 dans les zones de réserve et proliférative suggérant que ces cellules sont des cibles directes de T3 [36], plusieurs études ont montré que T3 stimulait l'expansion clonale des chondrocytes de réserve, mais inhibait la prolifération ultérieure tout en stimulation la différenciation hypertrophique et éventuellement l'apoptose [37-39]. Une interaction avec les voies IHH, PTHrP, BMP, FGF et Wnt (voir ci-après) serait responsable de cet effet, dans la mesure où T3 stimule l'expression de PTHrP, PPR1, BMP4, Wnt4 et FGFR3 [28, 40-42].

Au niveau osseux, il a été montré *in vitro* que les ostéoblastes et les ostéoclastes expriment TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 et TR $\beta$ 1 [43]. Plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré que T3 induit la différenciation des ostéoblastes et stimule la synthèse de la matrice osseuse et sa minéralisation [44]. Cet effet résulterait de l'interaction avec d'autres voies de régulation de la prolifération et de la différenciation ostéoblastiques, en particulier IGF-1 et FGF. En effet T3 induit la transcription de IGF-1 et stimule l'expression des protéines régulatrices IGF1BP-2 et IGF1BP-4, [45]. De plus, T3 stimule l'expression et l'activité de FGFR1, conduisant à l'activation de la signalisation MAPK et à l'induction de la différenciation [46]. L'action de T3 sur les ostéoclastes est moins claire. En effet, si l'excès de T3 induit *in vivo* une augmentation du nombre d'ostéoclastes et de leur activité conduisant à une perte osseuse,

cet effet pourrait résulter d'une action directe sur les cellules des lignées ostéoclastique ou d'une action indirecte via les ostéoblastes, les cellules de la moelle osseuse ou un autre type cellulaire [43, 47-49]

Des souris transgéniques présentant des mutations dans les gènes  $TR\alpha$  et  $TR\beta$  ont été étudiées [50] afin de mesurer les parts respectives de chaque récepteur dans l'effet de  $T_3$  et de mettre en évidence les mécanismes moléculaires sous-jacents et responsables des anomalies de développement du squelette et des défauts de remaniements osseux chez l'adulte.

**Figure 12 : Schéma récapitulatif du mode d'action des hormones thyroïdiennes dans le développement du squelette**



Les souris invalidées  $TR\alpha^{-/-}$  sont euthyroïdiennes mais ont un retard de croissance et une minéralisation osseuse retardée, associés à un défaut de différenciation des chondrocytes [51]. Les souris porteuses de mutations hétérozygotes dominantes-négatives du gène *THRA* ( $TR\alpha1^{PV/+}$ ,  $TR\alpha1^{R348C/+}$ ) souffrent d'un hypothyroïdisme systémique transitoire et présentent les caractéristiques d'une hypothyroïdie plus sévère que celle des souris  $TR\alpha^{-/-}$  [51, 52].

Les souris  $TR\beta^{-/-}$  sont résistantes aux hormones thyroïdiennes et ont des taux élevés de T4, T3 et TSH, associés à un phénotype d'hyperthyroïdisme. Les souris adultes  $TR\beta^{-/-}$  souffrent d'ostéoporose associée à une réduction de la minéralisation et du volume de trabécules ainsi qu'une augmentation du nombre d'ostéoclastes et de la résorption osseuse [53]. Chez des souris porteuses d'une mutation ponctuelle dominante-négative ( $TR\beta^{PV/+}$ ,  $TR\beta^{PV/PV}$ ), le phénotype observé est plus sévère.

Les différents modèles murins ont des mutations constitutives des TR, provoquant des perturbations systémiques plus ou moins intenses. Il est donc difficile de séparer les effets causés directement par la perturbation locale d'un récepteur au niveau de l'os et du cartilage de ceux médiés par les autres récepteurs encore fonctionnels en réponse aux perturbations plus globales de l'axe HHT. L'ensemble de ces résultats suggère une action majoritaire *via*  $TR\alpha$ , les anomalies du squelette observées après mutation ou délétion de  $TR\beta$  étant considérées comme des conséquences indirectes d'un défaut de régulation de la boucle de rétrocontrôle de l'axe HHT.

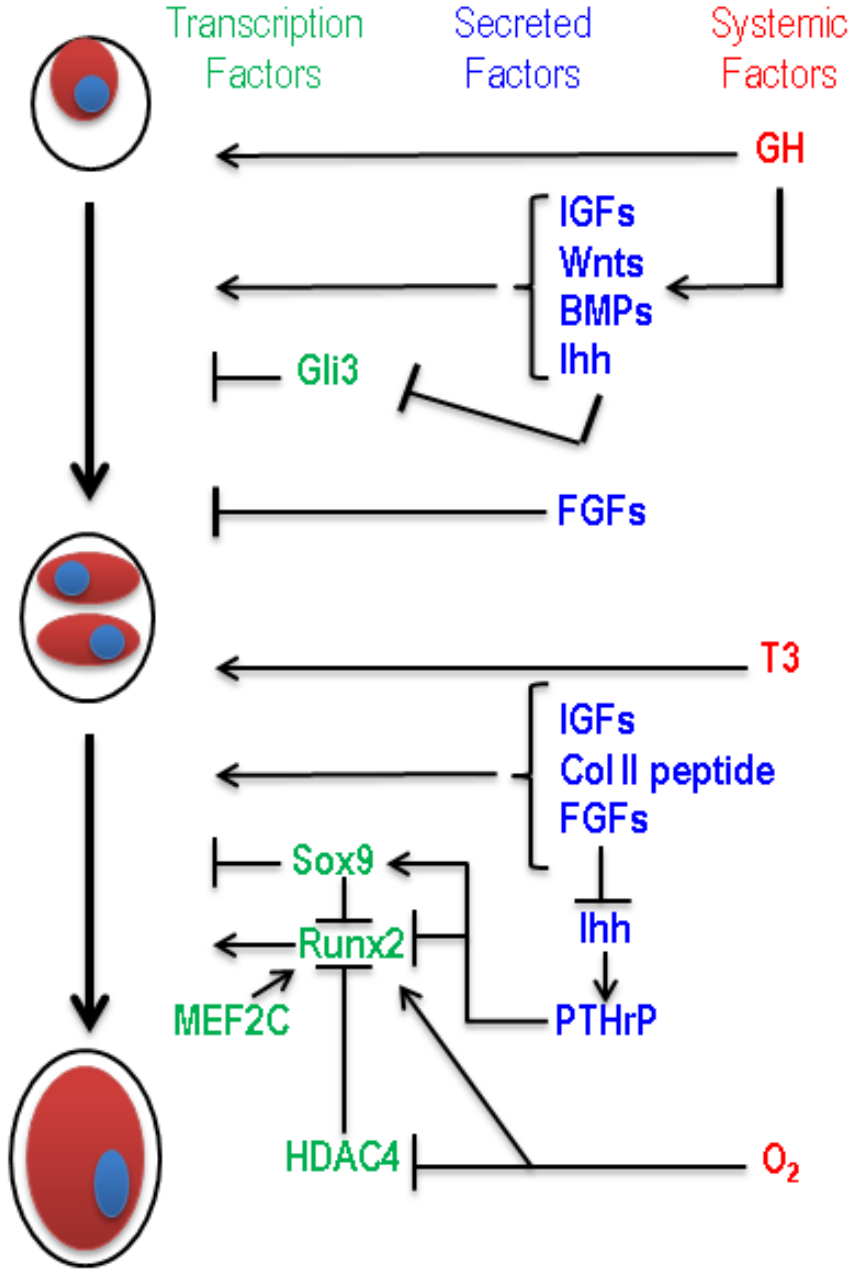
Toutefois, les parts respectives des perturbations du cartilage et de l'os dans le phénotype global ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents restent encore mal connus. Récemment, un cas de mutation de  $TR\alpha$  a été décrit chez l'enfant (mutation  $TR\alpha1^{E403X}$ ). La protéine  $TR\alpha1$  tronquée résultant de cette mutation ne peut pas lier T3 et provoque un phénotype similaire à celui observé chez la souris  $TR\alpha1^{PV/+}$  [54]. Deux autres cas de patients (un père et sa fille) présentant une mutation ponctuelle dans le gène *THRA* ( $TR\alpha1^{F397fs406X}$ ) ont été répertoriés. Ces deux patients présentaient également un retard de développement osseux et des taux normaux de T3 [55]. Ces découvertes ont relancé l'intérêt d'une compréhension détaillée des mécanismes, préalable indispensable à la mise au point de traitements pharmacologiques.

## 2.2. La voie IHH/PTHrP

La voie impliquant les gènes IHH (Indian hedgehog) et PTHrP (Parathyroid hormone related protein) régule la croissance de la plaque de croissance, sa maturation et sa différenciation [56]. Un modèle de boucle de rétrocontrôle impliquant ces deux hormones a été proposé.

IHH coordonne la prolifération des chondrocytes et la différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes. Il est sécrété par les chondrocytes préhypertrophiques et lie le récepteur membranaire Patched-1 (Ptc-1) qui active Smoothed (Smo), une protéine membranaire, conduisant à l'activation des facteurs de transcription de la famille GLI dans les cellules du périchondre. Le signal est alors transmis aux cellules périarticulaires qui sécrètent PTHrP. PTHrP diffuse le long de la plaque de croissance et induit l'activation de son récepteur PPR1 dans les chondrocytes prolifératifs et préhypertrophiques. La liaison de PTHrP à PPR1 a pour effet de promouvoir la prolifération des chondrocytes et de bloquer la différenciation hypertrophique, aboutissant à une diminution de l'expression d'IHH [57, 58]. Ainsi, la voie IHH/PTHrP, au travers de cette boucle de rétrocontrôle négatif, assurent un contrôle très fin de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation chondrocytaire au sein de la plaque de croissance. Cette voie est vraisemblablement modulée par d'autres facteurs tels que Sox9 ou Runx2 (figure 13). IHH régule également la différenciation des ostéoblastes *via* l'induction du facteur de différenciation ostéoblastique Runx2 au niveau des cellules du périchondre.

Figure 13 : Représentation schématique des facteurs systémiques (rouge), localement sécrétés (bleu) et de transcription (vert) impliqués dans la régulation de la prolifération et de l'hypertrophie des chondrocytes au cours de l'ossification endochondrale.



## 2.3. Les Fibroblast Growth Factors (FGF)

Les Fibroblast Growth Factors (FGF) et leurs récepteurs (FRFR) sont des familles de protéines homologues essentielles dans la régulation de la prolifération et de la différenciation chondrocytaire. Plusieurs FGF sont exprimés au cours des différentes étapes de l'ossification endochondrale, pour la plupart dans le péri-chondre (Fgf7,8,9,17 et 18), suggérant l'existence d'une régulation paracrine. Les FGFR possèdent un domaine extracellulaire de liaison des FGF et un domaine intracellulaire tyrosine kinase activant de multiples voies de signalisation.. Fgfr1, Fgfr2 et Fgfr3 sont exprimés respectivement dans les chondrocytes préhypertrophiques et hypertrophiques, les ostéoblastes et dans les chondrocytes prolifératifs [59]. Chaque récepteur aurait un rôle distinct au cours de l'ossification endochondrale (figure 14). Fgfr1 joue un rôle dans la différenciation et la production de la MEC alors que Fgfr3 est impliqué dans la prolifération et la différenciation chondrocytaire. Des études menées sur des souris transgéniques et des lignées cellulaires ont permis de montrer que l'activation de la voie de signalisation FGF inhibe la prolifération chondrocytaire, jouant ainsi un rôle antagoniste à celui de la voie BMP [60-62].

Différentes chondrodysplasies sont associées à des mutations des FGFR, notamment l'achondroplasie due à des mutations activatrices de FGFR3. De telles mutations inhibent la prolifération et la différenciation terminale et entraînent une désorganisation de la structure du cartilage de croissance. Cette action s'effectue par le biais de la voie de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase).

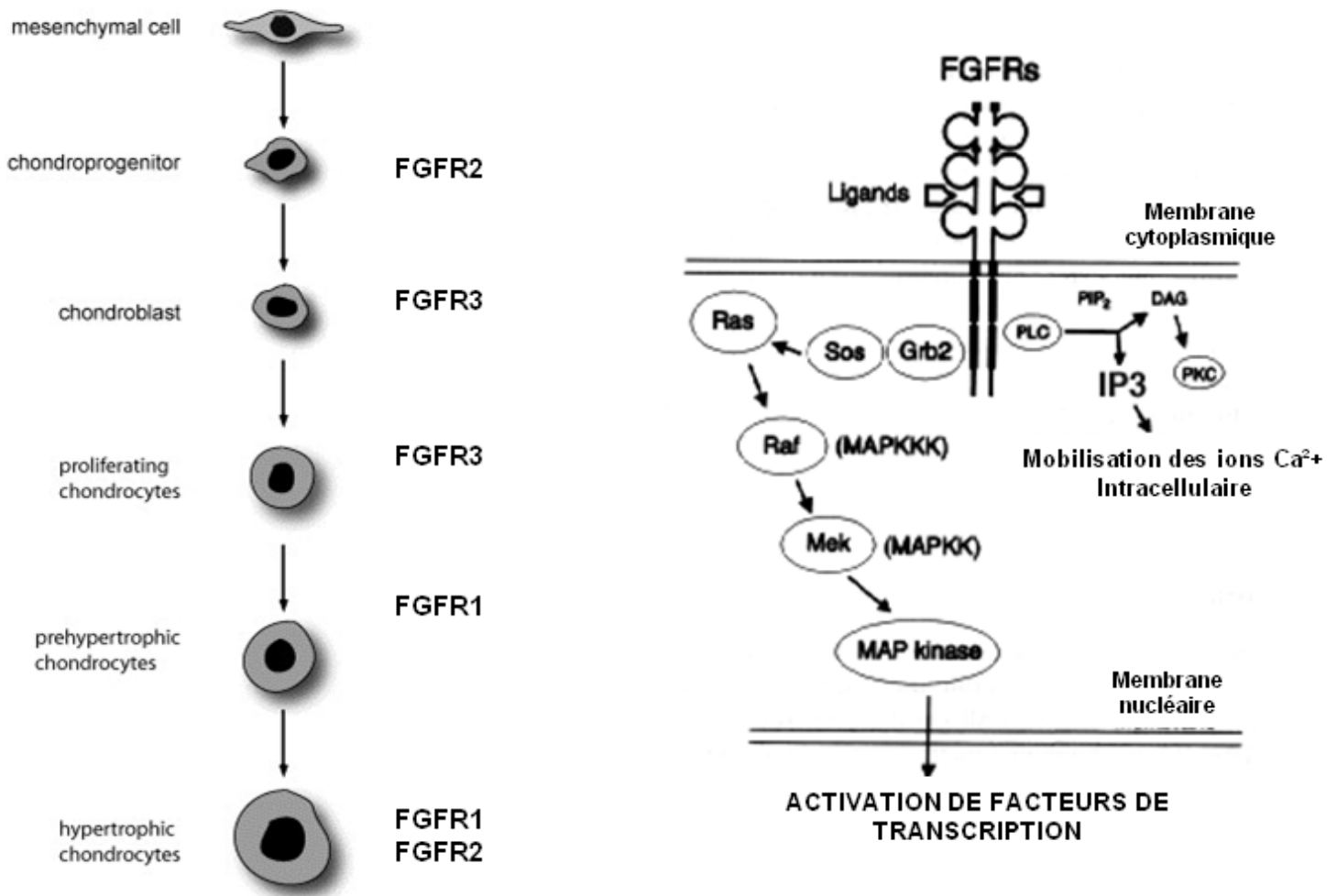
Ces signaux intracellulaires sont modulés par le GMP cyclique (GMPc), identifié comme un régulateur majeur de l'ossification endochondrale [63], dont la production dépend des peptides natriurétiques, en particulier du CNP (C-type natriuretic peptide) et de son récepteur NPR-B. CNP et NPR-B sont exprimés par les chondrocytes de la zone proliférative et préhypertrophique, suggérant une boucle de régulation paracrine permettant d'ajuster la dynamique du cartilage de croissance. La surexpression du CNP restaure le phénotype de souris achondroplasies en inhibant les MAPK [64].

## 2.4. Les BMP (Bone Morphogenetic Protein)

Les BMP appartiennent à la superfamille du TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor). Leur activité biologique passe par leur liaison à des récepteurs membranaires de type sérine-thréonine kinase de type I et II (BMPR) qui par dimérisation vont phosphoryler des protéines de la famille SMAD (Smad 1, 5, 8). Une fois phosphorylées celles-ci vont interagir avec Smad4 pour jouer le rôle de facteur de transcription, conduisant à l'expression des gènes cibles comme des facteurs de croissance tels Shh et les BMP elles-mêmes, le collagène de type 1, la phosphatase alcaline, l'ostéopontine ou la sialoprotéine osseuse qui sont impliqués dans la biologie des tissus calcifiés (figure 15).

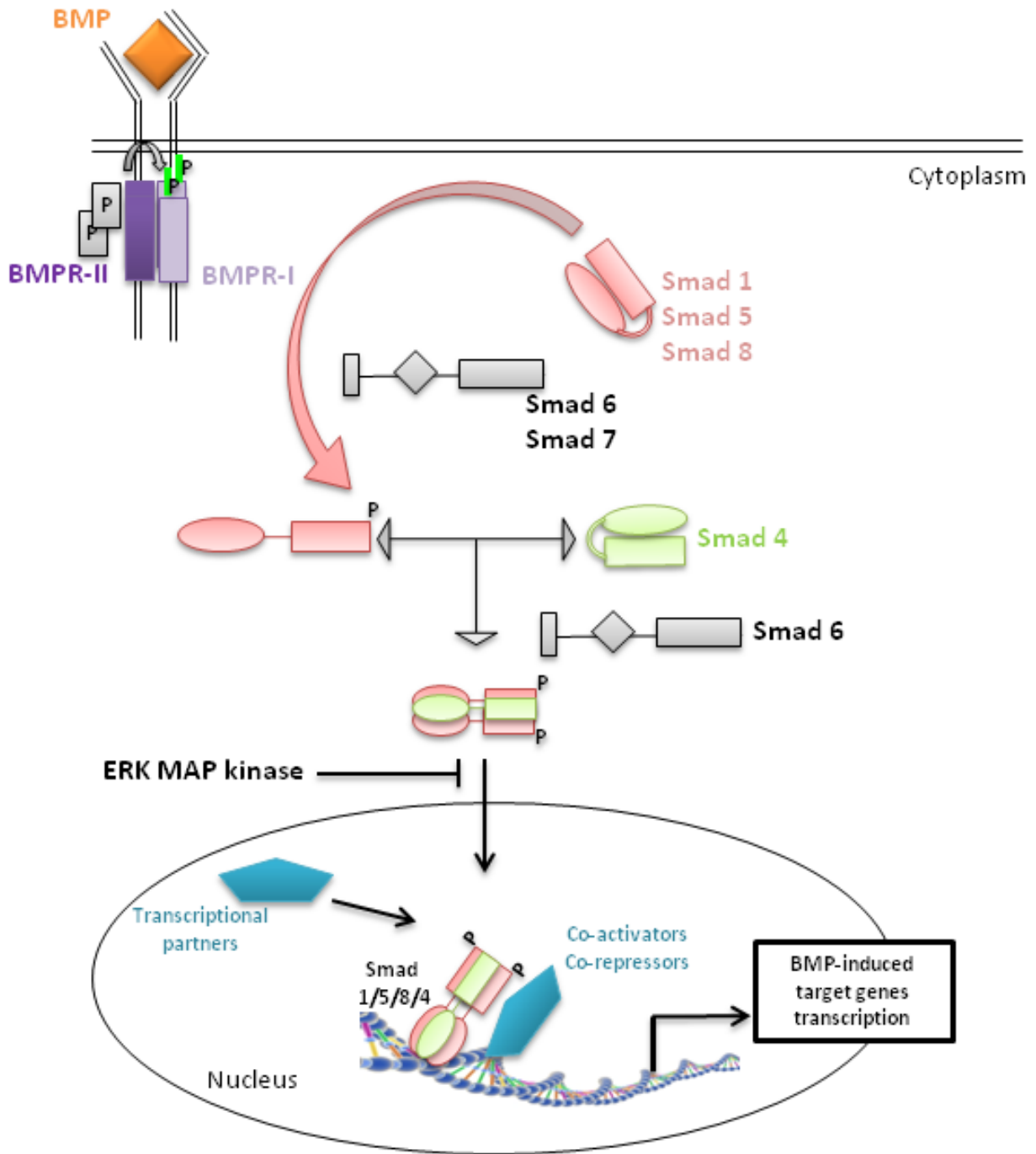
Les BMP ainsi que leurs récepteurs sont exprimés dans la maquette cartilagineuse et jouent un rôle dans des étapes précoces de l'ossification endochondrale. Elles sont notamment impliquées dans la formation des condensations mésenchymateuses et dans des étapes plus tardives de la chondrogenèse. Bmp2 et Bmp6 sont exprimés dans les chondrocytes hypertrophiques et Bmp7 dans les chondrocytes prolifératifs [65, 66]. Les BMP agiraient en parallèle de la voie IHH/PTHrP afin de coordonner la prolifération et la différenciation terminale des chondrocytes et auraient des effets antagonistes aux FGF [67, 68].

Figure 14 : Voie de signalisation des FGFs



- A. Expression des récepteurs aux FGFs selon les types de chondrocytes.
- B. Les FGFRs possèdent trois domaines Ig (immunoglobulin-like) extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire protéique tyrosine kinase (PTK). La liaison des ligands au niveau des domaines Ig induit l'autophosphorylation du domaine PTK et l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Ainsi, FRS2 et Grb2 peuvent activer plusieurs effecteurs tels que PI3K/AKT, activant ainsi la voie calcique IP<sub>3</sub>, ou des Ras conduisant à l'activation de MAP Kinase dont la translocation dans le noyau conduit à l'activation de facteurs de transcription.

Figure 15 : Voie de signalisation des BMPs



Les dimères de BMP-2, -4 ou -7 (jaune) se lient au complexe du récepteur (violet) entraînant la phosphorylation du récepteur de type 1 (BMPR-1) par le récepteur de type 2 (BMPR-2) qui en retour va conduire à la phosphorylation d'une R-smad (Smad 1, 5 ou 8) (rouge). Cette Smad phosphorylée se lie à la Co-smad (verte) et se complexe va alors être transféré dans le noyau cellulaire pour activer ou réprimer la transcription de gènes cibles en fonction des co-facteurés présents (bleu)

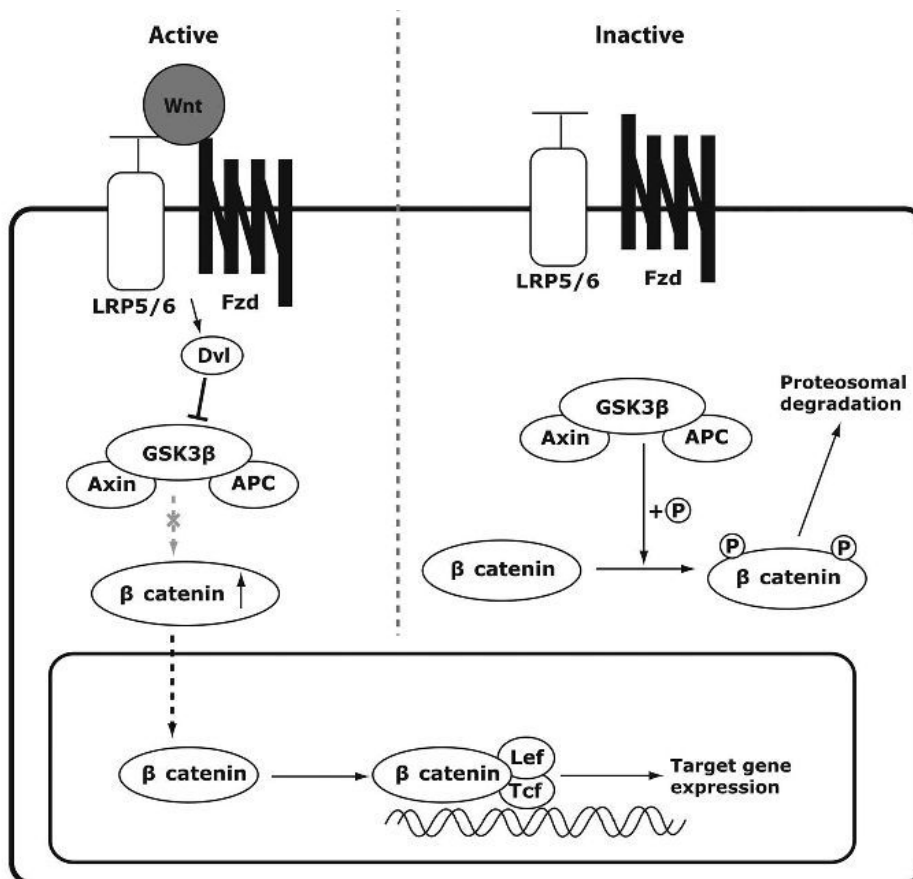


## 2.5. La voie WNT

Les protéines sécrétées de la famille Wnt sont impliquées dans la survie, la prolifération et la différenciation des chondrocytes au sein de la plaque de croissance [69]. La liaison à leur récepteur Fzd (Frizzled) et ses corécepteurs Lrp5 ou Lrp6 induit l'activation de la voie canonique, médiée par la  $\beta$ caténine, ou de la voie non canonique médiée par la PKC (Protéine Kinase C calcium dépendante).

Les facteurs de croissance WNT constituent une famille de régulateurs essentiels de la chondrogénèse et de la différenciation des chondrocytes. En effet, l'activation de la voie WNT, médiée par le facteur de transcription TGF- $\beta$ , induit la différenciation ostéoblastique et inhibe, en parallèle, la différenciation chondrocytaire des cellules mésenchymateuses. Dans les chondrocytes différenciés, la voie WNT induit la différenciation hypertrophique jouant ainsi un rôle majeur dans le processus d'ossification endochondrale. [70-72] (figure 16).

Figure 16 : Voie de signalisation des Wnt



En présence de son ligand Wnt, le récepteur frizzled (Fzd) se lie à son corécepteur LRP-5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein) induisant par la suite l'activation de Dvl (Disheveled). L'activité de la glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) est alors inhibée et provoque l'augmentation du taux cytoplasmique  $\beta$ caténine qui une fois transférée dans le noyau cellulaire se lie aux facteurs de Tcf (T-cell factor) et Lef-1 (lymphoid enhancer-binding factor) activant ainsi la transcription de gènes cibles. En absence de Wnt, GSK3 $\beta$  induit la phosphorylation constitutive de la  $\beta$ caténine qui est alors dirigée vers le protéasome pour être dégradée. L'expression des gènes cibles est donc faible.

D'après Jeong Hwan Kim et al., 2013

## 2.6. Les facteurs de transcription

La différenciation des chondrocytes et ostéoblastes connaît une étape commune dite ostéo-chondrocytaire, puis une différenciation des deux lignées conditionnée par l'expression de facteurs de transcription spécifique (Figure 9) [73, 74].

Le facteur de transcription Sox9 est essentiel pour le passage de la cellule mésenchymateuse indifférenciée à un progéniteur ostéo-chondrocytaire. Il intervient également aux stades précoces de la différenciation chondrocytaire et des mutations de ce gène sont responsables de dysplasie campomélique (courts et incurvés, plaque de croissance réduite avec expansion de la zone hypertrophique et minéralisation prématurée). Il est exprimé dans les chondrocytes prolifératifs et stimule en culture la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans la matrice cartilagineuse, comme Col2a1, Col1a2 et les agrécanes. Deux autres facteurs de la même famille, L-Sox5 et Sox6, jouent un rôle prépondérant dans la chondrogenèse, ralentissant la prolifération et la différenciation des chondrocytes primordiaux et entraînant une quasi-absence de dépôt de matrice cartilagineuse.

Runx2, joue un rôle majeur dans la différenciation des ostéoblastes à partir des cellules mésenchymateuses. Il intervient également dans la différenciation des chondrocytes hypertrophiques. Il est initialement exprimé dans les cellules de la condensation mésenchymateuse, puis son expression se restreint aux chondrocytes préhypertrophiques. Les souris invalidées pour Runx2 sont dépourvues d'ostéoblastes, elles présentent également une diminution du nombre de chondrocytes hypertrophiques et un défaut de minéralisation de la matrice cartilagineuse [75].

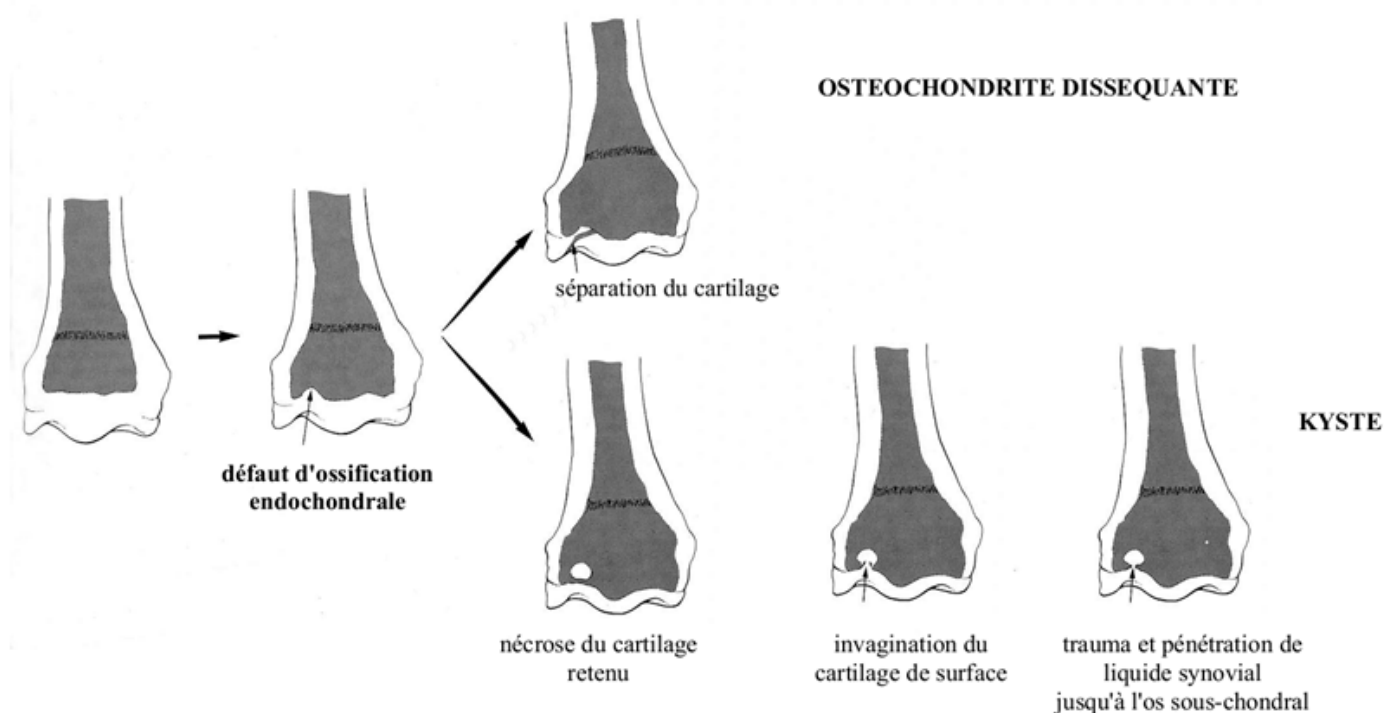
## 3. Pathogénie et physiopathologie de l'ostéochondrose.

Les premières descriptions de patients présentant des fragments ostéochondraux dans les articulations remontent à 1840, mais il a fallu attendre 1870 pour que Paget décrive le processus pathologique et émettent l'hypothèse d'une nécrose localisée conduisant au détachement d'un fragment. L'implication potentielle de traumatismes, à l'origine d'une inflammation de l'os sous-chondral et du cartilage, a été suggérée en 1888 par König qui proposa l'appellation d'ostéochondrite disséquante. Depuis, diverses classifications ont été proposées chez l'Homme en se basant sur la localisation des lésions (Siffert en 1981 définit les atteintes épiphysaires, les atteintes apophysaires et les atteintes métaphysaires) ou sur des critères anatomoradiologiques (classification de Bedouelle en 4 stades d'évolution). Cette pathologie est peu fréquente, touche préférentiellement les jeunes garçons sportifs après une poussée de croissance importante. Les lésions sont majoritairement localisées au niveau des rotules ou des fémurs mais les coudes ou le rachis peuvent également être affectés [76]. Elle est considérée comme une atteinte nécrotique de l'os sous-chondral et du cartilage en regard. La physiopathologie de cette affection n'est pas encore totalement connue et plusieurs théories ont été avancées : microtraumatique, vasculaire, génétique, dysplasique par défaut d'ossification [77]... Plus récemment, l'ostéochondrose a été décrite chez de nombreuses espèces dont le chien, le porc et le cheval. Chez la volaille, des lésions cartilagineuses similaires à celles de l'OC ont été décrites mais on parle de dyschondroplasie [78] De par sa prévalence importante chez ces espèces, (15 à 40 % chez le porc, 10 à 30% chez le cheval, 20% chez le chien), l'ostéochondrose est un problème majeur pour les éleveurs [79, 80]. La cause directe d'apparition des lésions est cependant, incertaine mais il est communément admis que la manipulation (traumatismes) des animaux, leur alimentation, la vitesse de croissance et des facteurs génétiques jouent un rôle important [78, 80, 81].

### 3.1. Définition de l'OC chez le cheval

L'OC équine a été décrite pour la première fois chez le cheval en 1947 comme une manifestation syndromique [82]. En 1978, des fractures endochondrales et des fragments cartilagineux ont été observés chez de jeunes individus, principalement dans le jarret, résultant d'une perturbation du processus d'ossification endochondrale [83, 84]. Les études ultérieures ont mis en évidence plusieurs formes pathologiques, allant de fragments cartilagineux de taille variable, partiellement détachés de l'os sous-chondral ou retrouvés libres dans l'articulation, à des kystes osseux sous-chondraux (figure 16).

**Figure 17: Formation des lésions d'OCD et des kystes osseux sous-chondraux chez le cheval**



*Adapté d'après MC Ilwraith (1982) et Watkins (1992)*

Les lésions se développent entre la naissance et trois – quatre mois, certaines d'entre elles régressent spontanément, d'autres persistent et deviennent permanentes. Ces lésions sont principalement retrouvées bilatéralement dans le grasset, le jarret et le boulet [85]. Cette importante variabilité en termes de types de lésions et de leur localisation rend le dépistage et la classification des lésions difficiles pour les cliniciens.

Malgré son impact sur la filière équine (10 à 30% de la population équine est touchée selon les races de chevaux [86] et les articulations affectées), la physiopathologie et l'étiopathogénie de l'OC demeurent incertaines et controversées. Plusieurs modèles de physiopathologie, qui seront développés par la suite, ont été proposés et plusieurs facteurs semblent impliqués dans l'apparition des lésions.

## 3.2. Diagnostic et traitements

### 3.2.1. Signes cliniques et radiologiques

La pathologie peut rester infra-clinique ou aboutir à des manifestations cliniques, souvent tardives, comme une boiterie légère à modérée, une réponse positive aux tests de flexion, une réduction de mobilité de l'articulation ou un épanchement articulaire de gravité variable.

D'un point de vue radiologique, la lésion caractéristique est une irrégularité locale de la surface de l'os sous-chondral, donnant l'impression d'une encoche ou d'un coup d'ongle. En cas d'OCD, un ou des fragments ostéocondraux ("souris articulaire") peuvent être visibles *in situ* ou libre dans l'articulation. Les kystes apparaissent comme une zone de moindre minéralisation dans l'os sous-chondral. La radiographie ne permet cependant de visualiser que l'atteinte osseuse. Les lésions cartilagineuses précoces ou certaines formes d'OC présentant un décollement du cartilage sans atteinte de l'os sous-chondral échappent ainsi au diagnostic. L'arthroscopie diagnostique est de ce fait parfois nécessaire.

### 3.2.2. Sites de prédilections

Certaines articulations apparaissent plus vulnérables que d'autres aux lésions d'ostéochondrose. Le tarse et le grasset sont particulièrement touchés, sans doute en lien avec leur anatomie et la fermeture tardive de leur plaque de croissance, rendant ces articulations plus vulnérables durant une période plus longue. De plus, il a été montré qu'il existait des sites de prédilection au sein d'une même articulation, comme la partie distale de la crête intermédiaire du tibia ou les lèvres latérales de la trochlée du talus et de la trochlée fémorale, probablement en lien avec la distribution de l'intensité des contraintes biomécaniques [87, 88].

### 3.2.3. Classification des lésions

Plusieurs types de lésions, observés dans différentes articulations, ont été regroupés sous le terme ostéochondrose. Une gradation des lésions d'ostéochondrose, basé sur une échelle allant de 0 (cartilage normal) à 6 (présence d'un fragment ostéochondrale libre dans l'articulation) a été proposée en combinant descriptions morphologiques et histologiques [4] (tableau I). Cette classification permet de caractériser les lésions selon leur sévérité et leur degré d'avancement mais ne tient pas compte de la variabilité observée en termes de type de lésions et de localisation.

Tableau I : Classification histologiques des lésions d'ostéochondrose équine

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

D'après Van de Iest et al., 2004

Récemment, Jean-Marie Denoix et al.[89] ont proposé une classification des différentes lésions sur la base de leur étiopathologie anatomique et fonctionnelle. Le terme de pathologie ostéochondrale juvénile (Juvenile OsteoChondral Condition, JOCC) a alors été proposé afin les regrouper selon leur localisation et leur origine biomécanique. Ainsi, trois catégories de lésions d'OC ont été proposées:

- les fragments ostéochondraux à la surface articulaire (AS-OCF) résultant d'une surcharge de compression ou de cisaillement. Ce type de lésion est retrouvé très fréquemment au niveau des crêtes latérales des trochlées fémorales et des crêtes sagittales des condyles métatarsiens ou métacarpiens. Les fragments observés résulteraient de l'ossification de la couche ostéogénique profonde du cartilage épiphysaire
- les fragments ostéochondraux péri-articulaires (PA-OCF) induits par une compression trop importante en flexion ou en extension. On retrouve ce type de lésion dans les articulations présentant une large gamme de mouvements tels que les cochlées du tibia ou les phalanges proximales. Les fragments ostéochondraux seraient de l'os sous-chondral et de l'os épiphysaire péri-articulaire
- les kystes osseux sous-chondraux juvéniles (JSBC) résultant d'une compression trop importante au niveau des zones des surfaces articulaires convexes subissant un maximum de pression au sein de l'articulation telles que les condyles fémoraux médiaux ou la partie distale des phalanges proximales.

### 3.2.4. Marqueurs biologiques

Compte tenu de la difficulté du diagnostic, plusieurs études ont été menées afin de mettre en évidence des biomarqueurs de l'OC, permettant ainsi d'éviter les examens radiologiques dont l'interprétation est souvent difficile ou de dépister précocement les individus atteints avant même que les signes radiologiques ne soient visibles. De tels travaux ont porté sur les dosages dans le liquide synovial et le sang de quelques marqueurs biochimiques du métabolisme de l'os et du cartilage. Hélas, aucun marqueur biologique spécifique de l'OC n'a pu être mis en évidence. Chez 63 étalons de sports, Verwilghen et al., ont étudié la relation entre le statut radiologique (sains ou atteints d'une pathologie ostéoarticulaire) et les taux de marqueurs biochimiques sanguins connus de la dégradation du cartilage et de l'inflammation synoviale (Insulin growth factor-I, myeloperoxydases, Coll2-1 and Coll2-1NO(2)). Mais, aucune corrélation entre la classification radiologique des individus et les paramètres sanguins mesurés [90] n'a été obtenue. En revanche, chez des poulains, les animaux atteints d'OC présentaient des changements significatifs de concentrations d'ostéocalcine, un marqueur direct de la formation osseuse, dans le sérum au cours de la première semaine post-partum. Ainsi, le taux circulant d'ostéocalcine pendant les premières semaines après la naissance pourraient être un bon marqueur de prédiction à l'OC. Toutefois, des travaux complémentaires sont à effectuer afin d'en évaluer la valeur informative en termes de présence de lésions d'OC [91].

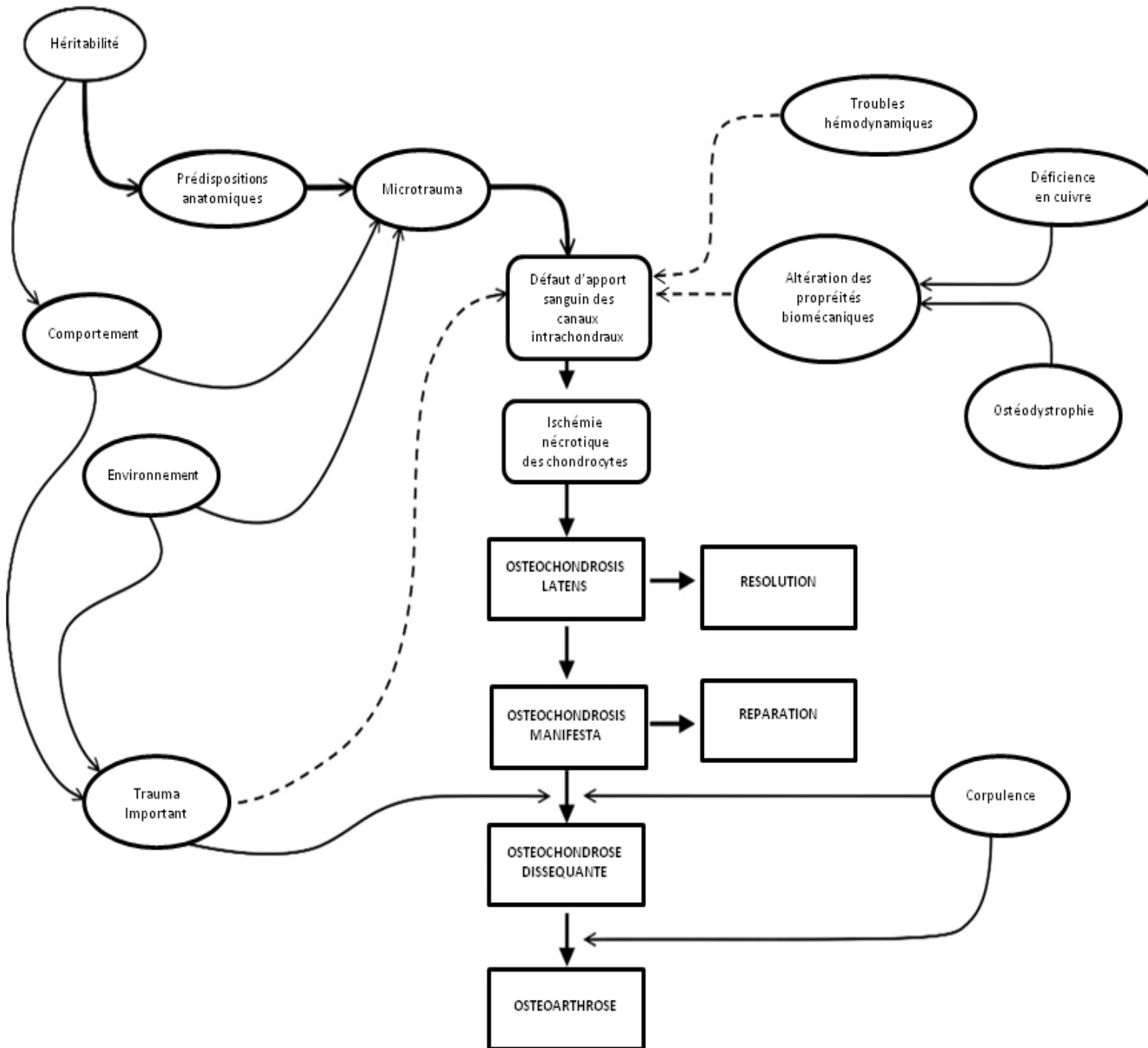
### 3.2.5. Traitements

En fonction de l'âge de l'animal et de l'articulation touchée, le traitement de l'OC peut être soit conservatif (repos), soit chirurgical. Le pronostic est variable selon l'âge de l'animal et la sévérité de la lésion et l'articulation touchée. Le traitement chirurgical par arthroscopie permet de réaliser une exérèse des fragments ou un curetage des kystes. Des tentatives de réparation à l'aide de broches ou par resurfaçage de l'articulation (arthroplastie mosaïque) au moyen de greffons ostéochondraux prélevés en zone non portante ont également été couronnées de succès. Dans la grande majorité des cas, les chevaux de sports traités retrouvent une carrière sportive normale. Pour les cas les plus graves, les chevaux sont réorientés vers du loisir ou vers la reproduction dans le cas des juments.

### 3.3. Etiologie

L'origine multifactorielle de l'ostéochondrose chez le cheval est communément admise. Ainsi, de nombreux facteurs, qui seront développés par la suite ont été proposé (figure 18). Cependant, l'implication directe de certains d'entre eux dans la mise en place des lésions n'a pas été clairement établie.

**Figure 18 : Schéma causal des facteurs étiologiques susceptibles d'être impliqués dans le développement des lésions d'ostéochondrose**



Adapté d'après Ytrehus B et al. Vet Pathol 2007



### **3.3.1. Facteurs génétiques : hérabilité, prévalence et gènes candidats**

L'ensemble des études d'hérabilité a montré le caractère polygénique de l'OC, des résultats similaires ayant été mis en évidence chez d'autres espèces comme le porc ou le chien. Différentes races de chevaux (Trotteurs Suédois, Hanovriens, Selles Italien) ont une fréquence des lésions d'OCD plus élevée dans la descendance de certains étalons que dans le reste de la population [92]. L'hérabilité des lésions d'OC est variable selon les articulations et les races. Chez les trotteurs l'OC du jarret a des hérabilités estimées entre 0.24 et 0.52 alors que chez le selle français, l'hérabilité du jarret était nulle et de 0,5 pour le pied antérieur [1, 93]. Etant donné cette variabilité importante entre les races de chevaux, plusieurs auteurs ont suggéré que le facteur d'hérédité serait étroitement lié à la vitesse de croissance et à la conformation mais cette hypothèse n'a cependant pas été clairement démontrée.

Par ailleurs, des études de détection de QTL (Quantitative Trait Loci) ont permis d'identifier une quinzaine de grandes régions du génome associées à la prédisposition à l'OC [94]. Deux gènes candidats ont été suggérés dans deux des régions [95], mais des études doivent encore être menées pour les valider et déterminer leur rôle potentiel dans cette affection.

### **3.3.2. Croissance, corpulence et facteurs endocriniens**

L'incidence de l'OC augmente chez les poulains à croissance rapide et à ossature large puisque les lésions d'OC au niveau du grasset et du jarret sont plus fréquentes chez les poulains à croissance rapide ou de forte corpulence [96, 97]. Ces lésions seraient la conséquence de forces biomécaniques excessives exercées sur le cartilage articulaire en cours de maturation.

Une dérégulation hormonale pourrait être impliquée dans l'apparition des lésions d'OC [98] puisque des lésions d'ostéochondrose disséquante et des kystes osseux sous-chondraux ont été observées chez des poulains hypothyroïde présentant également un retard d'apparition des centres d'ossification, un retard de développement de l'os et du cartilage et une fermeture retardée des plaques de croissance [99-103]. Afin de mieux comprendre et de caractériser les anomalies de développement liées à l'hypothyroïdisme chez le poulain, D'Amours et al., ont induit expérimentalement une hypothyroïdie congénitale chez un modèle de cobaye. Des lésions ostéo-articulaires, semblables à celles décrites chez les poulains ont été observées chez ces cobayes [104].

### **3.3.3. Alimentation**

Chez des poulains soumis à une alimentation hyper-énergétique des lésions d'OC sembleraient être induites par une alimentation déséquilibrée. En effet, une alimentation riche en carbohydrates provoquerait une importante hyper-insulinolémie postprandiale et une augmentation d'insuline et d'IGF-1 et 2 ayant potentiellement un effet sur le processus d'ossification endochondrale. De plus, l'insuline stimulant l'élimination rapide des hormones thyroïdiennes circulantes, les individus soumis à un régime hyper-énergétique ont également une diminution des taux sanguins de T3 et T4 [98, 105]. Comme nous l'avons vu précédemment, T3 et T4 sont impliqués dans les stades de différenciation terminale des chondrocytes et dans l'invasion vasculaire du cartilage de croissance. Ainsi, une alimentation déséquilibrée pourrait entraîner une perturbation de la maturation des chondrocytes hypertrophiques favorisant la formation d'îlots de cartilages immatures et ainsi conduire, *in fine*, au développement de lésions d'OC [106].

Les déséquilibres en minéraux comme les carences en cuivre augmentent l'incidence des lésions d'OCD chez les poulains, en lien avec une modification des propriétés



biomécaniques du cartilage. Les excès en zinc et en phosphore ont également été associés à l'apparition de lésions [107].

Chez le porc, la part du facteur alimentaire dans le développement des lésions a également été largement étudiée sans pour autant pouvoir conclure avec certitude quant à son implication dans la physiopathologie. En 2006, Frantz et al.[108] a mis en évidence l'implication de méthionine/thréonine, du cuivre et du manganèse dans le métabolisme de l'os et du cartilage. Ainsi, une combinaison de ces nutriments dans l'alimentation des porcs pourrait réduire l'incidence des lésions d'OC. Toutefois, des études complémentaires doivent être réalisées afin de valider cette hypothèse.

### **3.3.4.Stress mécaniques et traumatiques**

L'induction primaire des lésions par les contraintes mécaniques est, en revanche, sujette à controverse, même si l'existence de sites anatomiques de prédilection suggère l'implication de ces facteurs. Par ailleurs, l'existence d'une «fenêtre de vulnérabilité», période critique durant laquelle l'ossification endochondrale serait sensible aux facteurs étiologiques, a été suggérée pour expliquer la distribution des lésions: généralement un seul type d'articulation est atteint, souvent de façon bilatérale ou quadrilatérale pour les boulets. Comme l'ossification des différentes articulations n'est pas synchrone, la présence transitoire de facteurs étiologiques comme les contraintes biomécaniques pourrait expliquer l'apparition préférentielle de lésions sur un seul type d'articulation [109].

## **3.4.Physiopathologie de l'OC : différents modèles proposés**

### **3.4.1.Modèle d'une fragilité du cartilage et/ou de l'os**

Chez le porc, une fragilité des tissus osseux et cartilagineux pourraient être la cause principale de boiterie en lien avec des lésions d'OC [110].

Selon Dammrich [81] les lésions primaires d'OC chez le chien, sont associées à une densité osseuse faible de l'os sous-chondral ; qui de ce fait n'assurerait pas son rôle de support du cartilage articulaire. Ces défauts primaires, associés à des contraintes biomécaniques excessives conduiraient, secondairement, à des défauts de nutrition, de métabolisme, de fonctions et de viabilité des chondrocytes au niveau de la surface articulaire.

Chez le cheval, Hurtig et al., a montré que des poulains atteints de lésions articulaires présentaient des défauts de liaison entre les fibres de collagènes au niveau des matrices osseuse et cartilagineuse en raison d'un manque d'enzyme lysyl oxidase (liaison des groupes d'hydroxylylisine entre les fibres de collagènes adjacentes). Cette anomalie serait à l'origine d'un défaut de réponse aux contraintes biomécaniques pouvant conduire au développement de lésions d'OC [111]. Cependant, si l'on tient compte de la morphologie hétérogène des lésions d'OC, du fait qu'elles se développent dans des sites de prédilection bien défini et de la forte prévalence dans différentes races de chevaux, il est au demeurant peu probable que la formation de tissus de soutien fragiles joue à elle seule un rôle majeur dans l'apparition des lésions d'OC chez le cheval [112].

### **3.4.2.Modèle d'une dyschondroplasie initiale**

L'histologie des lésions précoces a mis en évidence des accumulations de chondrocytes indifférenciés en bordure de l'os sous-chondral [113]. Les lésions primaires résulteraient donc d'une dyschondroplasie, avec arrêt de la différenciation des chondrocytes au stade préhypertrophique, production d'une matrice inappropriée et perturbation de l'invasion vasculaire. Il a été noté aussi, des modifications de composition de la matrice et de son turnover (pour revue voir [114]): une augmentation du contenu en collagène VI, une altération du métabolisme des protéoglycanes ainsi qu'une modification des taux ou de la localisation d'enzymes intervenant dans la dégradation de la matrice (MMPs, TIMP1,

cathepsines B et D). Il est cependant possible que ces modifications soient une conséquence de la pathologie, plus qu'une cause initiale.

Un défaut de maturation des chondrocytes hypertrophiques pourrait se traduire par une réduction de la production de facteurs angiogéniques, perturbant secondairement l'invasion vasculaire et l'arrivée des ostéoclastes. En conséquence, la croissance du cartilage se poursuivant sans résorption et sans ossification, son épaisseur augmenterait dans la zone dyschondroplasique, empêchant *in fine* toute nutrition des couches profondes par le liquide synovial et provoquant une nécrose locale.

En fonction des contraintes biomécaniques ou des traumatismes subis par cette zone fragilisée, la lésion d'OC évoluerait ensuite en OCD ou en kystes osseux sous-chondraux (Figure 16). En effet, des forces de tension ou de cisaillement créeraient des micro-fractures se développant à partir de la zone nécrosée vers la surface du cartilage, provoquant la dissection partielle (flap) ou totale (souris articulaire) d'un fragment ostéochondral. Dans les zones de compression, la pression entraînerait l'invagination de la zone nécrotique dans l'os sous-chondral ou l'injection de liquide synovial dans des micro-fractures, provoquant une résorption osseuse et l'élargissement du kyste.

Toutefois, l'hypothèse d'une dyschondroplasie initiale ne prend pas en compte certaines caractéristiques de l'OC incluant l'existence de sites de prédilections. [112]

### **3.4.3. Modèle d'une nécrose de l'os sous-chondral**

Chez l'homme, les lésions primaires d'OC sont souvent considérées comme provenant d'une nécrose de l'os sous-chondral conduisant secondairement à des lésions du cartilage sous-jacent. Toutefois, l'origine de la nécrose de l'os sous-chondral n'a pas été clairement démontrée même si l'hypothèse d'une perturbation de la vascularisation de l'os semble être admise.

Dans une étude menée sur des jeunes lapins chez lesquels des lésions cartilagineuses disséquantes ont été générées chirurgicalement, Bravo et al. [115] ont montré que de telles lésions conduisent à la formation d'un centre d'ossification auxiliaire résultant de la présence d'os trabéculaire dans le flap de cartilage. Un approvisionnement sanguin insuffisant (sans doute en raison des mouvements du flap) dans le centre d'ossification néoformé pourrait par la suite conduire à une nécrose de l'os sous-chondral.

### **3.4.4. Modèle d'une nécrose ischémique du cartilage de croissance**

Des études de lésions précoces d'OC chez le porc ont révélé la présence de régions chondro-nécrotiques dépourvues de canaux intrachondraux [116]. Il semblerait donc qu'un défaut de vascularisation puisse être impliqué dans l'apparition de lésions d'OC. Des travaux récents ont montré que, chez le porc et le lapin, l'interruption de quelques canaux intrachondraux provoque rapidement une nécrose localisée du cartilage et conduit au développement de lésions ostéochondrales (pour revue voir [112]). Cependant, l'origine primaire du défaut de vascularisation n'a pas été clairement établie. Selon Ytrehus et al. le défaut de vascularisation du cartilage conduisant au développement de lésion d'OC pourrait être expliqué par une régression prématurée des canaux intrachondraux résultant d'un défaut du processus d'ossification endochondrale [117, 118]. De plus, l'interruption des canaux cartilagineux était principalement localisée à la jonction de l'os sous-chondral et du cartilage. Ainsi, des micro-traumas pourraient être à l'origine de micro-fracture de l'os sous-chondral et conduire à l'interruption des canaux intrachondraux du cartilage sous-jacent. Chez le cheval, des travaux menés chez des jeunes poulains ont mis en évidence une des altérations locales du cartilage en lien avec la distribution des canaux intrachondraux suggérant un lien entre la vascularisation du cartilage et les défauts observés [119-121]. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'interruption des canaux intrachondraux, résultant d'un trauma ou d'une matrice défectueuse, pourrait être à l'origine d'une ischémie

locale conduisant à la formation de zones nécrotiques et *in fine* au développement de lésions d'OC.

### **3.4.5.Mécanismes moléculaires**

Les gènes et les mécanismes moléculaires impliqués dans l'une ou l'autre des hypothèses demeurent inconnus. Des programmes de détection de QTL associés à la prédisposition à l'OC ont été mis en place ces dernières années dans différentes races de chevaux de selle et de course [1, 95, 122-125]. Des régions d'intérêt et plusieurs gènes candidats dans chacune des régions ont été identifiés, mais aucun gène ou mutation n'a pour le moment été clairement associés avec la prédisposition à l'OC. De façon surprenante, aucun QTLs détectés n'a été retrouvé en commun entre les différentes études. Ce manque de correspondance entre les études est peut-être en lien avec les différences de sites analysés ou les différences de puissance des dispositifs, ce qui rend difficile les comparaisons entre études. Il est probable que les imprécisions et les différences de définitions de la pathologie, en mélangeant sous un même phénotype des entités différentes, y contribue également fortement.

## RESULTATS

### 4. Processus biologiques impliqués dans la physiopathologie de l'ostéochondrose équine.

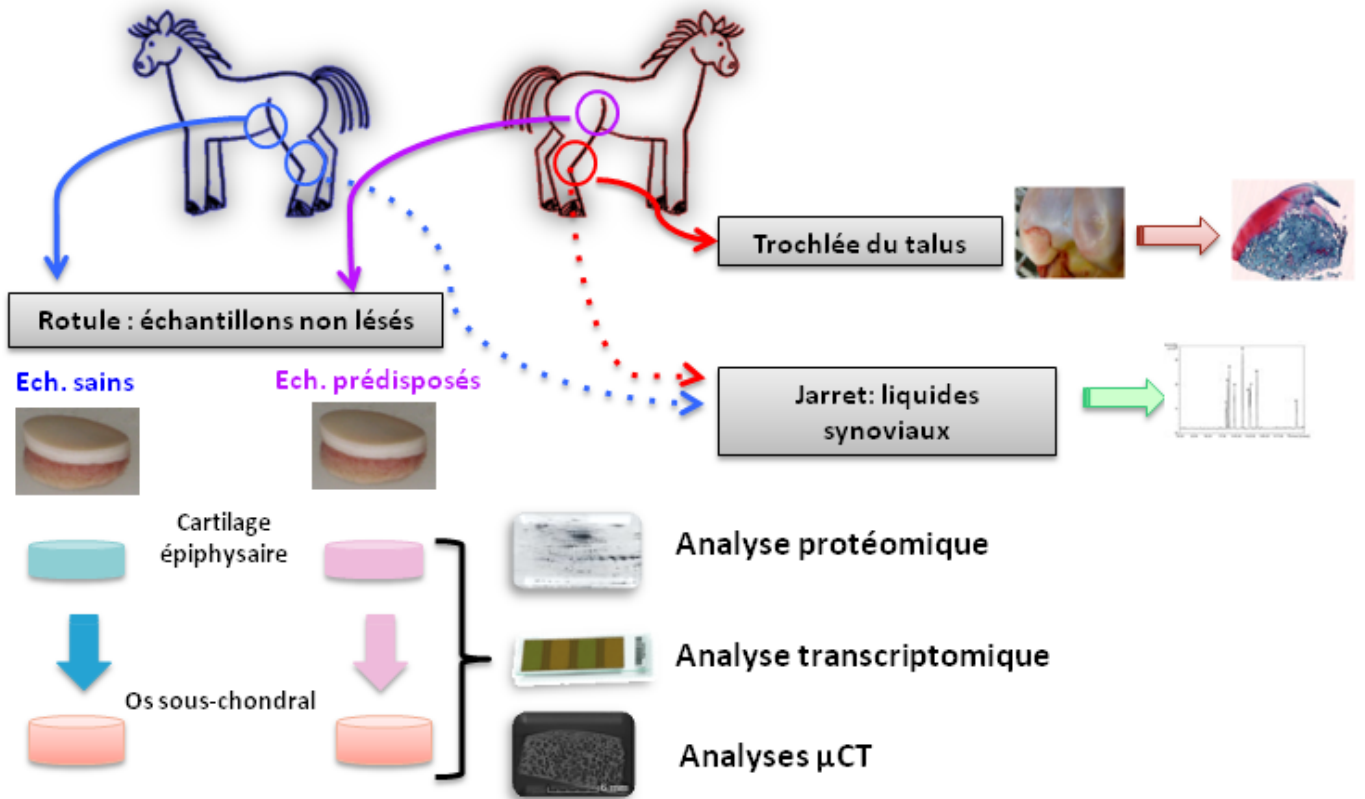
L'objectif premier de ma thèse était d'améliorer la compréhension de la pathogénie et de mettre en évidence les processus biologiques perturbés afin de faciliter le clonage positionnel des gènes impliqués dans la prédisposition à l'OC. Pour cela, un dispositif expérimental original a été mis en place, me permettant d'analyser les différences de protéome et de transcriptome du cartilage et de l'os sous-chondral entre chevaux sains et atteints.

Grâce à une collaboration avec la station expérimentale IFCE (Institut Français du Cheval et de l'Équitation) située à Chamberet, j'ai pu disposer d'un lot de 34 poulains de race Anglo-Arabe nés d'Avril à Mai 2009 et élevés dans les mêmes conditions (alimentation, environnement). A l'âge de six 6 mois, le statut ostéoarticulaire des poulains a été évalué par l'équipe du Professeur Olivier Lepage (VetAgro Sup-pôle équin) à partir d'un examen clinique et d'un bilan radiographique de 16 clichés. Parmi l'ensemble des poulains, cinq individus sains, ne présentant aucun signe de pathologie ostéoarticulaire, et cinq individus atteints, avec au moins une lésion d'ostéochondrose sur les trochlées du talus, ont été sélectionnés pour l'étude. Le lot de poulains sélectionnés était équilibré en sexe, âge et articulation lésée. A huit mois, les poulains ont été transférés à la clinique équine de VetAgro Sup à Lyon) et euthanasiés afin de prélever d'une part les lésions d'OC et d'autre part des échantillons d'os sous-chondral et de cartilage épiphysaire sur les articulations non lésées. Une partie de ces échantillons a été soumise à une compression expérimentale de 24 heures. L'ensemble du dispositif expérimental est représenté schématiquement dans la ci-dessous (figure 19).

Figure 19: Dispositif expérimental de l'étude des voies biologiques impliquées dans la physiopathologie de l'OC équine

5 poulains sains

5 poulains atteints



#### 4.1. Développement d'une méthode d'analyse protéomique de l'os et du cartilage

Dans un premier temps, afin de réaliser notre étude protéomique à partir d'échantillons d'os et de cartilage épiphysaire de cheval, nous avons mis au point une technique d'analyse basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle. En effet, l'analyse protéomique d'os et de cartilage constitue un véritable challenge en raison de la structure et des propriétés biochimiques de ces deux tissus. Les différentes méthodes décrites jusque-là étaient réalisées à partir de cellules ou d'explants en culture [126], limitant les études relatives à la biologie *in vivo* des chondrocytes et à l'homéostasie de la MEC. Nous avons donc développé une méthode simple et efficace basée sur une extraction des protéines au phénol, une électrophorèse bidimensionnelle, une coloration des gels au nitrate d'argent puis une identification des protéines par LC-MS/MS.

Cette méthode ne nécessite ni mise en culture qui pourrait induire d'éventuelles modifications physiologiques, ni fractionnement qui pourrait réduire la reproductibilité. Elle permet donc d'étudier le protéome d'échantillons d'os et de cartilage collecté *in vivo*, en conditions physiologiques normales. Nous avons pu identifier ces protéines issues de plusieurs compartiments cellulaires prouvant ainsi que la procédure pouvait être utilisée pour des études moléculaires *in situ* des contenus cellulaires des chondrocytes, des ostéoblastes, des ostéoclastes et de la matrice extracellulaire à l'exception des protéoglycanes. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue *Proteomics* : **Desjardin et al., A method for proteomic analysis of equine sub-chondral bone and epiphyseal cartilage [127].**

## TECHNICAL BRIEF

# A method for proteomic analysis of equine subchondral bone and epiphyseal cartilage

Clémence Desjardin<sup>1</sup>, Thierry Balliau<sup>2</sup>, Benoît Valot<sup>2</sup>, Michel Zivy<sup>3</sup>, Laurence Wimel<sup>4</sup>, Gérard Guérin<sup>1</sup>, Edmond Cribiu<sup>1</sup> and Laurent Schibler<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1313, Biologie Intégrative et Génétique Animale, Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup>INRA, PAPPSO, UMR 0320/UMR8120 Génétique Végétale, PAPPSO, Gif-sur-Yvette, France

<sup>3</sup>CNRS, PAPPSO, UMR 0320/UMR8120 Génétique Végétale, Gif-sur-Yvette, France

<sup>4</sup>Station expérimentale des Haras Nationaux, IFCE, Chamberet, France

Proteomic analyses of cartilage and, to a lesser extent, of bone have long been impaired because of technical challenges related to their structure and biochemical properties. We have developed a unified method based on phenol extraction, 2DE, silver staining, and subsequent LC-MS/MS. This method proved to be efficient to characterize the proteome of equine cartilage and bone samples collected *in vivo*. Since proteins from several cellular compartments could be recovered, our procedure is mainly suitable for *in situ* molecular physiology studies focused on the cellular content of chondrocytes, osteoblasts, and osteoclasts as well as that of the extracellular matrix, with the exception of proteoglycans. Our method alleviates some drawbacks of cell culture that can mask physiological differences, as well as reduced reproducibility due to fractionation. Proteomic comparative studies between cartilage and bone samples from healthy and affected animals were thus achieved successfully. This achievement will contribute to increasing knowledge on the molecular mechanisms underlying the physiopathology of numerous osteoarticular diseases in horses and in humans.

Received: July 5, 2011  
Revised: January 31, 2012  
Accepted: February 24, 2012

**Keywords:**

Animal proteomics / 2DE / Cartilage / Mass spectrometry / Subchondral bone

A large number of skeletal genetic and degenerative diseases, such as chondrodysplasias, osteoarthritis, osteoporosis, or osteopetrosis has been described in many species. Proteomic technologies have proven very useful to unravel molecular and cellular mechanisms that contribute to disease etiology and progression and to identify biomarkers [1]. However, compared to many other tissues, such analyses on cartilage and, to a lesser extent, on bone are less advanced because of technical challenges related to their biochemical properties. Indeed, due to its low cellularity, cartilage is difficult to obtain in adequate quantities for most protein analyses. Moreover, cartilage extracellular matrix (ECM) is mainly composed of highly anionic macromolecules that interfere with IEF [2].

Thus, proteomics of the skeleton has long been restricted to the study of cell or explant tissue cultures [3], which are of limited interest to investigate questions relating to the *in vivo* chondrocyte biology and ECM homeostasis. Refined tissue preparation techniques, combined with improved reproducibility of 2DE and sensitivity of MS/MS have made possible the direct proteomic characterization of cartilage and bone tissues [2]. For instance, bone protein extraction has been improved by hydrochloric acid demineralization [4]. Likewise, sample prefractionation using precipitation with a cationic detergent, chromatography, or sequential fractionation can remove major ECM macromolecules that interfere with IEF [5]. One major disadvantage of such techniques is the selective or nonspecific partial loss of several proteins, negatively affecting reproducibility, and downstream comparative analysis. More recently, Pecora et al. [6] described an exclusion method based on passive rehydration loading that does not

**Correspondence:** Dr. Laurent Schibler, BIGE, UMR1313 GABI, INRA CRJ, Domaine de Vilvert, Bat 440, F-78350 Jouy-en-Josas, France

**E-mail:** laurent.schibler@jouy.inra.fr

**Fax:** +33 1 34 65 24 78

**Abbreviation:** ECM, extracellular matrix

**Colour Online:** See the article online to view Fig. 2 in colour.



require sample pretreatment; this was efficient and reproducible for 2DE in mouse but failed to resolve horse cartilage protein samples.

Here, we describe a simple, efficient, and reproducible protocol to study both cartilage and bone without any pretreatment or in vitro culture step. This protocol, derived from plant proteomic techniques [7, 8], allowed us to characterize horse epiphyseal cartilage and subchondral bone proteomes using 2DE, silver staining, and LC-MS/MS spot identification.

Cartilage and subchondral bone explants were obtained from femoral trochlea of five 1-year-old foals euthanized as part of a larger project (ethics approval ref 0964 from the VetAgroSup ethics board). Sections were cut perpendicular to the cartilage surface and included epiphyseal cartilage and about 5 mm of subchondral bone (see data in Supporting Information Fig. S1). Explants were washed in PBS and cartilage slices were then separated from subchondral bone and flash frozen in liquid nitrogen. Although not performed in the analysis reported here, a centrifugation step (30 s at  $6000 \times g$ ) can be added to remove blood from subchondral bone (see Supporting Information Fig. S2 for a comparison between 2DE gels).

Frozen cartilage (200 mg) and bone (150 mg) samples were crushed in liquid nitrogen using a hammer and a stainless steel mortar and pestle and then subsequently pulverized into a fine powder in liquid nitrogen using a porcelain mortar and pestle. This was suspended in 10 mL of extraction buffer (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 0.7 M saccharose, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, 10 mM thiourea, 2 mM PMSF, and  $\beta$ 2-mercaptoethanol 2%). Then, an equal volume of buffered AquaPhenol pH 8 (Qbiogene, ref B063501) was added and the solution was incubated on a shaker for 30 min at 4°C. Phenol is known to denature and dissolve proteins and lipids leaving water-soluble matter (carbohydrates, nucleic acids, etc.) in the aqueous layer. Since hyaluronan and proteoglycans are soluble in water, phenol extraction is believed to reduce their amount in the protein extract. After a 30-min centrifugation step ( $12\,000 \times g$  at 4°C), the phenol phase was recovered and back extracted with 10 mL of extraction buffer followed by shaking and centrifugation steps. Phenol-extracted proteins were then precipitated by adding 25 mL of cold methanol, 0.1 M of ammonium acetate, and overnight incubation at  $-20^\circ\text{C}$ . Proteins were finally pelleted by centrifugation ( $10\,000 \times g$ , 30 min at  $-10^\circ\text{C}$ ), washed with 30 mL of cold methanol and vacuum-dried. Proteins were then solubilized in R2D2 buffer [9] and quantified using the Plusone 2D Quant kit (GE Healthcare).

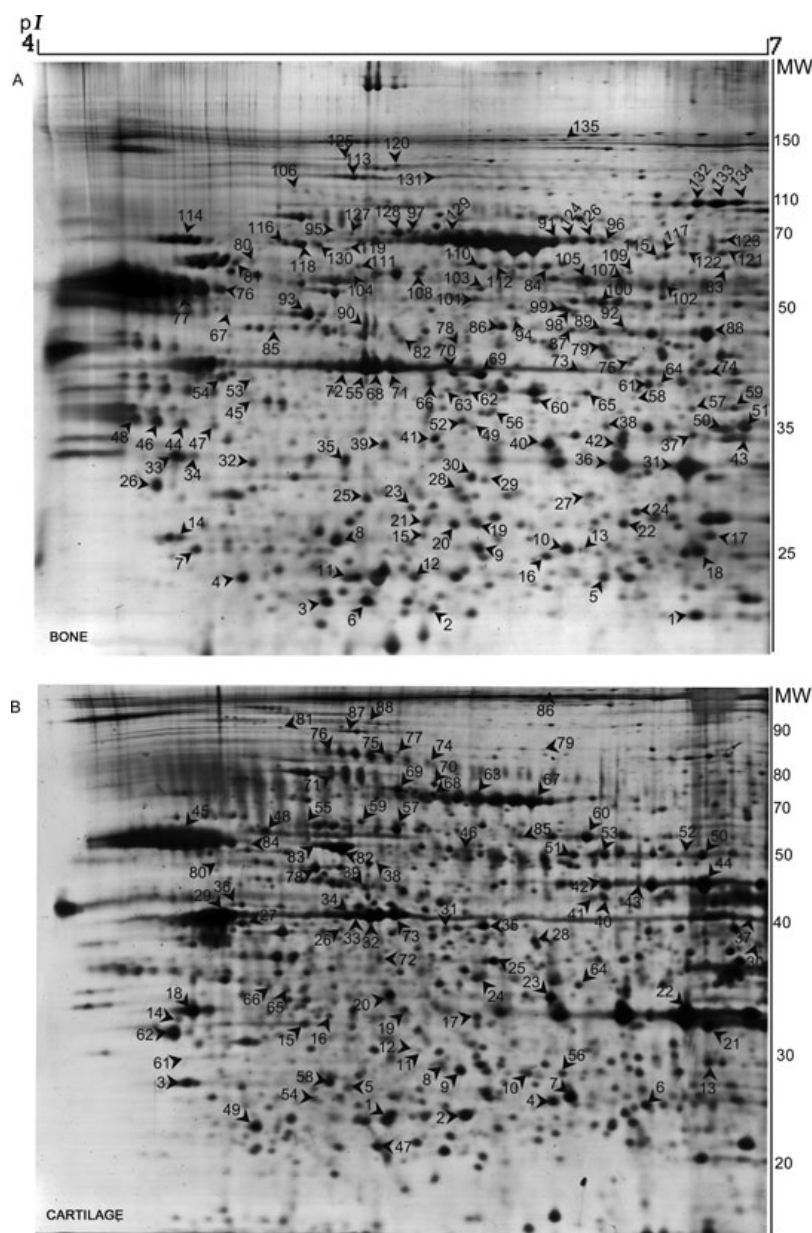
First-dimension separation was performed with 24-cm-long linear pH 4–7 immobilized pH gradient (IPG) dry strips (Biorad). A total of 50–200  $\mu\text{g}$  of protein were loaded per strip followed by an active rehydration (13 h at 20°C and 50 V). Full focusing was achieved after applying 84 000 Volt-hours (Vh) at 20°C in a Protean IEF Cell (Biorad). The IEF program was set as follows: 200 V for 30 min (linear increase), 500 V for 30 min (linear increase), 1000 V for 1 h (linear increase),

and 10 000 V (rapid increase) until 84 000 Vh. Prior to second-dimension separation, strips were equilibrated by three 15-min incubation steps (buffer1: 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, glycerol 30%, SDS 2%, DTT 1%; buffer 2: 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, glycerol 30%, SDS 2%, iodoacetamide 2.5%; migration buffer: 25 mM Tris, 0.2 M glycine, 0.1 M SDS). Second-dimension separation was performed on a  $20 \times 24$  cm polyacrylamide gel (acrylamide 11%, 15 mM piperazin diacrylamide, 0.5 M Tris-HCl pH 8.8, SDS 0.1%) and carried out at 30 mA/gel and 16°C during 15 h at 130 V.

2DE gels were silver-stained as previously described [10] and scanned using an Amersham Imagescanner. Aligned images (Samespots software) were imported into a Progenesis project to perform spot detection (minimal volume  $>6 \times 10^6$ ), matching steps, optical density calibration, and normalization of spot volumes. Proteins were excised from gels using an EXquest Spot Cutter robot (Biorad) and digested using a standard trypsin protocol [11]. Tryptic peptides were analyzed by LC-MS/MS using a LTQ-XL ETD (ThermoFinnigan) [12]. A database search was performed with the X!tandem freeware v2010.01.01.4 (<http://www.thegpm.org/tandem/>) as previously described [13]. Three databases were used: (i) the NCBI (<http://www.ncbi.com>) Equus Caballus protein database v20100519 (21 331 entries); (ii) the EBI Ensembl Equus Caballus (<http://www.ebi.ac.uk/ebisearch/search.ebi?db=genomes&t=caballus>) protein database v2010-05-19 (22 641 entries), and (iii) a contaminant database (trypsin, keratins). Only the proteins identified with at least two peptides were kept and classified according to their subcellular localization using both the DAVID gene functional classification tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) and the Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com/>).

Two hundred milligrams of cartilage yielded about 430  $\mu\text{g}$  of protein i.e. 2.2  $\mu\text{g}$  of protein per mg of fresh tissue, while a higher yield was obtained with bone samples i.e. 6.6  $\mu\text{g}/\text{mg}$  of fresh tissue. IEF could be achieved for protein amounts as high as 400  $\mu\text{g}$ , suggesting that hyaluronan and proteoglycans contents were efficiently reduced by aquaphenol protein extraction. However, we cannot rule out the possibility that some proteoglycans may remain in the sample. The highest 2DE gel resolution was obtained for protein amounts ranging from 75 to 200  $\mu\text{g}$  (data not shown).

2DE was carried out using either 100  $\mu\text{g}$  or 200  $\mu\text{g}$  of protein and two technical replicates were performed for each of the five horses. For cartilage, about 700 matching spots were detected among the ten gels and this number increased to about 900 and 1300 spots for spots matching at least nine and eight gels, respectively. The spot pattern was highly reproducible within a given sample (CV = 13% between technical duplicates) and was also consistent between samples. Assessment of biological variation showed that spot volumes varied significantly between foals (CV of 58%). For bone, the number of matching spots among the ten gels was about 900 and increased to 1300 and 1600 for spots matching in at least nine and eight gels, respectively. Technical reproducibility



**Figure 1.** Silver-stained 2D gels of equine subchondral bone and cartilage samples. (A) 2DE map of equine subchondral bone. (B) 2DE map of equine epiphyseal cartilage. Spots are shown according to their pI and MW. Spots corresponding to identified proteins are shown by a numbered arrow and listed in Supporting Information Table S1.

was high (CV less than 15%) and biological variation rose to 62%. Spot patterns were consistent both between replicates and samples. Thus for both tissues, quantitative variability estimated on the basis of technical CV determination, is similar to that reported for other 2DE analyses in the literature [6], and is lower than the biological variability, making this method valuable to investigate protein expression differences between samples.

A total of 100 and 36 spots were excised from 200  $\mu$ g and 100  $\mu$ g cartilage gels, respectively, leading to LC-MS/MS iden-

tification of 87 and 23 proteins, respectively. The rate of protein identification was thus higher for the 200- $\mu$ g loaded gels than for the 100- $\mu$ g loaded gels (87% versus 64%). To increase the rate of protein identification for the 100- $\mu$ g loaded gels, unidentified spots were subjected to a second LC-MS/MS analysis, using a doubled amount of peptide sample, making it possible to identify 11 additional proteins.

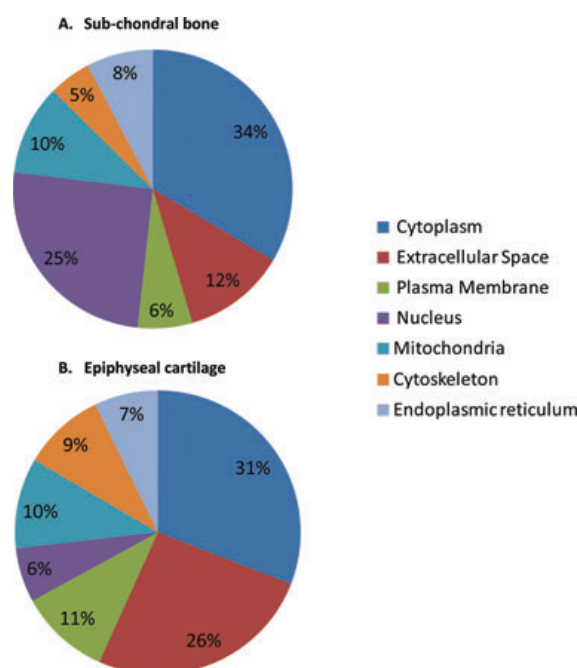
Finally, 89% of the spots excised from the cartilage gels could be identified (median number of spectra = 10, median e-value =  $10^{-47}$ , median sequence coverage 25%), a result

similar to that classically observed with Coomassie-stained gels.

Similar protein identification rates were obtained from bone gels, with success rates higher for 200- $\mu$ g loaded gels than for 100- $\mu$ g loaded gels. Altogether, 215 spots were excised leading to LC-MS/MS identification of 190 (90%) proteins (median number of spectra = 8, median e-value =  $10^{-34}$ ). The percent of sequence coverage ranged from 1% to 71% (median = 26%).

Thus, the method described here allows the comparison of cartilage and bone proteomes between tissue samples, reaching a high protein identification rate from silver-stained 2DE gels. Identified proteins are listed in Supporting Information Table S1 (data in Supporting Information) and showed as numbered arrows on the 2DE gel image (Fig. 1).

Some identified proteins have already been described at similar locations in previous studies i.e. collagen, type II, alpha 1 (COL2A1), enolase 1 (ENO1), and endoplasmic reticulum resident protein 29 (ERP29) in cartilage as reported by Pérez et al. [14] and creatine kinase (CK), albumin (ALB), and alpha-1-B glycoprotein (A1BG) in bone at similar *pI* and molecular weights as those reported by Jiang et al. [4]. It should be noted that no proteoglycan was identified in either tissue. A total of 51 proteins (22%) showed a discrepancy between their position on the gels and their predicted molecular weight, despite a significant e-value and a high number of spectra. Among these, 19 (9%) indicated by \* in Supporting Information Table S1, may represent proteolytic products. In particular, it is well known that type I, type II, type III, and type XI collagens are synthesized as prepropeptides with C- and N-terminal globular domains, which are removed by extracellular proteinases to promote formation of collagen fibrils. Bone spots 35 and 33, which were identified respectively as COL1A2 and COL11A1, probably correspond to such C-terminal fragments of collagen propeptides. Likewise, cartilage spots 56 and 12 probably correspond to fragments of the N-terminal part of COL6A1 and COL11A2 and spots 22 and 14 to the C-terminal part of COL2A1 and COL11A1 (Supporting Information Fig. S3). Alternatively, in 21 (9%) cases indicated by \*\* in Supporting Information Table S1, the discrepancies between predicted and apparent molecular weight (MW) may result from unpredicted splicing or erroneous annotations of the horse genome. For example, predicted MW for transferrin (Bone spot 134, apparent MW = 75 kDa) differ between the Ensembl (<http://www.ensembl.org>) and the Uniprot (<http://www.uniprot.org>) databases (109 versus 78 kDa). Likewise, cartilage spot 25 (dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1) has an apparent MW higher than expected (35 versus 20 kDa), but it does agree with its human homolog (31 kDa). We found no obvious explanation for the 11 (4%) remaining proteins. For instance, alpha-2-HS-glycoprotein (bone spot 77 and cartilage spot 84) exhibits an apparent MW higher than expected. PTM may account for this discrepancy, since the protein was identified both in cartilage and bone at a similar location based on many peptides spread over the whole protein sequence. Likewise, observed



**Figure 2.** Subcellular localization of proteins identified by MS/MS in equine subchondral bone (A) and epiphyseal cartilage (B). Identified proteins were classified according to their subcellular localization determined using both the DAVID gene functional classification tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/gene2gene.jsp>) and the Ingenuity Pathway Analysis software (<http://www.ingenuity.com/>).

and predicted *pI* were in good agreement, except for proteins known to be subjected to posttranslational processing and putative proteolytic fragments (large *pI* discrepancies > 1 *pI*). A total of 24 proteins showed small differences (median = 0.18 *pI*). PTMs, genetic polymorphisms, or technical bias may account for these differences.

Proteins were categorized according to their biological functions and their cellular compartment using the DAVID database and the Ingenuity Pathway Analysis software (Fig. 2). Distribution of their subcellular location suggests that our method allowed extraction and identification of proteins from virtually all the cellular compartments, including ECM, and could be useful to analyze intracellular and extracellular proteins. However, since we did not evaluate the efficiency and reproducibility of proteoglycans' depletion, the procedure is inappropriate for quantitative studies focused on these proteins. Overall, the procedure described here is suitable for in situ molecular physiopathological comparative studies focused on cellular and intracellular proteins. It alleviates the drawbacks of cell cultures that may mask physiological differences and reduced reproducibility due to fractionation. It makes it possible to perform comparative proteomics between healthy and affected cartilage and bone samples. To

evaluate the universality of this method, we also analyzed epiphyseal cartilage and subchondral bone femur samples from two P14 mice, two rabbit fetuses, and two piglets. Protein yields (2.8, 13, and 40  $\mu\text{g}$  of protein/mg of cartilage for pig, rabbit, and mouse, respectively) were consistent with results reported in previous studies. Good results were obtained (Supporting Information Figs. S4 and S5) without changing the protocol, except for piglet cartilage (centrifugation step at  $15\,000 \times g$  instead of  $12\,000 \times g$  to separate the phenol layer). Since a small amount of starting material (50 mg of cartilage for foal and piglet, 10 mg for rabbit, and 6 mg for mouse femoral heads) is sufficient to obtain enough total protein (100  $\mu\text{g}$ ), our method can be applied to study several animal models and should be also efficient to analyze human patient biopsies.

Global analysis of cartilage and bone by proteomic approaches will undoubtedly provide new insights into the biology of these important tissues and into the molecular mechanisms involved in numerous osteoarticular pathologies such as osteoarthritis or osteoporosis in humans. Likewise, developmental orthopedic diseases and especially osteochondrosis represents a major concern in horse industry. Such comparative proteomic approaches may prove useful to decipher molecular mechanisms involved in these disorders and refine nosological entities. In addition, it is likely that direct proteomic analysis of cartilage and bone will help identify new biomarkers.

*This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR BIOCART) and from the French Horse and Riding Institute (IFCE). We are grateful to Julie Rivière, Mathieu Diribarne, and Xavier Mata for their contribution in horse surgery. We thank Stephan Bouet and Emmanuelle Koch for providing the pig and rabbit samples and Hélène Hayes for English editing.*

*The authors have declared no conflict of interest.*

## References

- [1] Ruiz-Romero, C., Blanco, F. J., The role of proteomics in osteoarthritis pathogenesis research. *Curr. Drug Targets* 2009, 10, 543–556.
- [2] Wilson, R., Belluoccio, D., Bateman, J. F., Proteomic analysis of cartilage proteins. *Methods* 2008, 45, 22–31.
- [3] Cillero-Pastor, B., Ruiz-Romero, C., Caramés, B., López-Armada, M. J. et al., Proteomic analysis by two-dimensional electrophoresis to identify the normal human chondrocyte proteome stimulated by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* 2010, 62, 802–814.
- [4] Jiang, X., Ye, M., Liu, G., Feng, S. et al., Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J. Proteome Res.* 2007, 6, 2287–2294.
- [5] Wilson, R., Bateman, J. F., Cartilage proteomics: challenges, solutions and recent advances. *Proteomics Clin. Appl.* 2008, 2, 251–263.
- [6] Pecora, F., Forlino, A., Gualeni, B., Lupi, A. et al., A quantitative and qualitative method for direct 2DE analysis of murine cartilage. *Proteomics* 2007, 7, 4003–4007.
- [7] Hurkman, W. J., Tanaka, C. K., Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 1986, 81, 802–806.
- [8] Faurobert, M., Pelpoir, E., Chaïb, J., Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods Mol. Biol.* 2007, 355, 9–14.
- [9] Méchin, V., Consoli, L., Le Guilloux, M., Damerval, C., An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* 2003, 3, 1299–1302.
- [10] Scheler, C., Lamer, S., Pan, Z., Li, X. P. et al., Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS). *Electrophoresis* 1998, 19, 918–927.
- [11] Méchin, V., Balliau, T., Château-Joubert, S., Davanture, M. et al., A two-dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry* 2004, 65, 1609–1618.
- [12] Ligat, L., Lauber, E., Albenne, C., San Clemente, H. et al., Analysis of the xylem sap proteome of *Brassica oleracea* reveals a high content in secreted proteins. *Proteomics* 2011, 11, 1798–1813.
- [13] Frottin, F., Espagne, C., Traverso, J. A., Mauve, C. et al., Co-translational proteolysis dominates glutathione homeostasis to support proper growth and development. *Plant Cell* 2009, 21, 3296–3314.
- [14] Pérez, E., Gallegos, J. L., Cortés, L., Calderón, K. G. et al., Identification of latexin by a proteomic analysis in rat normal articular cartilage. *Proteome Sci.* 2010, 8, 27.



## 4.2. Etude protéomique comparative de l'os sous-chondral et du cartilage épiphysaire de chevaux sains et atteints d'OC

La méthode d'analyse protéomique de l'os et du cartilage m'a permis de comparer le protéome de l'os sous chondral et du cartilage épiphysaire non lésés de chevaux sains et atteints d'OC, soumis ou non à une compression expérimentale.

Au préalable, une classification des lésions d'OC a été effectuée à partir de caractéristiques histologiques et de biomarqueurs métabolomiques du liquide synovial des articulations atteintes.

Alors qu'au plan clinique les individus atteints sélectionnés paraissaient homogènes, lors de la nécropsie, nous avons observé trois types de lésions. Deux poulains présentaient des lésions de type « coup d'ongle » associé à une griffure du cartilage articulaire, deux autres avaient un fragment de cartilage partiellement détaché de l'os sous-chondral et le dernier poulain présentait une perte importante de cartilage, jusqu'à l'os sous-chondral. Les analyses histologiques ont confirmé l'hétérogénéité observée et nous ont permis de classer les lésions en deux catégories : les « scratches » associées à une invagination du cartilage articulaire sous l'os sous-chondral adjacent et les « fractures » associées à une rupture entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral. Les caractéristiques histologiques de ces lésions laissent à penser qu'il y aurait deux grands types lésionnels différents. Pour les « scratches », les observations histologiques suggèrent soit qu'il s'agit de lésions de type kystes-like à des stades d'évolution différents (précoce et tardif) soit qu'il s'agit de lésions différentes.

L'étude protéomique comparées à confirmer l'hétérogénéité observée, en particulier entre individus atteints, mais en cohérence avec les types lésionnels identifiés en histologie. Cela suggère l'existence de types lésionnels différents et réduit la puissance de notre dispositif. Il a toutefois été possible de mettre en évidence des protéines présentant une expression différentielle entre l'os et le cartilage de chevaux sains et atteints d'OC, certaines étant communes aux deux types de lésions et d'autres étant spécifiques

Globalement, nos données d'histologie, de métabolomique, de protéomique et de microCT ont permis de définir au moins deux types de lésions (fractures et scratches) impliquant des mécanismes moléculaires communs et spécifiques. Un défaut constitutif du cartilage semble être principalement impliqué dans la physiopathologie des lésions de type fracture alors que des défauts à la fois de l'os sous-chondral et du cartilage apparaissent être à l'origine des scratches. En effet, les chevaux atteints d'OC présentent une structure anormale de la matrice cartilagineuse en lien avec un défaut d'homéostasie. De façon plus spécifique, les lésions de type fracture semblent résulter d'un défaut d'hypertrophie des chondrocytes conduisant à une minéralisation anormale de la MEC. Chez les individus atteints de lésions de type scratches, une densité osseuse moins importante qui semblerait résulter d'un défaut de vascularisation de l'os sous-chondral et d'une perturbation du métabolisme osseux a été observée.

Nos données permettent de préciser la définition des différentes entités de l'OC et pourraient également être pertinentes afin d'en améliorer le diagnostic et de développer des traitements applicables chez les chevaux et d'autres espèces dont l'homme. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication soumise dans PlosOne : **Desjardin et al., *Proteomics provides new insights into the molecular physiopathology of Equine Osteochondrosis.***

## Proteomics provides new insights into the molecular physiopathology of Equine Osteochondrosis

Clémence Desjardin<sup>1</sup>, Julie Riviere<sup>1</sup>, Anne Vaiman<sup>1</sup>, Caroline Morgenthaler<sup>1</sup>, Mathieu Diribarne<sup>1</sup>, Michel Zivy<sup>2</sup>, Laurence Le Moyec<sup>3</sup>, Laurence Wime<sup>4</sup>, Olivier Lepage<sup>5</sup>, Claire Jacques<sup>6</sup>, Edmond Crihiu<sup>1</sup> and Laurent Schibler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1313, Biologie Intégrative et Génétique Animale, Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup> CNRS, PAPPSO, UMR 0320/UMR8120 Génétique Végétale, Gif-sur-Yvette, France

<sup>3</sup> INSERM, U902 UBIAE, Université d'Evry Val d'Essonne, EVRY, France

<sup>4</sup> Station expérimentale des Haras Nationaux, IFCE, Chamberet, France

<sup>5</sup> VetAgro Sup, GREMERES-ICE, Campus Vétérinaire, Marcy l'Etoile, France

<sup>6</sup> UR4, University Pierre and Marie Curie, Paris, France

### Corresponding author:

Dr Laurent Schibler, BIGE, UMR1313 GABI, INRA CRJ, Domaine de Vilvert, Bat 440, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

Email: [laurent.schibler@jouy.inra.fr](mailto:laurent.schibler@jouy.inra.fr)

FAX: +33 1 34 65 24 78

**Abstract** Osteochondrosis (OC) is a juvenile osteo-articular disorder affecting several mammalian species. OC has been described as a focal disruption of endochondral ossification, leading to joint swelling, stiffness and varying degrees of lameness. In horses, OC is considered as multifactorial and has become a major concern in the horse industry in terms of animal health care and economy. Our comprehensive study was designed to identify constitutive defects in epiphyseal cartilage and subchondral bone associated with the development of primary lesions, to refine lesion classification and identify potential biomarkers. Ten month-old foals were allocated to two groups: healthy (n=5) and OC-affected (n=5). Histology was performed on OC-affected hocks, metabolomics was performed on healthy and OC-affected hocks, proteomics and  $\mu$ CT were performed on healthy stifles from healthy and OC-affected animals. Histology, metabolomics, proteomics and  $\mu$ Ct identified two lesion subtypes: fractures and scratches. Modulated proteins in cartilage and bone samples were associated with cellular processes including cell cycle, energy production, cell signaling and adhesion as well as tissue-specific processes such as chondrocyte maturation, extracellular matrix and mineral metabolism. Of these modulated proteins, five were already identified in synovial fluid samples from OC-affected foals: ACTG1 (actin, gamma 1), albumin, haptoglobin, FBG (fibrinogen beta chain) and C4BPA (complement component 4 binding protein, alpha). Principal Component Analysis and hierarchical clustering of modulated proteins showed fracture samples were clustered near healthy samples in bone, in contrast to scratches. Our data suggests equine OC consists of at least two lesion subtypes involving different molecular mechanisms and that OC predisposition could be due to a defect in both bone and cartilage tissue. This will contribute to refining the definition of OC entities and may prove to be relevant in improving diagnosis and develop relevant treatments for horses and other species, including humans.

**Keywords** Equine Osteochondrosis, cartilage, subchondral bone, proteomics, metabolomics,  $\mu$ CT.

## INTRODUCTION

Osteochondrosis (OC) has been described as a focal failure or disruption of endochondral ossification [1] that occurs in young, growing individuals. The condition affects horses as well as other animal species such as pig, poultry and dogs and also humans.

The principal lesion of OC is the localized failure of growth cartilage to become converted to bone. In its early subclinical stages, where focal areas of cartilage necrosis are confined to the epiphyseal cartilage, the condition has been referred to as dyschondroplasia [2], or more recently *osteochondrosis latens*, whereas the presence of retained cores of cartilage and focal areas of cartilage necrosis visible on macroscopic and radiographic examination is designated as *osteochondrosis manifesta* [3]. These primary lesions may produce islands of cartilage that result in subchondral cysts or dissecting lesions on the joint surface (*osteochondritis dissecans*, OCD) [4,5]. In the final stage, osteochondral fragments may separate and become loose intra-articular bodies (joint mice), leading to further damage such as synovitis and pain accompanied by varying degrees of lameness [4].

Two main hypotheses have been put forward to explain the origin of primary lesions. Firstly, primary dyschondroplastic lesions [6] are thought to resist the ossification process and to ultimately become retained cartilage, susceptible to further damage within the joint as a result of biomechanical stress [7]. Histological studies have made it possible to grossly divide primary lesions into two main groups [6-8]: 1) lesions with an accumulation of chondrocytes apparently arrested in the pre-hypertrophic stage and associated with necrotic areas, and 2) lesions characterized by an alteration of mineralized matrix, necrotic areas, and increased type VI collagen immunoreactivity as well as cartilage cores retained in the subchondral bone [9]. In a second hypothesis, a local defect in cartilage canal blood supply, in a certain age window, may lead to focal ischemic necrosis of growth cartilage [3,10,11]. Local disruption of cartilage canals may be induced by trauma or biomechanical constraints [11,12].

Equine OC has become a major concern in the horse industry in terms of animal health care and economy [13] and is considered as a multifactorial disorder influenced by environment (including dietary imbalance and biomechanical factors), physiological factors (including growth, conformation and hormonal imbalance), and genetics [3,14,15]. Many studies, including gene mapping studies have been conducted to elucidate its etiology, pathogenesis and genetics [for review see 16], but no clear picture has emerged so far, probably due to the confusion regarding the definition of the disease and the lack of understanding of primary lesion formation [3].

There is clearly a need for a better understanding of OC molecular physiopathology in order to refine nosological entities and increase positional cloning efficiency. Our study was therefore designed to compare the proteome of epiphyseal cartilage and subchondral bone sampled from healthy joints of healthy and OC-affected foals. The study aimed at identifying defects in either tissue that may be associated with the development of primary lesions, with a view of refining lesion classification and identifying potential diagnostic biomarkers.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animal Care Committee*

The experimental protocol the number 0964 was reviewed and approved by the Animal Care Committee of VetAgro Sup (France), which abides by the requirements of Directive 86/609 of the European Community Council.

### *Animals*

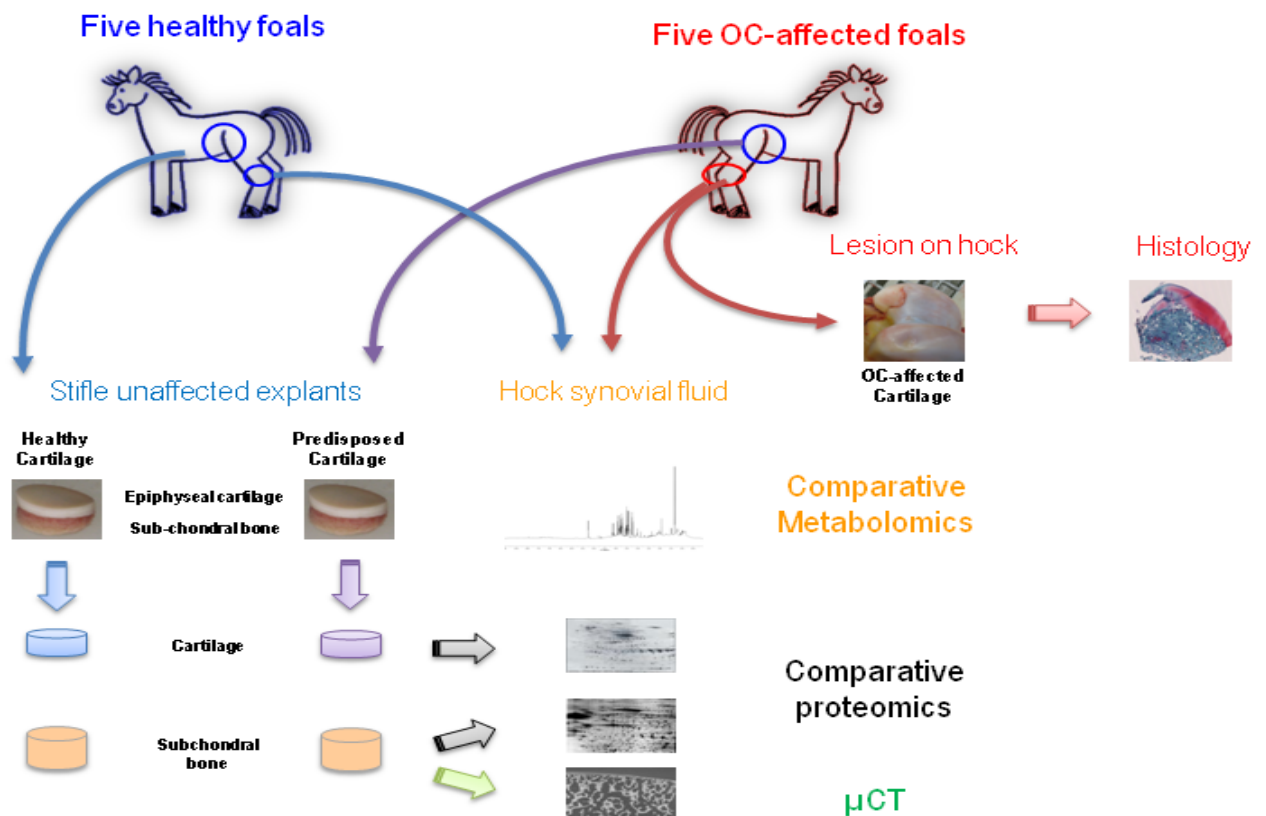
Anglo-Arab saddle breed foals were obtained from the experimental station of the French National Stud (Station IFCE de Chamberet) to reduce genetic and environmental variability. Management of mare-foal pairs was by rotational grazing until the end of the grass season.



### Study Design

The study was designed to identify constitutive defects in epiphyseal cartilage and subchondral bone that may be associated with the development of primary lesions. An additional objective was to identify potential biomarkers associated with the condition. Clinical and radiographic examination of the stifle and hock was performed on ten foals aged six-

seven months for allocation to two groups of five animals (Figure 1): Healthy (without any signs of osteoarticular affection; H1 – H5) and OC-affected (at least one lesion on the *talus trochlea*; OC1-OC5). Foals were euthanized at 10 months by lethal intravenous injection of T61.



**Figure 1:** Study Design. Ten foals were allocated to two groups based on clinical and radiographic assessment of the stifle and hock: Healthy (n=5) and OC-affected (n=5). Lesions from OC-affected foals were classified histologically. Explants from healthy stifle joints (all animals) and hock synovial fluid (from healthy and OC-affected animals) were used for comparative metabolomics, comparative proteomics and micro computed tomography ( $\mu$ CT). Blue arrows correspond to healthy joints; red arrows correspond to affected joints.

### *Histological Analysis and Immunocytochemistry*

Osteochondral lesions for histological analysis were cut in the sagittal plane to include 5 mm of subchondral bone and fixed for 18 hours in a solution of 4% paraformaldehyde (PFA), decalcified for one month in 20 ml DC3 solution and embedded in paraffin. 5- $\mu$ m sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES) and safranin O-Light Green (LGS).

#### *Proteomics*

Cartilage and subchondral bone cylindrical explants were obtained from the femoral *trochlea* (healthy joint) using a 12-mm punch. Frozen cartilage (200 mg) and bone (150 mg) samples were crushed in liquid nitrogen using a hammer and a stainless steel mortar and pestle and then ground to a fine powder in liquid nitrogen using a porcelain mortar and pestle. Protein extraction and quantification, 2-DE and spot identification were then performed as previously described [17]. Spot volume normalization was performed using the Progenesis “Total Volume Ratio” option. Descriptive statistics were done using R scripts and the ade4 package. Principal component analysis (*dudi.pca*) and between-class correspondence analysis (*dudi.bca*) were performed to investigate differences between healthy and OC-affected horses as well as heterogeneity between affected samples. Spots having inertia above the third quartile and showing at least a 50% change in abundance were considered as associated with the pathology. A hierarchical clustering (Pearson correlation) was also performed based on a subset of differentially expressed spots (t-test, adjusted p-value < 0.2).

#### *Comparative Micro Computed Tomography ( $\mu$ CT)*

Cylindrical cartilage and subchondral bone explants were obtained from healthy stifle joints (femoral *trochlea*) of both healthy and OC-affected foals using a 12-mm punch. Samples were stored in 70% ethanol at 4°C before use. Scans were performed using approximately 15- $\mu$ m voxel sizes (Phoenix nanotom™, GE measurement and control). The scanner used a tungsten source X-ray tube

operating at 100 KV and 70  $\mu$ A. Data acquisition from each sample required 90 minutes. Images were reconstructed using Phoenix datos|x CT software™. For measurements, the Microview™ software was used and the calibration for mineral density in the scans was performed with the use of a phantom (hydroxyapatite). For each sample, two regions of interest (ROIs) were designed manually corresponding to the subchondral bone area (less than 2 mm from the cartilage area) and to the trabecular area (between 3 and 4 mm under the cartilage area). Morphometry parameters measured were: bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), and trabecular spacing (Tb.Sp).

#### *Metabolomics*

Synovial fluid was collected from tibiotarsal joints from healthy and OC-affected foals. When possible, synovial fluid from OC foals was also collected from the contralateral healthy joint. Samples were thawed at room temperature and 600  $\mu$ L added to 5-mm NMR tubes prefilled with 100  $\mu$ L deuterium oxide for field locking. The proton spectra were acquired at 500 MHz on a Bruker Advance III spectrometer, with the noesy1D sequence for water suppression. The temperature was 297 K. The FIDs were collected on 32 K points for a spectral window of 600 Hz and 64 transients. The FIDs were processed with the MestReNOVA software. The Fourier transform was performed with an exponential function producing a 0.3 Hz line broadening. Spectra were phased and the baseline correction was performed with three points at 0, 5, and 9 ppm. Each spectrum was calibrated using acetic acid signal at 1.92 ppm in blood spectra. The spectral region between 0 ppm and 9 ppm was divided into 9000 spectral regions of 0.001 ppm width called buckets. Each bucket is labeled with its median chemical shift value. The water region, between 4.6 and 5 ppm, was excluded. Considering the possible variation of the sample concentration, the spectra were normalized according to the “Probabilistic Quotient Normalization” method [18].

Statistical analyses consisted of a Principal Component Analysis (PCA) performed using the statistics SIMCA P+ software (ver. 12, Umetrics AB, Umea, Sweden). The results are presented as a score plot constructed with the two principal components describing the spectra and the loading plots describing the importance of the variables (here, the buckets) to compute the principal components.

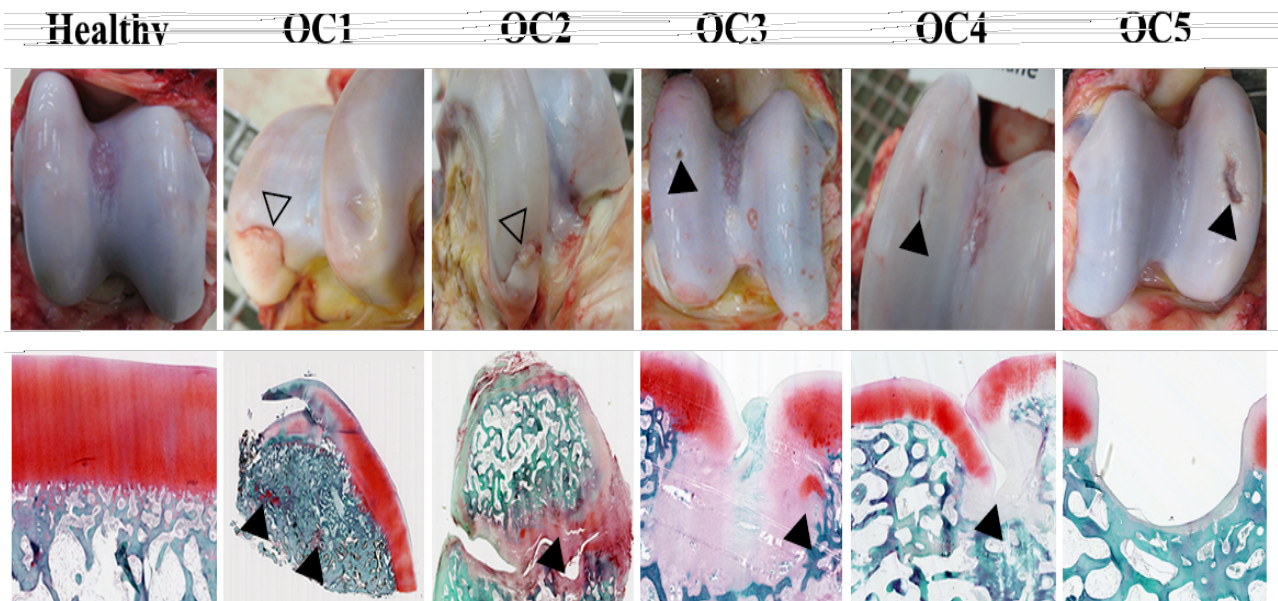
## RESULTS

### *Osteochondrosis (OC) Lesion Typology*

Two major types of macroscopic lesions were observed on the lateral trochlear ridge of the talus of five 10 month-old OC-affected horses and were classified as: fractures of articular cartilage (OCD, horses OC1, OC2, and OC4) or scratches (horses OC3, OC4, and OC5) ranging from minor superficial cartilage defect to absence of articular cartilage as far as the subchondral bone (upper panel Figure 2). At necropsy, the subchondral bone of affected horses appeared to be softer than the subchondral bone of healthy horses suggesting a lower bone density, especially for horses with scratches. Comparison between samples

collected from the lateral trochlear ridge of the talus of healthy horses with OC-affected horses showed the presence of irregularities and reduced thickness of articular cartilage, especially for horse OC5 (lower panel Figure 2). Staining was absent for this animal, suggesting altered proteoglycan content. Horses OC1 and OC2 presented abnormal cartilage cores retained in the subchondral bone.

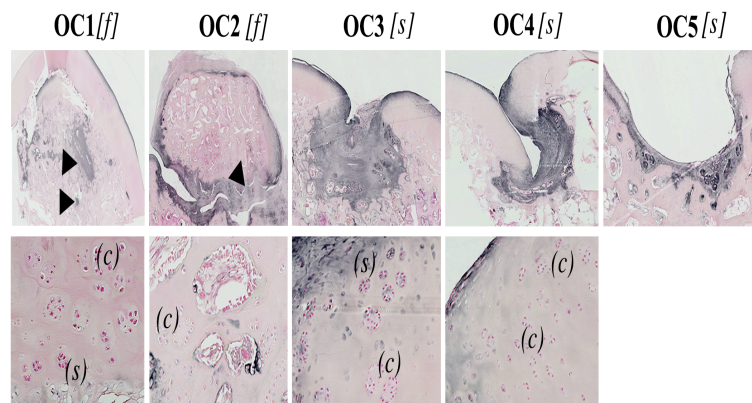
Type-VI collagen was widely distributed in the lesion (upper panel Figure 3), contrasting with the usual localization at the pericellular region (chondron) in healthy articular cartilage. This may be due to dedifferentiation of chondrocytes, leading to the formation of fibrocartilage. Abnormal chondrocyte clusters were observed at different localizations: surrounding the lesions, close to the lesions, and distant from the lesions for horses OC1-OC4 (lower panel Figure 3). Based on histology, scratches may be classified into two groups: 1) scratch lesions with invagination of articular cartilage, progressive dedifferentiation and high type-VI collagen expression (horses OC3 and OC4); and 2) lesions with major cartilage loss (horse OC5), with low type-VI collagen expression.



**Figure 2: Identification and Characterization of OC Lesion Subtypes.** Upper Panels - Macroscopic views of the *talus trochlea* of one healthy and five OC-affected foals. Two major types of OC lesions could be distinguished: cartilage fracture (horses OC1, OC2, and OC4; white arrows) and scratches with varying degrees of cartilage loss (horses OC3, OC5, and OC4; black arrows). Lower Panels - Histological views of OC lesions (light green/safranin-O stain). Irregularities and reduced thickness were observed at the cartilage surface. The absence of staining both in and close to the lesion indicates reduction in proteoglycan content. Abnormal cartilage cores retained in the subchondral bone were also observed (black arrows).

**Figure 3: Investigation of Type-VI Collagen Localization and Chondrocyte Organization.**

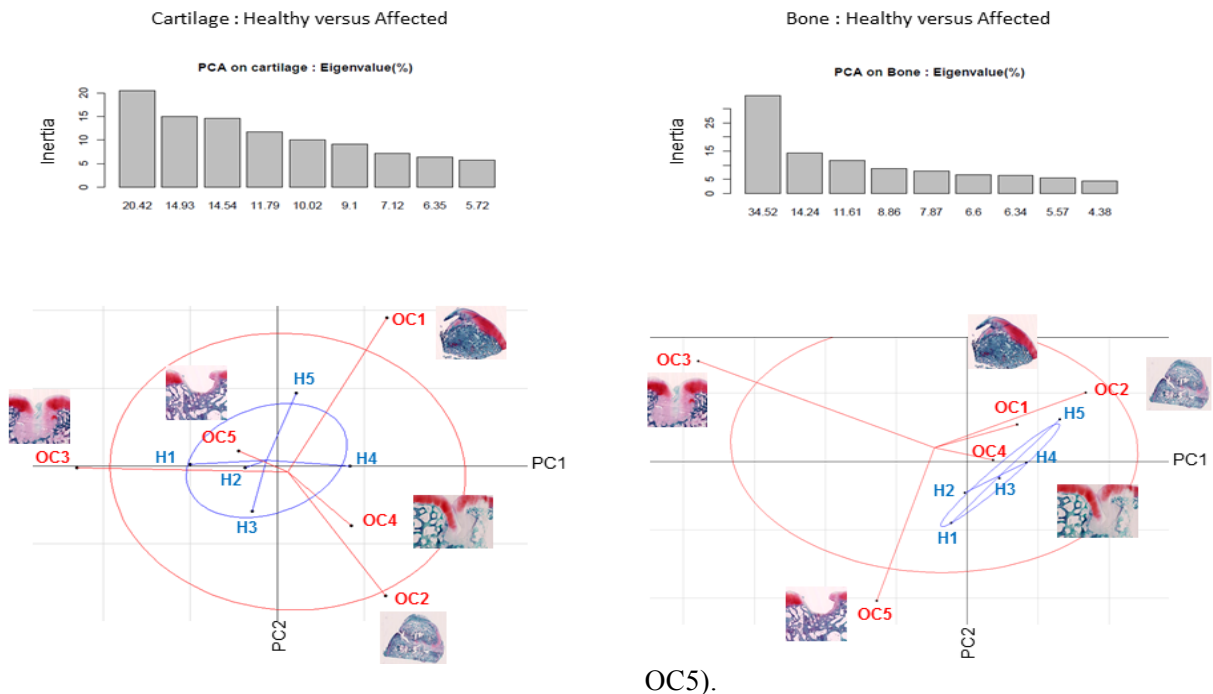
Upper Panel - Type-VI collagen localization by immunostaining. Both lesion types (fractures [f] and scratches [s]) were characterized by positively stained areas (arrows) indicative of cartilage dedifferentiation leading to the formation of local scar tissue (fibrocartilage). Lower Panel - Magnification views (x20) of animals OC1-OC4 showing chondrocyte clusters located surrounding (s) or close to the lesions (c), which may reflect a healing process is underway



*Proteomics Comparative Analysis*

Comparison between normal bone and cartilage samples from healthy (healthy samples) and OC horses (predisposed samples) was performed with our previously published method [17]. A total of 554 and 639 reproducible spots were observed on cartilage and bone gels, respectively. Principal Component Analysis (PCA) showed an important heterogeneity between samples in both cartilage and bone, especially for OC-

affected foals (Figure 4a). A hierarchical clustering (HCL) was also performed based on differentially expressed spots (Figure 4b). Histology, PCA and HCL corroborated in the classification of samples as fractures and scratches in both cartilage and bone. Furthermore, fracture-predisposed samples (horses OC1, OC2, and OC4) were clustered near healthy samples in bone, in contrast to scratche-predisposed ones (horses OC3 and



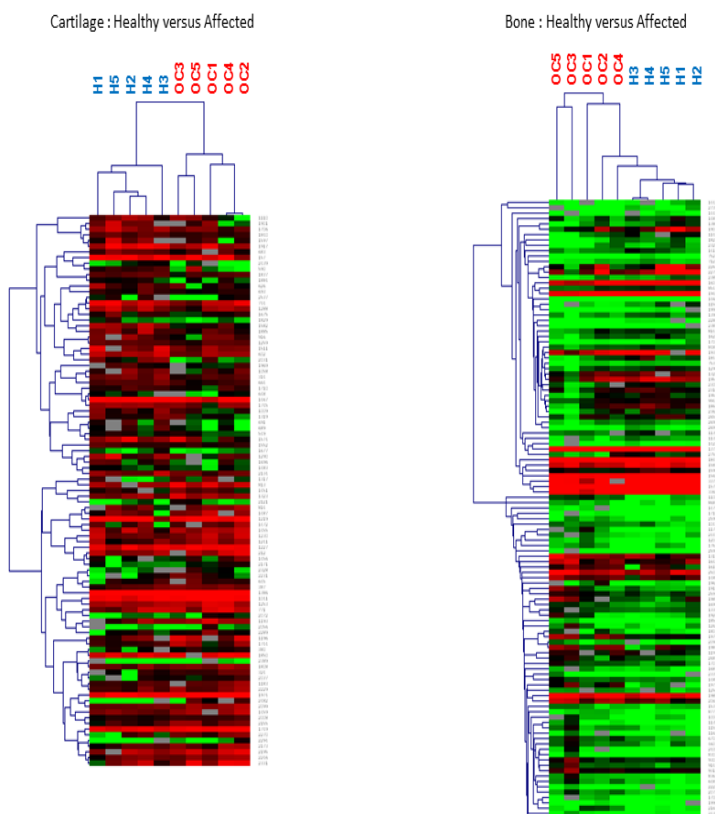
**Figure 4A: Principal Component Analysis (PCA) of Proteomic Data.** The PCA shows there is a great heterogeneity between OC-affected foal samples in both cartilage and bone. Furthermore, fracture samples (horses OC1, OC2 and OC4) cluster near healthy samples in bone, in contrast to scratches (horses OC3 and OC5). This suggests that fractures may result mainly from a cartilage defect, whereas scratches may result from a combined cartilage and bone defect.



Between-class correspondence analysis highlighted 23 (cartilage) and 37 (bone) modulated proteins between healthy and predisposed samples (Supplementary file Table 1 and Table 2). In cartilage, the identified differentially expressed proteins are mainly involved in growth, proliferation and development, cellular assembly and organization, cell communication, cell adhesion, lipid and protein metabolism, energy production, vesicle-mediated transport and immune system process (Supplementary file S1). Proteins associated with osteoarticular diseases and developmental disorders such as achondrogenesis, dysplasia, or Stickler and Kniest syndromes were also modulated. In subchondral bone, differentially modulated proteins are mainly involved in developmental

processes, cellular component organization, cell-to-cell signaling, cell adhesion, protein metabolic process, protein transport and response to stimulus (Supplementary file S2).

Several plasma proteins, including fibrinogen- $\beta$  and - $\gamma$ , hemopexin, transferrin, complement component 4 binding protein  $\alpha$ , as well as apolipoprotein A1 and fetuin B, were modulated in both scratch- and fracture-predisposed samples. In addition, five of the modulated proteins had also been identified in synovial fluid samples from OC-affected foals [19]: actin gamma 1, albumin, haptoglobin, fibrinogen beta chain and complement component 4 binding protein alpha (denoted by# in Supplementary file Table 1 and Table 2).



**Figure 4B: Hierarchical Clustering (HCL) of Proteomic Data.** Differentially expressed spots (97 in cartilage, 126 in bone) between healthy samples collected from OC-affected and healthy foals were used to perform HCL. A distinction could be made between OC-affected and healthy foals, as well as fractures and scratches in both cartilage and bone. In addition, fracture-affected foals appear close to healthy ones

based on their bone proteome, suggesting that this lesion subtype shows only a minor defect in bone

#### *Metabolomic Study of Synovial Fluid*

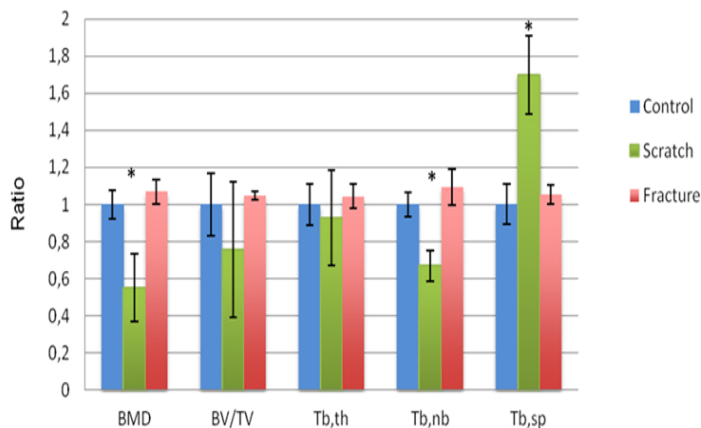
A PCA based on the synovial fluid NMR spectra discriminated between scratch-affected, healthy and fracture-affected samples in PC1 (Figure 6A), in good agreement with proteomic and histological features. PC2 mainly discriminated injured and healthy joints from fracture-affected horses, but did not discriminate well between healthy joints from OC-affected (OC1 and OC2 left joints) and healthy horses. The loading plots (Figure 6B) provide the weight of each spectral region, showing that most metabolites positively contribute to PC1, with lactate, glucose, acetate, creatine and pyruvate having the heaviest loadings. Thus, elevated levels of these metabolites characterize injured joints from fracture-affected horses (OC2\_R, OC4\_L and OC4\_R), and to some extent, healthy joints from fracture-affected horses (OC1\_L and OC2\_L). Elevated levels of lactate and acetate are suggestive of hypoxic and acidotic status whereas increased glucose and pyruvate levels indicate a low efficiency of glycolysis and reduced aerobic processes. Elevated levels of branched-chain amino acids and creatine may be indicative of increased proteolysis. In contrast, synovial fluid collected from joints affected by scratches (horses OC3\_L, OC5\_R and OC5\_L) had reduced levels of glucose,

pyruvate and lactate, and an increase in ketone bodies including hydroxybutyrate.

This is suggestive of a reduced anaerobic glycolytic rate as well as the use of fatty acids as a source of energy.

#### *Validation by Comparative $\mu$ CT Morphometry Analysis of Subchondral Bone*

Bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), and trabecular spacing (Tb.Sp) were measured on subchondral bone from the medium of femoral trochlea explants. These parameters were used for PCA analysis and distinguished scratch from fracture-predisposed samples, in agreement with observed histological features and data obtained from proteomics. Again, fracture-predisposed samples (horses OC1, OC2 and OC4) were clustered near healthy samples (Supplementary file S3). Bone mineral density was significantly reduced (40% decrease) in subchondral bone from scratch-predisposed samples (horses OC3, OC4 and OC5; Figure 5), in agreement with the findings at necropsy. In addition, bone structure was disrupted, with samples showing a reduced number of *trabeculae*, reduced trabecular thickness (30%) and increased trabecular spacing (50% increase). The  $\mu$ Ct analysis did not reveal any variation in bone samples from foals affected by fractures.



**Figure 5: Comparison of Subchondral Bone Structure using  $\mu$ Ct.** The ratio between affected and healthy samples was computed for each parameter: bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), and trabecular separation (Tb.Sp). Bone mineral density was significantly reduced in subchondral bone from

foals affected by scratches (horses OC3, OC4 and OC5). The  $\mu$ Ct analysis did not reveal any variation in bone samples from foals affected by fractures.

## DISCUSSION

The terms "*osteocondrosis*" and "*osteocondritis dissecans*" have been overused in horses, being applied indiscriminately to a variety of lesions in the skeleton of horses, without respect to recognized differences in their etiology, pathogenesis and clinical characteristics. Conversely in humans, several severe conditions were initially grouped under the heading of *osteocondrosis* [20], but have now been subdivided into about 50 syndromes [21].

Based on a comprehensive approach including radiographic, histological,  $\mu$ CT, proteomic and metabolomic techniques, our study aimed at improving our understanding of equine OC physiopathology. Histology, PCA and HCL corroborated with the commonly accepted classification of two subtypes: fracture (OCD) and scratch lesions. In addition, we observed many features consistent with previously described OC lesions in several species, including cartilage retained in the underlying subchondral bone, changes in matrix composition, chondrocyte clusters, and the presence of scar tissue similar to fibrocartilage [6]. Chondrocyte clusters have been described as a characteristic feature of osteoarthritic lesions and are thought to result from proliferating chondrocytes attempting to repair the tissue [22,23]. Histology also revealed the heterogeneous nature of scratches, showing various degrees of cartilage invagination and cartilage loss up to the subchondral bone. This heterogeneity may be related to a progressive degeneration of epiphyseal cartilage, leading finally to cartilage loss and development of a thin fibrocartilage layer, or alternatively, to different pathological entities.

Our proteomic study was designed to explore the hypothesis of a putative constitutive defect and focused on healthy cartilage and bone sampled from the stifle of healthy and OC-affected horses. Based on our proteomic results, PCA showed that equine OC predisposition might be due to a defect in both cartilage and bone tissues. Several proteins were found to be modulated and five of the

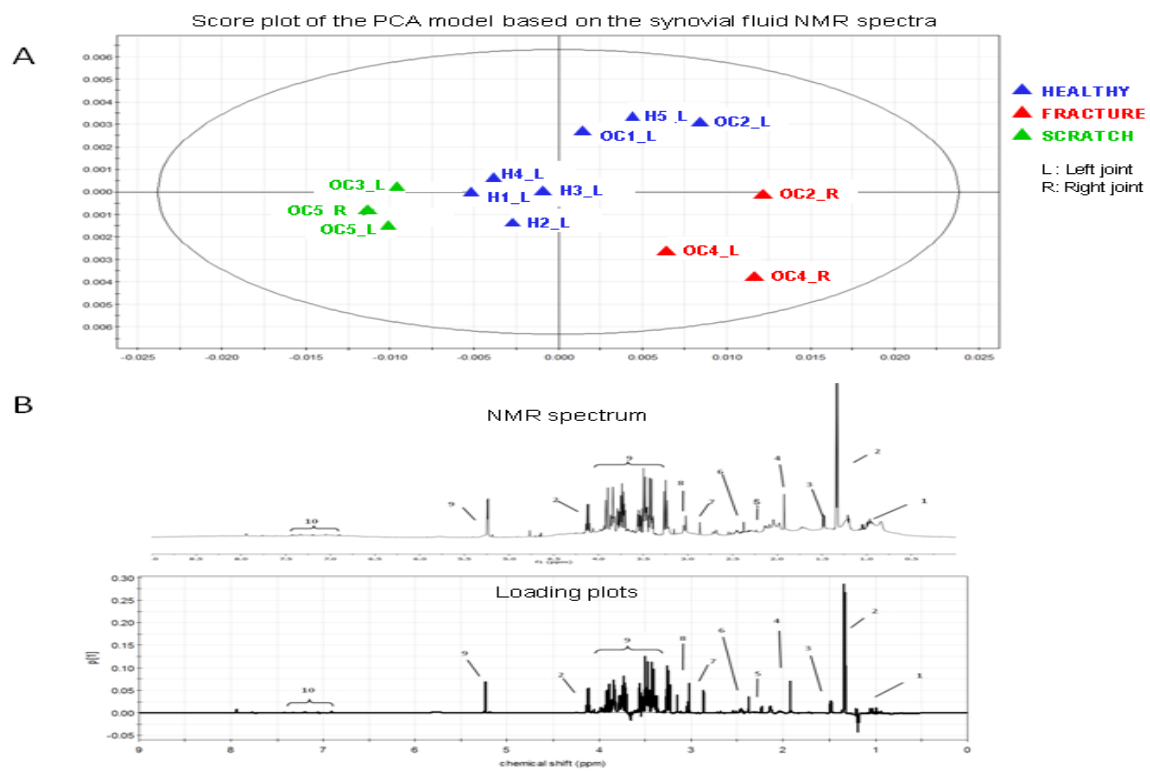
differentially expressed proteins, ACTG1, ALB, HP, FBG and C4BPA (Supplementary Table 1), have also previously been identified in synovial fluid from OC-affected horses [19]. In addition, a between-class correspondence analysis highlighted several proteins specifically involved in susceptibility to each lesion subtype, suggesting that common as well as distinct molecular mechanisms may be involved in the etiopathogeny of each OC subtype.

#### *Molecular Mechanisms in Cartilage*

In cartilage, the down-regulation of COL3A1 and up-regulation of COL6A1 and HAPLN1, proteins involved in ECM structure and chondrocyte microenvironment and

micromechanical regulation [24] suggest a production of an altered ECM. In addition, down-regulation of CLU a glycoprotein providing a protective effect for cells at the fluid-tissue interface is in line with the previously-observed down-regulation in advanced osteoarthritic cartilage [25] suggesting a reduced protection against biomechanical stress.

Furthermore, the down-regulation of CKB and NDUFS1 may be indicative of an altered energy homeostasis leading to defective cartilage maturation in OC-affected foals. CKB is required for normal development and mineralization of the growth plate and its expression level is related to chondrocyte maturation stages [26].



**Figure 6- A: Score Plot of the PCA Model Based on Synovial Fluid NMR Spectra.** Synovial fluids were collected from tibiotarsal joints from healthy and OC-affected foals. When possible, synovial fluid from OC foals was also collected from the contralateral healthy joint. Synovial fluids were analyzed by NMR metabolomics and a PCA based on obtained spectra was performed showing discrimination between healthy, fracture-affected and scratch-affected joints, but not between healthy joints from OC-affected (OC1\_L and OC2\_L) and healthy foals. L = left joint; R = right joint; H = healthy foal; OC = affected foal; Blue: healthy joint; Green: scratch; Red: fracture. **B: Proton NMR spectrum of synovial fluid (upper graph) and loading plot (lower graph) of the first principal components obtained with the PCA model.** The importance of the buckets (y-axis) is plotted as a function of their chemical shift (x-axis). The corresponding metabolites are increasing along the component when positive and decreasing along the component when negative. Metabolite attributions: 1: branched-chain amino acids including valine, leucine, and isoleucine; 2: lactic acid; 3: alanine; 4: acetic acid; 5: acetone; 6: pyruvic acid; 7: trimethylamine; 8: creatine; 9: glucose; 10: aromatic amino acids including tyrosine and phenylalanine.



CKB is thought to play a key role during the switch from oxidative metabolism to glycolysis associated with the hypertrophic differentiation process. In line with a defective cartilage maturation hypothesis, up-regulation of proteins involved in vesicle transport and ubiquitin-dependent protein degradation by the proteasome (VCP and PSMB3), down-regulation of the chaperone proteins FKBP10 and CLU as well as translation elongation factor EEF1D suggest impaired protein biosynthesis, folding, secretion and degradation. Taken together, these findings are consistent with data obtained in human OCD fragments, showing chondrocytes with abnormal accumulation of ECM proteins in distended rough endoplasmic reticulum (ER) [27], suggesting that OCD might be an ER storage disease. However, some specificity was observed according to lesion subtype. For example in cartilage predisposed to scratches, up-regulation of HSPA1A and PDIA3—which play a role in the folding of newly synthesized glycoproteins— suggest that a partial ER-stress response may have been triggered.

Since ER stress triggers metabolism changes [28], such a hypothesis may be consistent with our metabolomic data, showing reduced glycolysis and increased utilization of fatty acids to produce energy, a characteristic feature of the inflamed rheumatoid joint [29]. In contrast, HSPA1A was down-regulated in fracture predisposed cartilage. However, in this later case, modulation of additional genes involved in energy metabolism, such as ENO1 is consistent with metabolomics findings, showing a reduced aerobic glycolysis and an increased proteolysis to overcome this defect and produce the required ATP.

These differences may lead to an alternative outcome according to lesion subtype: scratch susceptibility appeared to be mainly associated with impaired ECM structure. Down-regulation of several major ECM constituents such as COL2A1, COL3A1, SPARC and COL11A2, as well as COL11A1, which are essential for maintaining the spacing and diameter of type-II collagen fibrils [30] and MFG-E8, a protein preserving the structure of articular cartilage and stabilizing chondrocyte adhesion to the ECM [31], may be indicative of a defective ECM.

In contrast, fracture susceptibility seemed to be mainly associated with an impaired ECM mineralization, as suggested by down-regulation of AHSG, a glycoprotein whose knockout in mice leads to growth plate defects, including reduced number of hypertrophic chondrocytes as well as accelerated mineralization [32]. This defect may result from defective hypertrophic chondrocyte terminal differentiation and up-regulation of major cytoskeletal components (VIM, ACTG1, ACTA1). This is in agreement with essential role of the cytoskeletal network during chondrogenesis and hypertrophy [33]. The defective cartilage mineralization occurring in OC may result in a failure of osteoclast remodeling. Decreased or delayed mineralization combined with altered ECM structure may therefore lead to impaired epiphyseal cartilage biomechanical properties, making it prone to fractures.

#### *Molecular Mechanisms in Bone*

Scratch-affected horses had softer and more vascularized subchondral bone, and osteonectin—a glycoprotein known to promote angiogenesis, increase metalloproteinase activity, and inhibit bone mineralization—was shown to be up-regulated, together with other plasma proteins. One of these was apolipoprotein A1, which in bone, may promote cholesterol efflux and affect HDL levels, leading to the alteration of bone mineral density and trabecular architecture. There is growing evidence suggesting that abnormalities in lipid metabolism may impact bone metabolism and mineral density. In particular, exogenous sources of cholesterol are essential for osteoclast formation as well as survival [34] and several studies have suggested a relationship between HDL, osteoblasts, osteoclasts, and bone mineral density [for review see 35]. Up regulation of AZGP1 - an adipokine involved in lipid metabolism - may provide clues about the link between body weight, conformation and OC susceptibility. Indeed a genetic linkage between AZGP1 and body weight has been shown in mice [36] and polymorphisms in this gene have been associated with high body weight, body length and chest girth in cattle [37].

Scratch-affected samples showed more modulated proteins than fracture-affected samples and fold changes were higher in these samples suggesting that scratches may result from a major bone defect, whereas fractures may be associated with a slight bone defect. In line with our  $\mu$ Ct data, defective mineralization and an altered subchondral bone structure are the main hallmarks of samples from scratch-affected horses. Proteomic data agree with this finding since several modulated proteins are associated with bone mineralization and bone remodeling. For example, down-regulation of ATP6V1A may impair ATP production, which is essential for osteoclasts to generate the acidic environment required for the digestion of the organic bone matrix [38] as well as proper osteoblast differentiation and activation [39]. Likewise, down-regulation of CKB, AHSG and CA may also be associated with impaired bone mineralization process [40,41].

Together, our results suggest that equine OC consists of at least two lesion subtypes involving different molecular mechanisms and that OC predisposition could be due to a defect in both bone and cartilage tissue. This seems to be a general feature of osteoarticular diseases, which are often associated with cartilage disruption extending into the underlying subchondral bone [for review see 42]. A constitutive cartilage defect may be responsible for OCD physiopathology, whereas combined cartilage and bone defects may trigger scratches. However, the precise mechanisms linking cartilage and bone defects remain to be elucidated and it is not clear whether a primary cartilage defect triggers a bone defect (or *vice versa*) or whether both tissues are independently affected.

Differentially expressed plasma proteins highlighted in this study, such as haptoglobin, hemopexin, fetuin, apolipoprotein A1 and transferrin may represent relevant diagnostic biomarkers, but further studies are needed to evaluate their diagnostic or prognostic significance. Likewise, proton NMR spectroscopy enabled the investigation of low molecular weight molecules present in the synovial fluid from the hocks of healthy and OC-affected foals, a technique which has already been successfully applied to study pathological synovial fluids in humans [43] and horses [44]. In conclusion, our data will

contribute to refining the definition of OC entities. This is a prerequisite in order to improve diagnosis and develop relevant treatments for horses and other species.

## ACKNOWLEDGEMENTS

**This study was funded by a grant of Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENM-006).**

## AUTHOR CONTRIBUTION:

Study design: LS, OL and CJ. Study conduct: LS and LW. Data collection: all authors. Data analysis and interpretation: LS, MZ, CD, LLM. Manuscript writing and revising: LS, CD, EPC. **All authors state that they have no conflicts of interest.**

## REFERENCES

1. Olsson SE (1978) Osteochondrosis in domestic animals. Introduction. Acta Radiol Suppl 358: 9-14.
2. Jeffcott LB, Henson FM (1998) Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (osteochondrosis). Vet J 156: 177-192.
3. Ytrehus B, Carlson C, Ekman S (2007) Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. Vet Pathol 44: 429-448.
4. McIlwraith CW (2011) Osteochondrosis. Adams and Stashak's lameness in horses: 1155-1164.
5. Olsson SE, Reiland S (1978) The nature of osteochondrosis in animals. Summary and conclusions with comparative aspects on osteochondritis dissecans in man. Acta Radiol Suppl 358: 299-306.
6. Henson F, Davies M, Jeffcott L (1997) Equine dyschondroplasia (osteochondrosis)-histological findings and type VI collagen localisation. Veterinary Journal. pp. 53-62.
7. Jeffcott LB, Henson FMD (1998) Studies On Growth Cartilage In The Horse And Their Application To Aetiopathogenesis Of Dyschondroplasia (Osteochondrosis). Veterinary Journal 156: 177-192.
8. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, Carlson CS, Dolvik NI (2007) Early lesions of osteochondrosis in the distal tibia of foals. J Orthop Res 25: 1094-1105.

9. Muir H (1995) The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays* 17: 1039-1048.
10. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, Carlson C, Dolvik N (2008) Epiphyseal cartilage canal blood supply to the distal femur of foals. *Equine Vet J* 40: 433-439.
11. Ytrehus B, Ekman S, Carlson CS, Teige J, Reinholt FP (2004) Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs. *Bone* 35: 1294-1306.
12. Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, et al. (2004) The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res*: 17-26.
13. Jeffcott LB (1996) Osteochondrosis - An international problem for the horse industry. *Journal of Equine Veterinary Science* 16: 32-37.
14. McIlwraith CW (2004) Developmental orthopedic disease: Problems of limbs in young horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 24: 475-479.
15. van Weeren PR (2006) Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D). *Clinical Techniques in Equine Practice* 5: 248-258.
16. Distl O (2013) The genetics of equine osteochondrosis. *Vet J* 197: 13-18.
17. Desjardin C, Balliau T, Valot B, Zivy M, Wimel L, et al. (2012) A method for proteomic analysis of equine subchondral bone and epiphyseal cartilage. *Proteomics* 12: 1870-1874.
18. Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H (2006) Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in H-1 NMR metabonomics. *Analytical Chemistry* 78: 4281-4290.
19. Chiaradia E, Pepe M, Tartaglia M, Scoppetta F, D'Ambrosio C, et al. (2012) Gambling on putative biomarkers of osteoarthritis and osteochondrosis by equine synovial fluid proteomics. *J Proteomics* 75: 4478-4493.
20. Schenck RC, Jr., Goodnight JM (1996) Osteochondritis dissecans. *J Bone Joint Surg Am* 78: 439-456.
21. Siffert RS (1981) Classification of the osteochondroses. *Clin Orthop Relat Res*: 10-18.
22. Sandell LJ, Aigner T (2001) Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res* 3: 107-113.
23. Gee E, Davies M, Firth E, Jeffcott L, Fennessy P, et al. (2007) Osteochondrosis and copper: histology of articular cartilage from foals out of copper supplemented and non-supplemented dams. *Vet J* 173: 109-117.
24. Alexopoulos LG, Youn I, Bonaldo P, Guilak F (2009) Developmental And Osteoarthritic Changes In Col6a1-Knockout Mice: Biomechanics Of Type VI Collagen In The Cartilage Pericellular Matrix. *Arthritis Rheum* 60: 771-779.
25. Connor JR, Kumar S, Sathe G, Mooney J, O'Brien SP, et al. (2001) Clusterin expression in adult human normal and osteoarthritic articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 727-737.
26. Hobson GM, Funanage VL, Elsemore J, Yagami M, Rajpurohit R, et al. (1999) Developmental expression of creatine kinase isoenzymes in chicken growth cartilage. *J Bone Miner Res* 14: 747-756.
27. Skagen PS, Horn T, Kruse HA, Staergaard B, Rapport MM, et al. (2011) Osteochondritis dissecans (OCD), an endoplasmic reticulum storage disease?: a morphological and molecular study of OCD fragments. *Scand J Med Sci Sports* 21: e17-33.
28. Wang X, Eno CO, Altman BJ, Zhu Y, Zhao G, et al. (2011) ER stress modulates cellular metabolism. *Biochem J* 435: 285-296.
29. Naughton D, Whelan M, Smith EC, Williams R, Blake DR, et al. (1993) An investigation of the abnormal metabolic status of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis by high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEBS Lett* 317: 135-138.
30. Xu L, Flahiff CM, Waldman BA, Wu D, Olsen BR, et al. (2003) Osteoarthritis-like changes and decreased mechanical function of articular cartilage in the joints of mice with the chondrodysplasia gene (cho). *Arthritis Rheum* 48: 2509-2518.
31. Yoshimi M, Miyaishi O, Nakamura S, Shirasawa S, Kamochi H, et al. (2005) Identification of genes preferentially expressed in articular cartilage by suppression subtractive hybridization. *J Med Dent Sci* 52: 203-211.
32. Seto J, Busse B, Gupta HS, Schafer C, Krauss S, et al. (2012) Accelerated growth plate mineralization and foreshortened proximal limb bones in fetuin-a knockout mice. *PLoS One* 7: e47338.
33. Woods A, Wang G, Beier F (2007) Regulation Of Chondrocyte Differentiation By The Actin Cytoskeleton And Adhesive Interactions. *J Cell Physiol* 213: 1-8 ST - Regulation of chondrocyte differentiatio.

34. Luegmayr E, Glantschnig H, Wesolowski GA, Gentile MA, Fisher JE, et al. (2004) Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1: S108-118.
35. Ackert-Bicknell CL (2012) HDL cholesterol and bone mineral density: is there a genetic link? *Bone* 50: 525-533.
36. Gohda T, Makita Y, Shike T, Tanimoto M, Funabiki K, et al. (2003) Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type 2 diabetes model: is Zn-alpha2 glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? *Diabetes* 52: 2175-2181.
37. Zhang B, Guo YK, Li S, Zhang LZ, Lan XY, et al. (2012) Genotype and haplotype analysis of the AZGP1 gene in cattle. *Mol Biol Rep* 39: 10475-10479.
38. Rousselle AV, Heymann D (2002) Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* 30: 533-540.
39. Orriss IR, Knight GE, Ranasinghe S, Burnstock G, Arnett TR (2006) Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation. *Bone* 39: 300-309.
40. Somjen D, Kaye AM, Binderman I (1985) Stimulation of creatine kinase BB activity by parathyroid hormone and by prostaglandin E2 in cultured bone cells. *Biochem J* 225: 591-596.
41. Chang X, Zheng Y, Yang Q, Wang L, Pan J, et al. (2012) Carbonic anhydrase I (CA1) is involved in the process of bone formation and is susceptible to ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther* 14: R176.
42. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M (2010) The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 18: 419-433.
43. Hugle T, Kovacs H, Heijnen IA, Daikeler T, Baisch U, et al. (2012) Synovial fluid metabolomics in different forms of arthritis assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Exp Rheumatol* 30: 240-245.
44. Lacitignola L, Fanizzi FP, Francioso E, Crovace A (2008) <sup>1</sup>H NMR investigation of normal and osteo-arthritic synovial fluid in the horse. *Vet Comp Orthop Traumatol* 21: 85-88

**Table 1 : Differentially expressed proteins in cartilage**

**Differentially expressed proteins identified by BCA between OC and healthy foals**

Protein ID	Symbol	Name	Fold	
			Sc vs H	Fr vs H
ENSECAP00000016841 *	COL11A2	Collagen type XI, alpha 2	-11.4	-2.2
ENSECAP00000007023 *	CKB	Creatine kinase, brain	-6.8	-6.0
ENSECAP000000011846	SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	-5.3	-1.1
ENSECAP000000008827	MF12	Antigen p97	-2.8	-1.2
ENSECAP000000021299	COL2A1	Collagen, type II, alpha 1	-2.7	-1.3
ENSECAP000000022367	COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	-2.6	-1.5
ENSECAP000000014610 *	CLU	Clusterin	-1.8	-1.8
ENSECAP000000011205	FKBP10	FK506 binding protein 10, 65 kDa	-1.8	-1.5
ENSECAP000000006156	EEF1D	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta	-1.8	-1.4
ENSECAP000000013490	NDUFS1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa	-1.6	-1.5
ENSECAP000000007649	APOA1	Apolipoprotein A-I	-1.5	-2.5
ENSECAP000000017379	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	1.1	-2.8
ENSECAP000000004949	ENO1	Enolase 1, (alpha)	1.1	1.6
ENSECAP000000021406	MMP1	Matrix metalloproteinase 1	1.1	6.1
ENSECAP000000012774	AHSG	Alpha-2-HS-glycoprotein	1.2	-4.5
ENSECAP000000022557 *	DDAH1	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	1.3	1.5
ENSECAP000000009171#	ALB	Albumin	1.3	-2.1
ENSECAP000000014153 *	HAPLN1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	1.5	2.0
ENSECAP000000008974	VCP	Valosin-containing protein	1.6	1.3
ENSECAP00000001101 *	PSMB3	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 3	2.7	2.7
ENSECAP000000020429	COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1	3.4	1.7
ENSECAP000000018075	PDIA3	Protein disulfide isomerase family A, member 3	4.3	1.2
ENSECAP000000010505	C14orf166	UPF0568 protein C14orf166	5.3	1.4

**Additional proteins differentially expressed identified by BCA between Fracture and Scratches foals**

Protein ID	Symbol	Name	Fold	
			Sc vs H	Fr vs H
ENSECAP000000020710	COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1	-7.8	1.5
ENSECAP000000016644	MFGE8	Milk fat globule-EGF factor 8 protein	-1.7	8.2
ENSECAP000000015994	TPT1	Tumor protein, translationally-controlled 1	-1.7	1.2
ENSECAP000000016124 #	ACTG1	Actin, gamma 1	-1.6	1.7
ENSECAP000000019875	SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1	-1.5	2.3
ENSECAP000000004638	VIM	Vimentin	-1.4	1.7
ENSECAP000000015847	DSG1	Desmoglein 1	-1.3	2.0
ENSECAP000000013637	POTEJ	POTE ankyrin domain family, member J	-1.1	1.7
ENSECAP000000000126	ACTA1	Actin, alpha 1, skeletal muscle	-1.1	1.7
ENSECAP000000019512	PNP	Purine nucleoside phosphorylase	1.1	-16.8
ENSECAP000000018335	TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	1.4	-2.3
ENSECAP000000000832	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	1.5	-2.8
XP_001500445.2	PGAM4	Phosphoglycerate mutase family member 4	2.0	-12.9

**H : Healthy**  
**Sc : Scratches**  
**Fr : Fractures**

\* denotes a protein also identified by differential analysis (Kruskall Wallis pvalue <0.05)

# denotes proteins also identified in synovial fluid of OC horses by the study of Chiaradia pepe et al., 2012

Table 2 : Differentially expressed proteins in bone

Differentially expressed proteins identified by BCA between OC and healthy foals

Protein ID	Symbol	Name	Fold	
			Sc vs H	Fr vs H
ENSECAP00000021299	COL2A1	collagen, type II, alpha 1 (C1er)	-6.0	-1.6
ENSECAP00000015051 *	CA1	Carbonic anhydrase 1	-5.3	-2.3
ENSECAP00000007023	CKB	creatine kinase, brain	-4.3	-1.3
ENSECAP00000019205	ATP6V1A	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	-3.3	-1.2
ENSECAP00000016124 *#	ACTG1	actin, gamma 1	-3.0	-1.2
ENSECAP00000019663	ACTN4	actinin, alpha 4	-2.3	1.0
ENSECAP00000012746 *	ATIC	5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleotide	-2.1	-1.3
ENSECAP00000018335	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	-1.8	-1.5
ENSECAP00000013637	POTEJ	POTE ankyrin domain family, member J	-1.7	-1.2
ENSECAP00000012774 *	AHSG	alpha-2-HS-glycoprotein	-1.6	-2.2
XP_001916320.1	VIM	vimentin	-1.6	-1.2
ENSECAP00000009171#	ALB	albumin	-1.1	-2.0
ENSECAP00000009479	TALDO1	transaldolase 1	-1.1	4.1
ENSECAG00000013693	COL1A1	collagen type I alpha-1	1.1	1.8
ENSECAP00000016044	PSME2	proteasome activator subunit 2 (PA28 beta)	1.2	1.7
ENSECAP00000012141	MTAP	methylthioadenosine phosphorylase	1.8	1.2
ENSECAP00000011516 *	TTC38	tetratricopeptide repeat domain 38	2.0	1.5
ENSECAP00000003687 *	FETUB	fetuin B	2.0	1.5
ENSECAP00000009723 *	SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1	2.1	1.1
ENSECAP00000000126	ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle	2.1	1.4
ENSECAP00000001665	DSP	desmoplakin	2.1	-1.1
ENSECAP00000019071 *#	HP	haptoglobin	2.2	1.3
ENSECAP00000014242	HPX	hemopexin	2.3	1.2
ENSECAP00000008406 *#	FGB	fibrinogen beta chain	2.4	1.8
ENSECAP000000022660 *	MVP	major vault protein	2.5	1.4
ENSECAP00000011409 *#	C4BPA	complement component 4 binding protein, alpha	2.5	1.4
ENSECAP00000007649 *	APOA1	apolipoprotein A-I	2.7	1.6
ENSECAP00000008974	VCP	valosin-containing protein	2.8	1.1
ENSECAP00000017994	ACTN1	actinin, alpha 1	2.9	1.0
ENSECAP00000008827	MF12	antigen p97	3.1	3.1
ENSECAP00000005450	CLU	clusterin	3.1	1.8
ENSECAP00000018374	JUP	junction plakoglobin	3.1	1.3
ENSECAP00000011846	SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	3.2	1.9
ENSECAP00000009701 *	F2	coagulation factor II (thrombin)	3.3	1.3
ENSECAP00000008891 *	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1	4.7	1.3
ENSECAP00000006553 *	FGG	fibrinogen gamma chain	4.9	2.0
XP_001915506 *	AZGP1	alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding	6.0	2.8

Additional proteins differentially expressed identified by BCA between Fracture and Scratches foals

Protein ID	Symbol	Description	Fold	
			Sc vs H	Fr vs H
ENSECAP00000009456	PRDX2	peroxiredoxin 2	-2.8	1.4
ENSECAP00000011470	ARHGDI3	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	-2.3	3.6
ENSECAP00000016524	TF	transferrin	1.4	-1.8

H : Healthy  
 Sc : Scratches  
 Fr : Fractures

\* denotes a protein also identified by differential analysis (Kruskal Wallis pvalue <0.05)

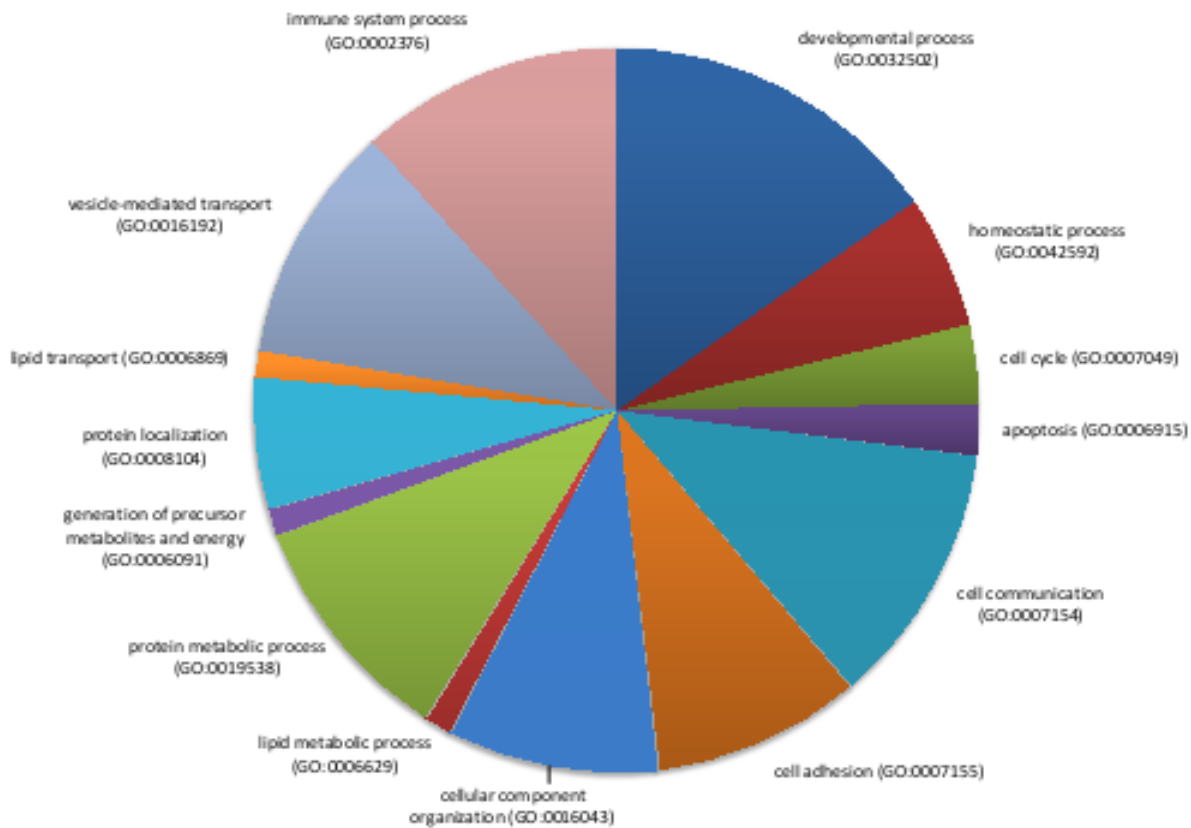
# denotes proteins also identified in synovial fluid of OC horses by the study of Chiaradia pepe et al., 2012



## S1: Cartilage annotation

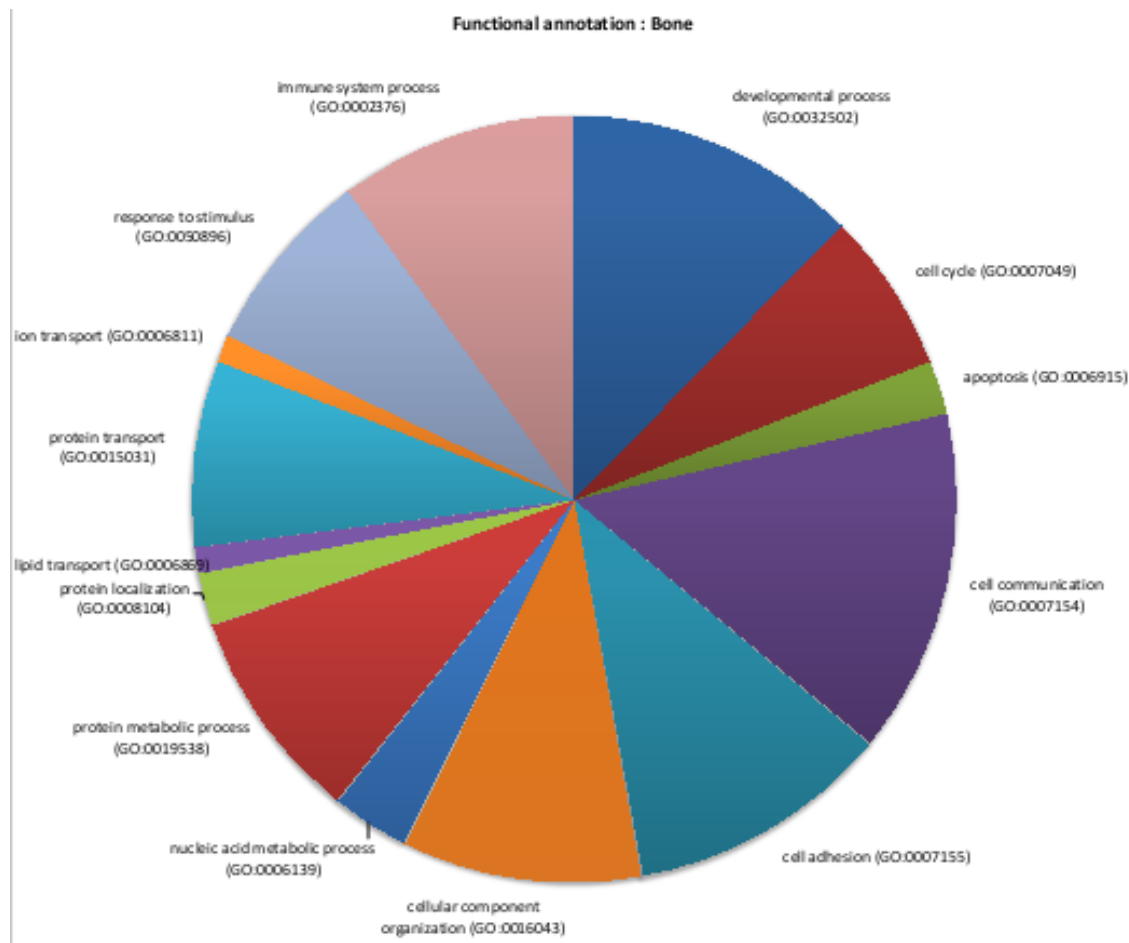
GO term	Gene number
developmental process (GO:0032502)	13
homeostatic process (GO:0042592)	5
cell cycle (GO:0007049)	3
apoptosis (GO:0006915)	2
cell communication (GO:0007154)	10
cell adhesion (GO:0007155)	8
cellular component organization (GO:0016043)	8
lipid metabolic process (GO:0006629)	1
protein metabolic process (GO:0019538)	9
generation of precursor metabolites and energy (GO:0006091)	1
protein localization (GO:0008104)	5
lipid transport (GO:0006869)	1
vesicle-mediated transport (GO:0016192)	9
immune system process (GO:0002376)	10

Functional annotation : Cartilage



## S2: Bone annotation

GO term	Gene number
developmental process (GO:0032502)	11
cell cycle (GO:0007049)	6
apoptosis (GO:0006915)	2
cell communication (GO:0007154)	13
cell adhesion (GO:0007155)	10
cellular component organization (GO:0016043)	9
nucleic acid metabolic process (GO:0006139)	3
protein metabolic process (GO:0019538)	8
protein localization (GO:0008104)	2
lipid transport (GO:0006869)	1
protein transport (GO:0015031)	7
ion transport (GO:0006811)	1
response to stimulus (GO:0050896)	7
immune system process (GO:0002376)	9



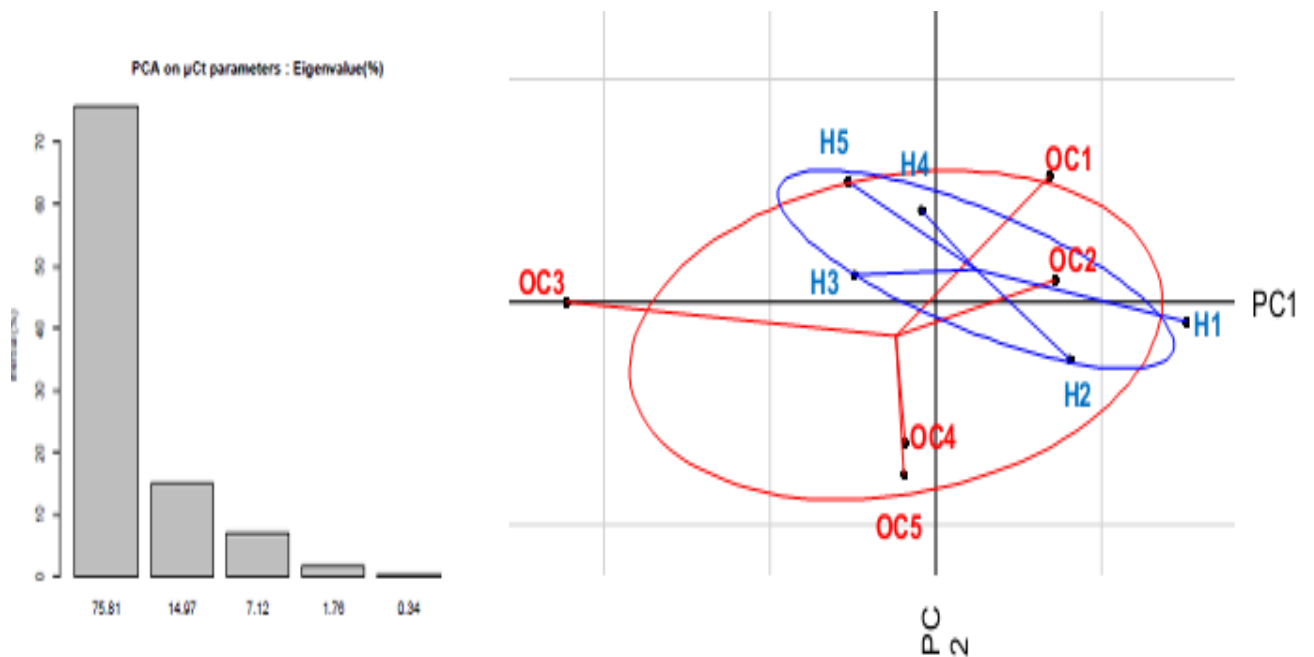
S3:  $\mu$ CT analysis

Raw data

	Sample	BMD (mg/cc)	BV/TV	Tb,th (mm)	Tb,nb	Tb,sp (mm)
Controls	H1	280	0.48	0.11	4.37	0.14
	H2	273	0.36	0.10	3.60	0.19
	H3	203	0.21	0.07	2.98	0.26
	H4	210	0.25	0.07	3.79	0.24
	H5	203	0.21	0.06	3.38	0.26
Scratch	OC3	86	0.12	0.06	2.13	0.42
	OC5	171	0.34	0.10	2.72	0.32
	OC4	295	0.23	0.09	2.60	0.30
Frac	OC1	212	0.35	0.08	4.99	0.19
	OC2	243	0.37	0.09	4.29	0.21

Statistics

	BMD	BV/TV	Tb,th	Tb,nb	Tb,sp
Control	1	1	1	1	1
Scratch	0.549878044	0.757615982	0.928482897	0.669122594	1.699243816
Fracture	1.069915016	1.048594058	1.044733339	1.09262302	1.055363986
SE Ctrl	0.08	0.17	0.11	0.06	0.11
SE Scratch	0.18	0.37	0.26	0.08	0.21
SE Fract	0.07	0.02	0.07	0.10	0.05
ttest Scratch	0.04	0.51	0.77	0.03	0.02
ttest Fract	0.85	0.53	0.87	0.06	0.62



### 4.3. Etude transcriptomique comparative de l'os sous-chondral et du cartilage épiphysaire de chevaux sains et atteints d'OC

Une troisième partie du travail a porté sur l'analyse et la comparaison du micro-transcriptome de l'os sous-chondral et du cartilage épiphysaire des mêmes poulains afin d'évaluer le rôle potentiel des micro-ARN (miRNA), une famille de petits ARN non codants, dans la physiopathologie de l'OC.

En effet, les miRNA, jouent un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes dans un grand nombre de tissus. La biogenèse des miRNAs s'effectue à partir d'un miRNA primaire (long transcrit) qui est transformé en un pre-miRNA de ~60 nucléotides par la ribonucléase nucléaire Drosha afin d'être. Le pre-miRNA résultant est ensuite pris en charge par l'endoribonucléase Dicer afin de générer un duplex de ~22 paire de bases. Par la suite, un des brin du duplex est incorporé au complexe RISC (RNA-induce silencing complex) afin d'être dirigé vers le transcrit cible. La liaison de RISC induit alors le clivage ou l'inhibition de la traduction du RNA messenger, selon le degré de complémentarité entre le miRNA et le transcrit cible. L'invalidation du gène DICER dans le cartilage chez la souris entraîne une absence de maturation des miRNA et provoque une dyschondroplasie, démontrant leur importance dans le processus d'ossification endochondrale. De plus, les miRNA sont impliqués dans la pathogénie de pathologies complexes telles que l'arthrose, l'ostéopénie ou l'ostéoporose. Toutefois, aucune analyse pangénomique *de novo* n'avait encore été réalisée afin d'établir le répertoire des miRNA exprimés dans l'os et le cartilage chez l'Homme ou la souris, et à fortiori chez le cheval.

Ainsi, l'objectif de nos travaux était 1) d'établir un catalogue de miRNA exprimés dans l'os et le cartilage équin, 2) d'identifier d'éventuels défauts constitutifs d'expression de certains miRNAs dans l'os et cartilage des chevaux atteints d'OC conduisant au développement de lésions d'OC et 3) identifier des miRNAs potentiellement impliqués dans la réponse aux contraintes biomécaniques.

Nous avons donc choisi une approche de séquençage RNA-Seq afin de coupler identification et quantification des miRNAs. En collaboration avec Anne Vaiman (préparation des banques de séquençage SOLID) et Rachel Legendre (analyse bioinformatique), nous avons établi un répertoire de 418 et 410 miRNAs déjà connus (autres tissus et autres espèces) dans le cartilage et l'os respectivement. De plus, nous avons également mis en évidence près de 400 nouveaux miRNAs potentiels pour chacun de ces tissus.

L'analyse différentielle entre les chevaux sains et atteints a permis de mettre en évidence des miRNAs différentiellement exprimés dans le cartilage et dans l'os mais aussi après compression dans les deux tissus. L'ensemble de nos résultats suggère donc une implication des miRNA dans la physiopathologie de l'OC chez le cheval mais aussi dans la réponse cellulaire aux stress biomécaniques. Ces résultats pourraient permettre d'identifier des miRNA prometteurs pouvant constituer de bonnes cibles thérapeutiques ou pouvant être utilisés comme biomarqueurs diagnostics. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique soumise dans BMC Genomics : **Desjardin et al., *Next-generation sequencing identifies equine cartilage and subchondral bone miRNAs and suggests their involvement in osteochondrosis physiopathology***

# Next-generation sequencing identifies equine cartilage and subchondral bone miRNAs and suggests their involvement in osteochondrosis physiopathology

Clémence DESJARDIN<sup>1</sup>, Xavier MATA<sup>1</sup>, Rachel LEGENDRE<sup>1</sup>, Anne VAIMAN<sup>1</sup>, Sean P KENNEDY<sup>2</sup>, Denis LALOE<sup>1</sup>, Claire JACQUES<sup>3</sup>, Edmond P CRIBIU<sup>1</sup> and Laurent SCHIBLER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, UMR1313 Génétique animale et biologie intégrative, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France ; AgroParisTech, 16, rue Claude Bernard, 75231 Paris, France.

<sup>2</sup>INRA, UMR1319 Micalis, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>3</sup>UR4, University Pierre and Marie Curie, Paris, France

## Corresponding author:

Clémence DESJARDIN, BIGE, UMR1313 GABI, INRA CRJ, Domaine de Vilvert, Bat 440, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

Email: clemence.desjardin@jouy.inra.fr

## **Abstract**

MicroRNAs (miRNAs) are an abundant class of small single-stranded non-coding RNA molecules ranging from 18 to 24 nucleotides. They negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level and play key roles in many biological processes, including skeletal development and cartilage maturation. In addition, miRNAs involvement in osteoarticular diseases has been proved and some of them were identified as suitable biomarkers for pathological conditions. Equine osteochondrosis (OC) is one of the most prevalent juvenile osteoarticular disorders in horses and represents a major concern for animal welfare and economic reasons. Its etiology and pathology remain controversial and biological pathways as well as molecular mechanisms involved in the physiopathology are still unclear. This current study aims to investigate the role of miRNAs in the constitutive defects associated with equine OC development, evaluate the role of miRNAs in the regulation of mechano-transduction pathways and identify promising miRNAs which may be valuable diagnostic biomarkers. Here we define the epiphyseal cartilage and subchondral bone miRNome, including about 200 new miRNAs. Differentially expressed miRNAs were identified between bone and cartilage from healthy and OC foals, as well as after an experimental mechanical loading. Taken together, our results suggest a role of miRNAs in equine OC physiopathology and in the cellular response to biomechanical stress

**Keywords:** microRNA, cartilage, bone, equine osteochondrosis

## INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) are an abundant class of small single-stranded non-coding RNA molecules of 18 to 24 nucleotides generated by a sequential processing of long RNA transcripts by two specific RNase III proteins: Dicer and Drosha [1]. Studies performed during the past decade have led to the discovery of many miRNAs in almost all organisms [2]. Over 8000 predicted miRNAs from plants, animals and viruses are currently described in miRBase, the reference database. It has been shown that miRNAs negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level by targeting specific mRNAs for cleavage or translational repression through the RNA-induced silencing complex (RISC)[3]. They play key roles in many biological processes, including development, cell proliferation, differentiation as well as apoptosis and have been shown to be involved in a number of physiopathological processes [4].

Analysis of cartilage-specific Dicer-knock-out (KO) mice [5] revealed a crucial role of miRNAs in cartilage development and integrity. However, a comprehensive identification of miRNAs expressed in cartilage and bone and their precise role is still unclear. Recent studies highlighted the role of some miRNAs in endochondral ossification [6], chondrocytes differentiation [7], regulation of bone remodeling [8] and osteoblast and osteoclast differentiation and functions [9-11]. In addition, miRNA expression profiling performed on bovine articular cartilage suggested their involvement in mechano-transduction pathway and in the maintenance of articular cartilage homeostasis [12]. In line with their role in cartilage maturation and bone development, miRNAs are now recognized as key players in osteoarthritis (OA) physiopathology [13, 14] and may prove to be involved in other osteoarticular diseases [15]. For example, it has been demonstrated that mir-27b regulates a protein involved in MEC turn-over, the Matrix Metalloproteinase 13 (MMP-13), in both normal and OA human chondrocytes. This result suggests that an abnormal expression of mir-27b may contribute to OA development [16]. Furthermore, some miRNAs have been identified as biomarkers for pathological conditions including OA [17].

Most recently, there has been growing interest in using next-generation sequencing (NGS) to catalog small RNAs in a variety of tissue. The aim of our study was to use short-read NGS technology (SOLID™, Life Technologies) to establish a comprehensive repertoire of miRNA expressed in either equine cartilage or subchondral bone and to investigate their potential role in equine osteochondrosis (OC). This juvenile osteoarticular disease leads to joint swelling, stiffness and varying degrees of lameness [18-20]. OC is one of the most prevalent developmental orthopedic diseases in equine population and constitutes a major concern in terms of animal welfare as well as its economic impact [21]. Its etiology and pathology are still unclear, due to the confusion regarding the definition of the disease and the lack of understanding of primary lesions formation [22]. Clearly, there is a need for a better understanding of OC molecular physiopathology in order to refine nosological entities.

Here, we analysed healthy cartilage and subchondral bone from healthy (healthy samples) and OC-affected (predisposed samples) foals, with and without an experimental mechanical loading. This was performed with the aim of exploring the role of miRNAs in the constitutive defects associated with OC development, as well as in regulating mechano-transduction pathways. This work made it possible to define, for the first time to our knowledge, the comprehensive epiphyseal cartilage and subchondral bone miRNome, including about 300 new putative miRNAs. Furthermore, we highlighted miRNAs associated with both OC status and mechanical loading, suggesting that miRNAs may be involved in OC physiopathology as well as in the cellular response to biomechanical stress. Our work identified several promising miRNAs that may prove to be valuable therapeutic targets or diagnostic biomarkers that could help refining the nosological entities.

## MATERIAL & METHODS

- Animal Care Committee

The experimental protocol was reviewed and approved under the number 0964 by the Animal Care Committee of VetAgro Sup, which abides by the requirements of the



directive 86/609 of the European Community Council.

- Samples collection and experimental design (figure 1)

The study was based on Anglo-Arab saddle breed foals, obtained from the experimental station of the French National Stud (Station IFCE de Chamberet) to reduce genetic and environmental variability. Mare-foal couples were managed on swivel pastures until the end of the grass season. At between six to seven months of age, foals were subjected to clinical and radiographic examination (multiple radiographic projections of stifle, hock and fetlock; a total of 16 views). Three healthy (without any signs of osteoarticular affection) and three OC-affected (at least one lesion on the hock) foals were identified and euthanized at 10 months by lethal intravenous injection of T61. All joints were macroscopically examined at necropsy to ensure the healthy status and confirm radiologic diagnosis. Cartilage and subchondral bone cylindrical explants were obtained from the stifle (healthy joint) using a 12-mm punch. Explants including epiphyseal cartilage and about 5 mm of subchondral bone were washed in PBS and placed in DMEM culture medium for subsequent mechanical-loading experiments or flash frozen in liquid nitrogen for subsequent RNA-seq analysis.

- Experimental loading

Harvested cartilage explants were placed into individual compression wells of Biopress culture plates (Flexercell International, Hillsborough) in 1.5 ml of culture medium (DMEM, containing penicillin-streptomycin 1%, glutamine 2%, albumin 0,1% and Hepes 30 mM). All experiments were performed at 37°C, under ambient atmosphere. A compressive stress was applied to individual samples by the Flexercell FX-4000C system (sinusoidal waveform at 0.5 Hz, 1MPa, 24h00) whereas the control explants stayed in unloaded conditions, as previously described [23]. PGE2 production was measured in the media by a high sensitivity commercially available enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), as previously described [24].

- Sequencing

miRNA was extracted from ~150mg of tissue (bone and cartilage) which had been previously frozen at -80°C post-necropsy and

subsequently stored in liquid nitrogen. The *mirVana*<sup>TM</sup> miRNA Isolation Kit (Ambion) was used to extract small RNA (smRNA) from cartilage following the manufacturer's protocol. Total RNA was purified from bone using the miRNeasy Mini kit (Qiagen) and the RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) for enrichment of small RNA (<200 nt) following the manufacturer's protocol. The concentrations of smRNA were determined using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer and the size and purity were determined using a Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent) loaded with a RNA 6000 Nano Kit. Approximately 190ng of miRNA extracted from bone and 70ng from cartilage was used for library constructions following the protocol for the SOLiD<sup>®</sup> Total RNA-Seq Kit (Life Technologies). Thirty libraries were prepared: 15 for cartilage and 15 for bone. Among these 15 libraries, 3 were prepared from healthy cartilage/bone from healthy horses, 3 from healthy cartilage/bone from OCD horses, 3 from healthy cartilage/bone from healthy horses after 24H of compression, 3 from healthy cartilage/bone from OCD horses after 24H of compression and 3 from healthy cartilage/bone from healthy horses in the culture medium used during compression.

Briefly, the small RNAs were hybridized and ligated with SOLiD<sup>TM</sup> Adaptor Mix, a reverse transcription was performed and the cDNAs were purified using the MinElute PCR purification kit (Qiagen). The 60-80 base pair fraction of the cDNA was excised from a 10% acrylamide gel stained with SYBR Gold (Invitrogen) and an amplification was realized by PCR (95°C - 1min, 18 x (95°C -30s, 62°C - 30s, 72°C - 30s), 72°C - 7min) using the SOLiD 5' PCR primer and a 3' library-specific barcoded SOLiD primer. The amplified DNA was purified using the Purelink PCR micro kit (Invitrogen) and the 110-130 bp region was excised from a 6% acrylamide gel stained with SYBR Gold (Invitrogen). The yield and size distribution of the amplified DNA were assessed and pools of three different horses were made to decrease the effect of individual variability. Libraries were processed on the SOLiD EZBead system for template bead preparation prior to sequencing.

Small RNA libraries were sequencing on a SOLiD 5500XL Series Genetic Analysis System at the Metaquant Platform (INRA,

Jouy-en-Josas). 350 million 50-nt reads were generated over the thirty libraries.

- Adaptor trimming and reads mapping

Adaptors in color space (5'-330201030313112312-3') were removed by Cutadapt (version 0.9.5), permitting two mismatches over reads between 17 and 26 nucleotides. Read mapping was performed using Bowtie (version 0.12.7) with color space options, in v- alignment mode, permitting 2 mismatches. Uniquely mapping reads and reads with <6 total alignments were retained. In the second case, all alignments were reported in the best-to-worst order (*best* option). Reads with >6 alignments were removed. Mapped reads overlapping with known non-coding RNAs (except miRNAs) obtained from RFAM (<http://rfam.sanger.ac.uk/>) were also discarded.

- *Loci* detection and quantification

Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) was used to convert the SAM files to BAM files and Bedtools (<http://code.google.com/p/bedtools/>) to retrieve information from the alignment file and extract it into a \*.wig file with all positions available (chromosome, start, stop) for each read or *locus* mapped to the reference genome ("genomeCoverageBed"). The candidate *loci* were then used as guidelines for excising potential miRNAs precursor sequences from the horse genome. Two potential sequences were excised, one at -10 bp and +50bp centered on the island and another at -50bp and +10bp, to simulate the 5p and 3p position of the potential miRNA. Each potential precursor sequence was passed to RNAfold tool (Vienna package, version 1.8.5) to predict secondary structures and detect potential hairpin structure. In-house Perl scripts were used to count reads in each candidate *loci* for all samples.

- miRNAs annotation

Equine mature miRNAs annotations were extracted from the miRBase database (<http://www.mirbase.org/>). In order to extend annotations, human, bovine, dog, pig and mouse miRNAs precursor sequences were aligned to the horse genome by BLAST (version2.2.25). Hits with a bit score higher than 90 were conserved and IntersectBed (tool

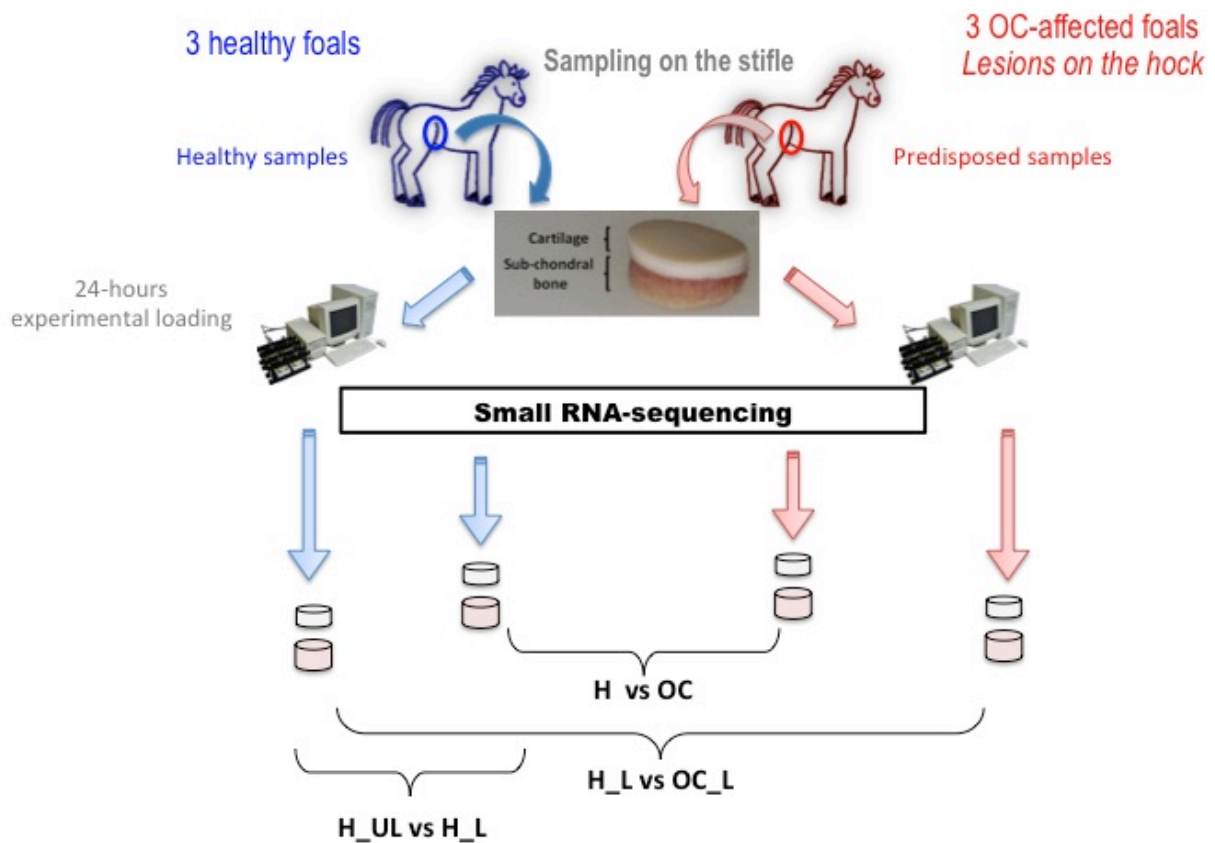
of BedTools) was used to annotate each candidate miRNA. Manual cleaning and curation was performed to correct or improve nomenclature. For putative new miRNAs, we applied the follow filtering criteria: a size between 17 and 29 bases, a count greater than or equal to 1000 in at least one experimental library and a free energy of the secondary structure calculated by RNAfold lower than -20 kcal/mol, which is characteristic of known miRNAs RNAfold scores. MapMi (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/MapMi/>) was used to query orthologs in five other mammalian species (cattle, pig, humans, dog and mouse).

- Statistical analysis

Statistical analysis for determining differential expression was performed with R v2.15.0 [25] using the Bioconductor package DESeq version 1.0.0 [26]. DESeq utilizes a negative binomial distribution for modeling read counts per miRNA and implements a method for normalizing the counts. This normalization procedure uses the library median of the ratios between the read count and the geometric mean of each gene as a scaling factor for each library. The p-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method [27]). A comprehensive description of miRNA expression patterns was performed by principal component analysis (PCA) and between-class analysis (PCA of the table of the group means, BCA). *The R package ade4* (Version 1.5-2) was used for these R package (version 1.4.17).

- Identification and functional annotation of miRNAs predicted targets

The miRmap web tool (<http://mirmap.ezlab.org/app/>) was used to query for miRNAs predicted targets [28]. For each miRNAs of interest, a comprehensive target prediction was obtained. We considered only predicted targets having a miRmap score above 90 and retained, at most, the first 500 with the best score. In addition, these targets were also filtered based on known expression patterns in cartilage and bone, respectively. Functional annotation was performed using PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) [29] and statistical enrichment with ToppCluster (<http://toppcluster.cchmc.org/>)



**Figure 1: Experimental design.** Three healthy and three OC-affected foals (presenting lesion on the hock) were divided in two groups. Healthy (H) and OC-predisposed (OC) cartilage and bone samples were pieced on the stifles. Samples were then subjected (\_L) or not (\_UL) to a 24-hours experimental loading. Short-read NGS technology (SOLID™, Life Technologies) was performed to define the cartilage and sub-chondral bone miRNomes. Three comparisons were used: between healthy and OC predisposed samples (H vs OC) to test the hypothesis of a constitutive defect, between healthy loaded and unloaded samples (H\_L vs H\_UL) to evaluate the role of miRNA in the response to biomechanical stress and between healthy and OC-predisposed samples loaded (H\_L vs OC\_L) to test the hypothesis of a impaired response to mechanical loaded in OC-affected foals.

## RESULTS

- *Experimental mechanical loading*

Two explants from each horse were subjected to compressive stress using a Flexercell FX-4000C system, whereas two other explants were left in unloaded conditions to serve as controls. Prostaglandin E2 (PGE2) release in the media (pg/mg/ml of explant) was measured to evaluate compression efficiency. In agreement with previous data obtained on mouse costal cartilage explants [30], a significant two-fold induction was observed, on average, between compressed and uncompressed samples (Supplementary data). No significant differences were observed between compressed predisposed and healthy samples.

- *Identification and characterization of miRNAs in equine bone and cartilage tissues*

Thirty libraries were sequenced using the SOLID™ technology, generating 9 to 15 million reads for each library. After adaptor trimming and size selection, about 70% of these reads were mapped to the EquCab2 horse genome for each sample, defining about 53998 to 97964 regions. Among these regions, 327 and 329 in cartilage and bone, respectively, overlapped with previously known mammalian miRNA (Table 1-A, B). Secondary structure analysis identified 282 and 293 putative new miRNAs in cartilage and bone, respectively (Supplementary data). Only regions with a genomic coverage greater than 2 were kept for further analysis.

We elaborated a set of 609 expressed miRNAs in cartilage and 622 miRNAs in bone. 561 miRNAs were found to be expressed in both tissues. About 300 putative new miRNAs were identified based on their expression level and RNAfold score. Existing miRNA

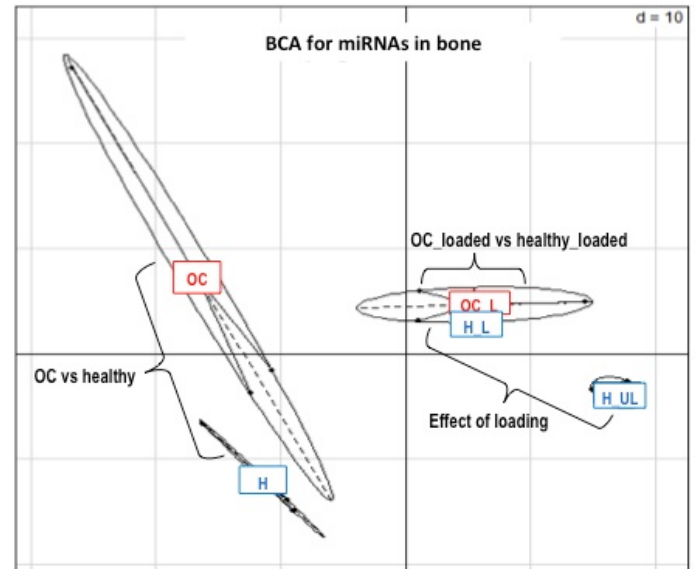
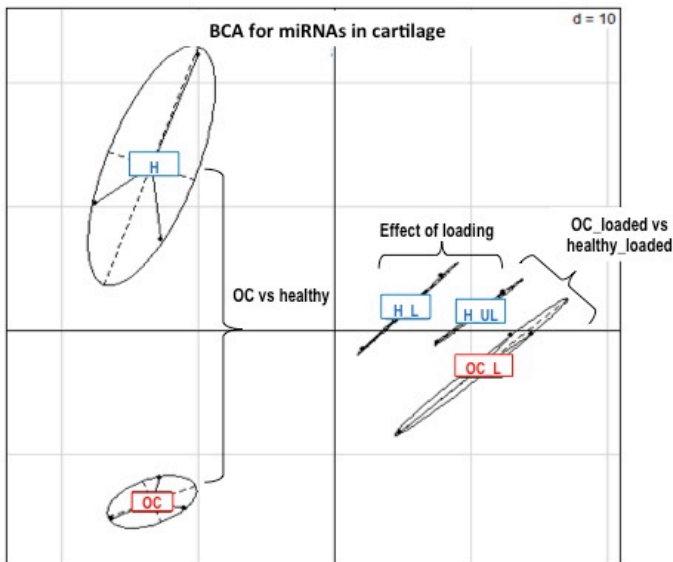
precursor sequences were searched using MapMi in five other mammalian genomes (cattle, pig, humans, dog and mouse), identifying likely orthologs in at least one species for 163 miRNAs.

- *Differential miRNAs expression analysis*

A between-class correspondence analysis was performed for each tissue, showing a good discrimination between each experimental condition (figure 1): normal native cartilage or bone from healthy (H) *versus* affected (OC) foals, before (H\_UL) *versus* after (H\_L, OC\_L) an experimental 24h mechanical loading (figure 2 A-B). Differential analyses were also performed for each tissue and each condition. Loaded and unloaded samples could be efficiently discriminated, confirming the efficiency of the experimental compression.

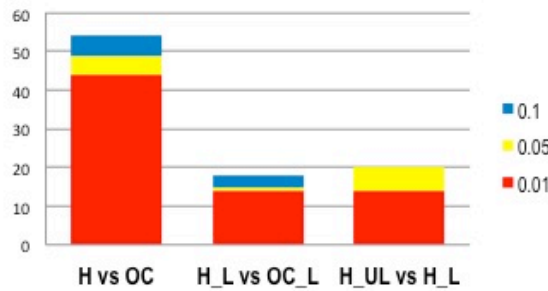
Expression levels of miRNA in normal bone and cartilage from healthy and predisposed samples were compared to determine the potential role of miRNAs in equine OC physiopathology. This analysis highlighted 49 miRNAs differentially expressed in cartilage (including 5 annotated) and 41 miRNAs (8 annotated) in bone (figure 3-A, B). In cartilage, three miRNA were found to be up-regulated in contrast to bone where 40 miRNAs were up-regulated and only a single miRNA species was found to be down-regulated (figure 2-C).

We also investigated changes in miRNA expression induced by mechanical stress. Nineteen differentially expressed miRNAs were identified in cartilage (2 annotated) and 21 in bone (2 annotated). Among these, 12 miRNAs were up-regulated in cartilage and 9 in bone (figure 3-A-B).

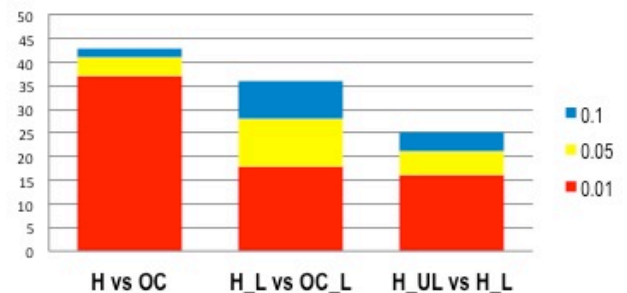


**Figure 2: Between Class Analysis (BCA) based on A- cartilage and B- bone miRNomes.** BCA succeed in discriminating between healthy samples (H) and predisposed samples of OC-affected foals (OC), as well as healthy samples loaded (H\_L) and unloaded (H\_UL) in both cartilage and bone. This suggests that miRNA may be involved in OC physiopathology and biological response to mechanical loading. In contrast, BCA does not well discriminate between healthy samples loaded (H\_L) and OC predisposed samples loaded (OC\_L) in cartilage and bone. This may prove that biomechanical response is not disrupted in cartilage and bone predisposed samples of OC-affected foals.

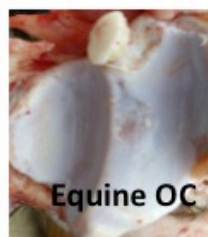
**A** Number of differentially expressed miRNAs in cartilage in function of *p*-value and comparison



**B** Number of differentially expressed miRNAs in bone in function of *p*-value and comparison



**C**



Equine OC

Epiphyseal cartilage	miRNAs Down-regulated in OC foals	eca-mir-126-5p eca-mir-135a-5p eca-mir-451 eca-mir-486-3p eca-mir-486-5p
Subchondral bone	miRNAs Up-regulated in OC foals	eca-mir-92a-3p eca-mir-18a-3p eca-mir-197 eca-mir-296-5p eca-mir-423-3p eca-mir-486-3p eca-mir-486-5p eca-mir-1249

**Figure 3: Number of differentially expressed miRNAs in cartilage A- and bone B- according to *p*-value (0,1 ; 0,05 ; 0,01) and comparisons performed: between healthy and OC predisposed samples (H vs OC); between healthy loaded and unloaded samples (H\_L vs H\_UL); between healthy and OC-predisposed samples loaded (H\_L vs OC\_L). C- Annotated miRNAs differentially expressed between healthy and predisposed cartilage and bone. In cartilage, 5 annotated miRNAs were down-regulated whereas in bone, 8 annotated miRNAs were up-regulated. Those data suggest a role of miRNAs in OC physiopatholog**

Finally, in order to test the hypothesis of an impaired response to biomechanical stress in OC horses, miRNA expression was compared in normal bone and cartilage from OC *versus* healthy foals after experimental loading. In cartilage, 15 miRNAs (1 annotated) were modulated, 7 of these being up-regulated. (figure 3-A). In bone, 28 miRNAs (2 annotated) were differentially expressed, including 24 up-regulated and 1 down-regulated in OC foals (figure 3-B).

- *Identification and functional annotation of miRNAs predicted targets*

Predicted targets of annotated miRNAs differentially expressed in bone and cartilage of OC foals were queried using miRmap [28]. About 2400 putative targets could be identified, ranging from 42 to 250 targets for each miRNAs of interest in cartilage and from 51 to 250 in bone (177 and 192 targets on average in cartilage and bone, respectively). Global functional annotation using PANTHER showed that predicted targets were primarily involved in cell cycle, cell adhesion, energy production and metabolism, as well as cell communication, adhesion and transport (Figure 4A and 4B). Functional enrichment analysis in cartilage highlighted genes primarily associated with skeletal phenotypes and involved in cell cycle and differentiation, energy production and metabolism (ATPase and GTPase activity, carbohydrate metabolic process, macromolecule biosynthesis), proteins modifications, folding and transport (protein modification process, transport, endoplasmic reticulum unfolded protein response, proteolysis), cellular homeostasis, extracellular matrix structure and dynamics (collagen, chondroitin sulfate and glycosaminoglycan catabolic process, regulation of metalloendopeptidase activity), cellular organization (cytoskeleton), ossification as well as regulation of Wnt and fibroblast growth factor signaling pathways (Supplementary file 1).

In bone, genes were also associated with skeleton development and morphogenesis, as

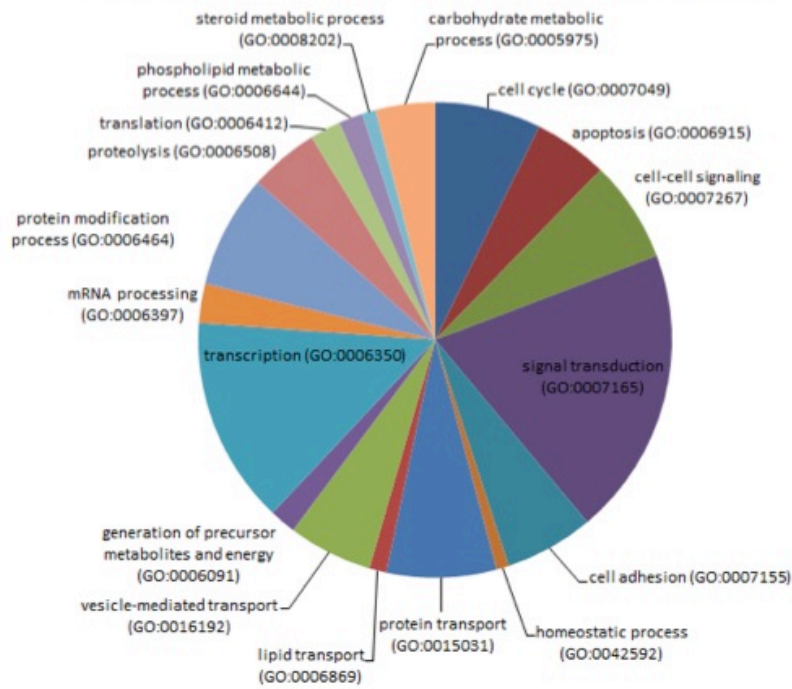
well as osteoblasts and osteoclasts differentiation (Supplementary file 2). Enriched functions included energy production (Ras and Rab GTPase, mitochondria), calcium homeostasis (endoplasmic reticulum calcium ion homeostasis, calcium channel activity), lipid biosynthesis and transport, vesicle transport (vesicle organization, vesicle-mediated transport, Golgi to ER retrograde vesicle-mediated transport, endocytosis, exocytosis), as well as regulation of growth factor signaling pathways (fibroblast growth factor, insulin-like growth factor I, transforming growth factor beta).

## DISCUSSION

In this study we characterized miRNA expression profiles in equine epiphyseal cartilage and subchondral bone using NGS analysis. We identified 609 and 622 miRNAs expressed in cartilage and bone, respectively, including about 300 novel miRNAs. Recently, Sun *et al.*, described the use of a Solexa-based deep sequencing approach to identify miRNAs profiles of articular cartilage from rat femoral head cartilage. Our study made it possible to highlight 310 known miRNAs as well as 86 novel miRNAs candidates [31]. Since 215 miRNA are found in common with the present study, our results extend the repertoire of miRNA expressed in cartilage by adding 111 additional miRNAs. We provide a comprehensive repertoire of miRNAs expressed in both cartilage and bone samples collected *in vivo*. In particular, our results highlighted numerous new putative highly expressed miRNAs based on a high confidence RNA-fold score. Most of these also display orthologous precursor sequences in at least one other mammalian genome.



### Functional annotation of miRNAs targets in cartilage



### Functional annotation of miRNAs target in bone

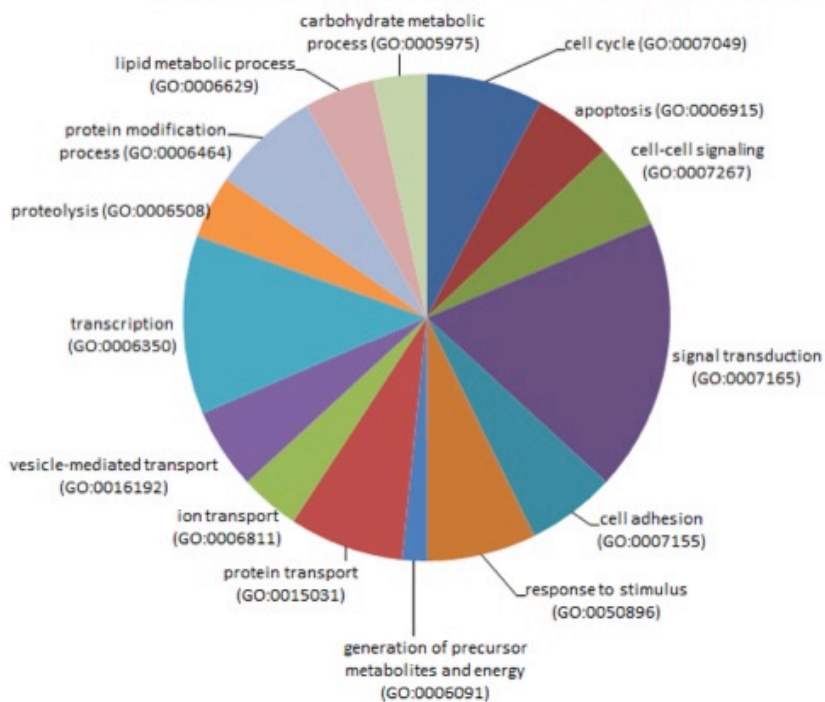


Figure 4 : Molecular functions of targets of miRNAs differentially expressed between healthy and OC-affected foals in cartilage (upper panel) and bone (lower panel)



Furthermore, they were found to be modulated between healthy and OC-affected horses, providing support for the hypothesis that these sequences do not account for experimental artifacts, but rather may represent genuine miRNAs or smallRNAs. Such a large number of new putative miRNAs may be due to the lack of studies and data specifically targeting cartilage and bone miRnome.

Equine osteochondrosis is the most common developmental osteoarticular disorder in equine populations leading to pain and lameness. Primary lesions are thought to result from a focal disruption of endochondral ossification, leading to cartilage retention into subchondral bone. Several studies have suggested that primary lesions result from an initial dyschondroplasia associated with an impaired differentiation of chondrocytes [32, 33] whereas other studies have supported the hypothesis of an initial disruption of canal blood supply leading to the formation of necrotic cartilage areas [34-36]. Our recent proteomics study revealed that equine OC results from a constitutive defect in both bone and cartilage and involves several biological processes [37]. Here, our miRNome analysis agrees with these previous findings. Indeed, differential analysis between healthy and OC foals highlighted 49 and 41 modulated miRNAs in cartilage and bone, respectively.

In cartilage, predicted target genes were found associated with known functions and mechanisms involved in maintenance of cartilage integrity. For example, the balance between catabolic and anabolic processes plays a critical role in cartilage homeostasis[38]. It has been shown that several miRNAs including mir-140, mir-199a, mir-193 and mir-29a/29b may be involved in cartilage anabolic and catabolic regulation by regulating the expression of key genes involved in those process such as MMP13, Adams-5 or Col2A1 (for review see [39]). Following these results, our data suggest that differentially expressed miRNAs regulate genes involved in macromolecule metabolism and protein folding and transport. This may also reflect a modification of cartilage turn-over in OC foals. Furthermore, chondrocyte energy metabolism plays a major role in chondrocyte development, maturation and mineralization process [40-42]. Likewise, actin cytoskeleton, which plays a major role in chondrocyte

hypertrophic differentiation [43], was highlighted in our data. Taken together, our results suggest that down-regulation of miRNAs expression in OC predisposed foals may alter pathways crucial for cartilage maturation, leading to an abnormal extracellular cartilage matrix synthesis. Interestingly, extracellular matrix changes were observed in OC-affected horses, often associated with a disruption of cartilage canals [32, 44-46]. Thus, our findings are consistent with a role of miRNAs in cartilage genetic susceptibility to equine OC.

Likewise, in bone, miRNAs target genes were found associated with functions essential for bone development and remodeling, as well as bone cell differentiation and activation. For instance, energy production and metabolisms are undoubtedly essential for proper bone tissue development. Indeed, ATP is essential for osteoclasts to generate the acidic environment required for solubilization of the alkaline salts and digestion of the organic bone matrix [47], and is involved in osteoblast differentiation and activation [48]. In addition, several studies have demonstrated that Rab GTPases, a family of proteins involved in membrane traffic, play an key role for osteoclasts function, in particular for the polarized transport of acidic vesicles of the endocytic/lysosomal pathway required for formation of the ruffled border (for review see [49]). Likewise, lipids, especially cholesterol, are essential for osteoblasts and osteoclasts development [for review see 50]. Consistent with the known role of miRNAs in the control of bone remodeling (for review see[8]) and their involvement in key regulation pathways of bone formation and remodeling such as BMP-signaling pathway (mir-133, mir-135) [51] and Wnt-signaling pathway (mir-29a) [52], miRNA predicted targets were found to be involved in the regulation of several signaling pathways (FGF, TGFb, IGF1). An essential role of zinc finger proteins in the regulation of osteoblast differentiation and bone remodeling has also recently emerged. For example, ZFP521 acts as a co-factor of Runx2 and the Runx2/ZFP521 balance regulates bone homeostasis [53]. ZNF384 regulates expression of type I collagen, counteracts BMP2-enhanced osteoblast differentiation as well as PTH induced MMP-13 expression [54].

Our data supports a role of miRNA in a constitutive bone defect associated with a predisposition to OC, including impaired bone remodeling and bone cells homeostasis.

To investigate the role of miRNAs in mechanotransduction pathways in bone and cartilage, samples were subjected to a 24-hours experimental loading treatment. The comparative analysis between unloaded and loaded samples made it possible to identify modulated miRNAs in cartilage and in bone. Regulation of mechanotransduction pathways in articular cartilage by miRNAs was previously suggested in a study performed with bovine articular cartilage [12]. This study allowed for the identification of additional miRNAs (mir-17-3p, mir-874-3p) as well as 17 new ones involved in response to mechanical stress. This work is the first to demonstrate a role of miRNAs in the regulation of mechanotransduction pathways in bone.

In conclusion, based on the miRNome, equine OC appears to be associated with combined cartilage and bone defects, in good agreement with our previous proteomics findings. The precise mechanisms linking cartilage and bone defects remain to be elucidated. Moreover, cartilage and subchondral bone serve as a functional unit to maintain joint homeostasis and a disruption or modification of either of these two tissues may lead to the remodeling of the other (for review see [55]). Nevertheless, factors involved in this interaction remain unknown. miRNAs are secreted in both tissues and may be able to take part in the communication from cartilage to bone and from bone to cartilage through the synovial fluid. In fact, miRNAs are present in synovial fluid and their expression is modified in pathological situations such as OA [17]. We observed miRNAs differentially expressed between healthy and OC cartilage and bone, some of which should constitute relevant OC biomarkers in synovial fluid and, to a lesser extent, in plasma.

Finally, there is no evidence indicating that identified defects could alone be sufficient to induce OC lesions. Since biomechanical constraints are thought to trigger the development of focal lesions, we also explored the hypothesis of an impaired response to biomechanical constraint and some mild differences could be observed between healthy

and predisposed samples. However, it remains unclear whether these differences may reflect a constitutively impaired response to biomechanical constraints or may reflect changes in ECM structure and biomechanical properties, consequently modifying mechanical signal transduction and leading to a slightly different outcome.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by a grant of Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENM-006).

We are grateful to Laurence Wimel from the IFCE experimental station for its help.

## AUTHOR CONTRIBUTION:

Study design: LS, XM and CJ. Study conduct: LS and XM. Data collection: all authors. Data analysis and interpretation: LS, XM, CD, DL. Manuscript writing and revising: LS, CD, SK. All authors state that they have no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Bartel DP: **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell* 2004, **116**(2):281-297.
2. Griffiths-Jones S: **The role of RNA molecules in cellular biology. Editorial.** *Brief Funct Genomic Proteomic* 2009, **8**(6):405-406.
3. Ambros V: **The functions of animal microRNAs.** *Nature* 2004, **431**(7006):350-355.
4. Erson AE, Petty EM: **MicroRNAs in development and disease.** *Clin Genet* 2008, **74**(4):296-306.
5. Kobayashi T, Lu J, Cobb BS, Rodda SJ, McMahon AP, Schipani E, Merckenschlager M, Kronenberg HM: **Dicer-dependent pathways regulate chondrocyte proliferation and differentiation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(6):1949-1954.
6. Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T: **Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling.** *Mol Cell Biol* 2011, **31**(14):3019-3028.

7. Gradus B, Alon I, Hornstein E: **Mirnas Control Tracheal Chondrocyte Differentiation.** *Dev Biol* 2011, **360**:58-65  
ST - miRNAs control tracheal chondrocyte di.
8. Kapinas K, Delany AM: **MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**(3):220.
9. Hu R, Li H, Liu W, Yang L, Tan YF, Luo XH: **Targeting miRNAs in osteoblast differentiation and bone formation.** *Expert Opin Ther Targets* 2010, **14**(10):1109-1120.
10. Li H, Xie H, Liu W, Hu R, Huang B, Tan YF, Xu K, Sheng ZF, Zhou HD, Wu XP *et al*: **A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans.** *J Clin Invest* 2009, **119**(12):3666-3677.
11. Wei J, Shi Y, Zheng L, Zhou B, Inose H, Wang J, Guo XE, Grosschedl R, Karsenty G: **miR-34s inhibit osteoblast proliferation and differentiation in the mouse by targeting SATB2.** *J Cell Biol* 2012, **197**(4):509-521.
12. Dunn W, DuRaine G, Reddi AH: **Profiling microRNA expression in bovine articular cartilage and implications for mechanotransduction.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(8):2333-2339.
13. Nakasa T, Nagata Y, Yamasaki K, Ochi M: **A Mini-Review: MicroRNA In Arthritis.** *Physiol Genomics* 2011, **43**:566-570  
ST - A mini-review: microRNA in arthritis.
14. Díaz-Prado S, Cicione C, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Oreiro N, Fernández-López C, Blanco FJ: **Characterization of microRNA expression profiles in normal and osteoarthritic human chondrocytes.** *BMC Musculoskelet Disord* 2012, **13**:144.
15. He X, Eberhart JK, Postlethwait JH: **MicroRNAs and micromanaging the skeleton in disease, development and evolution.** *J Cell Mol Med* 2009, **13**(4):606-618.
16. Akhtar N, Rasheed Z, Ramamurthy S, Anbazhagan AN, Voss FR, Haqqi TM: **MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**(5):1361-1371.
17. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, Nakamura T: **Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2010, **12**(3):R86.
18. Jeffcott LB: **Osteochondrosis in the horse--searching for the key to pathogenesis.** *Equine Vet J* 1991, **23**(5):331-338.
19. Ekman S, Carlson CS: **The pathophysiology of osteochondrosis.** *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1998, **28**(1):17-32.
20. Hernandez VG, Mora VFA, Rodriguez TLE: **Etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment of osteochondrosis (oc).** 2011, **42**:311-329.
21. Jeffcott LB: **Osteochondrosis - An international problem for the horse industry.** *J Equine Vet Sci* 1996, **16**(1):32-37.
22. Ytrehus B, Carlson C, Ekman S: **Etiology and pathogenesis of osteochondrosis.** *Veterinary pathology* 2007, **44**(4):429-448.
23. Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A, Thirion S, Saffar JL, Jacques C: **Prostaglandin E2 synthesis in cartilage explants under compression: mPGES-1 is a mechanosensitive gene.** *Arthritis research & therapy* 2006, **8**(4):R135.
24. Berenbaum F, Humbert L, Bereziat G, Thirion S: **Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A2 via ATP in articular chondrocytes.** *J Biol Chem* 2003, **278**(16):13680-13687.
25. (2012) RdCT: **R: A language and environment for statistical computing.** In: R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2012.
26. Anders S, Huber W: **Differential expression analysis for sequence count data.** *Genome Biol* 2010, **11**(10):R106.
27. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I: **Controlling the false discovery rate in behavior genetics research.** *Behav Brain Res* 2001, **125**(1-2):279-284.
28. Vejnar CE, Blum M, Zdobnov EM: **miRmap web: comprehensive microRNA target prediction online.** *Nucleic Acids Res* 2013.
29. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD: **Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system.** *Nat Protoc* 2013, **8**(8):1551-1566.
30. Gosset M, Berenbaum F, Levy A, Pigenet A: **Mechanical Stress And Prostaglandin E 2 Synthesis In Cartilage.** *Biorheology* 2008, **45**:301-320.
31. Sun J, Zhong N, Li Q, Min Z, Zhao W, Sun Q, Tian L, Yu H, Shi Q, Zhang F *et*

- al: Micrnas Of Rat Articular Cartilage At Different Developmental Stages Identified By Solexa Sequencing. Osteoarthritis and cartilage* 2011, **19**:1237-1245.
32. Henson FM, Davies ME, Jeffcott LB: **Equine dyschondroplasia (osteochondrosis)--histological findings and type VI collagen localization.** *Vet J* 1997, **154**(1):53-62.
  33. Ytrehus B, Carlson CS, Ekman S: **Etiology and pathogenesis of osteochondrosis.** *Vet Pathol* 2007, **44**(4):429-448.
  34. Carlson CS, Cullins LD, Meuten DJ: **Osteochondrosis of the articular-epiphyseal cartilage complex in young horses: evidence for a defect in cartilage canal blood supply.** *Vet Pathol* 1995, **32**(6):641-647.
  35. Ytrehus B, Andreas Haga H, Mellum CN, Mathisen L, Carlson CS, Ekman S, Teige J, Reinholt FP: **Experimental ischemia of porcine growth cartilage produces lesions of osteochondrosis.** *J Orthop Res* 2004, **22**(6):1201-1209.
  36. Olstad K, Ytrehus B, Ekman S, Carlson CS, Dolvik NI: **Early lesions of articular osteochondrosis in the distal femur of foals.** *Vet Pathol* 2011, **48**(6):1165-1175.
  37. C D, J R, A V, C M, M D, M Z, L LM, L W, O L, C J *et al*: **Proteomics provides new insights into the molecular physiopathology of Equine Osteochondrosis.** In. Submitted in PlosOne; 2013.
  38. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ: **Cartilage in normal and osteoarthritis conditions.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008, **22**(2):351-384.
  39. Gibson G, Asahara H: **microRNAs and cartilage.** *J Orthop Res* 2013.
  40. Matsumoto H, DeBolt K, Shapiro IM: **Adenine, guanine, and inosine nucleotides of chick growth cartilage: relationship between energy status and the mineralization process.** *J Bone Miner Res* 1988, **3**(3):347-352.
  41. Shapiro IM, DeBolt K, Hatori M, Iwamoto M, Pacifici M: **Retinoic acid induces a shift in the energetic state of hypertrophic chondrocytes.** *J Bone Miner Res* 1994, **9**(8):1229-1237.
  42. Rajpurohit R, Mansfield K, Gao X, Shapiro IM: **Creatine Kinase Activity And Cartilage Energy Metabolism : Creatine Kinase-Creatine Phosphate Circuit Activity And Macromolecule Synthesis.** *Cells and Materials* 1998, **8**:73-82.
  43. Woods A, Wang G, Beier F: **Regulation Of Chondrocyte Differentiation By The Actin Cytoskeleton And Adhesive Interactions.** *Journal of cellular physiology* 2007, **213**:1-8 ST - Regulation of chondrocyte differentio.
  44. Ekman S, Heinegard D, Johnell O, Rodriguez-Martinez H: **Immunohistochemical localization of proteoglycans and non-collagenous matrix proteins in normal and osteochondrotic porcine articular-epiphyseal cartilage complex.** *Matrix* 1990, **10**(6):402-411.
  45. van de Lest CH, Brama PA, van El B, DeGroot J, van Weeren PR: **Extracellular matrix changes in early osteochondrotic defects in foals: a key role for collagen?** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1690**(1):54-62.
  46. Lecocq M, Girard CA, Fogarty U, Beauchamp G, Richard H, Laverty S: **Cartilage matrix changes in the developing epiphysis: early events on the pathway to equine osteochondrosis?** *Equine Vet J* 2008, **40**(5):442-454.
  47. Rousselle AV, Heymann D: **Osteoclastic acidification pathways during bone resorption.** *Bone* 2002, **30**(4):533-540.
  48. Orriss IR, Knight GE, Ranasinghe S, Burnstock G, Arnett TR: **Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation.** *Bone* 2006, **39**(2):300-309.
  49. Coxon FP, Taylor A: **Vesicular trafficking in osteoclasts.** *Semin Cell Dev Biol* 2008, **19**(5):424-433.
  50. Ackert-Bicknell CL: **HDL cholesterol and bone mineral density: is there a genetic link?** *Bone* 2012, **50**(2):525-533.
  51. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, Lian JB, Stein GS: **A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(37):13906-13911.
  52. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM: **miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop.** *J Biol Chem* 2010, **285**(33):25221-25231.
  53. Hesse E, Kiviranta R, Wu M, Saito H, Yamana K, Correa D, Atfi A, Baron R: **Zinc finger protein 521, a new player in bone formation.** *Ann N Y Acad Sci* 2010, **1192**:32-37.
  54. Shah R, Alvarez M, Jones DR, Torrungruang K, Watt AJ, Selvamurugan N, Partridge NC, Quinn CO, Pavalko FM, Rhodes SJ *et al*: **Nmp4/CIZ regulation of**

- matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) response to parathyroid hormone in osteoblasts.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, **287**(2):E289-296.
55. Mahjoub M, Berenbaum F, Houard X:  
**Why subchondral bone in**

**osteoarthritis? The importance of the cartilage bone interface in osteoarthritis.** *Osteoporos Int* 2012, **23** Suppl 8:S841-846.

## Differential expression analysis between cartilage from healthy and OC horse

miR	chromo	start	stop	bm_sain	bm_oste	FC OCvsS	padj_sain_oste
eca-mir-126-5p	25	37315408	37315429	32590	10680	-3.052	0.02009
eca-mir-135a-5p	16	35417147	35417169	113.6	17.5	-6.491	0.04917
eca-mir-451	11	42750443	42750463	56100	21350	-2.627	0.01328
eca-mir-486-3p	27	3709572	3709593	2571	570.4	-4.507	0.007032
eca-mir-486-5p	27	3709612	3709633	2523	551	-4.58	0.006468
new-eca-mir-004	1	3098488	3098509	135.9	26.38	-5.151	0.008021
new-eca-mir-014	1	21386891	21386911	43.21	4.472	-9.663	0.001333
new-eca-mir-042	1	89070552	89070573	1070	247.8	-4.319	0.008021
new-eca-mir-045	1	89071482	89071504	58630	14290	-4.103	1.684E-10
new-eca-mir-046	1	89071619	89071636	1358	218.9	-6.202	0.0002525
new-eca-mir-047	1	89075574	89075594	1179	97.68	-12.07	0.000004554
new-eca-mir-076	1	168005587	168005608	869.7	126.3	-6.886	0.0003482
new-eca-mir-082	1	183353826	183353847	151.5	25.11	-6.033	0.002115
new-eca-mir-1005	Un0288	25983	26012	1947	255	-7.636	0.0000874
new-eca-mir-1006	Un0288	26130	26155	2226	363.1	-6.13	0.0002377
new-eca-mir-1008	Un0288	26476	26505	1403	205	-6.846	0.0003858
new-eca-mir-1012	Un0288	51311	51329	8656	1966	-4.404	0.0006506
new-eca-mir-1014	Un0592	22826	22843	3660	732	-4.999	0.0008276
new-eca-mir-1015	Un0592	22879	22899	5039	647.3	-7.785	0.000004554
new-eca-mir-1017	Un0592	25614	25631	5649	919.4	-6.144	0.00003539
new-eca-mir-1020	Un0592	28505	28534	686.5	100.9	-6.804	0.0003482
new-eca-mir-1025	Un4614	6010	6037	1208	102.1	-11.84	0.000004554
new-eca-mir-160	3	36526241	36526263	50.51	1144	22.65518804	0.000002619
new-eca-mir-186	3	115113856	115113875	206	33.95	-6.067	0.005358
new-eca-mir-203	4	21397925	21397942	306.3	9.951	-30.79	3.406E-08
new-eca-mir-224	4	101065132	101065153	801.1	135.2	-5.927	0.0008276
new-eca-mir-232	5	12310862	12310884	23.53	259.9	11.04484206	0.001071
new-eca-mir-248	5	64748183	64748204	111.4	19.76	-5.638	0.006153
new-eca-mir-329	7	73936648	73936669	50.3	4.07	-12.36	0.0008276
new-eca-mir-354	8	18348058	18348075	285	56.44	-5.05	0.006468
new-eca-mir-373	8	37924579	37924596	138.9	12.21	-11.37	0.0002528
new-eca-mir-435	10	19316946	19316966	480.7	59.83	-8.034	0.0003482
new-eca-mir-442	10	26933838	26933859	104	2.014	-51.65	9.746E-07
new-eca-mir-461	10	78213116	78213135	38.22	0.6463	-59.13	0.000004469
new-eca-mir-464	11	3854302	3854319	48.43	5.205	-9.305	0.001539
new-eca-mir-497	11	38138712	38138733	60.19	7.788	-7.728	0.004646
new-eca-mir-532	13	949443	949462	81.84	7.73	-10.59	0.002176
new-eca-mir-696	17	79498553	79498575	182.8	35.96	-5.082	0.0463
new-eca-mir-754	20	13072297	13072315	410	71.85	-5.707	0.001539
new-eca-mir-768	20	42497121	42497143	271.8	2183	8.032128514	0.001683
new-eca-mir-789	21	35132605	35132624	89.66	7.119	-12.6	0.0008329
new-eca-mir-810	22	21498563	21498581	114.8	16.39	-7.009	0.001258
new-eca-mir-832	23	14556185	14556202	141.1	22.81	-6.185	0.002218
new-eca-mir-863	24	20539775	20539792	15.2	0.7458	-20.39	0.0009704
new-eca-mir-876	24	42656164	42656185	29.99	3.906	-7.677	0.005116
new-eca-mir-886	25	3952527	3952548	206.3	40.1	-5.145	0.005116
new-eca-mir-902	25	37257297	37257319	24.16	4.197	-5.757	0.02009
new-eca-mir-903	25	37755239	37755257	187	13.99	-13.37	0.00003539
new-eca-mir-955	29	10282153	10282174	220.6	42.7	-5.167	0.004433

Supplementary data - Cartilage - 2

**Differential analysis between cartilage from healthy and OC horse subjected to experimental loading**

miR	chromo	start	stop	bm_saco	bm_osco	FC OCvsS	padj_saco_osco
<b>eca-mir-874-3p</b>	14	38723842	38723863	1.907	17.26	9.049773756	0.02768
new-eca-mir-082	1	183353826	183353847	2204	62.16	-35.46	0.002935
new-eca-mir-1010	Un0288	50176	50196	19580	101300	5.173305742	0.003967
new-eca-mir-160	3	36526241	36526263	3925	41.01	-95.71	0.000005703
new-eca-mir-232	5	12310862	12310884	884	25.4	-34.8	0.0006237
new-eca-mir-286	6	66135451	66135473	197.9	4.765	-41.52	0.00002904
new-eca-mir-461	10	78213116	78213135	13.53	311.1	22.99908004	0.000004452
new-eca-mir-502	11	43023078	43023099	9.85	85.47	8.680555556	0.002935
new-eca-mir-569	14	6614083	6614104	1.099	186.1	169.2906721	2.037E-11
new-eca-mir-685	17	31883097	31883118	0.6733	169.5	251.8257366	1.789E-11
new-eca-mir-696	17	79498553	79498575	2109	24.79	-85.05	0.0002404
new-eca-mir-768	20	42497121	42497143	3308	142.3	-23.26	0.001848
new-eca-mir-886	25	3952527	3952548	2479	76.25	-32.51	0.003565
new-eca-mir-895	25	33142723	33142744	0	133.6		6.895E-12
new-eca-mir-997	Un0104	100244	100263	16.09	104.5	6.497725796	0.001968

Supplementary data - Cartilage - 3

**Differential analysis between healthy cartilage subjected or not to experimental loading**

miR	chromo	start	stop	bm_sanc	bm_saco	FC Sl s Sul	padj_sanc_saco
eca-mir-17-3p	17	61792455	61792474	10.5	53.88	5.130836326	0.02266
eca-mir-874-3p	14	38723842	38723863	15.76	1.907	-8.262	0.03783
new-eca-mir-051	1	92559515	92559533	79.06	691.5	8.748906387	0.007824
new-eca-mir-080	1	174891028	174891048	71.56	718.3	10.03713741	0.005042
new-eca-mir-1010	Un0288	50176	50196	59380	19580	-3.033	0.03401
new-eca-mir-1015	Un0592	22879	22899	13510	2852	-4.735	0.02439
new-eca-mir-1057	X	84619107	84619127	33.93	367.5	10.83188908	0.007824
new-eca-mir-160	3	36526241	36526263	507.5	3925	7.733952049	0.00001934
new-eca-mir-232	5	12310862	12310884	200.7	884	4.403346543	0.007824
new-eca-mir-252	5	73352587	73352609	76.6	1672	21.82453077	0.000001145
new-eca-mir-286	6	66135451	66135473	11.21	197.9	17.64602082	0.000001145
new-eca-mir-571	14	8530604	8530624	34.9	369.7	10.59322034	0.007824
new-eca-mir-627	15	69016587	69016604	168.2	15.46	-10.88	0.0003342
new-eca-mir-677	16	86468965	86468985	59.79	427.8	7.153075823	0.04129
new-eca-mir-696	17	79498553	79498575	24.48	2109	86.13264427	8.381E-13
new-eca-mir-803	22	11253995	11254017	437.3	30.13	-14.52	0.00002169
new-eca-mir-853	24	3018990	3019012	22.23	2.435	-9.127	0.007824
new-eca-mir-876	24	42656164	42656185	130.2	1544	11.85817621	0.0003342
new-eca-mir-881	24	44029428	44029446	318.8	57.1	-5.582	0.007824



## Differential analysis between bone from healthy and OC horses

miR	chromo	start	stop	bm_sain	bm_oste	FC OCvsS	padj_sain_oste
eca-mir-1249	28	41193671	41193692	341.6	26390	77.2797527	3.819E-14
eca-mir-18a-3p	17	61792597	61792617	29.3	728.3	24.85707184	0.000006595
eca-mir-197	5	58536560	58536580	1185	16570	13.98405817	0.000002593
eca-mir-296-5p	22	45210494	45210514	14.11	321.9	22.81542323	0.000008565
eca-mir-423-3p	11	43782481	43782501	989.9	9373	9.46969697	0.0002748
eca-mir-486-3p	27	3709572	3709593	3076	161500	52.5210084	4.441E-15
eca-mir-486-5p	27	3709612	3709633	3039	159600	52.54860746	4.441E-15
eca-mir-92a-3p	17	61793159	61793180	5393	38230	7.087172218	0.0003794
new-eca-mir-045	1	89071482	89071504	4765	33800	7.092198582	0.00005753
new-eca-mir-082	1	183353826	183353847	11.12	72.22	6.493506494	0.02577
new-eca-mir-1001	Un0231	19430	19452	18.84	560.6	29.75304969	0.000002165
new-eca-mir-108	2	34252432	34252453	3.43	382.5	111.5075825	5.297E-10
new-eca-mir-234	5	19811593	19811614	4.347	489.3	112.561909	4.149E-10
new-eca-mir-240	5	36050302	36050323	56.42	660.8	11.71234481	0.001092
new-eca-mir-261	6	7729190	7729211	4.271	262.6	61.50061501	1.715E-08
new-eca-mir-263	6	8764901	8764922	6.698	376.9	56.27462015	2.712E-08
new-eca-mir-264	6	8776083	8776104	2.341	620.6	265.1816494	3.988E-12
new-eca-mir-272	6	26400255	26400275	30.55	1278	41.82350481	1.523E-07
new-eca-mir-305	7	3938895	3938916	37.48	408.2	10.88968747	0.001373
new-eca-mir-328	7	68862641	68862661	19.33	390.9	20.22244692	0.00002378
new-eca-mir-371	8	34925708	34925728	4.11	243.1	59.17159763	1.87E-08
new-eca-mir-383	8	72965185	72965206	2.891	239.5	82.85004143	4.473E-09
new-eca-mir-389	8	93730141	93730162	4.843	214.6	44.30660168	1.411E-07
new-eca-mir-401	9	42574057	42574079	7.421	61.65	8.305647841	0.01079
new-eca-mir-458	10	74826758	74826780	13.17	884	67.11409396	8.988E-09
new-eca-mir-496	11	37825741	37825763	7.195	573.9	79.74481659	2.515E-09
new-eca-mir-497	11	38138712	38138733	100.9	9116	90.4159132	2.513E-12
new-eca-mir-501	11	42750709	42750730	8.855	1479	167.0285619	1.646E-11
new-eca-mir-506	11	50629908	50629929	2.708	185.8	68.58710562	1.715E-08
new-eca-mir-518	12	9881931	9881953	13.7	824.6	60.20469597	1.715E-08
new-eca-mir-594	14	52696145	52696166	47.35	7406	156.3966218	8.259E-14
new-eca-mir-599	14	88625938	88625957	108	2725	25.22704339	0.000002291
new-eca-mir-614	15	28595704	28595725	21.18	319.1	15.06250941	0.0001512
new-eca-mir-619	15	36960661	36960682	6.289	600.8	95.51098376	9.524E-10
new-eca-mir-649	16	9030453	9030474	5.35	291.9	54.5553737	2.712E-08
new-eca-mir-836	23	26410083	26410100	328.6	28.42	-11.56	0.02577
new-eca-mir-851	24	2816520	2816540	1.812	320	176.584849	6.672E-11
new-eca-mir-852	24	2991388	2991409	8.899	802.9	90.25270758	1.38E-09
new-eca-mir-858	24	11302625	11302644	110.3	2727	24.72187886	0.000002482
new-eca-mir-955	29	10282153	10282174	15.06	87.11	5.783689994	0.03097
new-eca-mir-978	31	3182277	3182297	4.013	246.5	61.42506143	1.728E-08

## Supplementary data - Bone -2

## Differential analysis between bone from healthy and OC horses subjected to experimental loading

miR	chromo	start	stop	bm_saco	bm_osco	FC OCl vsSl	padj_saco_osco
<b>eca-mir-1-3p</b>	22	48433554	48433575	337.3	2772	8.21692687	0.0001503
<b>eca-mir-2887</b>	Un0288	226302	226326	981.6	132.1	-7.43	0.03392
new-eca-mir-019	1	32153087	32153109	47.02	376.1	8	0.005448
new-eca-mir-036	1	77327884	77327905	48.95	314.7	6.43086817	0.004668
new-eca-mir-042	1	89070552	89070573	1811	6381	3.52360817	0.04029
new-eca-mir-045	1	89071482	89071504	468600	120500	-3.889	0.01511
new-eca-mir-051	1	92559515	92559533	55.47	312.8	5.64015792	0.03392
new-eca-mir-080	1	174891028	174891048	18.56	332	17.8890877	0.00006901
new-eca-mir-082	1	183353826	183353847	84.1	3942	46.8603561	1.973E-13
new-eca-mir-163	3	40469401	40469422	62.73	431.3	6.87285223	0.01363
new-eca-mir-286	6	66135451	66135473	1.59	113.9	71.6332378	2.359E-08
new-eca-mir-335	7	82117441	82117459	125.1	821.7	6.57030223	0.006845
new-eca-mir-401	9	42574057	42574079	5.041	210.1	41.684035	0.000002301
new-eca-mir-502	11	43023078	43023099	1.762	283.6	160.901046	7.617E-10
new-eca-mir-627	15	69016587	69016604	12.75	201.5	15.805279	0.000006251
new-eca-mir-677	16	86468965	86468985	12.46	74.28	5.95947557	0.04793
new-eca-mir-685	17	31883097	31883118	159.7	2.124	-75.2	0.000007886
new-eca-mir-839	23	37804435	37804453	1934	204.8	-9.443	0.02761
new-eca-mir-863	24	20539775	20539792	37.54	284.1	7.56429652	0.01058
new-eca-mir-870	24	33798979	33799001	54.18	1012	18.6706497	0.000003709
new-eca-mir-875	24	40681566	40681583	79.25	418.3	5.27704485	0.01681
new-eca-mir-876	24	42656164	42656185	108.6	945.5	8.70322019	0.001229
new-eca-mir-881	24	44029428	44029446	50.06	475.8	9.50570342	0.0007932
new-eca-mir-886	25	3952527	3952548	103.8	5540	53.361793	3.467E-15
new-eca-mir-931	27	29637635	29637652	2.985	265.4	88.8888889	1.086E-08
new-eca-mir-951	29	8421150	8421168	12.4	67.66	5.45553737	0.02138
new-eca-mir-955	29	10282153	10282174	123.3	6442	52.246604	2.56E-15
new-eca-mir-997	Un0104	100244	100263	13.87	367.4	26.4900662	0.000007135

## Supplementary data - Bone -3

## Differential analysis between healthy bone subjected ro not to experimental loading

miR	chromo	start	stop	bm_sanc	bm_saco	FC Sl vs Sul	padj_sanc_saco
<b>eca-mir-206-3p</b>	20	49820638	49820659	0.8234	15.68	19.0367409	0.00804
<b>eca-mir-424-3p</b>	X	106954979	106954999	2.058	23.99	11.6550117	0.0125
new-eca-mir-042	1	89070552	89070573	8140	1811	-4.495	0.001322
new-eca-mir-076	1	168005587	168005608	3959	954.7	-4.146	0.009799
new-eca-mir-262	6	7784304	7784325	1.763	32.27	18.2982617	0.005914
new-eca-mir-329	7	73936648	73936669	438.4	48.53	-9.034	0.003181
new-eca-mir-502	11	43023078	43023099	18.76	1.762	-10.64	0.02419
new-eca-mir-627	15	69016587	69016604	708.5	12.75	-55.59	3.927E-10
new-eca-mir-636	15	87953448	87953465	904.5	187	-4.836	0.009653
new-eca-mir-685	17	31883097	31883118	0.376	159.7	424.808836	7.21E-08
new-eca-mir-699	18	3355044	3355065	71.13	657.8	9.2506938	0.004763
new-eca-mir-789	21	35132605	35132624	125.3	889.6	7.10227273	0.01925
new-eca-mir-803	22	11253995	11254017	67.98	1.529	-44.47	0.00000306
new-eca-mir-836	23	26410083	26410100	8.81	71.23	8.08407437	0.0316
new-eca-mir-839	23	37804435	37804453	116.4	1934	16.6168162	0.00002577
new-eca-mir-853	24	3018990	3019012	171.4	32.84	-5.219	0.03406
new-eca-mir-863	24	20539775	20539792	376.5	37.54	-10.03	0.001322
new-eca-mir-875	24	40681566	40681583	795.4	79.25	-10.04	0.0001271
new-eca-mir-881	24	44029428	44029446	393.7	50.06	-7.865	0.003375
new-eca-mir-895	25	33142723	33142744	0	13.12		0.004763
new-eca-mir-951	29	8421150	8421168	323.6	12.4	-26.1	0.000002405

#### 4.4. Tentative de validation interraciale des hypothèses biologiques émises par nos études intégratives.

Afin de vérifier si les mécanismes moléculaires dont nous suspicions l'implication en race Anglo Arabe étaient également impliqués en race Trotteur Français (TF), nous avons prélevé des échantillons de lésion et de cartilage non lésé de poulains TF atteints d'OC.

Grace à une collaboration avec les Dr JM Betsch, nous avons eu accès à deux poulains âgés de 6 mois présentant des lésions d'OCD dans le relief intermédiaire du tibia. Nous avons également pu prélever des échantillons sur deux poulains sains du même âge destinés à l'abattoir.

Macroscopiquement, les poulains atteints présentaient un fragment ostéochondral partiellement détaché de l'os sous-chondral. L'analyse histologique de ces lésions a permis de mettre en évidence une zone de fracture entre l'os sous-chondral et le cartilage articulaire. Un tissu cicatriciel (fibrocartilage) a pu être observé de part et d'autre de la fracture. Le fragment ostéochondral présentait du cartilage une zone minéralisée centrale, laissant à penser qu'un centre d'ossification s'est mis en place.

Nous avons également étudié la structure du cartilage ainsi que l'organisation et l'ultra-structure des chondrocytes ont été étudiés par microscopie électronique à transmission (MET) dans les lésions et dans du cartilage articulaire de chevaux sains. Nous avons pu observer, localement, une organisation anormale des fibres de collagènes de matrice, orientées perpendiculairement à la surface articulaire. Aucune différence majeure n'a été observée entre les chondrocytes des zones de réserve et proliférative des poulains sains et atteints. En revanche, les chondrocytes hypertrophiques des individus atteints présentaient des caractéristiques anormales et notamment des mitochondries grosses et vides, un reticulum endoplasmique (RE) dilaté ainsi qu'une quantité réduite de glycogène. Nous avons également comparé par MET des échantillons de cartilage non lésé de chevaux atteints et de chevaux sains. De façon surprenante, nous avons également observé un RE dilaté et des mitochondries anormales dans les chondrocytes hypertrophiques des individus atteints. De plus, au niveau du front d'ossification, des zones anormalement minéralisée ont été observées. Ces observations suggèrent donc que les chevaux atteints d'OC présentent un défaut constitutif du cartilage, associé à un stress du RE et un métabolisme énergétique perturbé conduisant à la synthèse d'une matrice anormale et une minéralisation anormale.

Des échantillons d'os et de cartilage ont également été prélevés sur les trochlées fémorales de ces chevaux afin d'entreprendre une analyse protéomique comparée et de mettre en évidence les voies moléculaires perturbées chez les chevaux atteints. Pour cela, nous avons bénéficié de l'installation d'un nouveau spectromètre de masse sur la plateforme PAPPSO, ce qui nous a permis de réaliser une analyse protéomique shot-gun. Une centaine de protéines exprimées différenciellement entre le cartilage et l'os de chevaux sains et atteints ont été mise en évidence. Dans le cartilage, les protéines étaient impliquées dans l'homéostasie et l'adhésion, cellulaire, le métabolisme énergétique, la biosynthèse et le transport des protéines, ce qui est cohérent avec les observations de MET. Dans l'os, les protéines modulées jouaient des rôles dans la biosynthèse et le transport des protéines, l'organisation de la MEC, le métabolisme énergétique et l'angiogénèse.

Les mécanismes moléculaires mis en évidence dans cette étude sont cohérents avec ceux révélés par l'étude intégrative réalisée avec des chevaux Anglo Arabe. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique soumise dans *Experimental and molecular pathology* : **Desjardin et al., Involvement of mitochondrial dysfunction and ER-stress in the physiopathology of equine Osteochondritis dissecans (OCD)**

## **Involvement of mitochondrial dysfunction and ER-stress in the physiopathology of equine Osteochondritis dissecans (OCD)**

*Clémence Desjardin<sup>1</sup>, Sophie Chat<sup>2</sup>, Mailys Gilles<sup>1</sup>, Rachel Legendre<sup>1</sup>, Julie Riviere<sup>1</sup>, Xavier Mata<sup>1</sup>,  
Thierry Balliau<sup>3</sup>, Diane Esquerré<sup>4</sup>, Edmond Cribiu<sup>1</sup>, Jean-Marc Betch<sup>5</sup> and Laurent Schibler<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> INRA, UMR1313, Biologie Intégrative et Génétique Animale, Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup> INRA, UR 1197 Génomique et Physiologie de la Lactation, Jouy-en-Josas, France

<sup>3</sup> INRA, PAPPISO, UMR 0320/UMR8120 Génétique Végétale, Gif-sur-Yvette, France

<sup>4</sup> GET-PlaGe, France

<sup>5</sup> Clinique Equine de Meheudin, Ecouché, France

### Corresponding author:

Dr Laurent Schibler, BIGE, UMR1313 GABI, INRA CRJ, Domaine de Vilvert, Bat 440, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

Email : [laurent.schibler@jouy.inra.fr](mailto:laurent.schibler@jouy.inra.fr)

FAX : +33 1 34 65 24 78

### **Abbreviations:**

OC: Osteochondrosis; OCD: *Osteochondritis dissecans*; ECM: Extra-Cellular Matrix

TEM : transmission electron microscopy

### **Abstract**

Osteochondrosis (OC) is a juvenile developmental disorder affecting several mammalian species including dog, pig, poultry, horse and man. Equine OC has been described as a focal disruption of endochondral ossification, leading to dissecting lesions (osteochondritis dissecans, OCD) or subchondral bone cysts. Sometimes, OCD fragment completely detach, becoming a free body. OCD lesions trigger joint swelling, stiffness and varying degrees of lameness and affect about 30% of the equine population. Thus OC has become a major concern in terms of animal health care and economy. OCD is considered as multifactorial but the physiopathology is still poorly understood and genes and molecular mechanisms involved in genetic predisposition are still unknown.

Our study was designed to identify biological processes associated with OCD susceptibility. We compared two healthy 18-month-old French Trotters and two OC-affected foals diagnosed with OCD lesions at intermediate ridge of the distal tibia. Histology was used firstly to confirm the diagnosis and finely characterize the lesions. A comparative shot-gun proteomic analysis was used to study normal cartilage and sub-chondral bone from healthy (healthy samples) and OC-affected foals (predisposed samples), making it possible to identify modulated proteins in cartilage and subchondral bone. Comparison of cartilage and bone structure and ultrastructure were made for OCD lesions as well as healthy and predisposed samples using Transmission electron microscopy (TEM).

Taken together, our results suggest that OCD lesions result from a defective hypertrophic terminal differentiation associated with mitochondrial dysfunction and ER-stress. These defects lead to an impaired extracellular cartilage matrix (ECM) and mineralization resulting in abnormal cartilage and bone biomechanical properties.

**Keywords:** Equine Osteochondrosis, TEM, proteomic shotgun cartilage, cartilage, sub-chondral bone

## INTRODUCTION

Osteochondrosis (OC) is a developmental orthopaedic disorder affecting joints of young individuals from different species including horse, pig, poultry, dog and man. OC has been described as a focal failure of endochondral ossification [1] that causes the cartilage to become irregular in thickness. This condition also often involves the subchondral bone leading to dissecting lesions (*osteochondritis dissecans*, OCD) or subchondral bone cysts. OCD is a relatively common developmental disease, affecting 10 to 30 % of the equine population, depending on breed and joint. Clinical signs develop when the joint surface is breached by the dissecting lesion or when a fragment completely detaches and becomes a free body (joint mouse), leading to joint inflammation, synovitis, varying degrees of lameness and development of arthritis. Thus, OCD has become a major concern in the horse industry in terms of animal health care and economy [2].

A multifactorial origin is commonly accepted, including environmental factors (dietary imbalance and biomechanical factors), physiological factors (growth, conformation and hormonal imbalance) and genetics (low to moderate heritability) [3-8]. OCD pathogeny remains unclear, probably due to the confusion regarding the disease definition and the lack of precise data about mechanisms of primary lesions formation [8]. In this respect, two main hypotheses have been proposed: the vascular and the dyschondroplastic hypotheses. In the first one, a focal interruption of canal blood supply leads to necrotic areas and abnormal ossification [9]. In the second hypothesis, primary lesions result from a local failure of endochondral ossification. Characteristic features of dyschondroplastic lesions include abnormal chondrocyte organization and shape, presence of chondrocyte arrested in the pre-hypertrophic stage, abnormal matrix

mineralization, necrosis areas, increased type VI collagen immunoreactivity and cartilage cores retained in subchondral bone. Taken together, these features suggest a disruption of the endochondral ossification process at the chondro–osseous junction that impair cartilage replacement by bone tissue as the ossification front advances with time [10]. In both hypotheses, shearing biomechanical forces are thought to drive the development of dissecting lesions.

Nevertheless, genes and molecular mechanisms involved in primary lesions are still unknown. Several gene mapping programs have thus been initiated worldwide in different breeds to improve our understanding of the condition and susceptibility factors (for review see [11]). Several quantitative trait loci (QTL) regions have been identified, with poor correspondence between studies probably due to differences in phenotypic definition, breeds and power. Candidate genes were found to be located in each chromosomal region, but no gene and mutations could be formerly identified to date. [12].

The aim of this current study was to investigate the biological pathways involved in the development of OCD lesions from the intermediate ridge of the distal tibia in French Trotters. We first characterized the lesion subtype using histology. A shot-gun proteomic analysis was subsequently used to compare normal cartilage and sub-chondral bone from healthy (healthy samples) and OC affected foals (predisposed samples), in order to test the hypothesis of a constitutive defect. Transmission electron microscopy (TEM) was performed to further characterize the lesion and to validate some hypotheses drawn from the proteomics data by comparing the morphology and ultrastructure of healthy and predisposed epiphyseal cartilage and subchondral bone.

## MATERIALS AND METHODS

### *Sample Collection*

The study was based on four 18 month-old French trotters obtained from two different studs and intended for slaughter. Clinical and a radiographic examination were performed to evaluate their osteoarticular status. During necropsy, all joints were macroscopically examined to confirm radiologic diagnosis. Lesions were cut in a sagittal plane and included 5 mm of sub-chondral bone. When possible, samples from the contro-lateral unaffected joint were collected. For all foals, sections from the femoral trochlea were also cut perpendicularly to the cartilage surface, to include epiphyseal cartilage and about 5 mm of sub-chondral bone. Some of these samples were fixed in 4% PFA for histological studies, whereas the others were flash frozen in liquid nitrogen for subsequent proteomics studies.

### *Histological Analysis*

Samples were fixed for 24-hours in a solution of 4% paraformaldehyde immediately after being collected. After fixation, samples were decalcified in EDTA 10% pH 8.8 solution for one month before being embedded in paraffin and sectioned at 5  $\mu$ m thickness. Sections were stained with Hematoxylin-Eosin-safranin-O (HES) and safranin-O and light green (LGS). Type-VI collagen immunohistochemistry was also performed.

### *Transmission Electron Microscopy (TEM)*

For electron microscopic analysis, tissues were cut, then fixed and decalcified with 2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 0.1M EDTA, in 0.1 M Na pH 7.2 cacodylate buffer for five weeks at 4°C. Samples were postfixed with 1% osmium tetroxide containing 1.5% potassium cyanoferrate, contrasted with uranyl acetate 2% in water, gradually dehydrated in ethanol (30%-100%) and embedded in Epon. For previsualization and selecting regions of interest, 1micron sections were counterstained with methylene blue-Azur II and visualized

using Nanozoomer (Hamamastu). Thin sections (70 nm) of selected zones were collected onto 200 mesh copper grids, and counterstained with lead citrate before examination with Zeiss EM902 electron microscope operated at 80 kVe (MIMA2-UR1196 Génomique et Physiologie de la Lactation, INRA, Plateau de Microscopie Electronique 78352 Jouy-en-Josas, France). Microphotographs were acquired using a charge-coupled device camera MegaView III CCD camera and analysed with ITEM software (Eloïse – SARL – Roissy CDG – France).

### *Shotgun Proteomics*

Protein extraction was performed as previously described [13]. Solubilization was achieved in ZUT buffer and proteins were quantified using the PlusOne 2-D Quant kit (GE Healthcare). After reduction by DTT and alkylation by IAA, proteins were digested by trypsin (2% w/w) overnight (buffer composition in supplementary data). Peptides were purified on solid phase extraction using polymeric C18 column (Phenomenex). After elution (40% acetonitrile) and speedvac drying, peptides were suspended in PSB buffer. Peptides (1  $\mu$ g) were analyzed by LC-MS/MS. A NanoLC-Ultra system (nano2DUltra, Eksigent) was used to separate peptides by nano chromatography on C18 column (15 cm, 75  $\mu$ m i.d., Nanoseparation). Subsequent on-line analysis was performed with a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Electron) using a nanoelectrospray interface (noncoated capillary probe, 10  $\mu$  i.d.; New Objective). Peptide ions were analysed using Xcalibur 2.1 with the following data-dependent acquisition steps: (1) full MS scan on a 400 to 1200 range of mass-to-charge ratio (m/z) with a resolution of 70000) and (2) MS/MS (normalized collision energy: 30%; resolution: 17500). Step 2 was repeated for the 8 major ions detected in step 1. Q Exactive raw files were converted with ProteoWizard 3.0.3706 [14] and uploaded into PROTEOMDB [15]. X!Tandem (2011.12.01.1,[16]) was used to search three

databases: (i) the NCBI Equus Caballus protein database (v20100519, 21331 Entries); (ii) the EBI Ensembl Equus Caballus protein database (v2010-05-19, 22641 Entries) and (iii) a contaminant database (trypsin, keratins). Only the proteins identified with at least two peptides were kept. Protein quantification was performed with MassChroQ software [17].

#### Statistics

Descriptive statistics were done using R scripts and the *ade4* package (v1.5-1). Between-class correspondence analysis (*dudi.bca*) was performed to investigate differences between healthy and predisposed samples. Proteins having inertia above the third quartile and showing at least a two-fold change in abundance were considered as associated with the pathology.

#### Whole Genome Sequencing, Read Mapping and Variant Calling.

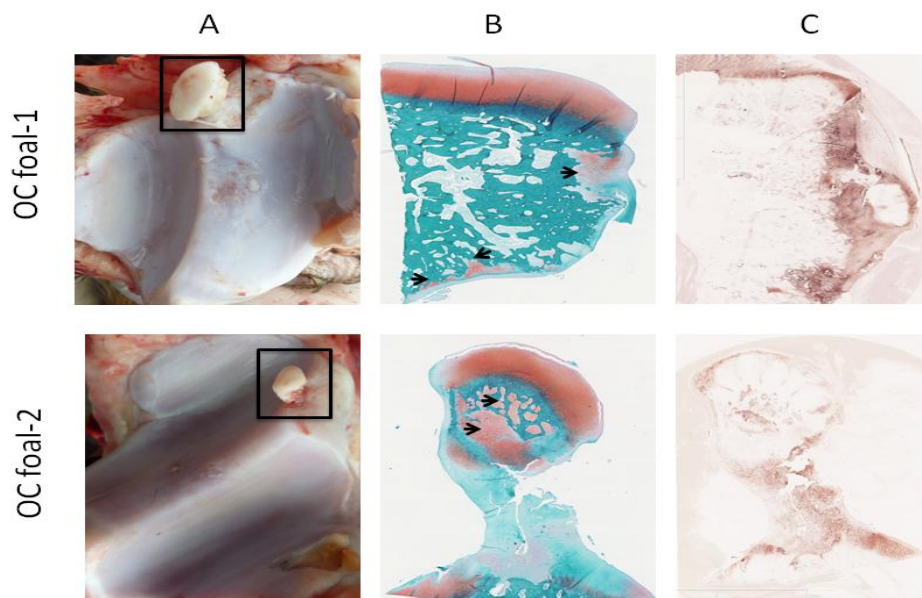
Ten French Trotters horses from our previous QTL mapping project [18] were chosen based on their genotype in order to be representative of allelic diversity at 10 QTL regions. One

paired-end library with a 300-bp insert size was generated for each horse at the Get-PlaGe genomic platform and sequenced on two HiSeq 2000 lanes using the Illumina TruSeq V2 Kit. The 100-bp reads were mapped on the EquCab2 horse sequence assembly using the BWA tool. Reads with a unique mapping and a minimal MAQ quality of 30 were kept. PCR duplicates were filtered and *mpileup* (SAMtools [19]) and Genome Analysis Tool Kit (GATK [20]) were used to call SNPs and small indels. Only variants with a quality score above 400 were kept. Functional consequences of these polymorphisms were predicted using Ensembl Variant Effect Predictor [21].

## RESULTS

### *Morphological and Histological Study of OC Lesions*

The OC-affected foals presented typical OCD lesions on the tibial intermediary relief (malleoli) as shown in figure 1-A. During necropsy, we observed large osteochondral fragments partly separated from the underlying sub-chondral bone. Sub-chondral bone from



**Figure 1: Macroscopic views and histological analysis of OC lesions.** A- Macroscopic observations showed an osteochondral flap partially detached from the underlying subchondral bone (square). B- Light green and safranin coloration revealed less safranin staining (in red) suggesting a modification of proteoglycan content in the articular cartilage. Abnormal retained cartilage cores were also observed in the subchondral bone (arrow). C- Type-VI collagen immunostaining showed a positive staining area which may be indicative of a healing process or scar tissue formation.



affected joints appeared softer than corresponding bone from healthy joints. No difference was observed between healthy and predisposed bone samples.

Histology confirmed the similarities between the lesions, including irregularities on the cartilage surface and modification of cartilage proteoglycan content, revealed by the absence of staining (figure 1-B). Furthermore, abnormal features were also observed in the sub-chondral bone with the presence of retained cartilage cores. Chondrocyte organization was also investigated. Abnormal clusters of chondrocytes were found in the deep zone of the articular cartilage, close to the lesion (data not shown).

Immunohistochemistry was performed to analyze type-VI collagen fibrils, showing abnormal features and localization, with accumulation of staining around the lesion and at the cartilage surface suggesting the presence of scar tissue (figure 1-C).

#### *Ultrastructural Characterization of Chondrocytes and ECM using TEM*

Comparison of articular cartilage samples from the intermediate ridge of the talus (IRT) harvested from healthy foals and cartilage samples harvested in the lesions (figure 2-A). In the superficial tangential zone (STZ) from healthy articular cartilage, chondrocytes were flattened shape with a large nucleus and few organelles. In the middle zone, chondrocytes showed a more rounded shape, the nucleus occupied a half part of the chondrocyte surface and we observed many organelles including numerous mitochondria, well-developed endoplasmic reticulum (ER) surrounded by ribosomes and Golgi. In the deep zone, chondrocytes were oval in shape with large vacuoles, glycogen aggregates, lipid droplets and abundant secretory organelles with an extended RER. ECM analysis showed characteristic patterns of normal collagen fibrils [22].

No differences were observed between STZ and middle zones from OC lesion or healthy

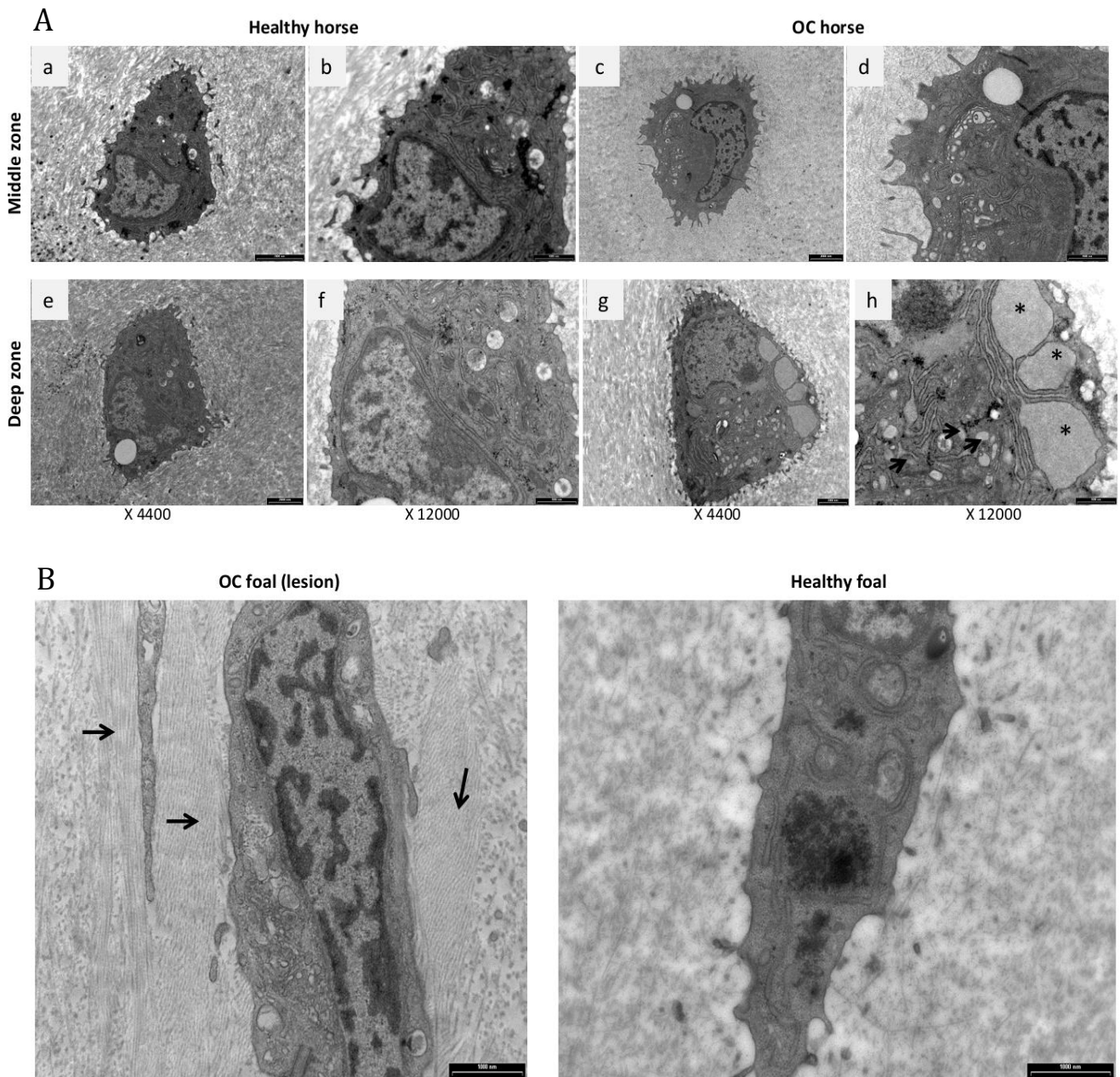
cartilage samples. In contrast, in the deep zone, chondrocytes from OC lesions exhibited a round shape and a large nucleus occupying about 25% of the chondrocyte surface. Mitochondria were abnormally large and appeared empty, whereas the rough ER (RER) was extended and showed abnormal hyper-dilated zones with accumulation of *cisternae*. We also observed numerous vacuoles and few lipid droplets.

In terms of ECM ultrastructure, abnormal fibril organization surrounding chondrocytes in the middle zone of the articular cartilage were observed (figure 2-B).

The same comparison was made for normal and predisposed cartilage samples harvested on the medial femoral trochlea (MFT) of healthy and OC affected horses (figure 3-A). Similar organization and chondrocyte ultrastructure were observed in healthy MFT and IRT cartilage. Interestingly, similar abnormal features were also observed in predisposed samples, including big and empty mitochondria as well as dilated RER in hypertrophic chondrocytes. Fibril organization appeared normal, but abnormal features at the ossification front were observed, with abnormal mineralized areas so called rosette-like (figure 3-B).

#### *Molecular Mechanisms Involved in OCD Physiopathology Revealed by Shotgun Proteomics*

A shotgun proteomics protocol was implemented to analyze cartilage and sub-chondral bone samples, leading to the identification of 684 proteins in cartilage and 883 proteins in bone (supplementary table 1 and 2). On these, 624 and 770 proteins were expressed in all cartilage and bone samples, respectively. In addition, ten were expressed in only one condition in cartilage (six in healthy and four in OC-affected samples) and six in bone (two in healthy and four in OC-affected samples). These proteins belong to virtually all cellular compartments, including the extracellular matrix (collagens and proteoglycans).



**Figure 2: Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis.** **A-** A comparative chondrocyte ultrastructure was performed on both healthy and OC cartilage. We did not observe differences for chondrocytes of the middle zone (a-c and magnifications b-d). In the deep zone (e-f and magnifications g-h), chondrocyte of OC cartilage showed abnormal features with big and empty mitochondria (arrow) as well as dilated ER (\*). **B-** Abnormal ECM organization was observed surrounding chondrocytes in the deep zone of the cartilage of OC-affected foals.

This protocol was used to compare the cartilage and sub-chondral bone proteome of healthy and predisposed samples. We performed a principal component analysis (PCA)-based descriptive statistical analysis (Figure 4). PCA on cartilage resulted in separation of the two groups along the first component (PC1). Greater proteome variability was observed within the predisposed samples. A Between Class Analysis (BCA) was performed to focus on the group effect, showing that 47% of the total inertia could be attributed to between-groups differences. Thus, BCA highlighted 82 proteins differentially expressed between healthy and OC-affected horses (supplementary table 3). In contrast, PCA on bone failed to efficiently discriminate healthy and predisposed samples, suggesting that OCD may be at most related to a minor bone defect. Likewise, BCA explained only 24% of the total inertia and highlighted 52 differentially expressed proteins between healthy and OC horses (supplementary table 4).

For cartilage, 35 proteins were up-regulated and 34 were down-regulated in predisposed samples, including 6 proteins expressed only in healthy foals and 4 in OC-affected foals (supplementary table 3). These proteins are involved in various biological pathways including ECM structure and maintenance, protein biosynthesis, mitochondrion and energy metabolism, protein folding, transport and catabolism (ER, proteasome complex, exocytosis), as well as calcium metabolism, cell adhesion and response to stress (figure 5-A).

For sub-chondral bone, 39 proteins were up-regulated in predisposed samples whereas 15 were down-regulated (supplementary table 4), including 2 proteins expressed only in healthy foals and 4 in OC-affected foals. We highlighted proteins involved in ECM organization, vasculature development, protein biosynthesis, metabolism (cellular catabolic process and lipid metabolic process), as well as cell adhesion, actin and microtubule

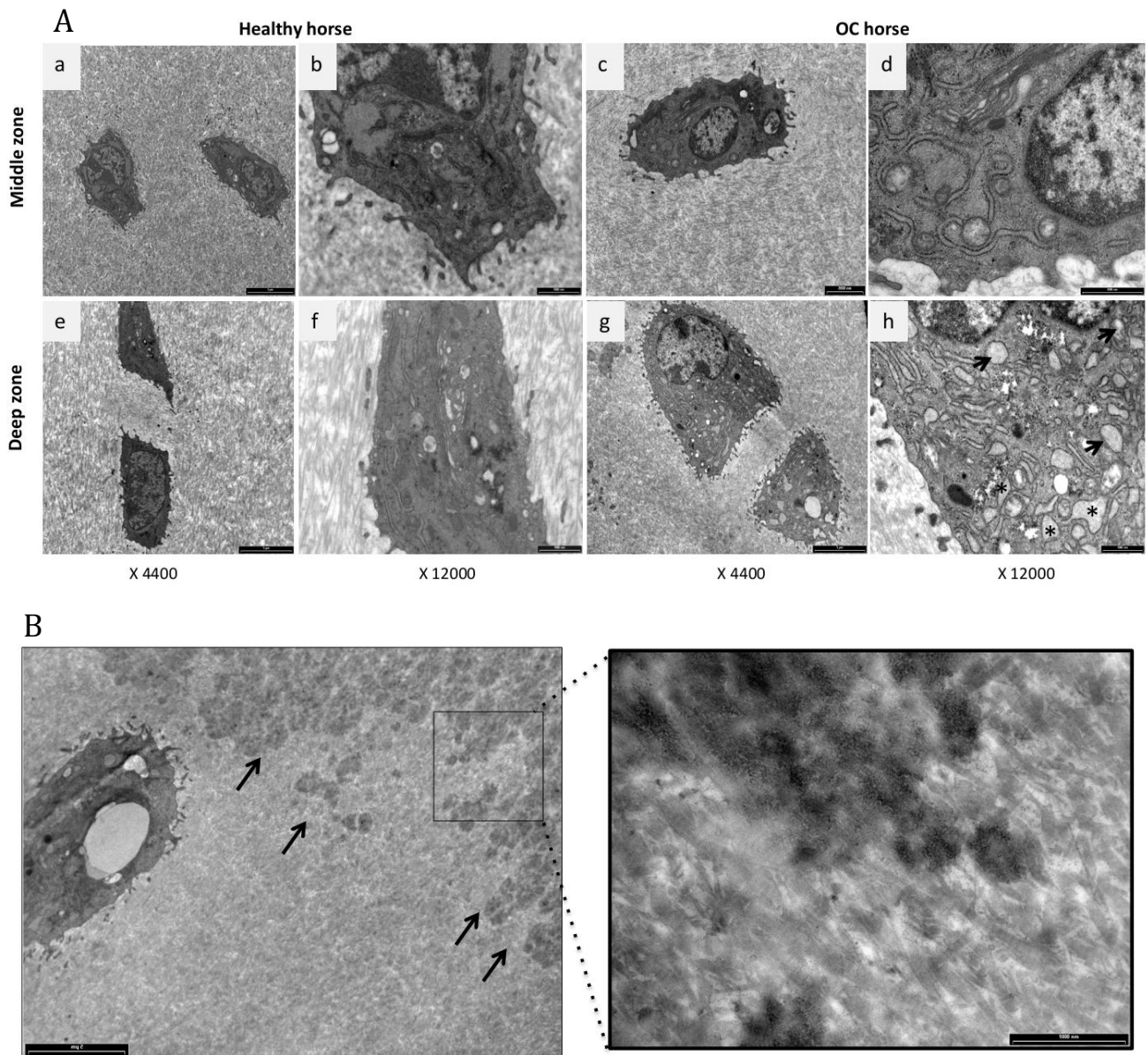
cytoskeleton and vesicle-mediated transport (figure 5-B).

*Using This Knowledge to Search for Candidate Genes and Mutations in QTL Regions.*

Whole genome sequencing (WGS) data from 10 horses (five healthy and five OCD-affected, chosen to be representative of allelic diversity at 10 QTL regions) were generated to identify putative deleterious mutations. About 465 Gb of sequences were generated, 95% being mapped on the horse genome and providing a mean sequence coverage per horse ranging from 12 to 19X (Supplementary S3). About 8 million polymorphisms could be detected, mainly in introns (2 millions) and intergenic regions (5 millions). About 18,000 non synonymous variants were identified, including 221 leading to gain or loss of a Stop codon. In addition 5600 variants were found to be located in promoters (Supplementary S3).

In a first attempt to prioritize candidate mutations, we focused on genes affected by damaging mutations (Stop, Frameshift, Splice site). Gene ontology (GO) terms associated with our proteomics dataset were used to filter candidate genes based on their GO annotations. This leads to a list of 783 candidate mutations affecting 351 genes (Supplementary S4). Interestingly, two of these genes appeared to be modulated in our cartilage proteomic data (DSP and PSMA1) and two in our bone proteomic data (CFH and CRP).

Then, a search for candidates was performed in published QTL regions associated with OCD in several breeds (Supplementary S5). Assuming a 4 Mb QTL interval, 172 deleterious mutations affecting 66 positional and functional candidate genes could be identified within these QTL regions (Supplementary S6). None of these was identified in our proteomic study, but AZGP1 was shown to be up-regulated in our previous study on Anglo Arabian foals [23].



**Figure 3: Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis.** **A-** Comparative chondrocyte ultrastructure was performed for healthy cartilage and predisposed cartilage sampled on the medial femoral trochlea (MFT). No ultrastructural differences were observed for chondrocytes of the middle zone (a-c and magnifications b-d). In the deep zone (e-f and magnifications g-h), chondrocytes of OC cartilage showed abnormal features with big and empty mitochondria (arrow) as well as dilated ER (\*) suggesting constitutive defects of cartilage in OC-affected foals. **B-** Rosette-like clusters (arrow) were observed at the ossification front in predisposed cartilage reflecting a disrupted mineralization.

## DISCUSSION

### *Shotgun Proteomics as a Powerful Approach to the Study of Bone and Cartilage.*

Proteomics has become a powerful tool for unraveling physiopathological mechanisms. However, proteomic analyses of cartilage and, to a lesser extent, of bone have long been impaired because of technical challenges related to their structure and biochemical properties. We recently described an efficient method based on phenol protein extraction, 2-DE and subsequent LC-MS/MS to analyze bone and cartilage proteomes [13]. Here, we used a shotgun proteomics approach to overcome the limits encountered with 2-DE analysis, especially the loss of high molecular mass proteins such as proteoglycans. To our knowledge, only a few shotgun proteomic studies have been conducted so far for cartilage [24, 25] or bone [26]. Our results demonstrate the efficiency of this new technique for the analysis of equine cartilage and bone explants. Proteins from all cellular compartments could be recovered, including ECM proteoglycans, suggesting superiority over the 2-DE/LC-MS/MS method in obtaining a comprehensive view of cartilage and bone proteomes.

### *Mitochondrial Dysfunction and ER-Stress in Hypertrophic Chondrocytes Appears as Striking Features of OCD Physiopathology and Susceptibility.*

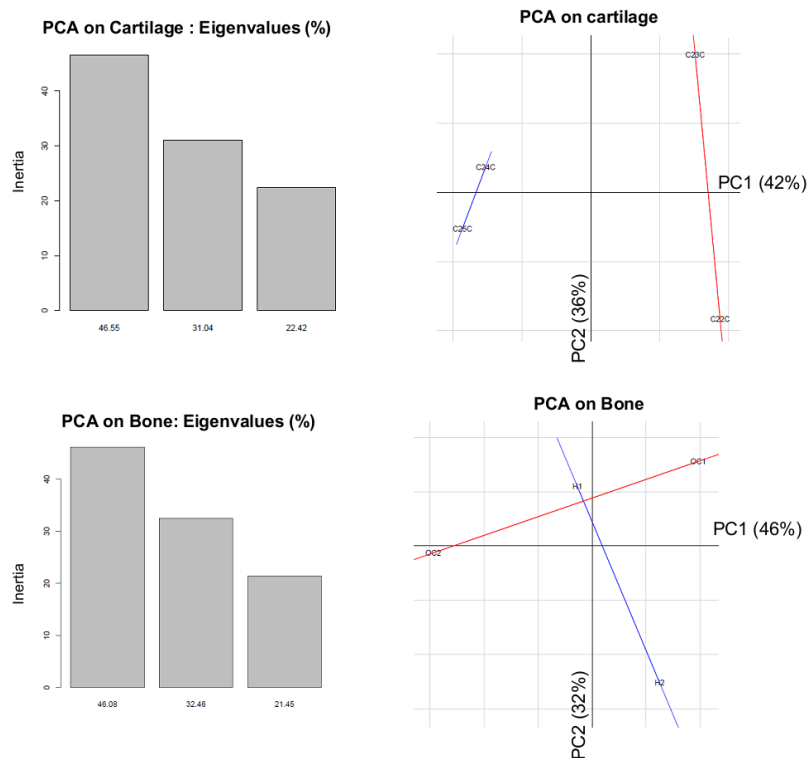
Despite numerous studies performed in the last decade, OC physiopathology remains an enigma. There is clearly a need for an improved definition of OC nosological entities and a better understanding of molecular mechanisms associated with genetic susceptibility. For example, the lack of correlation between different joints [27] as well as the lack of common QTLs for OC on fetlock and hock [18] suggest that different genes and mechanisms could be responsible for OC susceptibility, depending on the joint. Likewise, the poor correspondence between

genome-wide association studies (GWAS) performed on different breeds also suggests there may be some breed specificity. Our study was therefore designed to improve the morphological characterization of OCD lesions located on the intermediate ridge of the distal tibia, the most common reported location of tibiotarsal OCD [28] in the French Trotter, and to identify biological pathways involved in OC susceptibility.

Classical morphological and histological OCD features were observed in our samples. In addition, lesion ultrastructure analysis showed abnormal features including large and empty mitochondria, numerous vacuoles as well as dilated RER in hypertrophic chondrocytes. These findings suggest that mitochondrial dysfunction and ER stress may be involved in OCD molecular physiopathology, in good agreement with a study performed in humans [29].

Our TEM observations revealed not only abnormal mitochondria and dilated RER in OCD lesions but also in healthy cartilage of OC-affected foals (predisposed cartilage), suggesting that the dysfunction of mitochondria and ER stress may be a constitutive defect due to genetic predisposition. Several proteins known to be involved in mitochondrial function were down-regulated in predisposed cartilage. For example, ATP5C1 and ETFA are involved in electron transport, LGALS3, AK4, HEBP2, SSBP1, CYB5A in energy production and PRDX5 in oxidative stress (Supplementary Table 2). Energy production plays a crucial role in chondrocyte differentiation and homeostasis [30] and mitochondrial dysfunction has been proposed to play a key role in OA physiopathology by affecting pathways involved in ECM catabolism and calcification, protein biosynthesis, chondrocyte apoptosis and cytokine-induced inflammation [31]. These findings are also in good agreement with our previous study performed on Anglo Arabian horses showing that a defective energetic process appeared to be one

**Figure 4: Descriptive statistics for cartilage and bone.** PCA-based descriptive statistical analysis was performed on normalized protein expression levels (n=624 and n= 770 reproducible proteins in cartilage and bone respectively). PCA on cartilage showed a good separation of the two groups along the first component (PC1). Greater proteome variability was observed within the predisposed samples. PCA on bone failed to efficiently discriminate healthy and predisposed samples, suggesting that OCD may be at most related to a minor bone defect.



of the major features of predisposed cartilage [32]. Interestingly, proteins involved in energy production, mitochondrial membrane organization and free radical detoxification were previously identified using proteomics as differentially expressed in human healthy and OA cartilage samples [33].

Furthermore, our proteomics data are indicative of a constitutive defect in ER-associated degradation (ERAD) machinery, which is essential for damaged or misfolded proteins to be degraded by ubiquitin and proteasome-dependent processes during ER-stress. Indeed, we observed a down-regulation of PSMA, one of the major component of the proteasome complex and of PSMD14 (absent in predisposed samples). In addition, ER-stress may induce a decrease in protein synthesis and may affect cellular metabolism through diverse mechanisms, including calcium signaling as well as lipid biosynthesis and uptake [for review see 34]. The expression modulation of nine ribosomal proteins suggests translation may be affected. The down-regulation of several proteins associated with calcium homeostasis may also be indicative of altered

matrix synthesis and cartilage repair (for review see [35]). Interestingly, aggregation of misfolded proteins and malfunction of ER stress response is a common feature of a wide range of diseases, including several dyschondroplasia [36-38].

Taken together, these findings indicate that mitochondria dysfunction and ER stress in hypertrophic chondrocyte may play a role in OCD physiopathology as well as OCD genetic susceptibility.

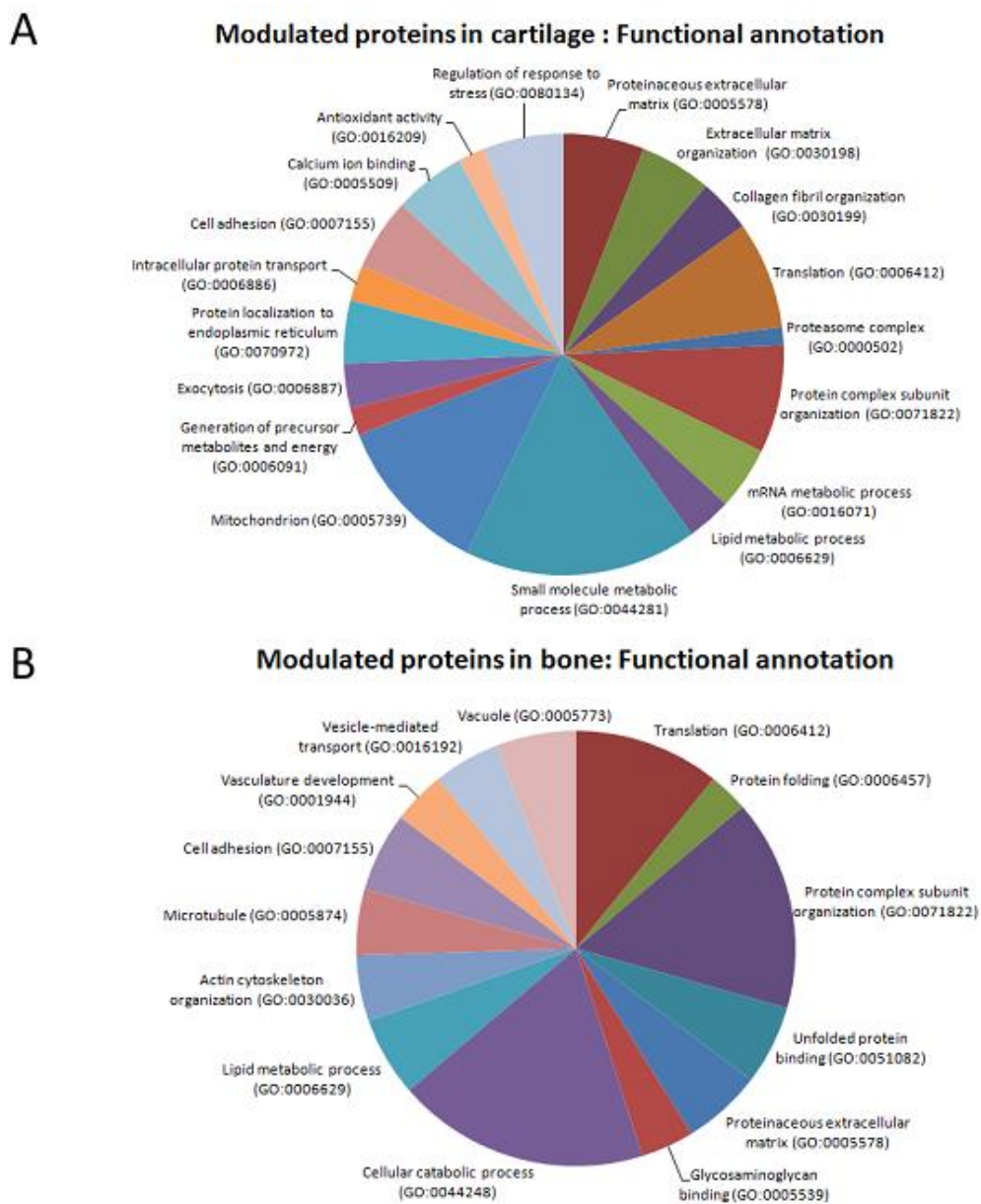
#### *How Mitochondrial Dysfunction and ER Stress May be Involved in OCD Physiopathology?*

Mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum (ER) stress are often jointly associated with pathological state, each of these factors contributing to the disease. Although our data do not provide additional clues about the primary defective mechanism, two hypotheses are proposed. In the first hypothesis, mitochondrial dysfunction may be a consequence of ER stress. Noteworthy, some mutations were identified in genes encoding ECM structural components (FBLN1, COL28A1) and proteoglycan modifying



enzymes (GALNT13, ST6GALNAC2), suggesting that accumulation of defective proteins may be primarily responsible for ER stress induction. Several studies have demonstrated that mitochondrial-dependent cell death pathways may be activated [39] in response to ER stress. In addition, it has been shown that sub-lethal ER stress might affect the biology and the morphology of mitochondria, resulting in loss of mitochondrial membrane potential and fragmentation of the mitochondrial network

leading to subsequent specific mitophagy [40]. These effects are thought to be mediated by the release of  $Ca^{2+}$  from ER and by reactive oxygen species (ROS) produced under ER stress [for review 41]. In the second hypothesis, mitochondrial dysfunction may trigger ER-stress. Indeed, protein folding and maintenance of  $Ca^{2+}$  homeostasis within the ER require large amounts of ATP. Accordingly, ATP depletion is one known mechanism by which ER stress may be induced [for review 41].



**Figure 5: Functional annotations of proteins differentially expressed between healthy and OC horses in cartilage (A) and bone (B).**



ER-stress also typically induces expression of ER chaperones and activation of the unfolded protein response (UPR) cascade, ultimately triggering apoptosis. Our proteomic data do not support involvement of such mechanisms as no changes in chaperone expression and no apoptotic signature were identified. Moreover, no apoptotic chondrocytes were found using TEM. This is however consistent with the physiopathology of OCD, that appears less severe than ER-stress associated dyschondroplasia. One explanation would be that mitochondrial dysfunction associated with a mild defect in ERAD machinery may lead to the accumulation of abnormal proteins in the ER, triggering only a partial ER stress response with induction of some, but not all, components of the unfolded protein response, as observed in islets of patients with type 1 diabetes [42]. Noteworthy, mutations identified in the CUL4A gene that encodes a core component of ubiquitin-protein ligase complexes, may be responsible for such a mild defect in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. This partial ER-stress response may alter chondrocyte biosynthetic activity and their proper secretory role, resulting in abnormal secreted ECM proteins and defective hypertrophic terminal differentiation.

In line with this hypothesis, it has been suggested that cartilage from OC-affected horses present an altered ECM structure [1, 43, 44]. Accordingly, in OC-affected cartilage, abnormal fibril organization was observed in the pericellular matrix surrounding hypertrophic chondrocytes (figure 2), a region essential for chondrocyte microenvironment and micromechanical regulation [45]. Changes in expression levels of several proteins involved in collagen fibrils and ECM organization was also observed, including collagen type II (COL2A1), type XI (COL11A1) and prolyl 4-hydroxylase alpha polypeptide I (P4HA1), a pivotal enzyme in collagen triple helix formation that is up-regulated in OA chondrocytes [46]. Up-regulation of osteonectin (SPARC), a

glycoprotein known to inhibit cartilage and bone mineralization, also suggests impaired ECM mineralization. Consistent with these findings, TEM analysis revealed abnormal concentration of rosette-like clusters at the ossification front, suggesting impaired mineralization [29].

#### *A Minor Defect in Bone also Contributes to the Physiopathology of OCD.*

Healthy and OC susceptible foals were classified based on their cartilage proteome. In contrast, proteomics failed to efficiently discriminate the two foal classes. In good agreement with our previous data, down-regulation of carbonic anhydrase (CA1), a protein known to promote the formation of CaCO<sub>3</sub>, as well as up-regulation of osteonectin, suggest impaired mineralization. Absence of Angiogenin (expressed solely in bone from Healthy foals), a potent angiogenic protein known to stimulate bone regeneration, may disrupt angiogenesis and delay osteoblast and osteoclast invasion. However, such a defective process may be counteracted by elevated expression levels of Tyrosyl-tRNA synthetase (YARS), which has been shown to be angiogenic in endothelial cell cultures. [47].

In addition, proteomics revealed modification of several pathways known to be involved in bone tissue development and remodeling. For example, modulation of lipid biosynthesis may impact bone metabolism and mineral density. In particular, cholesterol and its biosynthetic pathway are essential for osteoblast and osteoclast development [for review see 48]. Down-regulation of ACTA2, an enzyme involved in cholesterol esterification, may be indicative of reduced cholesterol absorption efficiency [49]. Likewise, up-regulation of Clusterin (Apo-J), which was already noticed in our previous study, may be associated with increased cholesterol efflux from bone cells [50] potentially altering cellular cholesterol homeostasis.

Furthermore, we observed up-regulation of the valosin-containing protein (VCP), a type-II ATPase family member protein shown to be involved in osteoclastogenesis and bone turnover [51]. Absence of angiogenin expression may also stimulate osteoclast-mediated bone resorption [52]. Consistent with such a hypothesis, enhanced biosynthetic and catabolic activities emerge as striking features from our data.

The precise mechanisms linking cartilage and bone defects remain to be elucidated. However, only limited bone proteome differences could be identified by BCA and no convincing ultrastructural defect was observed by TEM either in osteoblasts or in osteoclasts. Thus, we guess that the minor changes in bone are likely to be triggered by the cartilage defect. Indeed, growing evidence suggests that impaired chondrocyte terminal differentiation may be responsible for a defective bone development [53, 54]. Impaired ECM composition or mineralization may impact the ossification, either directly or indirectly by modulating numerous signaling pathways. For example, decorin, which was found to be under expressed in predisposed bone, modulates collagen fibril formation, matrix mineralization, as well as the bioactivity of various members of the transforming growth factor-beta (TGFbeta) family [55]. Alternatively, defective hypertrophic chondrocyte differentiation may also impair the secretion of factors involved in osteoblast and/or osteoclast recruitment or activation. Such factors are still unknown, but co-culture between periosteum and articular chondrocytes have already demonstrated the existence of such paracrine signaling pathways [56].

In conclusion, our study suggests that OCD lesions result from defective chondrocyte hypertrophic terminal differentiation, due to impaired energy production associated with the ER-stress response. Modification of ECM structure and mineralization probably lead to altered cartilage and bone biomechanical properties, making them prone to fractures.

Taking this knowledge into account, we propose a list of candidate genes and mutations identified in French Trotters within QTL regions associated with OCD. We are confident that some of them will prove to be involved in OCD predisposition.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was funded by a grant of Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENM-006).

#### **AUTHOR CONTRIBUTION:**

Study design: LS and DE. Study conduct: LS, JMB and DE. Data collection: all authors. Data analysis and interpretation: LS, CD. Manuscript writing and revising: LS and CD. All authors state that they have no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Ekman S, Carlson CS: **The pathophysiology of osteochondrosis.** *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 1998, **28**(1):17-32.
2. Jeffcott LB: **Osteochondrosis - An international problem for the horse industry.** *J Equine Vet Sci* 1996, **16**(1):32-37.
3. Lepeule J, Bareille N, Robert C, Ezanno P, Valette JP, Jacquet S, Blanchard G, Denoix JM, Seegers H: **Association of growth, feeding practices and exercise conditions with the prevalence of Developmental Orthopaedic Disease in limbs of French foals at weaning.** *Preventive veterinary medicine* 2009, **89**(3-4):167-177.
4. van Weeren PR, Barneveld A: **The effect of exercise on the distribution and manifestation of osteochondrotic lesions in the Warmblood foal.** *Equine Vet J Suppl* 1999(31):16-25.
5. McIlwraith CW: **Developmental orthopedic disease: Problems of limbs in young horses.** *J Equine Vet Sci* 2004, **24**(11):475-479.
6. Jeffcott L: **Osteochondrosis in the horse - searching for the key to pathogenesis.** *Equine Vet J* 1991, **23**(5):331-338.
7. van Weeren PR: **Etiology, Diagnosis, and Treatment of OC(D).** *Clinical Techniques in Equine Practice* 2006, **5**(4):248-258.
8. Ytrehus B, Carlson C, Ekman S: **Etiology and pathogenesis of osteochondrosis.** *Veterinary pathology* 2007, **44**(4):429-448.
9. Jeffcott LB, Henson FMD: **Studies On Growth Cartilage In The Horse And Their Application To Aetiopathogenesis Of Dyschondroplasia (Osteochondrosis).** *Veterinary journal* 1998, **156**(3):177-192.
10. Muir H: **The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules.** *Bioessays* 1995, **17**(12):1039-1048.
11. Distl O: **The genetics of equine osteochondrosis.** *Vet J* 2013.
12. Corbin LJ, Blott SC, Swinburne JE, Sibbons C, Fox-Clipsham LY, Helweggen M, Parkin TD, Newton JR, Bramlage LR, McIlwraith CW *et al*: **A genome-wide association study of osteochondritis dissecans in the Thoroughbred.** *Mamm Genome* 2012, **23**(3-4):294-303.
13. Desjardin C, Balliau T, Valot B, Zivy M, Wimel L, Guerin G, Cribiu E, Schibler L: **A method for proteomic analysis of equine subchondral bone and epiphyseal cartilage.** *Proteomics* 2012, **12**(11):1870-1874.
14. Kessner D, Chambers M, Burke R, Agus D, Mallick P: **ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development.** *Bioinformatics* 2008, **24**(21):2534-2536.
15. Langella O, Zivy M, Joets J: **The PROTIcDb database for 2-DE proteomics.** *Methods Mol Biol* 2007, **355**:279-303.
16. Craig R, Beavis RC: **TANDEM: matching proteins with tandem mass spectra.** *Bioinformatics* 2004, **20**(9):1466-1467.
17. Valot B, Langella O, Nano E, Zivy M: **MassChroQ: a versatile tool for mass spectrometry quantification.** *Proteomics* 2011, **11**(17):3572-3577.
18. Teyssedre S, Dupuis MC, Guerin G, Schibler L, Denoix JM, Elsen JM, Ricard A: **Genome-wide association studies for osteochondrosis in French Trotter horses.** *Journal of animal science* 2012, **90**(1):45-53.
19. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R: **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2009, **25**(16):2078-2079.
20. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M *et al*: **The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data.** *Genome research* 2010, **20**(9):1297-1303.
21. McLaren W, Pritchard B, Rios D, Chen Y, Flicek P, Cunningham F: **Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor.** *Bioinformatics (Oxford, England)* 2010, **26**(16):2069-2070.
22. Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P: **Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI.** *J Cell Biol* 1989, **108**(1):191-197.
23. Desjardin C, Riviere J, Vaiman A, Morgenthaler C, Diribarne M, Zivy M, Le Moyec L, Wimel L, Lepage O, Jacques C *et al*: **Proteomics provides new insights into the molecular physiopathology of Equine Osteochondrosis.** *submitted* 2013.
24. Xie S, Wang F, Yan D, Zhou G, Ye M, Zou H: **[Application of online two-dimensional separation system using monolithic columns for proteome**

- analysis of human cartilage]. *Se pu = Chinese journal of chromatography / Zhongguo hua xue hui* 2010, **28**(2):140-145.
25. Wang N, Zhao DH, Wu CA, Tian W, Xiao B, Hu JW: [Shotgun proteomic analysis of intervertebral disc tissues from fetal and adult subjects]. *Zhonghua yi xue za zhi* 2010, **90**(9):610-613.
  26. Bivi N, Picotti P, Müller LN, Romanello M, Moro L, Quadrioglio F, Tell G: **Shotgun proteomics analysis reveals new unsuspected molecular effectors of nitrogen-containing bisphosphonates in osteocytes.** *J Proteomics* 2011, **74**(7):1113-1122.
  27. Stock KF, Distl O: **Genetic correlations between osseous fragments in fetlock and hock joints, deforming arthropathy in hock joints and pathologic changes in the navicular bones of Warmblood riding horses.** *Livestock Science* 2006, **105**(1):35-43.
  28. Lykkjen S, Roed KH, Dolvik NI: **Osteochondrosis and osteochondral fragments in Standardbred trotters: prevalence and relationships.** *Equine veterinary journal* 2012, **44**(3):332-338.
  29. Skagen PS, Horn T, Kruse HA, Staergaard B, Rapport MM, Nicolaisen T: **Osteochondritis dissecans (OCD), an endoplasmic reticulum storage disease?: a morphological and molecular study of OCD fragments.** *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 2011, **21**(6):e17-33.
  30. Martin JA, Martini A, Molinari A, Morgan W, Ramalingam W, Buckwalter JA, McKinley TO: **Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in articular cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2012, **20**(4):323-329.
  31. Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C: **The role of mitochondria in osteoarthritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2011, **7**(3):161-169.
  32. C D, J R, A V, C M, M D, M Z, L LM, L W, O L, C J *et al*: **Proteomics provides new insights into the molecular physiopathology of Equine Osteochondrosis.** In. Submitted in PlosOne; 2013.
  33. Ruiz-Romero C, Lopez-Armada MJ, Blanco FJMD: **Mitochondrial Proteomic Characterization Of Human Normal Articular Chondrocytes.** *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2006, **14**:507-518.
  34. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, Wang ZV, Zorzano A, Hill JA, Jaimovich E *et al*: **Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration.** *International review of cell and molecular biology* 2013, **301**:215-290.
  35. Yammani RR: **S100 proteins in cartilage: role in arthritis.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1822**(4):600-606.
  36. Lisse TS, Thiele F, Fuchs H, Hans W, Przemeck GK, Abe K, Rathkolb B, Quintanilla-Martinez L, Hoelzlwimmer G, Helfrich M *et al*: **ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfecta.** *PLoS Genet* 2008, **4**(2):e7.
  37. Yoshida H: **ER stress and diseases.** *The FEBS journal* 2007, **274**(3):630-658.
  38. Cameron TL, Bell KM, Tatarczuch L, Mackie EJ, Rajpar MH, McDermott BT, Boot-Handford RP, Bateman JF: **Transcriptional profiling of chondrodysplasia growth plate cartilage reveals adaptive ER-stress networks that allow survival but disrupt hypertrophy.** *PLoS One* 2011, **6**(9):e24600.
  39. Wang X, Eno CO, Altman BJ, Zhu Y, Zhao G, Olberding KE, Rathmell JC, Li C: **ER stress modulates cellular metabolism.** *The Biochemical journal* 2011, **435**(1):285-296.
  40. Vannuvel K, Renard P, Raes M, Arnould T: **Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria.** *J Cell Physiol* 2013, **228**(9):1802-1818.
  41. Leem J, Koh EH: **Interaction between mitochondria and the endoplasmic reticulum: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.** *Experimental diabetes research* 2012, **2012**:242984.
  42. Marhfour I, Lopez XM, Lefkaditis D, Salmon I, Allagnat F, Richardson SJ, Morgan NG, Eizirik DL: **Expression of endoplasmic reticulum stress markers in the islets of patients with type 1 diabetes.** *Diabetologia* 2012, **55**(9):2417-2420.
  43. Mirams M, Tatarczuch L, Ahmed YA, Pagel CN, Jeffcott LB, Davies HM, Mackie EJ: **Altered gene expression in early osteochondrosis lesions.** *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2009, **27**(4):452-457.
  44. Henson FM, Davies ME, Jeffcott LB: **Equine dyschondroplasia (osteochondrosis)--histological findings and type VI collagen localization.** *Veterinary journal* 1997, **154**(1):53-62.

45. Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Haider MA: **The Pericellular Matrix As A Transducer Of Biomechanical And Biochemical Signals In Articular Cartilage.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1068**:498-512.
46. Grimmer C, Balbus N, Lang U, Aigner T, Cramer T, Muller L, Swoboda B, Pfander D: **Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hydroxylases: possible influence of low oxygen levels.** *Am J Pathol* 2006, **169**(2):491-502.
47. Zeng R, Chen YC, Zeng Z, Liu XX, Liu R, Qiang O, Li X: **Inhibition of mini-TyrRS-induced angiogenesis response in endothelial cells by VE-cadherin-dependent mini-TrpRS.** *Heart and vessels* 2012, **27**(2):193-201.
48. Ackert-Bicknell CL: **HDL cholesterol and bone mineral density: is there a genetic link?** *Bone* 2012, **50**(2):525-533.
49. Nguyen TM, Sawyer JK, Kelley KL, Davis MA, Rudel LL: **Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation.** *Journal of lipid research* 2012, **53**(1):95-104.
50. Gelissen IC, Hochgrebe T, Wilson MR, Easterbrook-Smith SB, Jessup W, Dean RT, Brown AJ: **Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells: a potential anti-atherogenic function?** *Biochem J* 1998, **331** ( Pt 1):231-237.
51. Badadani M, Nalbandian A, Watts GD, Vesa J, Kitazawa M, Su H, Tanaja J, Dec E, Wallace DC, Mukherjee J *et al*: **VCP associated inclusion body myopathy and paget disease of bone knock-in mouse model exhibits tissue pathology typical of human disease.** *PLoS One* 2010, **5**(10):e13183.
52. Morita Y, Matsuyama H, Serizawa A, Takeya T, Kawakami H: **Identification of angiogenin as the osteoclastic bone resorption-inhibitory factor in bovine milk.** *Bone* 2008, **42**(2):380-387.
53. Lu C, Wan Y, Cao J, Zhu X, Yu J, Zhou R, Yao Y, Zhang L, Zhao H, Li H *et al*: **Wnt-mediated reciprocal regulation between cartilage and bone development during endochondral ossification.** *Bone* 2013, **53**(2):566-574.
54. Mugniery E, Dacquin R, Marty C, Benoist-Lasselin C, de Vernejoul MC, Jurdic P, Munnich A, Geoffroy V, Legeai-Mallet L: **An activating Fgfr3 mutation affects trabecular bone formation via a paracrine mechanism during growth.** *Human molecular genetics* 2012, **21**(11):2503-2513.
55. Mochida Y, Parisuthiman D, Pornprasertsuk-Damrongsri S, Atsawasuwan P, Sricholpech M, Boskey AL, Yamauchi M: **Decorin modulates collagen matrix assembly and mineralization.** *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2009, **28**(1):44-52.
56. Grassel S, Rickert M, Opolka A, Bosserhoff A, Angele P, Grifka J, Anders S: **Coculture between periosteal explants and articular chondrocytes induces expression of TGF- $\beta$ 1 and collagen I.** *Rheumatology* 2010, **49**(2):218-230.

## Supplementary data - Proteomic

BUFFERS		Composition
PBS	Peptide Suspension Buffer	2% acetonitril , 0.05% formic acid, 0.05% TFA
ZUT	ZALS-urea-thiourea buffer	urea 6M, thiourea 2M, DTT 10 mM, Tris pH 8.8 30 mM, 0.1 % ZALS (zwitterionic acid labile surfactant, Proteabio)
ABBREVIATIONS		
IAA	iodoacetamine	
DTT	dithiotreitol	

Protein	BCA	Mean OC	MeanH	Fold Avd	Ensembl GeneID	Ensembl GeneID	Symbol	Description
P137	32	4.99E+08	1.35E+09	-2.7	ENSECA0000000012792	ENSG00000240972	MF	macrophage migration inhibitory factor (glycosylated on-inhibiting factor)
P142	33	1.28E+08	5.41E+08	-4.2	ENSECA000000006474	ENSG00000131981	LGA53	lectin, galactose-binding soluble, 3
P146	30	2.99E+08	1.45E+08	2.1	ENSECA0000000017191	ENSG00000118785	SPP1	secreted phosphoprotein 1
P151	34	4.65E+09	2.31E+09	2.0	ENSECA0000000021205	ENSG00000060718	COL11A1	collagen, type XI, alpha 1
P159	32	1.13E+08	2.28E+08	-2.0	ENSECA000000008254	ENSG00000116791	CRY2	crystallin, alpha (quinone reductase)
P185	29	2.39E+08	6.28E+08	-2.6	ENSECA0000000015875	ENSG00000118271	TRI	transthyretin
P197	32	1.77E+08	6.29E+07	2.8	ENSECA0000000020778	ENSG00000144152	FILN7	filamin 7
P198	34	3.81E+07	1.14E+08	-3.0	ENSECA0000000013915	ENSG00000149273	RPS3	ribosomal protein S3
P204	34	1.41E+08	2.26E+07	6.2	ENSECA0000000014820	ENSG00000096696	DSP	desmoplakin
P206	33	4.97E+07	1.30E+08	-2.6	ENSECA000000001661	ENSG00000108518	PRV1	profilin 1
P215	34	6.42E+07	1.32E+08	-2.1	ENSECA0000000012210	ENSG00000126247	CAPP1	calpain, small subunit 1
P221	30	4.96E+07	2.23E+07	2.2	ENSECA0000000014760	ENSG00000125844	RRP1	ribosome binding protein 1
P222	33	6.17E+07	1.38E+08	-2.2	ENSECA0000000016278	ENSG00000075142	SR	sarcosin
P239	32	6.69E+07	2.05E+08	-3.1	ENSECA0000000019037	ENSG00000170899	GSTM4	glutathione S-transferase alpha 4
P246	32	2.73E+07	6.02E+07	-2.2	ENSECA0000000008400	ENSG00000121095	CRPPLD1	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 1
P249	34	2.15E+07	9.37E+07	-4.4	ENSECA0000000000612	ENSG00000184674	GSTT1	glutathione S-transferase theta 1
P262	34	5.72E+07	1.30E+08	-2.3	XP_001918288.1	ENSG00000169567	HNTL	histidine triad nucleotide binding protein 1
P266	35	4.40E+08	2.49E+07	17.7	ENSECA0000000012496	ENSG00000122884	PHAI1	prolyl-4-hydroxylase, alpha polypeptide I
P27	34	4.00E+09	8.85E+09	-2.2	ENSECA0000000023142	ENSG00000136457	CHAD	chondroectherin
P272	28	3.48E+07	7.42E+07	-2.1	ENSECA0000000005884	ENSG00000105475	CYLL	crystallin, lambda delta 1
P276	30	4.15E+07	9.62E+07	-2.3	ENSECA0000000020769	ENSG00000113578	FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)
P280	33	4.37E+07	1.87E+08	-4.3	ENSECA0000000020830	ENSG00000170891	CYTL1	cytokine-like 1
P289	32	1.38E+07	5.40E+07	-3.9	ENSECA0000000024086	ENSG00000129084	P9AA1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 1
P291	33	2.91E+07	6.94E+07	-2.4	ENSECA0000000017769	ENSG00000167085	PHB	prohibitin
P296	34	3.35E+07	8.34E+07	-2.5	ENSECA0000000009059	ENSG00000241837	ATP5O	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit
P300	34	5.88E+07	1.59E+08	-2.7	ENSECA0000000012705	ENSG00000051620	HEBP2	heme binding protein 2
P310	28	1.94E+07	3.98E+07	-2.1	ENSECA0000000005106	ENSG00000176971	RBN	ribonucleotidyl transferase homolog (zebrafish)
P314	33	6.52E+07	2.90E+07	2.3	ENSECA0000000013439	ENSG00000116774	OLRXL3	olfactomedin-like 3
P318	34	2.96E+07	1.27E+08	-4.3	ENSECA0000000018161	ENSG00000223953	CIQTNS	CIQ and tumor necrosis factor related protein 5
P331	31	2.27E+07	6.32E+07	-2.8	ENSECA0000000018332	ENSG00000162433	AKA	adenylylase kinase 4
P332	34	1.25E+07	4.65E+07	-3.7	XP_001916014	ENSG00000004776	HSP96	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6
P347	33	2.52E+07	5.85E+07	-2.3	ENSECA0000000024684	ENSG00000105629	ATP5C1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
P354	34	3.59E+07	6.61E+06	5.4	ENSECA0000000022317	ENSG00000159231	CBP3	carbonyl reductase 3
P360	34	4.60E+07	2.14E+07	2.2	ENSECA0000000018040	ENSG00000134760	CSG1	desmoglein 1
P37	34	2.37E+09	1.12E+09	2.1	ENSECA0000000020252	ENSG00000167004	PD-A3	protein disulfide isomerase family A, member 3
P372	29	3.11E+07	9.41E+07	-3.0	ENSECA0000000017747	ENSG00000126432	PRDX5	peroxiredoxin 5
P374	31	7.22E+07	1.76E+07	4.1	ENSECA0000000009054	ENSG00000106165	CKB	creatine kinase, brain
P377	35	2.04E+07	4.13E+07	-2.0	ENSECA0000000020416	ENSG00000111229	ARPC3	actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 210Da
P378	34	1.12E+07	2.31E+07	-2.1	ENSECA0000000000708	ENSG00000205323	SARVP	SAP domain containing ribonucleoprotein
P384	32	2.71E+07	1.09E+07	2.5	ENSECA0000000013685	ENSG00000168477	TRO3	troponin X3
P409	28	3.29E+07	1.57E+07	2.1	ENSECA0000000006844	ENSG00000122786	CAI1	caldesmon 1
P413	34	1.26E+07	2.56E+07	-2.0	ENSECA0000000019384	ENSG00000104524	PYCR1	pyruvate-5-carboxylate reductase-like
P418	33	2.27E+07	4.79E+07	-2.1	ENSECA0000000017256	ENSG00000223927	RPS28	ribosomal protein S28
P432	34	1.90E+07	4.05E+07	-2.1	ENSECA0000000010625	ENSG00000087884	AMWC	adipogenesis associated, Mth938 domain containing
P435	31	2.61E+07	7.21E+07	-2.8	ENSECA0000000024049	ENSG00000189171	S100A13	S100 calcium binding protein A13
P436	31	2.95E+07	9.61E+07	-3.3	ENSECA0000000011837	ENSG00000142669	SH3BPGL3	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3
P439	33	1.37E+07	3.48E+07	-2.5	ENSECA0000000000000	ENSG00000147471	PRDC	proline synthase co-transcribed with bacterial
P444	35	2.85E+08	6.09E+06	46.8	ENSECA00000000009573	ENSG00000145425	RPS5A	ribosomal protein S5A
P447	31	2.50E+07	6.66E+07	-2.7	ENSECA0000000025006	ENSG00000129235	TXNDC17	thionin domain containing 17
P451	33	8.74E+06	2.50E+07	-2.9	ENSECA0000000010333	ENSG00000130313	PGI5	6-phosphogluconolactonase
P473	32	6.36E+06	2.43E+07	-3.8	ENSECA0000000019293	ENSG00000134419	RPS15A	ribosomal protein S15a
P489	33	6.75E+06	1.37E+07	-2.0	ENSECA0000000012531	ENSG00000170634	ACYP2	acylphosphatase 2, muscle type
P498	31	4.93E+07	1.47E+07	3.3	ENSECA0000000005661	ENSG00000170876	TNFRM3	transmembrane protein 43
P517	32	3.49E+07	7.07E+07	-2.0	ENSECA0000000024079	ENSG00000071082	RPL31	ribosomal protein L31
P530	34	6.98E+06	1.41E+07	-2.0	ENSECA0000000005988	ENSG00000076043	REXO2	REX, RNA exonuclease 2 homolog (S. cerevisiae)
P539	30	1.46E+07	3.31E+07	-2.3	ENSECA0000000012891	ENSG00000241553	ARPC4	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 200Da
P555	30	7.45E+06	2.14E+07	-2.9	ENSECA00000000007811	ENSG00000178922	HVI	hydroxyproline isomerase (putative)
P560	30	1.02E+07	4.22E+06	2.4	ENSECA00000000007979	ENSG00000198670	LPA	lipoprotein, lip(a)
P560	30	1.02E+07	4.22E+06	2.4	ENSECA00000000007979	ENSG00000122194	PLG	plasminogen
P568	30	1.90E+07	6.27E+07	-3.3	ENSECA00000000008221	ENSG00000196154	S100A8	S100 calcium binding protein A8
P569	28	4.44E+06	1.39E+07	-3.1	ENSECA00000000006828	ENSG00000166347	CY5A	cytochrome b5 type A (microsomal)
P57	30	3.80E+09	1.53E+09	2.5	ENSECA00000000004871	ENSG00000149257	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)
P579	30	1.52E+07	3.48E+07	-2.3	ENSECA0000000013269	ENSG00000185088	RPS27L	ribosomal protein S27-like
P581	29	4.17E+06	1.07E+07	-2.6	ENSECA0000000024471	ENSG00000005243	COP2	coatamer protein complex, subunit alpha 2
P582	33	1.63E+07	5.25E+06	3.1	ENSECA00000000008270	ENSG00000164687	FABP5	fatty acid binding protein 5 (prolactin-associated)
P583	31	7.76E+06	3.04E+06	2.6	ENSECA0000000014090	ENSG00000198755	RPL10A	ribosomal protein L10a
P595	33	2.16E+07	9.34E+06	2.3	ENSECA0000000011854	ENSG00000244255	CRI	Complement factor B, Uncharacterized protein, cDNAFL55673, highly similar to Complement factor B
P602	32	6.07E+06	3.67E+07	-6.1	ENSECA00000000021086	ENSG00000099977	DOT	D-dopachrome tautomerase
P623	32	9.43E+06	2.27E+07	-2.4	ENSECA00000000017197	ENSG00000099901	RANBP1	RAN binding protein 1
P656	29	1.53E+07	3.95E+06	3.9	ENSECA00000000016185	ENSG00000198832	SELM	Seleno protein M
P69	29	1.86E+09	4.64E+08	4.0	ENSECA0000000013874	ENSG00000113140	SPRN C	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
P7	31	3.65E+10	1.72E+10	2.1	ENSECA0000000022313	ENSG00000139219	COL3A1	collagen, type III, alpha 1
P85	34	3.36E+09	8.48E+08	4.0	ENSECA00000000020114			
P575	35	5.71E+06	-100.0	ENSECA0000000019034	ENSG00000153406	NIRAL1	NIRAL-like family domain containing 1	
P590	35	6.52E+06	-100.0	ENSECA0000000006959	ENSG00000105462	NAPA	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	
P608	35	3.48E+06	-100.0	ENSECA00000000005483	ENSG00000070880	CCDCL24	coiled-coil domain containing 124	
P621	35	1.20E+07	-100.0	ENSECA0000000006717	ENSG00000130707	ASE1	argininosuccinate synthase 1	
P622	35	9.33E+06	-100.0	ENSECA0000000020046	ENSG00000115233	PSMD14	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	
P631	35	8.77E+06	-100.0	ENSECA0000000002611	ENSG00000140374	ETFA	electron-transfer flavin protein, alpha polypeptide	
P567	35	7.47E+06	100.0	ENSECA00000000021065	ENSG00000122406	RPL5	ribosomal protein L5	
P652	35	5.47E+06	100.0	ENSECA0000000016583	ENSG00000173888	PHOSPHO1	phosphatase, orphan 1	
P658	35	1.03E+07	100.0	ENSECA0000000010538	ENSG00000149084	HSD17B12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	
P662	34	8.79E+06	100.0	ENSECA0000000013809	ENSG00000134765	DESL	desmolin 1	

Proteins already identified in Arango Arango OC affected horses





## 35-QTL regions

Chromo	Breed	Trait	Position in Mb	Reference
1	HW	OC, OCD, OC-F, OCD-F, OC-H, OCD-H	44	Lampe et al. (2009)
3	HW	OC, OCD	64	Lampe et al. (2009)
3	TB	OCD	88	Corbin et al. (2012)
4	HW	OC-F, OCD-F, OC-H, OCD-H	41	Lampe et al. (2009)
5	NT	OCD-H	41	Lykkjen et al. (2010)
10	NT	OCD-H	80	Lykkjen et al. (2010)
18	HW	OC, OCD	36	Lampe et al. (2009)
27	NT	OCD-H	38	Lykkjen et al. (2010)
28	NT	OCD-H	42	Lykkjen et al. (2010)
1	TF	OCD-H	129	Teyssèdre et al. (2012)
2	TF	OCD-H	115	Teyssèdre et al. (2012)
3	TF	OCD-H	69	Teyssèdre et al. (2012)
3	TF	OCD-H	85	Teyssèdre et al. (2012)
3	TF	OCD-H	106	Teyssèdre et al. (2012)
5	TF	Cisaillement	50	Teyssèdre et al. (2012)
7	TF	Cisaillement	26	Teyssèdre et al. (2012)
8	TF	OCD-H	49	Teyssèdre et al. (2012)
8	TF	OCD-H	83	Teyssèdre et al. (2012)
11	TF	Cisaillement	18	Teyssèdre et al. (2012)
13	TF	Total	8	Teyssèdre et al. (2012)
14	TF	OCD-H	74	Teyssèdre et al. (2012)
15	TF	OCD-H	20	Teyssèdre et al. (2012)
15	TF	OCD-H	25	Teyssèdre et al. (2012)
15	TF	Cisaillement	52	Teyssèdre et al. (2012)
16	TF	OCD-H	3	Teyssèdre et al. (2012)
16	TF	OCD-H	19	Teyssèdre et al. (2012)
17	TF	OCD-H	80	Teyssèdre et al. (2012)
20	TF	OCD-H	13	Teyssèdre et al. (2012)
20	TF	Cisaillement	45	Teyssèdre et al. (2012)
20	TF	Total	56	Teyssèdre et al. (2012)
26	TF	Cisaillement	24	Teyssèdre et al. (2012)
28	TF	Cisaillement	18	Teyssèdre et al. (2012)

## 5. Rôle des hormones thyroïdiennes dans la maturation du cartilage : rôle potentiel dans la physiopathologie de l'OC

Compte tenu du rôle potentiel des hormones thyroïdiennes dans l'apparition des lésions d'OC, nous avons cherché à préciser leur effet dans l'ossification endochondrale et le rôle spécifique de TR $\alpha$ 1. Nous avons ainsi étudié un modèle de souris transgénique hétérozygote exprimant la mutation dominante-négative L400R spécifiquement dans les chondrocytes.

### 5.1. Présentation de la stratégie expérimentale.

L'étude exploite un modèle de souris transgénique obtenue par recombinaison homologue dans l'équipe du Dr Frédéric Flamant à Lyon [128]. Ces souris portent une mutation ponctuelle (L400R) dans l'exon 9 induisant la substitution de la leucine en position 400 par une arginine au niveau du domaine d'activation AF-2 de TR $\alpha$ 1.

Il a été montré que cette mutation imposait au récepteur TR $\alpha$ 1 une conformation équivalente à celle adoptée en l'absence de ligand. En conséquence, TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> ne peut pas recruter les histones acétyl-transférase co-activateurs SCR1 et SCR2 mais interagit avec des corépresseurs de la transcription en absence ou en présence de T3, exerçant ainsi une activité dominante-négative constitutive sur l'expression de ses gènes cibles.

L'allèle TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> comporte également la cassette de sélection encadrée par deux sites loxP, empêchant son expression (Figure 20). L'action de la recombinaison Cre permet d'exciser la cassette et de restaurer l'expression de l'allèle muté TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup>. Le croisement de souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> avec des souris exprimant la recombinaison Cre permet ainsi d'exprimer le récepteur muté de façon tissu spécifique, en fonction du promoteur contrôlant l'expression de Cre.

### 5.2. Obtention de souris transgéniques TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> Crecol2a1<sup>+/-</sup> et TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> Crecol1<sup>+/-</sup>

Afin de d'introduire la mutation TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> de façon constitutive et spécifique dans le cartilage ou l'os, des souris TR $\alpha$ <sup>AMI</sup> ont été croisé respectivement avec des souris Crecol2a1<sup>+/-</sup> ou Crecol1<sup>+/-</sup> pour lesquelles le système CRE/lox est sous le contrôle des promoteurs des gènes Col2a1 ou Col1a1 respectivement spécifiques du cartilage et de l'os. Nous avons ainsi pu obtenir des modèles de souris transgénique TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> Crecol2a1<sup>+/-</sup> et TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> Crecol1<sup>+/-</sup> présentant la mutation TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> de façon spécifique dans les chondrocytes ou dans les ostéoblastes. Ces croisements ont aussi permis d'obtenir des animaux contrôles : TR $\alpha$ 1<sup>AMI/+</sup> Crecol2a1<sup>wt/wt</sup> et TR $\alpha$ 1<sup>AMI/+</sup> Crecol1<sup>wt/wt</sup>.

### 5.3. Etudes des modèles de souris TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> Crecol2a1<sup>+/-</sup> et TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> Crecol1<sup>+/-</sup>

Une dernière partie du travail a porté sur l'étude de deux modèles de souris transgéniques présentant la mutation TR $\alpha$ <sup>L400R</sup> spécifiquement dans l'os et le cartilage.

L'hormone thyroïdienne T3 est requise pour la croissance post-natale du squelette et pour le remodelage osseux chez l'adulte. Les effets de T3 sont médiés par des récepteurs nucléaires, les TRs, présents dans de nombreux tissus. Il a été montré que les récepteurs alpha 1 (TR $\alpha$ 1) sont présents dans les chondrocytes suggérant ainsi des actions de T3 dans l'os et le cartilage via ces récepteurs. Afin de mieux comprendre ces actions, nous avons étudié les phénotypes de deux lignées de souris transgéniques exprimant la protéine dominante-négative TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> dans le cartilage (TR $\alpha$ <sup>L400R/wt</sup> Col2Cre<sup>tg/wt</sup> appelé TR $\alpha$ <sup>L400R/C2</sup>) et dans l'os (TR $\alpha$ <sup>L400R/wt</sup> Col1Cre<sup>tg/wt</sup> appelé TR $\alpha$ <sup>L400R/C1</sup>) grâce à une collaboration avec Olivier Chassande. Des analyses histomorphométriques et de  $\mu$ CT ont été réalisées afin d'en étudier leur phénotype ainsi que des études d'expression de gènes.

L'objectif de nos travaux était ainsi d'étudier les rôles spécifiques et directs de TR $\alpha$ 1 dans la maturation du cartilage et dans la déposition osseuse au cours des processus d'ossification endochondrale et membranaire. D'autre part, des mutations de TR $\alpha$ 1 ont été mises en évidence chez plusieurs patients présentant des signes cliniques d'hypothyroïdisme (notamment un retard de croissance). Notre étude devait également permettre de mieux comprendre le rôle crucial de TR $\alpha$ 1 dans la croissance du squelette.

Les études phénotypiques ont montré que, chez la souris, une mutation dominante-négative du récepteur TR $\alpha$ 1 dans les chondrocytes induit des défauts de l'os similaires à ceux observés dans le cadre de déficience de la T3 dont un retard de croissance et une faible densité minérale de l'os. Cependant, la même mutation exprimée dans les ostéoblastes matures n'induit pas de modification visible du phénotype.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que TR $\alpha$ 1 agit majoritairement dans le cartilage et que sa fonction principale est de stimuler la différenciation des chondrocytes. Au cours de la croissance osseuse post-natale, T3 stimule la différenciation et la maturation du cartilage activant ainsi, de façon indirecte, l'ossification endochondrale. Au vu de ces données, il semblerait donc que les altérations de la structure de l'os observées dans des conditions d'hypothyroïdie, résultent d'un défaut primaire de la maturation du cartilage et de défauts systémiques.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication scientifique soumise dans Human Molecular Genetics : **Desjardin et al., « Chondrocytes play a central role in the stimulation of bone growth by thyroid Thyroid hormone receptor alpha 1 »**

# Chondrocytes play a central role in the stimulation of bone growth by thyroid Thyroid hormone receptor alpha 1

Clémence Desjardin<sup>1</sup>, Cyril Charles<sup>2</sup>, Catherine Benoist-Lassel<sup>3</sup>, Julie Riviere<sup>1</sup>, Mailys Gilles<sup>1</sup>, Olivier Chassande<sup>4</sup>, Caroline Morgenthaler<sup>1</sup>, Denis Laloé<sup>1</sup>, Jérôme Lecardonnell<sup>1</sup>, Frédéric Flamant<sup>5</sup>, Laurence Legeai-Mallet<sup>3</sup>, Laurent Schibler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1313, Biologie Intégrative et Génétique Animale, Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup> CNRS UMR 5242, ENS Lyon, Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Lyon, Lyon, France

<sup>3</sup> INSERM, U781, Université Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

<sup>4</sup> UNIVERTISTY of Bordeaux, U1026, Bioingénierie Tissulaire, Bordeaux, France

<sup>5</sup> CNRSINRA, ENS, Institut de Génomique Fonctionnelle, Lyon, France

## Abstract

Thyroid hormone (T3) is required for post-natal skeletal growth and turnover of adult bones. T3 exerts its effect by binding to nuclear receptors (TRs). The presence of thyroid hormone receptor alpha 1 (TR $\alpha$ ) in chondrocytes suggests T3 actions in bone may be through these receptors. Mutant mice expressing the dominant negative TR $\alpha$ <sup>L400R</sup> protein in cartilage or bone (TR $\alpha$ <sup>L400R/wt</sup> Col2Cre<sup>tg/wt</sup> and TR $\alpha$ <sup>L400R/wt</sup> Col1Cre<sup>tg/wt</sup>, called TR $\alpha$ <sup>L400R/C2</sup> and TR $\alpha$ <sup>L400R/C1</sup>) were generated to perform histomorphometry,  $\mu$ CT as well as whole genome expression profiling studies. We show here that a dominant-negative mutation of the TR $\alpha$ 1 nuclear receptor in a mouse chondrocyte lineage is sufficient to reproduce the bone defects observed with T3 deficiency, while the same mutation expressed in mature osteoblasts has no visible effect. The bones of mutant mice, including the skull, were smaller than wild type animals. Differences in bone mineral density and trabecular thickness suggest a poorer quality bone in mutant mice. We conclude that the stimulation of bone growth by T3 after birth results from its ability to activate the expression required for the proper and timely differentiation of cartilage, and that T3 activates endochondral ossification indirectly during post-natal growth.

**Abbreviations:** Thyroid hormone (TH), Thyroid hormone receptor alpha 1 (TR $\alpha$ 1), Micro computed tomography ( $\mu$ CT), bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), tissue mineral content (TMC), tissue mineral density (TMD), bone volume fraction (BV/TV), relative bone surface (BS/BV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp).

**Keywords:** Thyroid hormone; Thyroid hormone receptor alpha; Chondrocyte; Endochondral ossification

## Introduction

The skeleton is made up of bones developing through two distinct processes, intramembranous ossification and endochondral ossification. Intramembranous ossification, which occurs in the flat bones of the skull and clavicle, involves direct differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts. In contrast, endochondral ossification, which occurs in the remainder of the skeleton, involves differentiation of mesenchymal cells into chondrocytes that form a cartilage template for future bone. During endochondral ossification, chondrocytes undergo hypertrophic differentiation, characterized by sequential changes in cell morphology and matrix synthesis, and the cartilage is ultimately replaced by bone tissue following vascular invasion. This process is tightly regulated by numerous circulating hormones, cytokines and growth factors (Mackie, Tatarczuch et al. 2011, Marino 2011), including the thyroid hormone T3 (3,5,3'-L-tri-iodo-thyronine, the active derivative of thyroxin T4), that is also required for the maintenance of adult bones.

Childhood hypothyroidism results in profound growth retardation, short stature, retarded bone age, skeletal dysplasia and delayed dental development, with abnormally thin growth plates and impaired chondrocyte hypertrophy (Williams, Robson et al. 1998). Hypothyroid rats display a disorganized growth plate with a decreased hypertrophic zone that does not contain collagen type X (Stevens, Hasserjian et al. 2000). Conversely, childhood thyrotoxicosis accelerates growth and advances bone age but

induces short stature due to premature fusion of the growth plates (Schlesinger, MacGillivray et al. 1973). T3 is thus considered as a positive regulator of cartilage maturation, stimulating clonal expansion of resting chondrocytes and hypertrophic differentiation, as shown by induction of collagen type X expression, changes in glycosaminoglycan secretion and alkaline phosphatase activity upon T3 stimulation (Ishikawa, Genge et al. 1998, Robson, Siebler et al. 2000, Miura, Tanaka et al. 2002, Bassett and Williams 2003). T3 is thought to regulate the onset of hypertrophy by controlling cell cycle progression at G1/S through the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 (Ballock, Zhou et al. 2000). However, T3 has also been shown to stimulate hypertrophy *in vitro*, without acting on proliferation (Burch and Lebovitz 1982, Bohme, Conscience-Egli et al. 1992). These actions are either direct or mediated through interactions with other signaling pathways. In particular, T3 has been shown to control or interact with several pathways involved in the regulation of chondrocyte proliferation and differentiation, including the Ihh-PTHrP feedback loop, GH, IGF1, Wnt, BMPs and FGFs (for review see Wojcicka, Bassett et al. 2013). For instance, T3 is thought to promote chondrocyte proliferation by activation of insulin-like growth factor (IGF)-1/IGF1R signaling through the PI3K/Akt pathway (Wang, Shao et al. 2010) and to promote terminal differentiation through the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway (Wang, Shao et al. 2007). Likewise, regulation of bone remodeling involves numerous signals (Zuo, Huang et al. 2012), including T3. T3 has been shown to

stimulate osteoblast biosynthetic activity and differentiation to regulate members of key pathways involved in osteoblast proliferation and differentiation, including IGF1, PTHrPR, FGFR1 and RANKL (for review see Wojcicka, Bassett et al. 2013). By contrast, osteoclastic response to T3 may be indirect and mediated in part by IL-6, PGE2 and RANKL secreted by osteoblasts upon T3 stimulation.

T3 exerts its effect by binding to nuclear receptors (TRs). The two main receptors, TR $\alpha$ 1 and TR $\beta$ 1 are encoded by the *Thra* and *Thrb* genes, which are both expressed in chondrocytes (resting, proliferating and prehypertrophic), osteoblasts and osteoclasts. TRs repress target gene transcription by recruiting corepressors. Upon T3 binding, they change their conformation, dissociating from the corepressor complex and recruiting transcription coactivators. This results in the chemical modification of histone tails and the recruitment of RNA polymerase II and transactivation of neighboring genes. The TR $\alpha$ 1 and TR $\beta$ 1 target genes in cartilage and bone cells remain for a large part unknown. The respective functions of TR $\alpha$ 1 and TR $\beta$ 1 have been analyzed using knock-out and knock-in mutations generated in mice. While all *Thra* and *Thrb* mutations have a visible effect on skeletal growth, they also have pleiotropic consequences on development and homeostasis, making it difficult to identify primary bone defects. Notably ubiquitous *Thrb* mutations result in increased circulating level of TSH and T3 due to disruption of the HPT axis. The bone phenotype resembles skeletal

hyperthyroidism, with advanced ossification and increased mineralization. This is unlikely to result from the absence of TR $\beta$ 1-mediated response of bone cells, but may rather be due to the excess of circulating T3 acting via TR $\alpha$  (O'Shea, Harvey et al. 2003, O'Shea, Bassett et al. 2006, Bassett, O'Shea et al. 2007). Although it has been proposed that bone also responds to the excess of TSH, this has been shown to be inconsistent with later investigations (Bassett, Williams et al. 2008). By contrast, *Thra* mutations do not usually alter the serum level of T3 and lead to a delayed ossification and bone growth that resembles hypothyroidism. Therefore the function of TR $\alpha$ 1 seems to be predominant in bone growth, consistent with the 10-fold higher expression levels of TR $\alpha$  than TR $\beta$  in the skeleton (O'Shea, Harvey et al. 2003). However, the serious retardation in postnatal development observed in some TR $\alpha$  KI models was largely absent in adult mice and could be rescued by increased circulating TH levels, suggesting that other mechanisms act to overcome the impediment caused by the mutant TR $\alpha$  receptor (Tinnikov, Nordström et al. 2002). The recent discovery of the first human germline mutations of *THRA* in patients with classic features of hypothyroidism (Bochukova, Schoenmakers et al. 2012, van Mullem, Chrysis et al. 2013) confirms the crucial role of TR $\alpha$ 1.

In order to investigate the specific and direct roles of TR $\alpha$ 1 in cartilage maturation and bone deposition during endochondral and membranous ossification processes, we used



Cre-mediated recombination in mice to generate tissue specific *Thra* mutations. Mice carrying the  $TR\alpha^{AMI}$  allele of *Thra* (Quignodon, Vincent et al. 2007) were crossed with transgenic mice expressing the Cre recombinase either in chondrocytes (Cre-Col2a1) or in osteoblasts (Cre-coll1a1). The Cre/loxP recombination triggers the expression of a mutant  $TR\alpha^{L400R}$  receptor with dominant-negative properties. Phenotype analysis and molecular studies revealed that, during bone development,  $TR\alpha 1$  functions mainly in cartilage and principally stimulates chondrocyte differentiation. Thus, alterations of bone structure observed in hypothyroidism are likely to be the result of a combination of primary cartilage maturation defects and systemic effects.

## Materials and Methods

### Animals

The structure (construction ??) of the  $TR\alpha^{AMI}$  allele and the phenotype of  $TR\alpha^{AMI/+}$  mice have been described previously (Flamant and Quignodon 2010). Col1Cre mice were provided by the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC) at the University of California, Davis, United States (Dacquin, Starbuck et al. 2002). Col2Cre mice have been described generated by (Sakai, Hiripi et al. 2001). As shown in supplementary Figure S1,  $TR\alpha^{AMI/AMI}$  males (129/Sv) were crossed with Col2Cre<sup>tg/wt</sup> or Col1Cre<sup>tg/wt</sup> females (C57bl6 background) to produce control mice ( $TR\alpha^{AMI/wt}$  Col2Cre<sup>wt/wt</sup> and  $TR\alpha^{AMI/wt}$  Col1Cre<sup>wt/wt</sup>) and mutant mice expressing the

dominant negative  $TR\alpha^{L400R}$  protein in cartilage or bone ( $TR\alpha^{L400R/wt}$  Col2Cre<sup>tg/wt</sup> and  $TR\alpha^{L400R/wt}$  Col1Cre<sup>tg/wt</sup>, called  $TR\alpha^{L400R}/C2$  and  $TR\alpha^{L400R}/C1$ ).

The experimental protocol number 12/033 was reviewed and approved by the Animal Care Committee of INRA and AgroParisTech (COMETHEA, France), which abides by the requirements of Directive 86/609 of the European Community Council.

### Histomorphometry and *in situ* Hybridization

#### *TR\alpha^{L400R}/C2*

For histological analyses, femurs from P1, P14 and P28 mice were fixed for 24 h in PFA followed by a decalcification in EDTA buffer for 1 to 3 weeks depending on the age of the mice. Paraffin-embedded 5- $\mu$ m longitudinal sections were cut and stained with hematoxylin-eosin or alcian blue-alizarin red.

*In situ* hybridization on the growth plates in femur sections from P1 and P28 mice was performed using collagen type-II and type X riboprobes to identify proliferative and hypertrophic zones of the growth plate.

Image J software was used to calculate mean values for the epiphysis and ossification centre area as well as growth plate thickness and RZ, PZ and HZ heights in femur sections from control and  $TR\alpha^{L400R}/C2$  mice. For histology and histomorphometry analyses, four to six animals per genotype were examined at each time point. At least two different levels of section were examined for each sample by

taking at least five separate measurements across each section examined.

#### *TRα<sup>L400R</sup>/C1*

For histomorphometry analyses, long bones were fixed, deshydrated in successive increasing ethanol solutions at 4°C and embedded in methyl-methacrylate according to standard protocols (Parfitt 1988). For each right femur or tibia, 7 µm-thick longitudinal sections, parallel to the sagittal plane, were obtained using a Leica Polycut E microtome (Leica, Switzerland) equipped with tungsten carbide 50j knives. Images were captured using a DXM 1200C camera coupled to an Eclipse 80i microscope (Nikon). Histomorphometric analysis was performed using the NIS-Elements AR software (Nikon). The measured trabecular area encompassed the secondary spongiosa. Trabecular bone perimeter, single- and double-labelled perimeters, and interlabelled widths were measured. These were used to calculate MS/BS ( $[(\text{double labelled perimeters} + \text{single labelled perimeters} / 2)] / \text{trabecular perimeters}$ ), MAR ( $[(\text{interlabelled widths} / \text{interval time})]$ ), BFR ( $[(\text{double labelled perimeters} + \text{single labelled perimeters} / 2)] \times \text{interlabelled widths} / \text{interval time} / \text{trabecular perimeters}$ ).

#### **Circulating T3/T4 levels**

Samples of blood were collected from P14, P21 and P28 *TRα<sup>L400R</sup>/C2* and control mice to estimate T3/T4 circulating levels using Roche T3 and T4 ECLIA Electrochemiluminescence assay.

#### **X-Ray and micro-computed tomography (µCT) analysis.**

The skeletons of the *TRα<sup>L400R</sup>/C2* mice and their control littermates were radiographed on Kodak oncology Film using Cabinet X-ray System Faxitron series-Hewlett Packard (15 sec, 35 KV and 3 mA).

#### ***TRα<sup>L400R</sup>/C2* mouse model**

µCT were done on femurs at X weeks of age. Mouse femurs were stored in 70% ethanol at 4°C before µCTmicro-computed tomography (µCT) analysis. Scans were performed using 5 µm voxel for femurs and 14 µm to 17 µm for heads (Phoenix nanotom™, GE measurement and control). The scanner used a tungsten source X-ray tube operating at 100 KV and 70 µA. Each sample required approximately 90 minutes for data acquisition. Images were reconstructed using Phoenix datos|x 2 CT software™. The Microview™ software was used for measurements, and the calibration for mineral density in the scans was performed with use of a phantom (hydroxyapatite). For each samples, two regions of interest were designed manually and scanned, corresponding to the trabecular subchondral bone area (2mm region below the cartilage) and to the cortical bone area (measured 5 mm under the cartilage area). The morphometric parameters examined were bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), tissue mineral content (TMC), tissue mineral density (TMD), bone volume fraction (BV/TV), relative bone surface (BS/BV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N) and trabecular separation

(Tb.Sp). For cortical bone, the parameters measured were BMD, inner and outer perimeters, marrow and cortical areas and total area. Geometric morphometric analyses were performed using Amira 5.3 and MorphoJ softwares with thirty-six 3D landmarks defined on skulls and mandibles. Specimen size was normalized and landmarks from different specimens superimposed using the Procrustes method. Skulls and mandibles were studied in two separate analyses.

#### ***TRα<sup>L400R</sup>/C1* mouse model**

3D microarchitecture of the distal femurs of mutant mice and its control littermate at X weeks of age were evaluated using a high-resolution (8 μm) microtomographic imaging system (eXplore Locus, General Electrics, USA). A 3D region within the secondary spongiosa in the proximal metaphysis of the tibia or femur was reconstructed, beginning 500 μm proximal to the growth plate and extending to 1.5 mm. Trabecular bone volume fraction (BV/TV, %) was determined using the Advanced Bone Analysis (ABA) software (GE, USA).

#### **Study of bone remodelling in 14 week-old**

##### ***TRα<sup>L400R</sup>/C1* mice.**

For the analysis of bone remodelling dynamic parameters, 25 mg/kg of calcein (Sigma) were injected intraperitoneally 6 and 2 days before sacrifice. Blood was collected from anesthetized mice (ketamine hydrochloride [5 mg/kg body weight] and xylazine [1 mg/kg body weight]) from the retroorbital vein into non heparinized tubes.

Serum was collected by centrifugation and stored at -70°C. After cervical dislocation, bones were excised, fixed overnight in 4% paraformaldehyde then transferred into 70% ethanol and stored at 4°C.

#### **Transcriptomics**

Three pairs of male mutant mice (*TRα<sup>L400R</sup>/C2*) and control littermates, as well as three pairs of female mutant mice (*TRα<sup>L400R</sup>/C2*) and control littermates were analyzed using Agilent SurePrint G3 Mouse Gene Expression microarrays that provide full coverage of mouse genes and transcripts, as well as long intergenic non-coding RNAs.

The two femoral heads of P14 *TRα<sup>L400R</sup>/C2* and control mice were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were crushed in liquid nitrogen using a mortar and pestle and RNA extraction performed using Qiagen RNeasy Mini kit.

Total RNA quality was checked with an Agilent2100 Bioanalyzer using RNA 6000 Nano Kits (Agilent Technologies). All RNA samples had an RNA integrity number (RIN) above 8. RNA amplification and labeling were performed using the one-color Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's recommendations. Each RNA sample (50 ng) was amplified and cyanin 3 (Cy3) labeled. QC of labeled cRNA was done using Nanodrop and Agilent 2100 Bioanalyzer. Subsequently, cRNA (600 ng) was fragmented and used for hybridization on Agilent sureprint G3 Mouse GE 8x60K Microarrays (design ID: 028005).

After hybridization, the Microarrays were washed according to the manufacturer's protocol. The chips were then scanned using a G2505CA scanner system (Agilent Technologies) at a resolution of 3  $\mu\text{m}$  and a dynamic range of 20 bits. The resulting .tiff images were analyzed using the Feature Extraction software v7.10.3.1 (Agilent Technologies). Detailed protocols can be obtained by contacting the CRB GADIE.

Statistical analyses were done in the BioConductor version 2.10 (Gentleman, Carey et al. 2004) and R version 2.15.0 environments (R Development Core Team 2005). Spots were filtered according to the "Gis WellAboveBG criterion (a description of this parameter can be found in the Feature Extraction Software Reference Guide). The intensity of spots was log<sub>2</sub>-transformed and centered by slide for data normalization. To identify genes that were differentially expressed, we applied the empirical Bayes, moderated t-statistics implemented in the BioConductor package LIMMA (version 3.12.0) (Smyth 2004). P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini and Hochberg method (Benjamini and Hochberg 1995).

## Results

To clarify the respective contribution of mature osteoblasts and chondrocytes in the promotion of bone growth by T3, we generated two transgenic mouse models expressing the TR $\alpha$ L400R mutant receptor in both cell types; osteoblasts (TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C1) and chondrocytes (TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2).

### **TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice exhibit postnatal growth retardation and delayed ossification whereas TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C1 display no bone defect**

Based on our morphometric and bones length comparative analysis, TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice revealed important and persistent postnatal growth retardation. TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice were 20% smaller and 25% lighter compared with the control at all postnatal ages examined (Figure 1 and supplementary Table 1). Mutant femurs, tibiae, humeri, ulnae as well as paws were 20% shorter than bones from control animals at all examined stages. However, the TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice phenotype remains harmonious. In contrast, no macroscopic defect could be observed in TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C1 mice up to 14 weeks of age (data not shown).

X-ray and 3D imaging revealed delayed ossification in TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mutant mice (Figure 2), also confirmed by alcian blue/alizarin red skeletal preparations, showing a greater proportion of blue stained cartilage in the mutant appendicular and axial skeleton (humerus, tibia, vertebrae and ribs) at P14, P21 and P28 (data not shown). Vertebrae of mutant mice were shorter and undermineralized and, more strikingly, epiphyses were not visible in the tibiae and femurs of mutant mice at all examined stages. Ossification delay persisted up to 5 weeks of age (Figures 2A, B, C). T3 and T4 circulating levels were measured, showing no systemic alteration in TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mutant mice (supplementary Table 2). Altogether, our results show that TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice display growth retardation by 2-3 weeks associated with a delayed ossification.

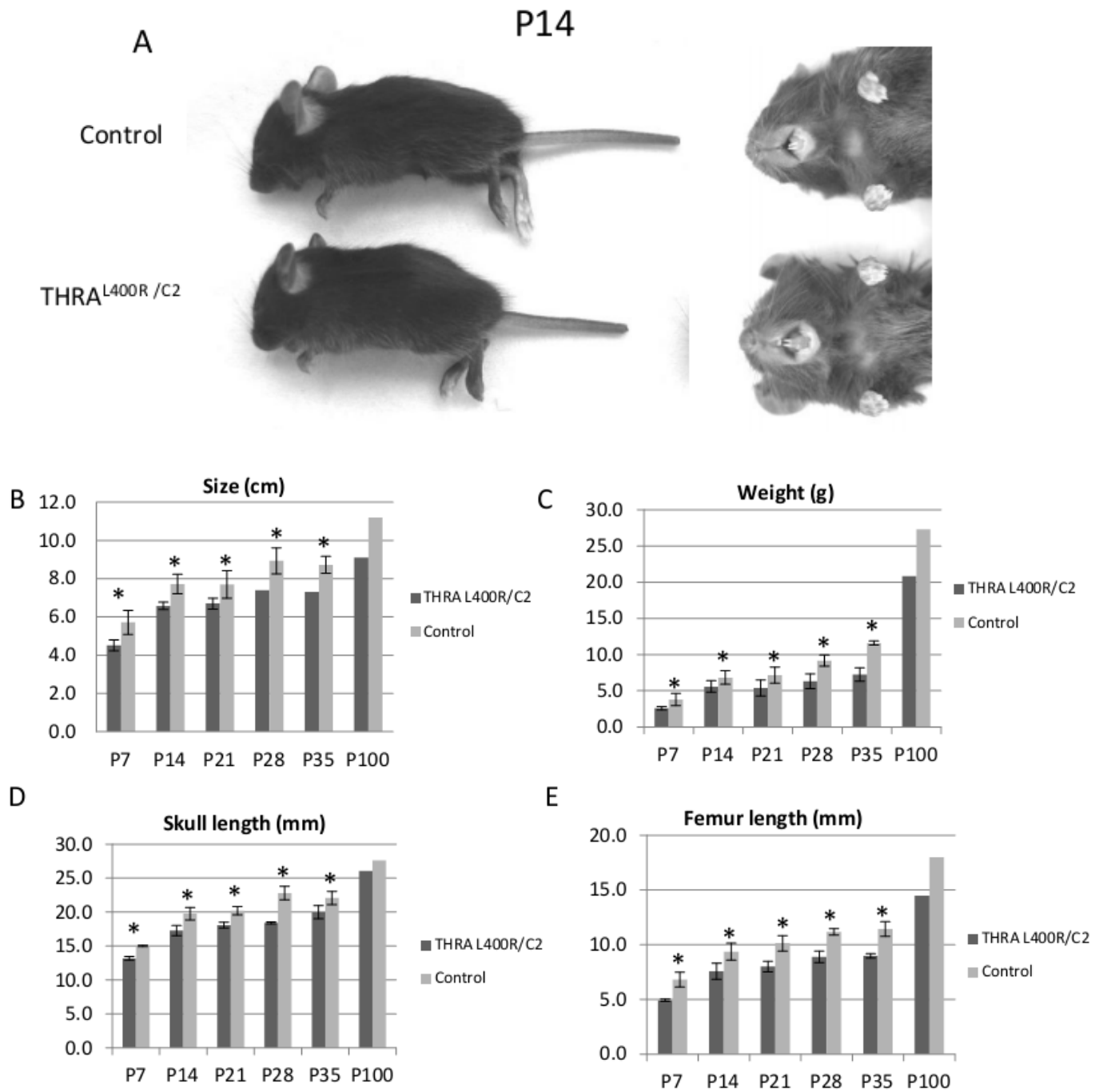


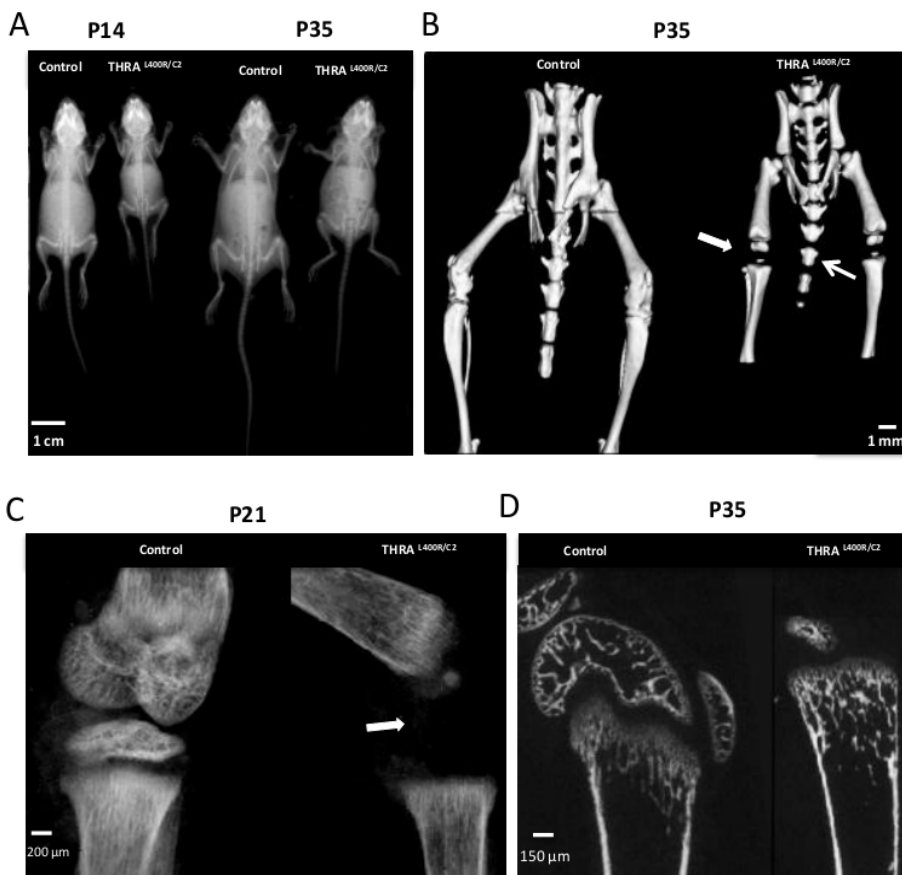
Figure 1: **Analysis of TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice phenotype** : (A) Mutant mice exhibited an important and persistent postnatal growth retardation (upper panel). (B) Size was 20% less and weight was 25% less for TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice compared to the control at all postnatal ages examined (graphics a and b, lower panel). Mutant femurs, tibiae, humeri, ulnae as well as paws were 20% shorter than bones from control animals at all examined stages (graphics c to f).

***TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice show skull abnormalities due to impaired endochondral ossification***

Macroscopically, TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice showed an abnormal skull conformation with a shorter snout (Figure 1). A 10% significant difference in length and width of skull between control and mutant mice was observed (supplementary Table 1). Detailed  $\mu$ CT analysis of the skull further revealed important phenotypic modifications, including an incomplete mineralization of supra-occipital bone at five weeks of age (Figure 3A). There is an occipital foramen in the TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 skulls. This phenotype is indicative of a delayed development of the occipital bones compared to controls. Interestingly, the affected parts correspond to a structure of cartilaginous

(Guihard-Costa and Sakka 1985). The sphenoccipital and intra-occipital synchondrosis seem to be normal in TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice compared to controls. There was no premature fusion of the sutures noticeable by  $\mu$ CT in mutant mice.

A morphometric analysis performed on skulls of P14, P21 and P35 mutants and controls made it possible to compare the allometric growth between both genotypes and to perform a principal component analysis (PCA). For the skull, the first PCA axis, which is highly correlated with age ( $p < 0.0001$ ), showed a progressive elongation of the skull, especially for the snout (Figure 3B).



**Figure 2: Comparative X-ray and 3D imaging analysis.** (A)- X-ray at P14, and P35 showing the dwarfism in TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice. (B)- 3D imaging confirmed the delay of ossification (arrows) at 5 week of age. (C)-High magnification at the level of the knee confirming the ossification delay in TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice at three weeks of age (arrows). (D) Ossification delay at 5 week of age (arrows)

origin, which is still unmineralized after birth

Segregation of control and mutant growth

lines on the analysis clearly indicates that the

skull shape is modified in mutants at all considered time points. Coordinates of mutant specimens along PC1 indicate a retarded growth, with an important delay at P35. The second PCA axis appeared to be uncorrelated with age ( $p=0.65$ ) and represent shape modification of the lower distal part of the skull. The apparent shift of growth lines along PC2 pointed out a reduced size of the supra-occipital area of the neurocranium. In contrast, study of mandibular shape revealed only minor differences between mutants and controls (Figure 3C), corresponding to a reduction in size of the angular process. Defects were observed mainly in cartilage-derived bone of the skull and since no differences were observed between  $TR\alpha^{L400R}/C1$  and control

mice, we conclude that the abnormal skull morphology results from impaired endochondral rather than intramembranous ossification.

***TR $\alpha^{L400R}/C2$  mice display impaired cartilage maturation and altered trabecular bone structure***

Comparison of the growth plate organization for  $TR\alpha^{L400R}/C2$  and control mice at 1, 2, 3 and 4 weeks of age, was based on histology (Figure 4) and type-II and type X collagen, osteocalcin (Figure 5), osteopontin and VEGF *in-situ* hybridization labelling. No obvious gross structural abnormality was observed, except the notable 2-3 weeks delay of secondary ossification center formation in the epiphysis of mutant mice.

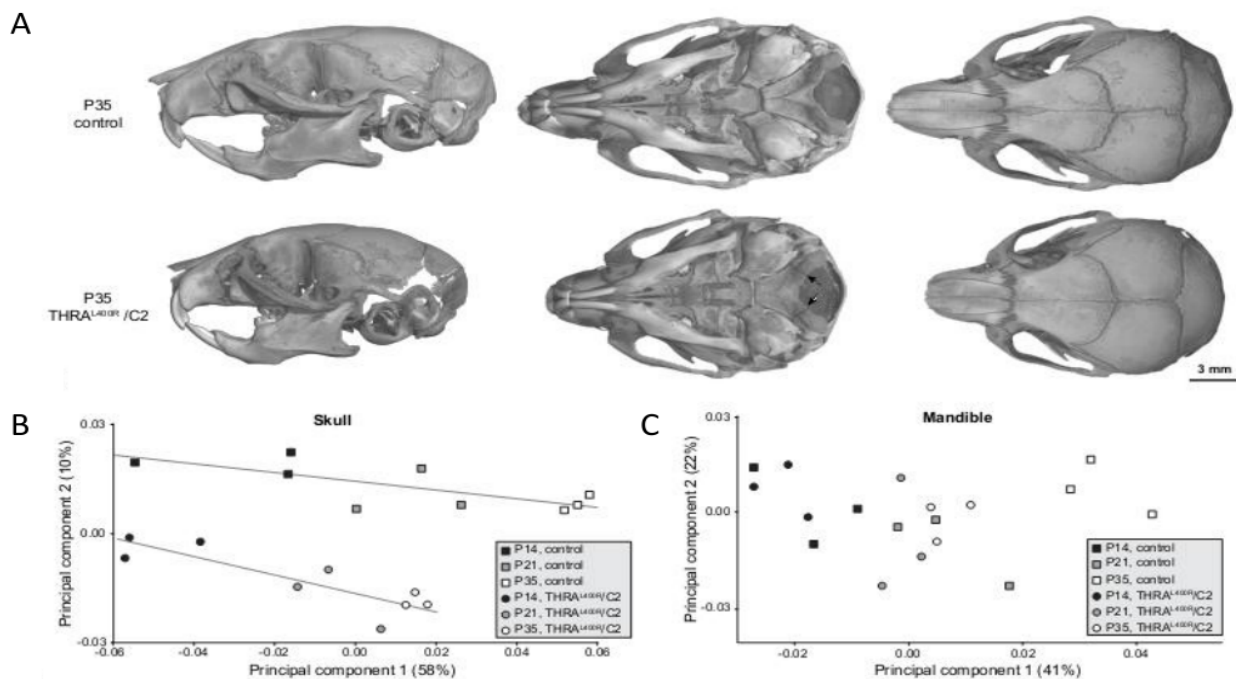


Figure 3: **Morphological modifications in skulls and mandibles of control and  $TR\alpha^{L400R}/C2$  mice.** A. Comparison of  $TR\alpha^{L400R}/C2$  and control mice at P35. Arrows indicate the un-fused intra-occipital suture in  $TR\alpha^{L400R}/C2$  mice. B-C Plot of principal components 1 and 2 based on Procrustes analysis of skull (B) and mandibular (C) 3D landmark coordinates of  $TR\alpha^{L400R}/C2$  and control mice at P14, P21 and P35.



No difference in VEGF expression was observed at any developmental stage (data not shown).

However, histomorphometry showed 20 % lower femur epiphysis height (supplementary Table 3). In addition, growth plate (GP) as well as proliferative (PZ) and hypertrophic zone (HZ) height were measured, showing a 10-15 % lower GP height due to a narrowing of both PZ (-10%) and HZ (-15%) as shown in Figure 6. During growth, control and mutant GP seemed to evolve in a similar way, except for the HZ whose decline with age appeared to be slower for mutant mice between 2 to 4 weeks. Noteworthy, lower GP height appeared to be proportionate to the smaller size of the femur epiphysis.

The rate of chondrocyte proliferation was investigated using BrdU incorporation and staining (Figure 7 and supplementary Table 4), showing a significant lower number of BrdU-positive cells in TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 PZ at 1 and 2 weeks. Chondrocyte proliferation decreased over-time, but at a slower rate in mutant mice. Consequently, no difference was observed in terms of BrdU-positive cells density at 3 weeks of age. Immunohistochemistry was also performed to explore cell cycle pathways, but Cyclin D1, p21 and p57 antibodies did not reveal any difference between mutants and controls at all development stages (data not shown).

Osteocalcin and osteopontin *in-situ* hybridizations were performed on TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 and control femurs to investigate bone structure. Osteocalcin expression was

restricted to osteoblasts lining trabecular and cortical bone in wild type mice. In TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice, osteocalcin was expressed in osteoblasts lining cortical bone and revealed the ossification delay of the secondary ossification center in the epiphysis bone (Figure 5C). Osteopontin expression pattern was not significantly different between wild type and mutant mice, except at 1 week when no signal could be detected in mutant epiphysis (data not shown).

To refine these observations,  $\mu$ CT was used to analyze subchondral and cortical bone (Figure 8 + supplementary Table 5). Lower bone mineral density and trabecular thickness were observed in femoral sub-chondral bone of TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 mice. In addition, an increase in trabecular number was observed at P14. The lower bone mineral density was the result of a decreased tissue mineral density, and not of bone volume fraction, suggesting that the quality, but not the volume of the mineralized bone was altered in mutant mice. Noteworthy, sub-chondral bone parameters of 5 week-old mutants appeared similar to bone parameters of 3 week-old controls, as exemplified by the PCA analysis (supplementary Figure S2). In cortical bone, the reduced cortical area in mutants suggested an imbalance between bone formation by osteoblasts of periosteum and endosteum and bone resorption by osteoclasts in the endosteum.

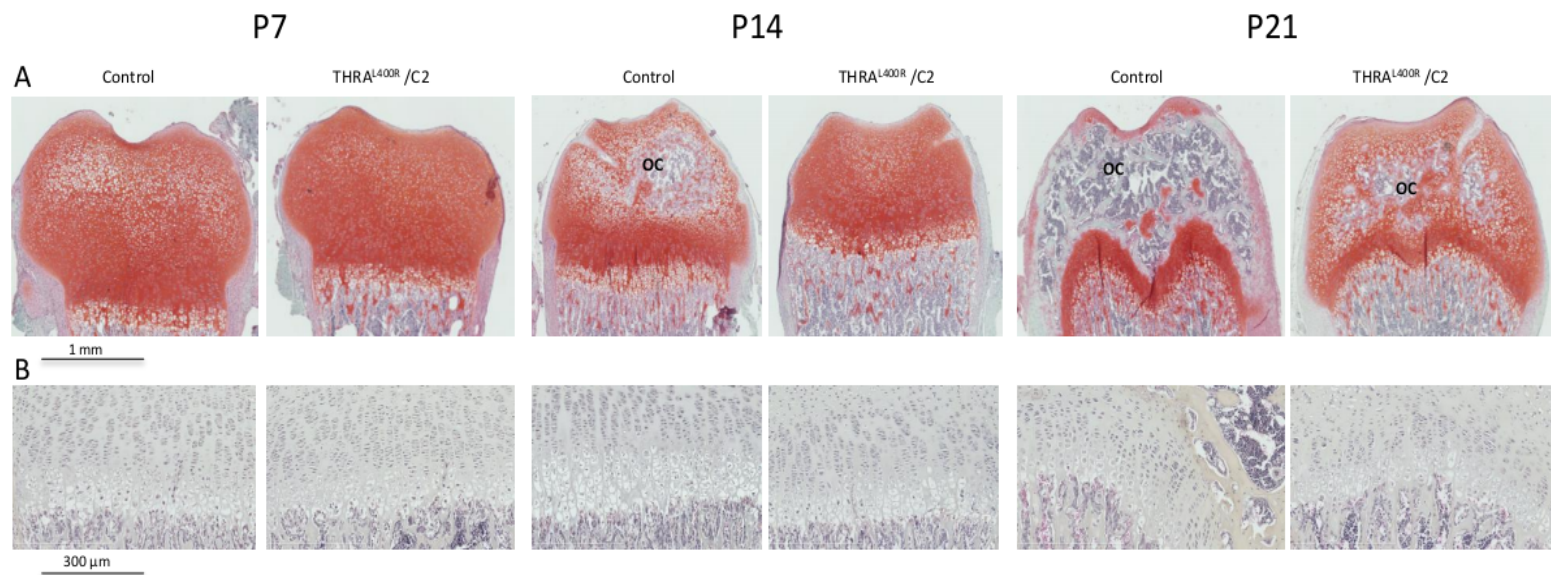


Figure 4: **Delay of ossification in THRA<sup>L400R</sup>/C2 femurs.** (A) Light green-Safranin O staining of control and THRA<sup>L400R</sup>/C2 femurs showing a delay of the formation of the epiphyseal ossification center (OC) in the mutant at P14 and P21. (B) Histological analyses of the growth plate showing normal cartilage from P7 to P21.

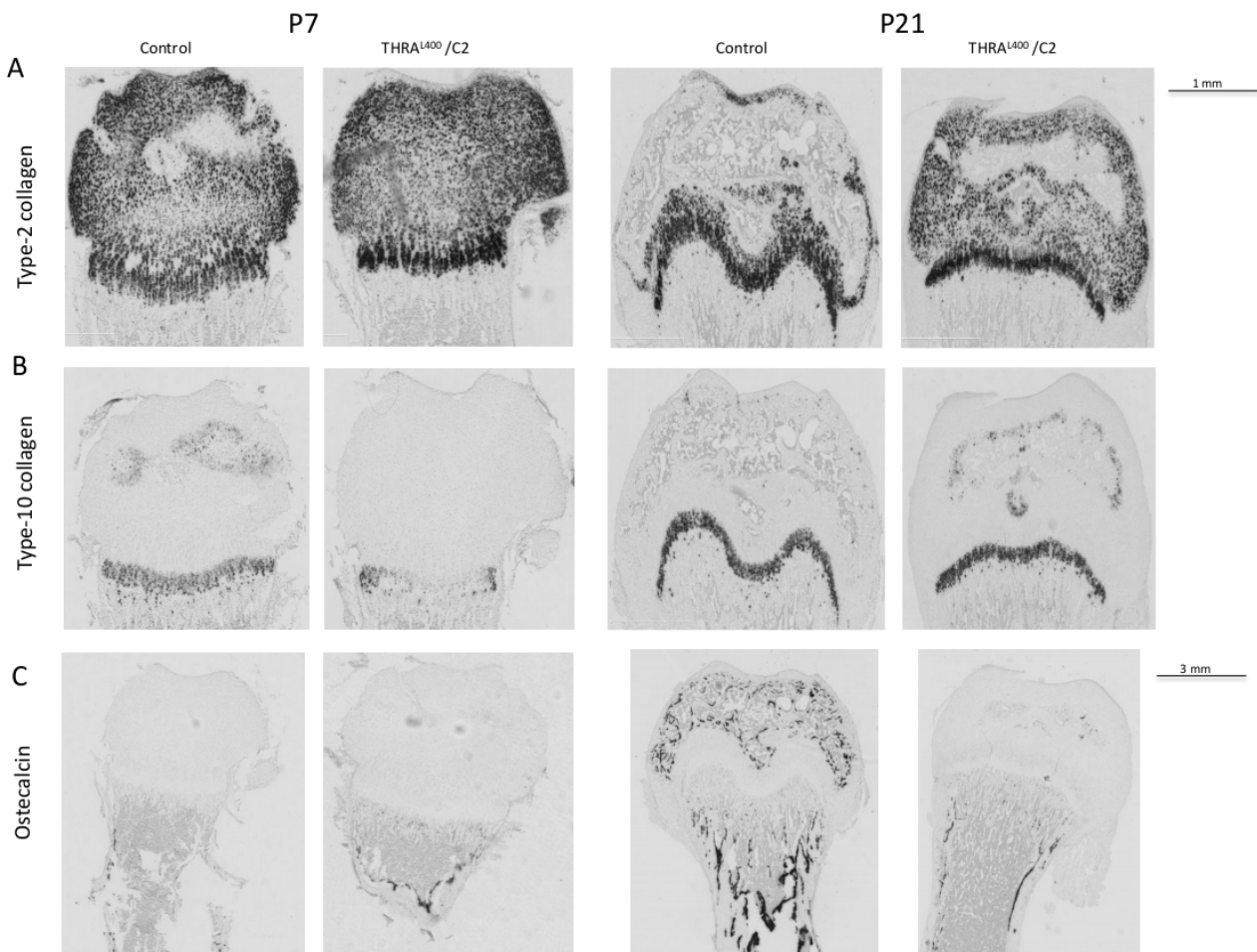


Figure 5: **Osteocalcin expression is correlated to the presence of osteoblasts.** (A) *In situ* hybridization of type II collagen showing a specific expression restricted to the cartilage. (B) *In situ* hybridization of type X collagen showing normal labeling of the hypertrophic zone in THRA<sup>L400R</sup>/C2 mice and its control littermate. (C) *In situ* hybridization of osteocalcin showing a specific expression of the protein in the mineralized tissues and confirming a delay of bone maturation.

By contrast, analysis of the cancellous bone volume fraction in proximal tibia did not reveal any difference between control and TR $\alpha^{L400R/+}$ /C1 mice expressing the dominant negative protein. Mineralizing surfaces, mineral apposition rate and bone formation rate were not significantly different in both groups (data not shown).

***Molecular mechanisms altered by the TR $\alpha^{L400R}$  mutation in cartilage***

To investigate molecular mechanisms altered by the TR $\alpha^{L400R}$  mutation in cartilage, we compared cartilage whole genome expression from two week-old TR $\alpha^{L400R}$ /C2 and control mice. DNA from six pairs of mutant and control littermates (three pairs of males and three pairs of females) were analyzed using Agilent SurePrint G3 Mouse Gene Expression microarrays. This analysis highlighted 95 down-regulated and 361 up-regulated genes (fold change  $\geq 1.5$ , adjusted p-value  $\leq 0.05$ ) in mutant mice (supplementary Table 6).

These genes are mainly involved in development (including 47 genes involved in skeletal development) cellular organization, cell communication, metabolic processes (including nucleic acid and protein metabolism as well as proteoglycan biosynthesis and bone mineralization), cell adhesion, vesicle-mediated transport, cell cycle and apoptosis (supplementary Table 7).

These modulated genes are associated with several skeletal phenotypes such as abnormal birth body size (MP:0009701) and skeleton morphology (MP:0005508), as well as abnormal bone ossification (MP:0008271). Statistically enriched biological processes include cell differentiation (GO:0030154), regulation of biosynthetic process (GO:0009889), regulation of primary metabolic process (GO:0080090) especially regulation of RNA metabolic process (GO:0051252) and regulation of nitrogen compound metabolic process (GO:0051171), as well as cell adhesion (GO:0007155) and cilium morphogenesis (GO:0060271) (supplementary Table 7).

Noteworthy, increased expression of Igf1r (x1.9) and Igf2r (x1.7) was observed, whereas no change in GHR and FGFR3 expression could be detected in our whole genome expression profiling study. Likewise, immunohistochemistry did not reveal any difference in FGFR3 expression between mutant and control mice (data not shown).

## Discussion

In the growth plate, TR $\alpha$ 1 and TR $\beta$ 1 are expressed in reserve and proliferating chondrocytes, suggesting these cells are direct targets for T3 action (Robson, Siebler et al. 2000). The generation of somatic mutations by Cre/loxP recombination reveals that TR $\alpha$ 1 in cartilage plays a predominant role in the promotion of bone growth by T3. This genetic evidence confirms previous hypotheses based

on *in vitro* studies (Rabier, Williams et al. 2006) and phenotype analysis of mice carrying germline mutations in cartilage (O'Shea, Bassett et al. 2005) and TR $\beta$  in bone (Monfoulet, Rabier et al. 2011). To further clarify the role of *Thra* in cartilage and bone, respectively, we studied the phenotypic and molecular defects induced by a tissue specific activation of the dominant-negative TR $\alpha$ 1<sup>L400R</sup> mutation in transgenic mice.

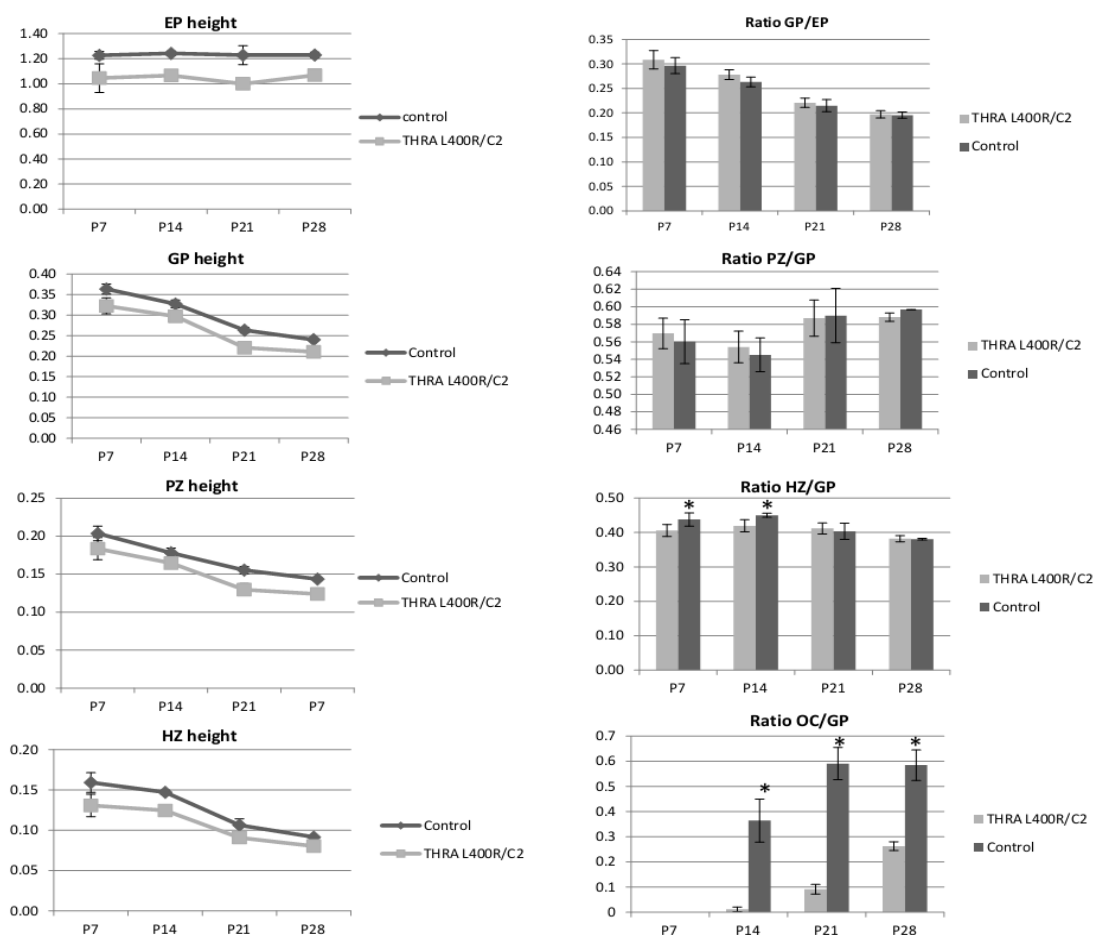


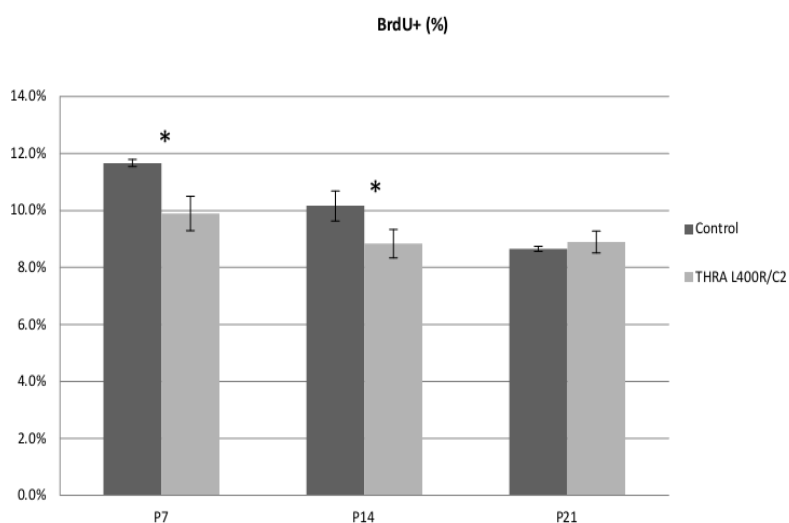
Figure 6: **Delayed endochondral ossification in THRA<sup>L400R</sup>/C2 mice.** Histomorphometry analysis of the growth plate showing that the heights of epiphysis (EP), growth plate (GP), proliferative zone (PZ) and hypertrophic zone (HZ) were reduced in THRA<sup>L400R</sup>/C2 mice compared to control littermates. Ratio calculation indicating that the GP height appeared to be proportionate to the size of the femur, the reduction of size of EP, PZ and HZ is proportional are proportional reduced to the size of the femur. The ratio OC/GP confirmed a delay of the endochondral ossification process.

### ***Comparison with previous *Thra* transgenic mouse models***

Cartilage-specific expression of the mutation resulted in a hypothyroidism-like phenotype, including severe 20% lower postnatal growth, a 10-20% lower growth plate height, delayed maturation of epiphysis and a 3 to 4 weeks delay in endochondral ossification, in good agreement with results observed previously in mice constitutively expressing the TR $\alpha$ 1<sup>PV</sup> mutation (O'Shea, Bassett et al. 2005). The strongly impaired maturation of epiphyses is consistent with clinical observations in young hypothyroid children. In TR $\alpha$ 1<sup>PV</sup> mutants, the delayed endochondral ossification was suggested to result from impaired transition of resting into proliferative chondrocytes, leading to a proportional narrowing of proliferating and hypertrophic zones. In our study we show however that the PZ evolves similarly in mutants and controls up to 4 weeks of age, whereas the mutant HZ decline at a slower rate than control HZ between 2 to 4 weeks. This suggests a

differential effect of *Thra* on proliferative and hypertrophic chondrocytes during growth.

In addition, TR $\alpha$ 1<sup>PV</sup> displayed delayed intramembranous ossification of the skull (delayed fontanelle closure and suture fusion), without any change in skull dimension. Here we report skull shape modifications in TR $\alpha$ <sup>L400R</sup>/C2 that results from impaired endochondral ossification of the supra-occipital bone and delayed intra-occipital suture fusion. The observed defect in snout elongation also leads to incisor malocclusion, which is likely to modify forces produced by masseter muscles attached on the angular process. Since, the angular process development is partly dependent on such forces (Rot-Nikcevic, Downing et al. 2007), it is tempting to speculate that on the one hand, the primary defect on supra-occipital bone may be indirectly responsible for the small changes observed at mutants mandible.



**Figure 7: Significant decreased of BrdU labeled cells in THRA<sup>L400R</sup>/C2 mice.** BrdU labelling showing a significant lower rate of chondrocyte proliferation in the femur growth plate at P7 and P14. No significant difference was observed at 3 weeks of age. These results strongly suggest that the proliferation of chondrocytes decreased over time but at a slower rate in mutant mice.

On the other hand, the Meckel cartilage may be disrupted, leading to the alteration of the size and the shape of the mandible.

The constitutive TR $\alpha$ 1<sup>PV</sup> mutation was shown to induce a small increase in TSH and the skeletal hypothyroidism was accompanied by impaired GH and IGF1 receptor expression and signaling in the growth plate. In opposite, no change in GHR expression was detected in our whole genome expression profiling study. In addition, increased expression of Igf1r (x1.9) and Igf2r (x1.7) was observed in two week-old femur epiphyses, in contrast to TR $\alpha$ 1<sup>PV</sup> mutants where Igf1r expression was not detected in the growth plate, although low levels of expression were evident in immature chondrocytes. Likewise, *in situ* hybridization showed a markedly reduced fgfr3 expression in TR $\alpha$ 1<sup>0/0</sup> mice (Barnard, Williams et al. 2005), whereas no change could be detected in our mouse model. These discrepancies may be due to the mutations themselves or may result from the differences in tissue specificity. Three human mutations have been reported recently, all located in the terminal exon and altering the C-terminal helix of the receptor (Bochukova, Schoenmakers et al. 2012, Moran, Schoenmakers et al. 2013, van Mullem, Chrysis et al. 2013). The patients share a number of phenotypic alterations, including short stature, but also display marled differences. It seems therefore that similar Thra mutations may produce different phenotype. A similar situation has been

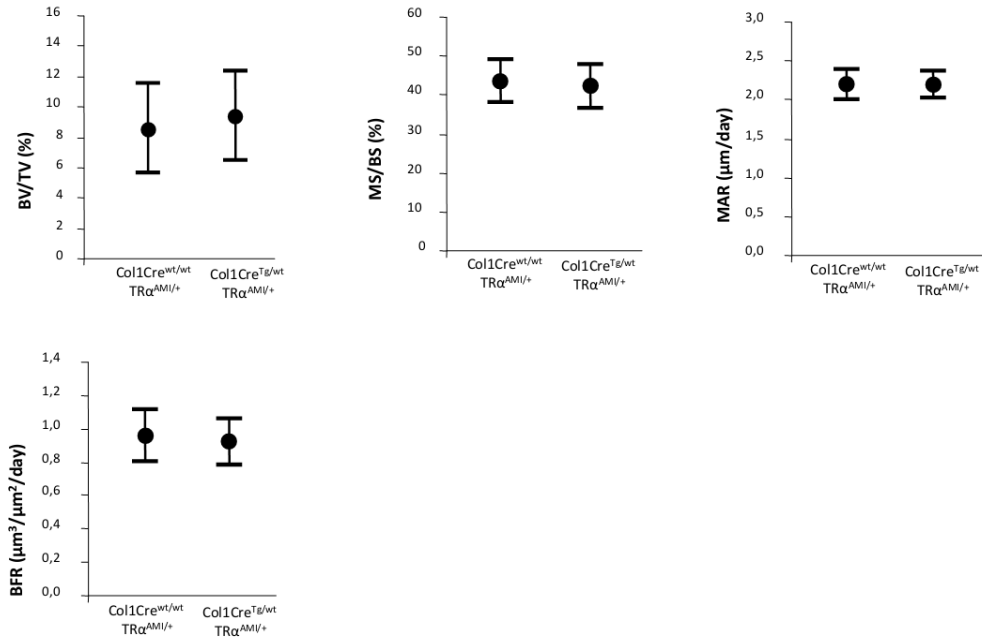
reported for Thr $\beta$  mutations, for which extensive *in vitro* studies showed that apparently similar changes in receptor structures can have different outcomes (Collingwood, Adams et al. 1994, Darimont, Wagner et al. 1998)

### ***Role of Thra in cartilage***

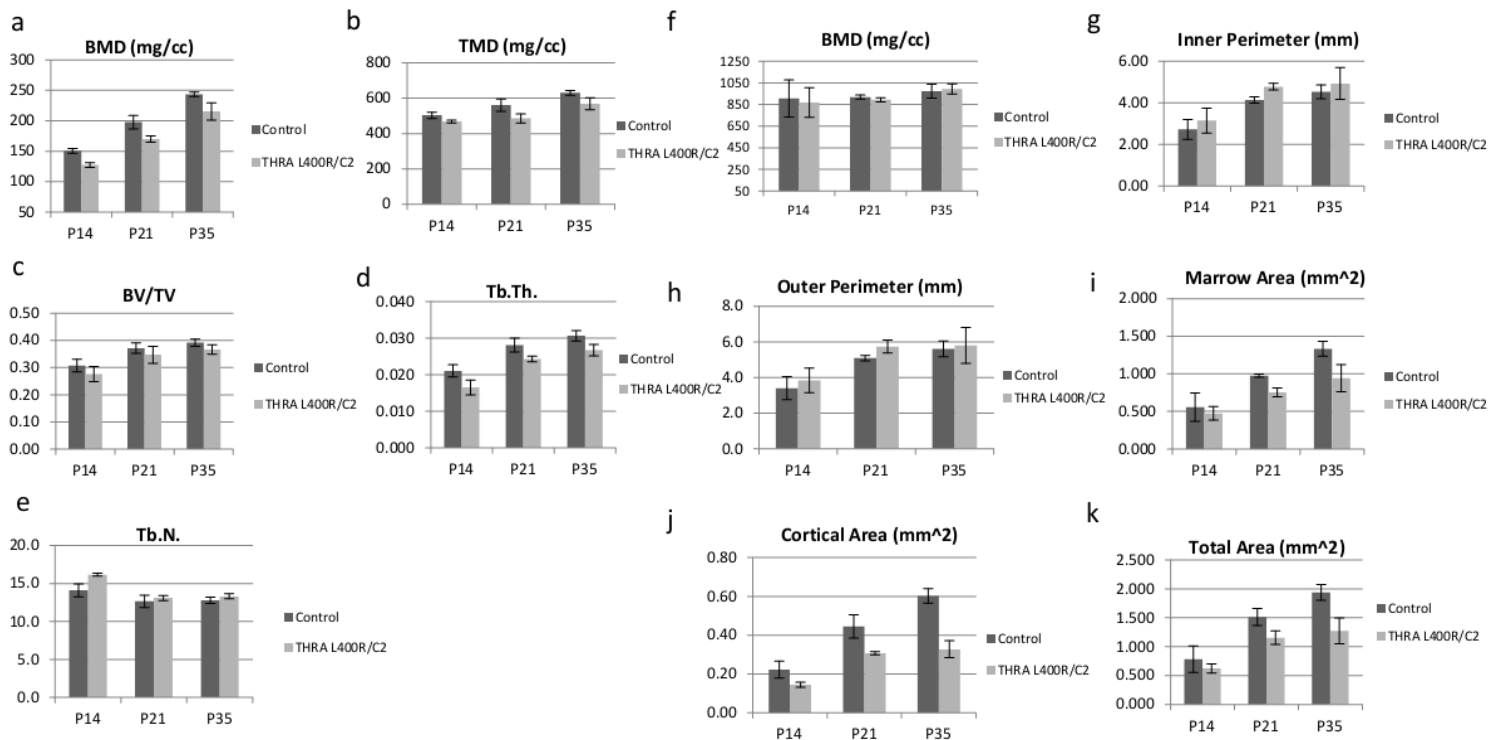
In cartilage, T3 is considered to act on chondrocyte proliferation, stimulating clonal expansion of resting chondrocytes and inhibiting chondrocyte proliferation. T3 treatment decreases proliferation of rib chondrocytes in wild type mice, independently of *Thra* (Rabier, Williams et al. 2006). In contrast, in our study, BrdU labeling showed a 5-15% lower chondrocyte proliferation rate in mutant mice, suggesting that *Thra* may be involved in mediating a positive effect of THs on chondrocyte proliferation. Such an effect would be in accordance with previous results obtained for hepatocytes, where THs have been shown to promote DNA-synthesis and G1/S cell-cycle progression (Alisi, Spagnuolo et al. 2004). Taken together, these data suggest that THs may control chondrocyte proliferation by two interacting and counteracting pathways involving TR $\alpha$  and TR $\beta$  respectively.

Consistent with the 15% lower number of proliferative cells that may trigger an insufficient 1.2 fold-change, no statistically significant change in cell cycle gene expression was observed in our whole genome expression study, except for Cyclin H (x1.6) and CDC26 (x1.8).

A



B



**Figure 8: Bone structure analysis:** Micro-computed tomography ( $\mu$ CT) was performed on femurs to analyze  $THRA^{L400R}/C1$  and  $THRA^{L400R}/C2$  mice bone structure. A- : The different parameters measured did not present significant differences between control and  $THRA^{L400R}/C1$  mice. B- In  $THRA^{L400R}/C2$  mutants, the subchondral trabecular bone displayed a lower BMD and TMD (a and b) at P14, P21 and P35. The trabecular thickness was also lower in mutant mice and the number of trabeculae was lower at P14 (d and e). The BV/TV ratio (c) was not significantly different between control and mutant mice. Taken together, these results suggest that the lower BMD resulted from a delay of mineralization in mutant mice but that the volume of the mineralized bone was not altered. There were significant differences between the cortical bone of control and mutant mice for the inner and the outer perimeters (g, h) and for the cortical and marrow areas (i, j). These data suggested an impaired balance between bone formation by osteoblasts of the periosteum and endosteum and bone resorption by osteoclasts in the endosteum.



T3 stimulates hypertrophic differentiation, as shown by induction of collagen type X expression, changes in heparan sulfate proteoglycan secretion and alkaline phosphatase activity upon T3 stimulation (Robson, Siebler et al. 2000, Bassett, Swinhoe et al. 2006). Likewise, THs are involved in terminal differentiation and capillary invasion by stimulating the degradation of proteoglycans, as illustrated by the aggrecan breakdown induced by TH enhancement of aggrecanase-2/ADAM-TS5 activity (Makihira, Yan et al. 2003). Previous studies have suggested that this action may be mediated primarily by TR $\alpha$  and that phenotypes resulting from dominant-negative mutation in TR $\beta$  result from excessive TR $\alpha$  stimulation, in line with a severely impaired pituitary-thyroid axis and elevated T3 levels (O'Shea, Harvey et al. 2003, O'Shea, Bassett et al. 2005). In contrast, *in vitro* studies have suggested that it could be mediated by TR $\beta$  (Rabier, Williams et al. 2006) and stimulation of BMP signaling (Lassova, Niu et al. 2009).

Here, we bring some insight into molecular mechanisms altered by alleviation of TH signaling mediated by TR $\alpha$  and suggest the receptor may be mainly involved in the crosstalk between several signaling pathways. Noteworthy, transcriptome analysis should be interpreted with caution, as changes in mRNA levels reflect direct effects on TR $\alpha$ 1 target genes, as well as indirect effects of this deregulation. In addition, we can't rule out that some changes may only reflect differences in

cells population and tissue composition. As exemplified by *in situ* hybridization results, down-regulation of Osteocalcin (+12.5) is more related to a reduced number of osteoblast located in the femoral head due to the delayed secondary ossification process. However, major changes in local signaling are obvious. Firstly, modulated genes are involved in extracellular matrix biosynthesis, structure and dynamics. Surprisingly only a few genes encoding structural components of the ECM were identified, including Bcan (+2.2) and Gpc3 (x1.9). In contrast, several genes involved in ECM component biosynthesis or catabolism were found to be modulated. For example, down-regulation of Mmp10 (+2.8) may impair proteoglycan degradation. Likewise, up-regulation of Csgalnact1 (x2.3) and Chst13 (x1.7), which are involved in chondroitin sulfate (CS) synthesis and sulfation, and Hyal2 (x1.8), which is essential for the breakdown of hyaluronan (HA), may lead to a disruption of ECM biomechanical properties. This may impact numerous signaling pathways since CS and HA are major components of the ECM known to influence chondrocyte proliferation and differentiation. In good agreement with the previous study of (Bassett, Swinhoe et al. 2006), up-regulation of Hs6st2 (x1.7) was also observed, suggesting changes in heparin sulfate sulfation pattern that may alter its biological functions, especially regulation of aggrecan metabolism and sequestration and diffusion of several growth factors such as FGFs and IHH.

Our data also suggest interactions with other signaling pathways. In particular, up-regulation of *Smoc1* (x1.8), a known BMP antagonist was observed, as well as up-regulation of *Igf1r* (x1.9), *Igf2r* (x1.7) and *Igf2bp2* (x1.6). T3 has been shown to stimulate *Igf1r* expression (Wang, Shao et al. 2010) *in vitro* and *Igf-1* is thought to stimulate proliferation of resting-zone chondrocytes, increase chondrocyte hypertrophy and promote longitudinal bone growth (van der Eerden, Karperien et al. 2003). Up-regulation of its receptors in  $TR\alpha^{L400R}/C2$  mice seems thus conflicting with the observed phenotype. This apparent inconsistency may be the result of up-regulation of some inhibitors. For instance, *Wisp3* (x2.6) has been demonstrated to suppress IGF1 signaling in chondrocytes and to be part of a WISP3–IGF1 regulatory loop whereby *Wisp3* restricts IGF1-mediated chondrocytes hypertrophy (Repudi, Patra et al. 2013). Likewise, *Igf2bp2* (x1.6) is known to counteract IGF1 signaling (Firth and Baxter 2002). Alternatively, this may result from an impaired crosstalk with the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways, which has been shown to act downstream of IGF1 signaling to stimulate growth plate chondrocyte proliferation and promote hypertrophy (Wang, Shao et al. 2010). Indeed, up-regulation of Wnt antagonist *Sfrp1* (x2.4) and *Sfrp2* (x2) as well as frizzled receptors *Fzd2* (x1.9) and *Fzd9* (x2) may alter Wnt signaling and may result in decreased proliferation and altered differentiation. In addition, *Sox9* (x2.7) is known to inhibit Wnt signaling (Topol, Chen et al. 2009) and its overexpression in mouse chondrocytes results

in a delayed endochondral ossification due to inhibition of proliferation and differentiation (Akiyama, Lyons et al. 2004). Furthermore, Wnt signaling depends largely upon the cytoskeleton and ciliary signaling (May-Simera and Kelley 2012). Interestingly, involvement of cytoskeleton, primary cilium and cell adhesion represent another striking feature emerging from our data. The role of cell shape, cell–cell and cell–ECM interactions, all relying on the cytoskeleton, as well as ciliary signaling are now well recognized and considered as essential to the maturation of chondrocytes (Woods, Wang et al. 2007).

Our microarray analysis identified a number of changes in gene expression. Some of the changes correspond to direct TR targets genes, and are likely to play a causative role in the observed phenotype, while others may reflect altered cell differentiation status. We tried to recognize some of the direct target genes by comparing our dataset with similar transcriptome analysis performed in other tissues (Chan and Privalsky 2009, Gil-Ibañez, Morte et al. 2013, Lin, Sieglaff et al. 2013) and by using the genome-wide TR occupancy data recently performed in a neural cell line (Fauquier, Romero et al. 2011). We expected that at least some of the target genes would be shared by different cell types. This was not the case. It seems therefore that, as previously reported for other nuclear receptors, the repertoire of TR target genes widely differs between different cell types.

### ***Role of *Thra* in bone***

T3 is thought to stimulate osteoblast differentiation and activity (Harvey, O'Shea et al. 2002), as well as osteoclast proliferation and activity. Although osteoclasts express TR $\alpha$  and TR $\beta$ , their responses to T3 seems to be indirect and mediated by osteoblasts through the expression of RANKL, IL-6, IL-8 and prostaglandin E2 (for review see Wojcicka, Bassett et al. 2013). Mice harbouring mutations in the *Thra* gene that either prevent synthesis of the receptor (Gauthier, Plateroti et al. 2001, Bassett, O'Shea et al. 2007) or produce a dominant negative receptor isoform (O'Shea, Bassett et al. 2005, Bassett, Nordstrom et al. 2007) show delayed ossification during the first three weeks after birth. However, these mice exhibit a rapid catch up of bone volume and mineralization, which reach much higher values than in wild type controls. In good agreement with these results, our data show that in mice expressing the dominant negative TR $\alpha$  receptor selectively in chondrocytes, the growth plate is disorganized with persistence of cartilaginous matrix and delayed ossification. The persistence of chondrocytes in the epiphysis is correlated with a considerable delay of ossification, with very few osteoblasts detected until three weeks of age in this area. Abnormalities are milder in subchondral bone, however the trabeculae have a reduced mineral density and a lower thickness, suggesting that ossification is disturbed. Our findings that several genes related to matrix protein post-translational modifications are altered in

mutants suggest that the quality of the extracellular matrix deposited by chondrocytes may impair subsequent action of osteoblasts. In contrast with these alterations of bone maturation in mice harbouring a chondrocyte-selective *Thra* mutation, the phenotype of mice expressing the dominant negative receptor in osteoblasts is unaltered. Thus, *Thra* does not exert a role in primary ossification through the control of osteoblast or osteoclasts activity but instead is primarily involved in the control of growth plate chondrocyte differentiation. The delayed ossification in mutant mice results primarily from the growth plate impairment, in good agreement with previous studies suggesting that impaired chondrocyte terminal differentiation may be responsible for a defective bone development (Mugniery, Dacquin et al. 2012, Lu, Wan et al. 2013).

The delayed formation of the secondary ossification center may result from impaired vascular invasion and/or osteoblast and osteoclast recruitment. In this respect, we identified several down-regulated chemokines (Ccl3  $\div$ 2.4, Ccl4  $\div$ 1.6, Ccl9  $\div$ 2.3 and Ccl12  $\div$ 1.6) and secreted proteins (Osteocalcin  $\div$ 12.5, Osteocrin  $\div$ 2.2 and Wisp2  $\div$ 2.2) that may take part to these defective processes. Indeed these chemokines are involved in angiogenesis (Tsui, Das et al. 2007, Wu, Li et al. 2008, Sahin, Grouls et al. 2011, Hashimoto, Singh et al. 2013). In addition CCL9 and CCL3 has also been shown to play a key role in osteoclastogenesis and osteoclast function (Yang, Mailhot et al. 2006) (Taddei, Queiroz-Junior et al. 2013).

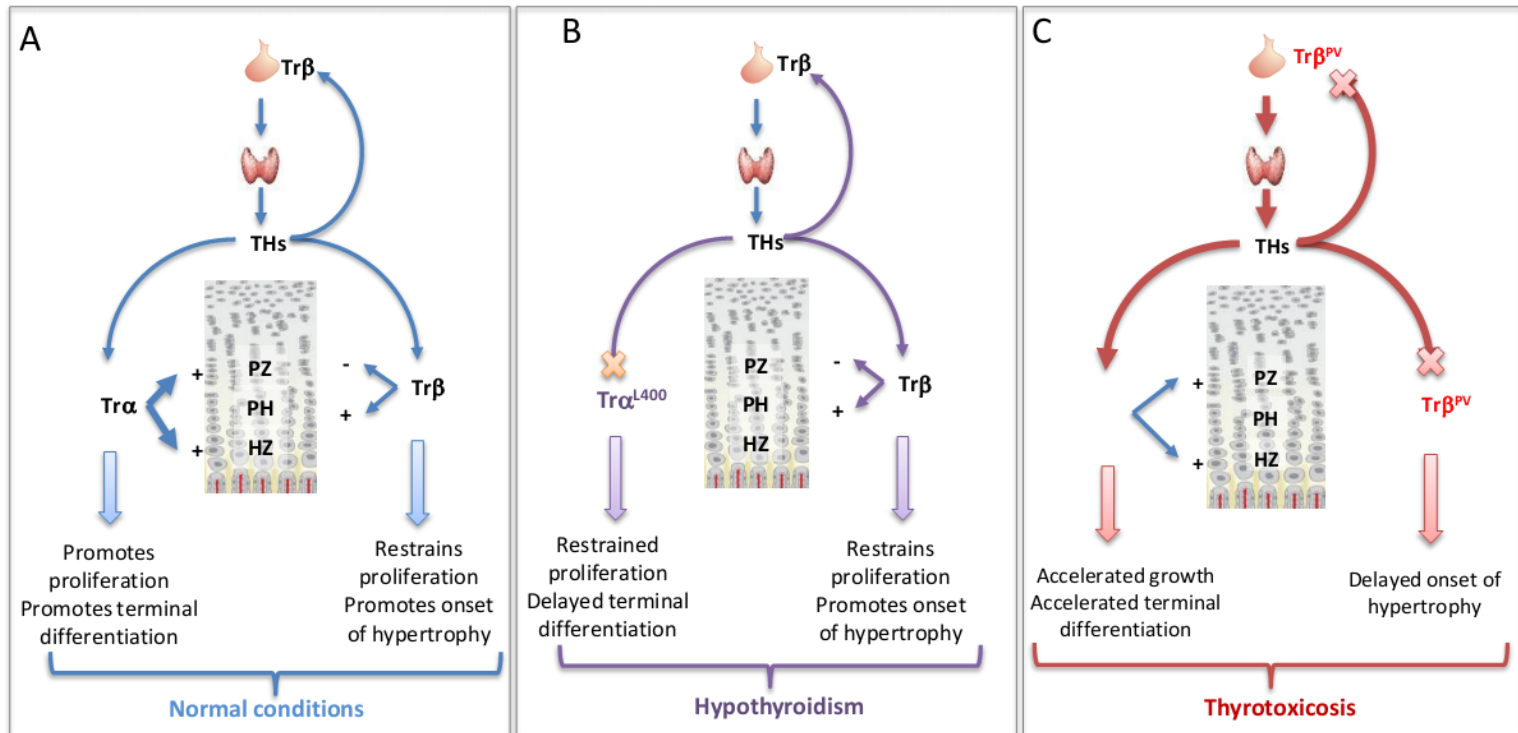


Figure 9: **Role of Tr $\alpha$  on the chondrocyte differentiation and proliferation in normal (A) and pathological conditions (B-C)**

Likewise, Osteocalcin (Bglap) produced by osteoblasts enhances osteoclastogenesis (Hashimoto, Kobayashi et al. 2001), regulates the growth and size of hydroxyapatite crystal and recruits osteoclast precursors to resorption sites and facilitates their differentiation to osteoclasts (Roach 1994). Furthermore, Ccl4 is thought to play a role in maturation and function of osteoblasts (Hoshino, Iimura et al. 2010) and Osteocrin acts as a soluble inhibitor of osteoblast differentiation (Thomas, Moffatt et al. 2003).

In summary, we demonstrate that a dominant-negative mutation in Tr $\alpha$  does not impair onset of chondrocyte hypertrophy, nor the hypertrophic process per se, but rather alters the fine tuning of

terminal differentiation, leading to delayed ossification (Figure 9). Our data support the hypothesis that an impaired chondrocyte terminal differentiation may be responsible for a defective vascularization and/or osteoblast recruitment, leading to a delayed development of secondary ossification center.

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr Mallein-Gerin from Institute of Biology and Chemistry of Proteins (LBTi, CNRS-LIMR 5305, Lyon) for providing us the Col2Cre mouse model.

This study was in part funded by a starting grant from INRA Animal genetics Department and UMR1313 GABI.

## Author Contribution

Study design: LS. Study conduct: CD, LS, LLM and FF. Data collection: CD, JR, CM, CBL, CC, OC, JLC. Data analysis and interpretation: LS, CD, LLM, FF, DL, CC, OC. Manuscript writing and revising: LS, CD, LLM, FF and OC.

All authors state that they have no conflicts of interest.

## References

- Akiyama, H., J. P. Lyons, Y. Mori-Akiyama, X. Yang, R. Zhang, Z. Zhang, J. M. Deng, M. M. Taketo, T. Nakamura, R. R. Behringer, P. D. McCrea and B. de Crombrughe (2004). "Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation." *Genes Dev* **18**(9): 1072-1087.
- Alisi, A., S. Spagnuolo, S. Napoletano, A. Spaziani and S. Leoni (2004). "Thyroid hormones regulate DNA-synthesis and cell-cycle proteins by activation of PKC $\alpha$  and p42/44 MAPK in chick embryo hepatocytes." *J Cell Physiol* **201**(2): 259-265.
- Ballock, R. T., X. Zhou, L. M. Mink, D. H. Chen, B. C. Mita and M. C. Stewart (2000). "Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in epiphyseal chondrocytes induced to terminally differentiate with thyroid hormone." *Endocrinology* **141**(12): 4552-4557.
- Barnard, J. C., A. J. Williams, B. Rabier, O. Chassande, J. Samarut, S. Y. Cheng, J. H. Bassett and G. R. Williams (2005). "Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis." *Endocrinology* **146**(12): 5568-5580.
- Bassett, J. H., K. Nordstrom, A. Boyde, P. G. Howell, S. Kelly, B. Vennstrom and G. R. Williams (2007). "Thyroid status during skeletal development determines adult bone structure and mineralization." *Mol Endocrinol* **21**(8): 1893-1904.
- Bassett, J. H., P. J. O'Shea, S. Sriskantharajah, B. Rabier, A. Boyde, P. G. Howell, R. E. Weiss, J. P. Roux, L. Malaval, P. Clement-Lacroix, J. Samarut, O. Chassande and G. R. Williams (2007). "Thyroid hormone excess rather than thyrotropin deficiency induces osteoporosis in hyperthyroidism." *Mol Endocrinol* **21**(5): 1095-1107.
- Bassett, J. H., R. Swinhoe, O. Chassande, J. Samarut and G. R. Williams (2006). "Thyroid hormone regulates heparan sulfate proteoglycan expression in the growth plate." *Endocrinology* **147**(1): 295-305.
- Bassett, J. H., A. J. Williams, E. Murphy, A. Boyde, P. G. Howell, R. Swinhoe, M. Archanco, F. Flamant, J. Samarut, S. Costagliola, G. Vassart, R. E. Weiss, S. Refetoff and G. R. Williams (2008). "A Lack Of Thyroid Hormones Rather Than Excess Thyrotropin Causes Abnormal Skeletal Development In Hypothyroidism." *Mol Endocrinol* **22**: 501-512 ST - A lack of thyroid hormones rather tha.
- Bassett, J. H. and G. R. Williams (2003). "The Molecular Actions Of Thyroid Hormone In Bone." *Trends Endocrinol Metab* **14**: 356-364 ST - The molecular actions of thyroid horm.
- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**(1): 289-300.
- Bochukova, E., N. Schoenmakers, M. Agostini, E. Schoenmakers, O. Rajanayagam, J. M. Keogh, E. Henning, J. Reinemund, E. Gevers, M. Sarri, K. Downes, A. Offiah, A. Albanese, D. Halsall, J. W. Schwabe, M. Bain, K. Lindley, F. Muntoni, F. Vargha-Khadem, M. Dattani, I. S. Farooqi, M. Gurnell and K. Chatterjee (2012). "A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene." *N Engl J Med* **366**(3): 243-249.
- Bochukova, E., N. Schoenmakers, M. Agostini, E. Schoenmakers, O. Rajanayagam, J. M. Keogh, E. Henning, J. Reinemund, E. Gevers, M. Sarri, K. Downes, A. Offiah, A.

- Albanese, D. Halsall, J. W. Schwabe, M. Bain, K. Lindley, F. Muntoni, F. Vargha-Khadem, F. V. Khadem, M. Dattani, I. S. Farooqi, M. Gurnell and K. Chatterjee (2012). "A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene." N Engl J Med **366**(3): 243-249.
- Bohme, K., M. Conscience-Egli, T. Tschan, K. H. Winterhalter and P. Bruckner (1992). "Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine." J Cell Biol **116**(4): 1035-1042.
- Burch, W. M. and H. E. Lebovitz (1982). "Triiodothyronine stimulation of in vitro growth and maturation of embryonic chick cartilage." Endocrinology **111**(2): 462-468.
- Chan, I. H. and M. L. Privalsky (2009). "Isoform-specific transcriptional activity of overlapping target genes that respond to thyroid hormone receptors alpha1 and beta1." Mol Endocrinol **23**(11): 1758-1775.
- Collingwood, T. N., M. Adams, Y. Tone and V. K. Chatterjee (1994). "Spectrum of transcriptional, dimerization, and dominant negative properties of twenty different mutant thyroid hormone beta-receptors in thyroid hormone resistance syndrome." Mol Endocrinol **8**(9): 1262-1277.
- Darimont, B. D., R. L. Wagner, J. W. Apriletti, M. R. Stallcup, P. J. Kushner, J. D. Baxter, R. J. Fletterick and K. R. Yamamoto (1998). "Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions." Genes Dev **12**(21): 3343-3356.
- Fauquier, T., E. Romero, F. Picou, F. Chatonnet, X. N. Nguyen, L. Quignodon and F. Flamant (2011). "Severe impairment of cerebellum development in mice expressing a dominant-negative mutation inactivating thyroid hormone receptor alpha1 isoform." Dev Biol **356**(2): 350-358.
- Firth, S. M. and R. C. Baxter (2002). "Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins." Endocr Rev **23**(6): 824-854.
- Flamant, F. and L. Quignodon (2010). "Use Of A New Model Of Transgenic Mice To Clarify The Respective Functions Of Thyroid Hormone Receptors In Vivo." Heart Fail Rev **15**: 117-120 ST - Use of a new model of transgenic mice.
- Gauthier, K., M. Plateroti, C. B. Harvey, G. R. Williams, R. E. Weiss, S. Refetoff, J. F. Willott, V. Sundin, J. P. Roux, L. Malaval, M. Hara, J. Samarut and O. Chassande (2001). "Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus." Mol Cell Biol **21**(14): 4748-4760.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang and J. Zhang (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.
- Gil-Ibañez, P., B. Morte and J. Bernal (2013). "Role of thyroid hormone receptor subtypes  $\alpha$  and  $\beta$  on gene expression in the cerebral cortex and striatum of postnatal mice." Endocrinology **154**(5): 1940-1947.
- Guihard-Costa, A. M. and M. Sakka (1985). Morphogenèse du supraoccipital. Etude expérimentale chez la souris. Mammalia. **49**: 551.
- Harvey, C. B., P. J. O'Shea, A. J. Scott, H. Robson, T. Siebler, S. M. Shalet, J. Samarut, O. Chassande and G. R. Williams (2002). "Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function." Mol Genet Metab **75**(1): 17-30.
- Hashimoto, F., Y. Kobayashi, S. Mataka, K. Kobayashi, Y. Kato and H. Sakai (2001). "Administration of osteocalcin accelerates orthodontic tooth movement induced by a closed coil spring in rats." Eur J Orthod **23**(5): 535-545.
- Hashimoto, Y., R. Singh and B. Lokeshwar (2013). "WNT SIGNALING PROTEIN (WISP2/CCN5) STIMULATES ANGIOGENESIS AND INVASION IN PROSTATE CANCER." The Journal of Urology **189**(4, Supplement): e209.
- Hoshino, A., T. Iimura, S. Ueha, S. Hanada, Y. Maruoka, M. Mayahara, K. Suzuki, T. Imai, M. Ito, Y. Manome, M. Yasuhara, T. Kirino, A. Yamaguchi, K. Matsushima and K. Yamamoto (2010). "Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts." J Biol Chem **285**(37): 28826-28837.
- Ishikawa, Y., B. R. Genge, R. E. Wuthier and L. N. Wu (1998). "Thyroid hormone inhibits growth and stimulates

terminal differentiation of epiphyseal growth plate chondrocytes." J Bone Miner Res **13**(9): 1398-1411.

Lassova, L., Z. Niu, E. B. Golden, A. J. Cohen and S. L. Adams (2009). "Thyroid hormone treatment of cultured chondrocytes mimics in vivo stimulation of collagen X mRNA by increasing BMP 4 expression." J Cell Physiol **219**(3): 595-605.

Lin, J. Z., D. H. Sieglaff, C. Yuan, J. Su, A. S. Arumanayagam, S. Firouzbakht, J. J. Cantu Pompa, F. D. Reynolds, X. Zhou, A. Cvorovic and P. Webb (2013). "Gene specific actions of thyroid hormone receptor subtypes." PLoS One **8**(1): e52407.

Lu, C., Y. Wan, J. Cao, X. Zhu, J. Yu, R. Zhou, Y. Yao, L. Zhang, H. Zhao, H. Li, J. Zhao, L. He, G. Ma, X. Yang, Z. Yao and X. Guo (2013). "Wnt-mediated reciprocal regulation between cartilage and bone development during endochondral ossification." Bone **53**(2): 566-574.

Mackie, E. J., L. Tatarczuch and M. Mirams (2011). "The Skeleton: A Multi-Functional Complex Organ: The Growth Plate Chondrocyte And Endochondral Ossification." J Endocrinol **211**: 109-121 ST - The skeleton: a multi-functional comp.

Makihira, S., W. Yan, H. Murakami, M. Furukawa, T. Kawai, H. Nikawa, E. Yoshida, T. Hamada, Y. Okada and Y. Kato (2003). "Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage." Endocrinology **144**(6): 2480-2488.

Marino, R. (2011). "Growth Plate Biology : New Insights." Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity **18**: 9-13.

May-Simera, H. L. and M. W. Kelley (2012). "Cilia, Wnt signaling, and the cytoskeleton." Cilia **1**(1): 7.

Miura, M., K. Tanaka, Y. Komatsu, M. Suda, A. Yasoda, Y. Sakuma, A. Ozasa and K. Nakao (2002). "Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate." J Bone Miner Res **17**(3): 443-454.

Monfoulet, L. E., B. Rabier, R. Dacquin, A. Anginot, J. Photosavang, P. Jurdic, L. Vico, L. Malaval and O. Chassande (2011). "Thyroid hormone receptor beta mediates thyroid hormone effects on bone remodeling and bone mass." J Bone Miner Res **26**(9): 2036-2044.

Moran, C., N. Schoenmakers, M. Agostini, E. Schoenmakers, A. Offiah, A. Kydd, G. Kahaly, S. Mohr-Kahaly, O. Rajanayagam, G. Lyons, N. Wareham, D. Halsall, M. Dattani, S. Hughes, M. Gurnell, S. M. Park and K. Chatterjee (2013). "An adult female with Resistance to Thyroid Hormone mediated by defective thyroid hormone receptor alpha." J Clin Endocrinol Metab.

Mugniery, E., R. Dacquin, C. Marty, C. Benoist-Lasselin, M. C. de Vernejoul, P. Jurdic, A. Munnich, V. Geoffroy and L. Legeai-Mallet (2012). "An activating Fgfr3 mutation affects trabecular bone formation via a paracrine mechanism during growth." Hum Mol Genet **21**(11): 2503-2513.

O'Shea, P. J., J. H. Bassett, S. Y. Cheng and G. R. Williams (2006). "Characterization of skeletal phenotypes of TRalpha1 and TRbeta mutant mice: implications for tissue thyroid status and T3 target gene expression." Nucl Recept Signal **4**: e011.

O'Shea, P. J., J. H. Bassett, S. Sriskantharajah, H. Ying, S. Y. Cheng and G. R. Williams (2005). "Contrasting skeletal phenotypes in mice with an identical mutation targeted to thyroid hormone receptor alpha1 or beta." Mol Endocrinol **19**(12): 3045-3059.

O'Shea, P. J., C. B. Harvey, H. Suzuki, M. Kaneshige, K. Kaneshige, S. Y. Cheng and G. R. Williams (2003). "A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone." Mol Endocrinol **17**(7): 1410-1424.

Parfitt, A. M. (1988). "Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units." Calcif Tissue Int **42**(5): 284-286.

Quignodon, L., S. Vincent, H. Winter, J. Samarut and F. Flamant (2007). "A Point Mutation In The Activation Function 2 Domain Of Thyroid Hormone Receptor Alpha1 Expressed After Cre-Mediated Recombination Partially Recapitulates Hypothyroidism." Mol Endocrinol **21**: 2350-2360 ST - A point mutation in the activation f.

R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Rabier, B., A. J. Williams, F. Mallein-Gerin, G. R. Williams and O. Chassande (2006). "Thyroid hormone-stimulated differentiation of primary rib chondrocytes in



vitro requires thyroid hormone receptor beta." J Endocrinol **191**(1): 221-228.

Repudi, S. R., M. Patra and M. Sen (2013). "WISP3-IGF1 interaction regulates chondrocyte hypertrophy." J Cell Sci **126**(Pt 7): 1650-1658.

Roach, H. I. (1994). "Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption." Cell Biol Int **18**(6): 617-628.

Robson, H., T. Siebler, D. A. Stevens, S. M. Shalet and G. R. Williams (2000). "Thyroid Hormone Acts Directly On Growth Plate Chondrocytes To Promote Hypertrophic Differentiation And Inhibit Clonal Expansion And Cell Proliferation." Endocrinology **141**(10): 3887-3897.

Rot-Nikcevic, I., K. J. Downing, B. K. Hall and B. Kablar (2007). "Development of the mouse mandibles and clavicles in the absence of skeletal myogenesis." Histol Histopathol **22**(1): 51-60.

Sahin, H., C. Grouls, M. M. Zaldivar, P. Schmitz, E. Borkham-Kamphorst, M. J. Moeller, F. Kiessling, C. Trautwein and H. E. Wasmuth (2011). "CXCL9 attenuates CC14 induced angiogenesis and liver fibrosis in vivo." Z Gastroenterol **49**(08): P446.

Sakai, K., L. Hiripi, V. Glumoff, O. Brandau, R. Eerola, E. Vuorio, Z. Bosze, R. Fassler and A. Aszodi (2001). "Stage-and tissue-specific expression of a Col2a1-Cre fusion gene in transgenic mice." Matrix Biol **19**(8): 761-767.

Schlesinger, S., M. H. MacGillivray and R. W. Munschauer (1973). "Acceleration of growth and bone maturation in childhood thyrotoxicosis." J Pediatr **83**(2): 233-236.

Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**: Article3.

Stevens, D. A., R. P. Hasserjian, H. Robson, T. Siebler, S. M. Shalet and G. R. Williams (2000). "Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation." J Bone Miner Res **15**(12): 2431-2442.

Taddei, S. R., C. M. Queiroz-Junior, A. P. Moura, I. Andrade, Jr., G. P. Garlet, A. E.

Proudfoot, M. M. Teixeira and T. A. da Silva (2013). "The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice." Bone **52**(1): 259-267.

Thomas, G., P. Moffatt, P. Salois, M. H. Gaumont, R. Gingras, E. Godin, D. Miao, D. Goltzman and C. Lanctot (2003). "Osteocrin, a novel bone-specific secreted protein that modulates the osteoblast phenotype." J Biol Chem **278**(50): 50563-50571.

Tinnikov, A., K. Nordström, P. Thorén, J. M. Kindblom, S. Malin, B. Rozell, M. Adams, O. Rajanayagam, S. Pettersson, C. Ohlsson, K. Chatterjee and B. Vennström (2002). "Retardation of post-natal development caused by a negatively acting thyroid hormone receptor alpha1." EMBO J **21**(19): 5079-5087.

Topol, L., W. Chen, H. Song, T. F. Day and Y. Yang (2009). "Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus." J Biol Chem **284**(5): 3323-3333.

Tsui, P., A. Das, B. Whitaker, M. Tornetta, N. Stowell, P. Kesavan, E. Kaiser, E. R. Lacy, L. Yan, L. A. Snyder and R. Sweet (2007). "Generation, characterization and biological activity of CCL2 (MCP-1/JE) and CCL12 (MCP-5) specific antibodies." Hum Antibodies **16**(3-4): 117-125.

van der Eerden, B. C., M. Karperien and J. M. Wit (2003). "Systemic And Local Regulation Of The Growth Plate." Endocr Rev **24**: 782-801.

van Mullem, A. A., D. Chrysis, A. Eythimiadou, E. Chroni, A. Tsatsoulis, Y. B. de Rijke, W. E. Visser, T. J. Visser and R. P. Peeters (2013). "Clinical phenotype of a new type of thyroid hormone resistance caused by a mutation of the TRalpha1 receptor; consequences of LT4 treatment." J Clin Endocrinol Metab.

van Mullem, A. A., D. Chrysis, A. Eythimiadou, E. Chroni, A. Tsatsoulis, Y. B. de Rijke, W. E. Visser, T. J. Visser and R. P. Peeters (2013). "Clinical phenotype of a new type of thyroid hormone resistance caused by a mutation of the TRalpha1 receptor; consequences of LT4 treatment." J Clin Endocrinol Metab.

Wang, L., Y. Y. Shao and R. T. Ballock (2007). "Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes." J Bone Miner Res **22**(12): 1988-1995.

Wang, L., Y. Y. Shao and R. T. Ballock (2010). "Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of beta-catenin signaling." J Bone Miner Res **25**(5): 1138-1146.

Williams, G. R., H. Robson and S. M. Shalet (1998). "Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth." J Endocrinol **157**(3): 391-403.

Wojcicka, A., J. H. Bassett and G. R. Williams (2013). "Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton." Biochim Biophys Acta **1830**(7): 3979-3986.

Woods, A., G. Wang and F. Beier (2007). "Regulation Of Chondrocyte Differentiation By The Actin Cytoskeleton And Adhesive Interactions." J Cell Physiol **213**: 1-8 ST - Regulation of chondrocyte differentiatio.

Wu, Y., Y. Y. Li, K. Matsushima, T. Baba and N. Mukaida (2008). "CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process." J Immunol **181**(9): 6384-6393.

Yang, M., G. Mailhot, C. A. MacKay, A. Mason-Savas, J. Aubin and P. R. Odgren (2006). "Chemokine and chemokine receptor expression during colony stimulating factor-1-induced osteoclast differentiation in the toothless osteopetrotic rat: a key role for CCL9 (MIP-1gamma) in osteoclastogenesis in vivo and in vitro." Blood **107**(6): 2262-2270.

Zuo, C., Y. Huang, R. Bajis, M. Sahih, Y. P. Li, K. Dai and X. Zhang (2012). "Osteoblastogenesis regulation signals in bone remodeling." Osteoporos Int **23**(6): 1653-1663.

# Supplementary data

S1

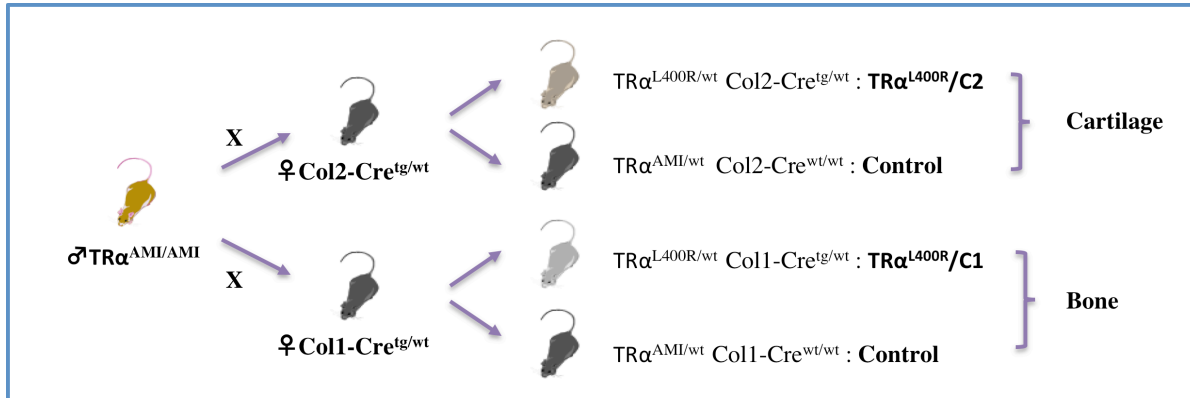
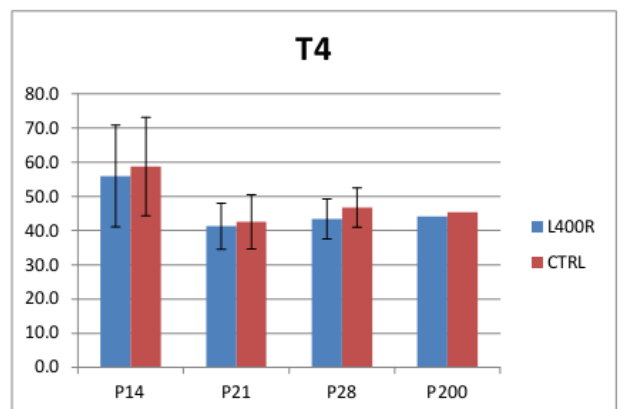
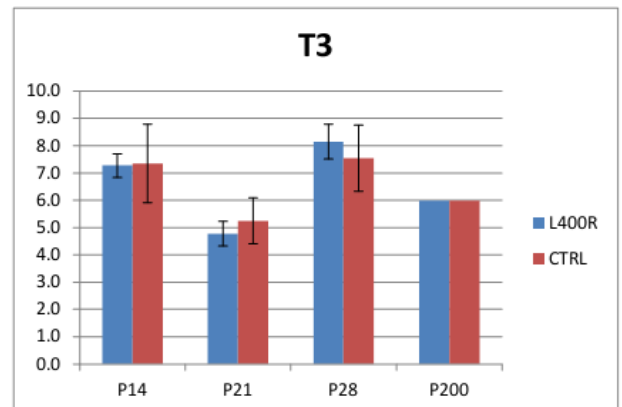


Table 2

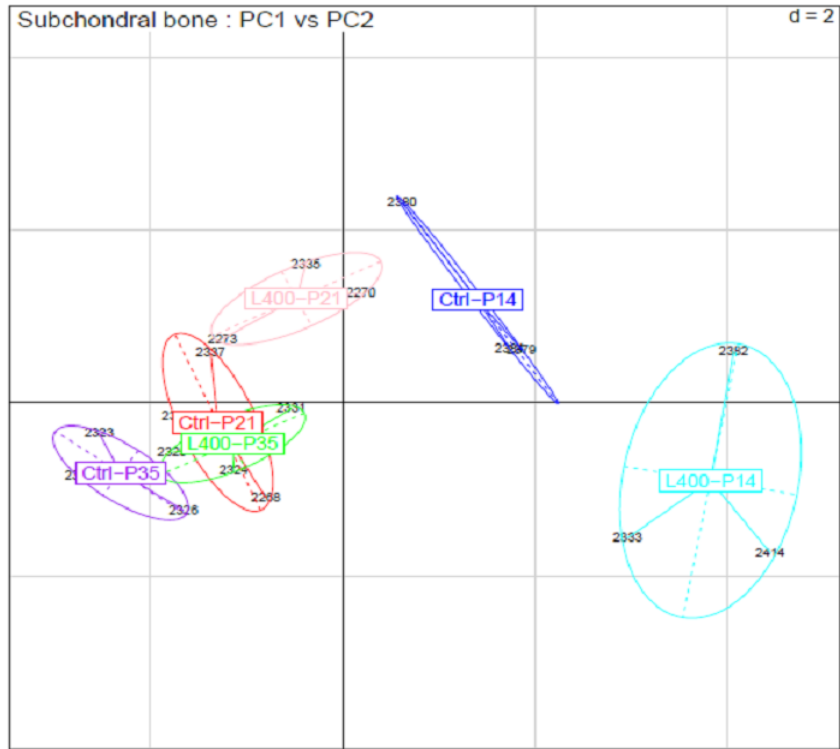
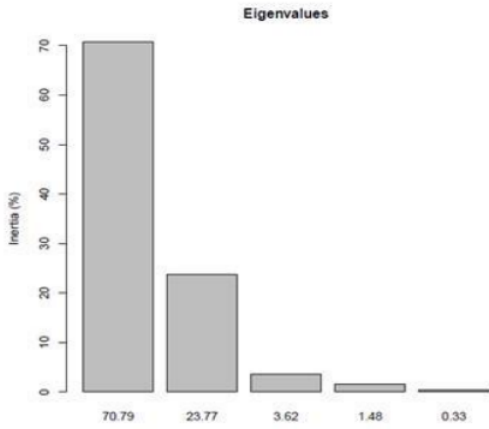
Age	TRαL400R/C2				CTRL			
	Mouse	Sex	T3	T4	Mouse	Sex	T3	T4
P14	1381	M	6.9	41.1	1389	M	5.7	45.0
P14	1430	F	6.8	66.8	1427	M	6.6	48.8
P14	1593	F	7.4	71.0	1591	F	8.4	75.8
P14	1598	M	7.8	62.2	1597	M	8.7	65.4
P14	1384	M	7.5	39.0				
<b>Mean</b>			<b>7.3</b>	<b>56.0</b>			<b>7.4</b>	<b>58.8</b>
<b>SD</b>			0.4	14.9			1.4	14.4
<b>p_value</b>							<b>0.9</b>	<b>0.8</b>
P21	1564	M	4.4	37.2	1570	M	4.0	32.8
P21	1567	M	5.4	48.6	1565	F	5.6	41.0
P21	1350	M	4.8	34.2	1351	M	5.8	52.0
P21	1353	F	4.5	45.3	1347	F	5.6	44.6
<b>Mean</b>			<b>4.8</b>	<b>41.3</b>			<b>5.3</b>	<b>42.6</b>
<b>SD</b>			0.5	6.7			0.8	8.0
<b>p_value</b>				<b>0.4</b>				<b>0.8</b>
P28	1390	M	7.2	36.0	1391	F	8.0	49.8
P28	1426	M	8.4	48.3	1425	M	8.4	45.8
P28	1301	M	8.6	48.0	1299	M	5.5	38.5
P28	1303	F	8.4	41.4	1302	F	7.4	45.8
P28					1392	F	8.4	54.0
<b>Mean</b>			<b>8.2</b>	<b>43.4</b>			<b>7.5</b>	<b>46.8</b>
<b>SD</b>			0.6	5.9			1.2	5.7
<b>p_value</b>							<b>0.3</b>	<b>0.4</b>
P200	803	F	6.0	44.2	1125	F	6.0	45.4



# S2

Contribution

	Comp1	Comp2	Comp3
BMD	2373	499	5155
BV/TV	2571	213	2599
TbTh	2742	16	224
TbN	2286	1078	1448
TbSp	27	8195	574



# DISCUSSION GENERALE

## INTRODUCTION

Les travaux réalisés au cours de cette thèse avaient pour objectifs d'améliorer la compréhension de la pathogénie de l'ostéochondrose équine, en mettant en évidence les processus biologiques et mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la physiopathologie de cette maladie. L'analyse du rôle du récepteur alpha des hormones thyroïdiennes ( $TR\alpha$ ), dans la maturation du cartilage et la croissance osseuse devait permettre d'évaluer l'implication potentielle des hormones thyroïdiennes dans la physiopathologie de l'OC. Ce travail devait ainsi permettre *in fine* de faciliter le clonage positionnel des gènes de prédisposition à l'OC. Globalement, la finalité de ce type de travaux recouvre le développement de biomarqueurs (dépistage, diagnostic et pronostic) ainsi que la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de développer de nouveaux traitements. Ces résultats pourraient potentiellement être transposables chez d'autres espèces dont l'homme.

Cette discussion finale vient compléter les discussions des articles présentés dans les différentes parties de la thèse, en apportant une vision plus globale et en s'attachant à identifier les atouts et les limites de ces travaux. Elle s'articulera autour d'une première partie consacrée à la classification et à la définition des lésions d'OC chez le cheval. Puis, dans une seconde partie, nous discuterons des hypothèses possibles concernant la physiopathologie et l'implication des hormones thyroïdiennes dans le développement des lésions. Enfin, une dernière partie sera consacrée aux perspectives et aux applications possibles de ces travaux pour la filière équine.

### 1. Vers une redéfinition de l'ostéochondrose (OC) équine ?

Les chevaux atteints d'OC peuvent présenter un épanchement synovial, des douleurs et des boiteries, premiers signes cliniques d'appels amenant le vétérinaire à suspecter la présence d'une lésion. Cependant, l'OC peut souvent rester asymptomatique. Le dépistage et le diagnostic reposent ainsi essentiellement sur un bilan radiographique, qui est à la base de la classification des lésions chez le cheval. Deux grands types de lésions ont été observés : des fractures du cartilage articulaire (OCD) et des kystes osseux sous-chondraux. Des études épidémiologiques ont établi que les lésions kystiques touchent principalement les condyles du fémur et l'articulation métacarpo-phalangienne, tandis que les lésions d'OCD sont plus fréquemment retrouvées dans les articulations métacarpo/métatarso-phalangiennes, fémoro-patellaire et tarsocrurale. Une classification prenant uniquement en compte les caractéristiques radiographiques a été développée afin de discriminer les lésions selon leur sévérité et d'établir un score de « gravité » [129].

Récemment, Denoix et al., ont établi une classification basée sur la localisation des lésions dans l'articulation et leur origine biomécanique [89]. Trois grands types de lésions ont alors été proposés : les fragments ostéochondraux à la surface articulaire (AS-OCF), les fragments ostéochondraux péri-articulaires (PA-OCF), les kystes osseux sous-chondraux juvéniles (JSBC) [89]. Toutefois, l'OC équine demeure une entité confuse, regroupant une grande diversité d'anomalies locales du cartilage et/ou de l'os sous-chondral, de localisation et de taille variables. La situation en termes de description et de classification apparaît très en retard par rapport à l'Homme où près d'une cinquantaine d'entités nosologiques ont été décrites [130]. Or, une description précise est essentielle pour une bonne compréhension de

la physiopathologie. Elle est également indispensable pour un phénotypage précis sans lequel les travaux de clonage positionnel ont peu de chance d'aboutir.

Ainsi, la définition peu précise des entités pourrait expliquer la faiblesse des héritabilités mesurées et la nécessité d'un facteur déclenchant contribuant également à diminuer ces valeurs. Cette imprécision pourrait également être à l'origine des résultats décevants de cartographie de QTL. En effet, plusieurs programmes ont été menés dans différentes races au niveau international et de nombreuses régions associées à l'OC ont été identifiées (pour revue voir [131]). Les résultats se sont avérés peu concordants entre les études et les QTLs identifiés n'expliquent qu'une faible part de la variance observée. Aucun gène candidat n'a pour le moment été validé [1, 122, 125, 132]. Sachant qu'aucune corrélation n'a été observée entre articulation, ces éléments laissent à penser que différentes maladies, résultant d'une perturbation de mécanismes moléculaires différents, sont regroupées sous le terme d'ostéochondrose. L'articulation lésée devrait pour le moins être considérée comme un élément clé de la classification. Les observations réalisées lors de cette thèse apportent également des éléments plaidant en faveur d'une redéfinition des entités nosologiques.

Nous avons réalisé des analyses histologiques de différentes lésions d'OC prélevées sur les trochlées du talus de cinq poulains anglo-arabe âgés de 10 mois dont le statu ostéo-articulaire avait été établi à partir d'un examen clinique et de clichés radiographiques. Macroscopiquement, ces lésions sont apparues hétérogènes d'aspect et de taille, allant d'une petite griffure à des cavités plus ou moins étendues dans le cartilage articulaire ainsi qu'à des fractures de celui-ci. Du fait des limites techniques, le bilan radiographique ne pouvait pas déceler une telle hétérogénéité des lésions. Nous avons regroupé les lésions selon deux types : les « fractures », localisées à l'extrémité de la trochlée et associées à un détachement de cartilage et les « scratches », localisés au milieu de la trochlée, montrant à une perte de cartilage plus ou moins importante. L'analyse histologique de ces lésions a permis de caractériser d'avantage les types de lésions. Pour les « scratches », nous avons observé deux sous-types de lésions : celle présentant une invagination du cartilage articulaire dans l'os sous-chondral sous-jacent et celles montrant une hypoplasie, voire une perte du cartilage articulaire, laissant apparaître l'os sous-chondral. Le premier type de lésion pourrait s'apparenter à une forme précoce de kyste osseux sous-chondral. En effet, les kystes osseux sous-chondraux ont été décrits comme des zones nécrotiques localisées dans l'os sous-chondral, présentant à leur extrémité distale un étroit canal établissant une communication avec l'articulation. Il semble vraisemblable qu'au cours de la croissance de l'épiphyse, les invaginations observées puissent conduire à l'enclavement d'une zone de cartilage, formant progressivement une cavité nécrotique dans l'os sous-chondral et évoluant en véritable kyste. Il a également été observé que les kystes récents étaient remplis de liquide et contenaient du matériel fibreux. Ceux des chevaux les plus âgés renfermaient des débris fibreux [133]. Ces observations sont en accord avec les résultats d'immunomarquage collagen type VI réalisés sur nos lésions « kystes-like », montrant la présence d'un tissu cicatriciel fibreux de type fibrocartilage.

Les lésions de type « fracture » que nous avons pu observer s'apparentent aux lésions de type OCD décrites dans la bibliographie [134]. L'analyse histologique a montré une zone de fracture nette entre le cartilage articulaire et l'os sous-chondral sous-jacent conduisant au détachement partiel d'un fragment de cartilage. Des fragments partiellement ossifiés libres dans l'articulation ont été décrits, suggérant que les fractures pouvaient affecter le cartilage et l'os sous-chondral. Nos observations histologiques indiquent que l'ossification d'un fragment partiellement détaché se poursuit avec création d'un nouveau centre d'ossification en son sein. Il semble ainsi plus probable que les fractures n'apparaissent qu'au sein du cartilage, à la jonction avec l'os sous-chondral.

Nos résultats mettent ainsi en évidence des types de lésion d'OC indiscernables par bilan radiographique. De façon intéressante, les lésions de type OCD ont été retrouvées aux

extrémités de l'articulation alors que les kystes-like et les scratches étaient localisés au milieu de celle-ci. Nos observations histologiques ne permettent pas de déterminer si les différentes formes de lésions correspondent à différents stades d'évolution d'un même type lésionnel ou si, au contraire, elles représentent des types de lésions différents. Toutefois, nos analyses protéomiques, basées sur du cartilage sain (prélevé sur les trochlées fémorales) d'animaux sains et atteints d'OC montrent des différences de protéomes associées aux sous-types lésionnels. En effet, les kystes semblent résulter d'un défaut constitutif de l'os et du cartilage, alors qu'un défaut constitutif du cartilage semble principalement en cause dans l'apparition des fractures, chez les Anglo-Arabs comme chez les Trotteurs Français. De même, le protéome des poulains porteurs de lésions de type « scratches- kystes like » et « scratches- perte de cartilage » semble différent, suggérant l'existence de sous-types plutôt que de stade d'évolution différents.

L'idée généralement admise et défendue par le Pr Denoix est celle d'un défaut constitutif qui s'exprime uniquement dans une articulation donnée du fait du type de contrainte biomécanique excessive auquel l'animal a été soumis. Contrairement à cette hypothèse, nos observations plaident en faveur de l'existence de pathologies distinctes, rendant l'articulation plus fragile et sensible à certains types de contraintes. Se pose alors la question de déterminer en quelle mesure les mécanismes moléculaires impliqués dans l'apparition de ces différents types de lésions sont également différents.

## 2. Eclairage sur les mécanismes physiopathologiques

Malgré les études menées dans les 20 dernières années, la physiopathologie de l'ostéochondrose demeure largement incomprise. Une première hypothèse, étayée par des travaux menés essentiellement chez le porc, invoque des ruptures localisées de canaux intra-chondraux dans la période périnatale, pour expliquer la formation de zones nécrotiques de l'os sous-chondral et/ou du cartilage. Une seconde hypothèse considère que les lésions primaires résulteraient d'une dyschondroplasie. Le défaut de maturation du cartilage conduirait à la formation d'une MEC anormale et à un épaississement localisé du cartilage, réduisant les apports nutritifs dans les régions plus profondes et provoquant ainsi une nécrose. Quelle que soit l'hypothèse, les mécanismes moléculaires sous-jacents n'ont pas été élucidés. Quelques travaux portant sur du cartilage lésé ont suggéré des modifications de composition de la matrice et de son turnover (pour revue voir [114]): une augmentation du contenu en collagène VI, une altération du métabolisme des protéoglycanes ainsi qu'une modification des taux ou de la localisation d'enzymes intervenant dans la dégradation de la matrice (MMPs, TIMP1, cathepsines B et D). Il est cependant probable que ces modifications ne soient qu'une conséquence de la pathologie, plutôt qu'une cause initiale.

Ainsi, l'originalité de ce travail de thèse est double : 1) l'étude du cartilage et de l'os prélevés sur des articulations non lésées de chevaux sains (échantillons sains) ou atteints d'OC (échantillons prédisposés) afin d'analyser le défaut constitutif primaire; 2) la combinaison de différentes techniques « omics » permet d'aborder sans *a priori* la question des mécanismes impliqués. Globalement, nos résultats, obtenus en race Anglo-Arabe et Trotteur Français, indiquent clairement que différents mécanismes moléculaires sont impliqués dans le développement des lésions, selon les sous-types de lésions et les races.

En effet, les lésions de type scratches semblent associées à un défaut conjoint de l'os et du cartilage, alors que les lésions de type OCD apparaissent, tant chez les poulains Anglo-Arabe que Trotteur Français, essentiellement liées à un défaut du cartilage. De façon générale, dans les deux sous-types de lésions et les deux races, les lésions d'OC sont associées à une altération de l'homéostasie du cartilage et de la structure de la MEC. Des



défauts de production d'énergie, de synthèse et de dégradation des protéines ont été mis en évidence, témoignant d'une maturation anormale du cartilage. De façon cohérente, nos analyses micro-transcriptomiques, réalisées à partir des mêmes chevaux, suggèrent un rôle des miRNAs dans ces perturbations : les cibles prédites des miRNAs exprimés différemment entre cartilage sain et prédisposé sont principalement impliquées dans les activités de maintenance de l'intégrité du cartilage ainsi que le métabolisme, le folding et le transport des protéines. De même au niveau de l'os, les cibles potentielles des miRNAs exprimés différemment sont impliquées dans le développement de l'os et son remodelage ainsi que dans l'activation de la différenciation des cellules osseuses. Toutefois, des différences importantes ont été observées. En particulier, le cartilage des chevaux atteints de lésions de type scratches présente plutôt un défaut structural de la MEC alors que ceux atteints d'OCD montrent un défaut de minéralisation de celle-ci. Ce retard de minéralisation pourrait conduire à une altération des propriétés biomécaniques du cartilage prédisposé à l'OCD, le rendant ainsi potentiellement enclin au développement de fractures. De plus, nos résultats ont montré que les chevaux présentant des scratches présentaient une densité minérale réduite de l'os sous-chondral, ainsi qu'une architecture anormale des trabécules pouvant résulter de la perturbation du métabolisme lipidique observé dans l'os.

Ces défauts de maturation et de synthèse de MEC sont associés à une perturbation du métabolisme énergétique, que nous avons pu explorer plus en détail chez les poulains Trotteurs Français atteints d'OCD. Nous avons ainsi mis en évidence un dysfonctionnement des mitochondries associé à un stress partiel du Réticulum Endoplasmique (RE). Or, le rôle essentiel du métabolisme énergétique dans la différenciation chondrocytaire et le maintien de l'homéostasie est reconnu [135]. Un dysfonctionnement mitochondrial a également été décrit comme perturbant le catabolisme et la calcification de la MEC, la synthèse des protéines et l'apoptose, jouant un rôle clé dans la physiopathologie de l'arthrose [136]. De même, l'agrégation de protéines au sein de RE et l'induction d'un stress du RE constitue le mécanisme physiopathologique de nombreuses maladies, dont plusieurs chondrodysplasies [137-139]. Au vu de nos résultats, il est cependant impossible de déterminer le facteur clé, d'autant qu'il est aujourd'hui établi que mitochondrie et RE communiquent via des mécanismes moléculaires spécifiques pour réguler conjointement de nombreux processus physiologiques tels que l'énergie mitochondriale, le métabolisme lipidique et la signalisation calcique (pour revue voir [140]). En particulier, la transmission de  $Ca^{2+}$  du RE vers la mitochondrie joue un rôle crucial dans le métabolisme mitochondrial, le taux de  $Ca^{2+}$  dans la mitochondrie régulant l'activité de plusieurs enzymes clés impliquées dans les fonctions métaboliques. L'utilisation des informations de cartographie peut toutefois apporter quelques éléments de réflexion.

D'une part, comme nous l'avons évoqué précédemment, plusieurs études d'association pangénomiques ont mis en évidence des régions du génome associées à l'OC mais peu de QTLs communs ont été identifiés entre races. Dans le dispositif GenEquin, pour lequel le phénotype était le plus sûr et le plus homogène (diagnostic radiologique complet de toutes les articulations par un même clinicien), aucun QTL n'a pu être identifié en commun entre articulations [125]. Ces observations sont en accord avec l'existence de mécanismes moléculaires sous-jacents différents selon les articulations et les races. D'autre part, en se basant sur les régions QTL détectées dans le cadre du programme ANR Genequin ainsi que divers programmes internationaux [131] et en exploitant les données de séquençage NGS de 10 Trotteurs Français représentatifs de la variabilité génétique présente dans ces régions (projet HiSeq OC), il a été possible d'identifier des mutations potentiellement délétères dans 25 des 32 régions QTL associées au développement de l'OCD du jarret. De façon intéressante, la plupart de ces gènes étaient associés à la mitochondrie, à la signalisation calcique et au transport vésiculaire. Par ailleurs, il a été montré que des poulains atteints d'OC présentaient un taux plasmatique de  $Ca^{2+}$  différents des individus sains [141]. Il est de ce fait tentant d'émettre l'hypothèse d'une dérégulation globale de la signalisation calcique qui induirait un stress partiel du RE et un dysfonctionnement mitochondrial perturbant la

différenciation chondrocytaire et conduisant ainsi à la synthèse d'une matrice extracellulaire anormale.

Il est toutefois à noter que des mutations de sites d'épissage ont également été identifiées dans des gènes codant pour des protéines structurales de la MEC (fibuline-1, collagène type XXVIII) et une N-acetylgalactosaminyltransferase (GALNT13) impliquée dans le glycosylation des protéoglycanes, ainsi que la création d'un codon stop prématuré dans une sialyltransferase impliquée dans la sulfatation des protéoglycanes (ST6GALNAC2). Il n'est donc pas exclu qu'un défaut de synthèse de certaines protéines ou une altération des modifications post-traductionnelles des protéoglycanes puissent être à l'origine d'un stress partiel du RE. Cependant, l'engorgement de RE par défaut de folding ou de modification des protéines est, au vu des exemples connus, plutôt responsable de chondrodysplasie sévères, comme dans le cas de la chondrodysplasie metaphysaire de type Schmid (MCDS), liée à diverses mutations du gène COL10A1 [139, 142].

Nos données s'avèrent particulièrement intéressantes pour prioriser les gènes et mutations candidates identifiées par ces projets de séquençage NGS. En effet, plus de 195 gènes localisés dans les régions QTL s'avèrent porteurs de mutations potentiellement délétères. Un filtre élaboré à partir des annotations GO associées à l'OCD d'après nos données de protéomiques permet de définir une liste prioritaire de 67 gènes. L'intérêt sera encore plus évident dès lors qu'il s'agira de s'intéresser aux 390 mutations non synonymes affectant 190 gènes ou aux 9000 mutations situées dans les promoteurs de 650 gènes. AZGP1 est le seul gène identifié par protéomique, présent dans les régions QTL et ayant un allèle potentiellement délétère (frameshift). Ce gène code pour une adipokine impliquée dans le métabolisme lipidique et a été lié génétiquement au poids à la naissance chez la souris [143] ainsi qu'au poids, à la taille et au périmètre thoracique chez les bovins [144]. Cette observation explique peut-être une partie du lien entre conformation, vitesse de croissance et prédisposition à l'OC.

Plusieurs études ont par ailleurs mis en évidence un lien étroit entre nutrition et développement de pathologies ostéo-articulaires chez le cheval et plus particulièrement l'OC [97, 145], probablement en relation avec des dérèglements endocriniens. En particulier, la fréquence de lésions d'OC semble augmentée chez des chevaux hypothyroïdiens [100, 146]. L'axe hypothalamo-hypophysaire pourrait donc jouer un rôle dans le développement des lésions d'OC chez le cheval. Nous avons donc tenté d'établir un lien éventuel au niveau moléculaire entre une dérégulation des hormones thyroïdiennes et le développement de lésions d'OC. Pour cela, nous avons analysé l'impact d'une absence de signalisation T3/T4 dans le cartilage à l'aide d'un modèle de souris exprimant dans le cartilage un allèle dominant négatif du récepteur TR $\alpha$ . Cette étude des souris Thra<sup>L400R/wt</sup> a montré que l'hypothyroïdie au niveau du cartilage induit un retard de la maturation du cartilage et de l'ossification secondaire ayant secondairement un impact dans le développement de l'os trabéculaire. La comparaison des mécanismes moléculaires perturbés dans ce modèle murin et ceux perturbés chez les chevaux n'a pas fait apparaître de similitudes. Nous n'avons pas non plus observé macroscopiquement de lésions ostéochondrotiques spontanées chez ces souris. Toutefois, nous n'avons pas testé l'hypothèse d'une plus grande sensibilité des souris mutantes aux stress mécaniques en les soumettant à des contraintes biomécaniques. Il semblerait donc que les lésions d'OC observées chez des chevaux atteints d'hypothyroïdie ne soient pas la conséquence directe au niveau de l'os ou du cartilage de la dérégulation des hormones thyroïdiennes, mais plutôt la résultante de l'action systémique des hormones thyroïdiennes sur d'autres voies, en particulier GH, IGF1 ou FGF.

Il a été montré que l'expression de IHH et de PTHrP (facteurs de régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire) augmente dans le cartilage articulaire de chevaux atteints d'OC, ce qui suggère une implication de la signalisation PTHrP/Ihh dans l'étiopathogénie de l'OC [147, 148]. Une telle perturbation pourrait induire un retard du processus d'ossification endochondrale à l'origine d'une certaine immaturité du cartilage et de l'os les rendant plus

fragiles. Ainsi, ils seraient inadaptés à la stature et au poids du poulain. Très récemment, le polymorphisme génétique du gène IHH a été étudié chez des chevaux sains et atteints d'OC de trois races différentes (Anglo-Arabian, Polish Coldblood and Polish Halfbred). Des variants génétiques d'IHH ont été mis en évidence avec des associations variables et plutôt faibles selon les races [149]. Rien dans nos résultats n'accrédite également l'hypothèse d'une implication d'IHH car aucun polymorphisme n'a été identifié par NGS chez les 10 Trotteurs Français, mis à part un SNP dans le 3'UTR. De plus, aucune région QTL n'a été détectée autour de ce gène.

### **3. Vers des applications directes pour la filière équine : Biomarqueurs et nouvelles thérapies**

L'OC est une affection ostéo-articulaire juvénile commune, touchant 10 à 30% de la population équine. Elle est considérée depuis une vingtaine d'années comme un problème majeur pour la filière équine, notamment pour l'industrie des chevaux de sports et de courses [86], du fait de l'importante dépréciation commerciale des chevaux atteints. Cependant, dans la majorité des cas, les individus ne présentent pas de signes cliniques, de douleur ou de boiterie. Le dépistage de lésions d'OC est donc souvent établi tardivement lors des visites d'achat ou lors de contrôles de routine. L'intérêt de disposer de biomarqueurs de dépistage précoce est donc évident, puisqu'ils permettraient de traiter le problème en amont, en identifiant très tôt les individus prédisposés au développement de lésions d'OC pour éviter de les exposer aux facteurs de risques, en particulier les traumatismes ou stress liés à des contraintes biomécaniques excessives. Une gestion d'élevage ou un entraînement spécifique constitueraient des solutions assez simples à mettre en œuvre au niveau de la filière. Une meilleure orientation de la carrière sportive des chevaux serait également envisageable, en réservant les chevaux à risque pour le loisir et non pour le sport ou la course où les contraintes biomécaniques sont beaucoup plus importantes.

Dans cette perspective, les marqueurs génétiques constituent des biomarqueurs de choix. Leur utilisation n'est malheureusement pas encore envisageable, du fait de l'imprécision des régions QTL, de leur nombre important et de la faible part de variance expliquée, ne permettant pas une estimation fiable et pertinente du statut des poulains. Nos études de protéomique du cartilage et de l'os prédisposés ont révélé des différences d'expression de quelques protéines plasmatiques comme l'haptoglobine, l'hémopexine, la fétuine A, l'apolipoprotéine A1 ou la transferrine. Leur dosage sanguin étant simple, ces protéines pourraient constituer d'excellents biomarqueurs de dépistage précoce, mais des études supplémentaires sur un grand nombre de chevaux seront nécessaires pour en valider l'intérêt. De même, au vu de nos données, la mesure des taux plasmatiques de  $Ca^{2+}$  semble une piste prometteuse, sachant que des différences ont d'ores et déjà été montrées entre poulains atteints et sains [141]. Dans cet ordre d'idée, le maintien d'un taux physiologique de calcium circulant pourrait donc constituer un moyen de prévenir les lésions d'OC chez des chevaux prédisposés.

Nos résultats indiquent que l'OC recouvre différentes pathologies, résultant de mécanismes moléculaires différents. Il est donc probable que, pour être efficaces, les éventuels traitements nécessitent d'être adaptés à chaque type de lésion. D'où l'intérêt de disposer de biomarqueurs de diagnostic, en complément ou en remplacement de la radiographie.

Dans ce contexte, plusieurs travaux ont déjà été menés afin d'identifier des biomarqueurs du liquide synovial, essentiellement des produits de dégradation des collagènes ou différents constituant de la MEC, témoignant d'une augmentation de l'activité

catabolique ou d'une activité anabolique anormale [150, 151]. Des résultats chez le porc laissent à penser que certains biomarqueurs pourraient permettre d'apporter des précisions sur le stade de développement et la sévérité des lésions [152]. L'utilisation de la métabolomique dans le cadre d'étude clinique constitue une technologie « -omics » émergente pouvant permettre l'identification de biomarqueurs spécifiques d'un statu pathologique mais permettant aussi d'apporter des éléments nouveaux dans la compréhension des voies métaboliques altérées dans la physiopathologie [153]. Notre étude métabolomique des liquides synoviaux a ainsi montré des profils différents entre articulation lésées et saines et entre types de lésions. Des différences entre articulations saines et prédisposées pourraient également être exploitées dans une certaine mesure. Ces premiers résultats semblent prometteurs et applicables au niveau de la filière. En effet, le prélèvement de liquide synovial dans une articulation est un acte peu invasif et facilement réalisable par un vétérinaire. Cependant, nos résultats préliminaires nécessitent d'être confirmés et validés sur des effectifs importants de chevaux bien caractérisés, ce qui pose un problème logistique et technique quasi insurmontable. En effet, il faudrait soit attendre l'autopsie du cheval à son décès, soit pratiquer des arthroscopies afin de déterminer les sous-types de lésion. De même, nos travaux ont permis d'identifier des miRNAs exprimés différenciellement entre échantillons sains et prédisposés. La collecte *in vivo* d'échantillons de cartilage et d'os n'étant pas envisageable lors d'examen cliniques, il serait intéressant d'étendre nos observations au plasma sanguin ou au liquide synovial, afin de mettre en évidence une éventuelle expression différentielle de quelques miRNAs, entre individus sains et atteints et/ou sains et prédisposés. Les miRNAs sont actuellement considérés comme d'excellent biomarqueurs circulants et leur expression différentielle dans le sang et le liquide synovial de patient atteint d'arthrose a déjà été montrée [154]. La mise au point de tels tests présenterait également un intérêt en terme de phénotypage fin, dans le cadre d'études GWAS, améliorant ainsi la détection de QTLs et l'identification de gènes candidats.

## CONCLUSION GENERALE

Le terme ostéochondrose regroupe plusieurs entités (OCD, Kystes, scratches) affectant des sites de préférences spécifiques et ayant une origine multifactorielle avec des composantes environnementales et génétiques. Différents mécanismes moléculaires sous-jacents sont impliqués dans le développement de ces entités. La prédisposition génétique est multigénique et variable selon les races de chevaux, sans doute en lien avec la conformation et la vitesse de croissance. Cette hypothèse est par ailleurs renforcée par le fait que dans certaines races de chevaux tels que les poneys Shetland, les Islandais ou les chevaux Dülmener, extrêmement peu de cas d'OC ont été observés [131].

Compte tenu du déterminisme génétique de l'OC et des multiples voies intervenant, il est clair qu'une stratégie visant à éradiquer cette affection semble illusoire. Cela explique très certainement les résultats décevants obtenus aux Pays-Bas où la prévalence de l'OC n'a quasiment pas baissé en dépit de la mise en place d'un contrôle de la reproduction des individus atteints. D'autre part, une telle stratégie induit un risque important d'appauvrissement génétique. Toutefois, un recul du nombre de cas d'OC a été observé dans la filière équine ces dernières années. Il a été proposé que cette diminution soit le résultat d'une sélection des reproducteurs opérée grâce aux bilans radiologiques. Cependant, compte tenu du caractère multifactoriel de l'OC, il est peu probable qu'une telle sélection permette, à elle seule, de réduire l'incidence de la pathologie. Au vu de nos résultats montrant un lien avec le métabolisme énergétique et lipidique, il semble, en revanche, plus probable que l'amélioration de la situation implique également une meilleure gestion de l'alimentation et de la croissance des poulains.

S'il apparaît totalement utopique d'éradiquer cette affection de la population équine ou d'éliminer les individus atteints, il serait possible d'en améliorer le dépistage et les traitements thérapeutiques. Les biomarqueurs, indicateurs biologiques d'un statut physiologique ou pathologique, pourraient constituer un moyen de diagnostic fiable et applicable au niveau de la filière. Ainsi, un dépistage précoce des poulains à risque serait envisageable et un management adapté de ces individus pourrait permettre de prévenir le développement de lésions d'OC. D'autre part, l'identification de gènes candidats et la mise en place de tests d'association constitueraient également un outil applicable auprès de la filière. Ainsi, un conseil génétique pourrait être proposé aux éleveurs afin d'éviter les croisements à risque.

## LISTE DE PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Publications

Desjardin et al., “*A method for proteomic analysis of equine sub-chondral bone and epiphyseal cartilage*”, Proteomics 2012

Desjardin et al., “*Proteomics provides new insights into the molecular physiopathology of Equine Osteochondrosis*”, soumis dans PlosOne 2013

Desjardin et al., “*Next-generation sequencing identifies equine cartilage and subchondral bone miRNAs and suggests their involvement in osteochondrosis physiopathology*”, soumis dans BMC Genomics 2013

Desjardin et al., “*Involvement of mitochondrial dysfunction and ER-stress in the physiopathology of equine Osteochondritis dissecans (OCD)*”, soumis dans Experimental and Molecular pathology 2013

Desjardin et al., “*Chondrocytes play a central role in the stimulation of bone growth by thyroid Thyroid hormone receptor alpha 1*”, soumis dans Molecular Endocrinology 2013

### Communications orales

33<sup>ème</sup> Conference of the International Society of Animal Genetics, Cairns (Australia)

Congrès de Génomique Animale et Microbienne, AGENEA La Rochelle (France)

37<sup>ème</sup> Journée de la recherche équine Paris (France)

### Présentations de posters

10<sup>ème</sup> Congrès International de Génétique Equine, Fondation Havemeyer, Furnas, Açores, Portugal

33<sup>ème</sup> Conference of the International Society of Animal Genetics, Cairns (Australia)

Colloque annuelle de l'école doctorale ABIES, Paris (France)

Séminaire des thésards du département de Génétique Animale de l'INRA, Limoges (France)

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ricard, A., Valette, J., Denoix, J., *27eme Journées de la Recherche Equine, Paris 2001*, pp. 153-164.
- [2] ROBERT, C., Valette, J. P., DENOIX, J.-M. M., Correlation Between Routine Radiographic Findings And Early Racing Career In French Trotters. *Equine Vet J* 2006, *36*, 473-478.
- [3] Geffroy, O., Couroucé, A., Valette, J., Kraft, E., *Pratique Vétérinaire Equine* 1997, pp. 283-290.
- [4] van de Lest, C. H., Brama, P. A., van El, B., DeGroot, J., van Weeren, P. R., Extracellular matrix changes in early osteochondrotic defects in foals: a key role for collagen? *Biochimica et biophysica acta* 2004, *1690*, 54-62.
- [5] Ballock, R. T., O'Keefe, R. J., The Biology Of The Growth Plate. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 2003, *85-A*, 715-726.
- [6] X.Chevalier, P. R., *EMC-Rhumatologie Orthopédie* 2004.
- [7] Berrier, A. L., Yamada, K. M., Cell-Matrix Adhesion. *J Cell Physiol* 2007, *213*, 565-573 ST - Cell-matrix adhesion.
- [8] Ahmed, Y. A., Tatarczuch, L., Pagel, C. N., Davies, H. M., *et al.*, Hypertrophy and physiological death of equine chondrocytes in vitro. *Equine veterinary journal* 2007, *39*, 546-552.
- [9] Duncan, H., Jundt, J., Riddle, J. M., Pitchford, W., Christopherson, T., The tibial subchondral plate. A scanning electron microscopic study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 1987, *69*, 1212-1220.
- [10] Milz, S., Eckstein, F., Putz, R., The thickness of the subchondral plate and its correlation with the thickness of the uncalcified articular cartilage in the human patella. *Anatomy and embryology* 1995, *192*, 437-444.
- [11] Eckstein, F., Milz, S., Anetzberger, H., Putz, R., Thickness of the subchondral mineralised tissue zone (SMZ) in normal male and female and pathological human patellae. *J Anat* 1998, *192 ( Pt 1)*, 81-90.
- [12] Madry, H., van Dijk, C. N., Mueller-Gerbl, M., The Basic Science Of The Subchondral Bone. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA* 2010, *18*, 419-433.
- [13] Mackie, E. J., Tatarczuch, L., Mirams, M., The Skeleton: A Multi-Functional Complex Organ: The Growth Plate Chondrocyte And Endochondral Ossification. *J Endocrinol* 2011, *211*, 109-121 ST - The skeleton: a multi-functional comp.
- [14] Shingleton, W. D., MacKie, E. J., Cawston, T. E., Jeffcott, L. B., Cartilage Canals In Equine Articular/Epiphyseal Growth Cartilage And A Possible Association With Dyschondroplasia. *Equine Vet J* 1997, *29*, 360-364 ST - Cartilage canals in equine articular/.
- [15] Levene, C., The Patterns Of Cartilage Canals. *Journal of anatomy* 1964, *98*, 515-538.
- [16] Kugler, J. H., Tomlinson, A., Wagstaff, A., Ward, S. M., Role Of Cartilage Canals In The Formation Of Secondary Centers Of Ossification. *Journal of Anatomy* 1979, *129*, 493-506.
- [17] Ekman, S., Carlson, C. S., The pathophysiology of osteochondrosis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 1998, *28*, 17-32.
- [18] Yamaguchi, T., Hayashi, K., Tayama, N., Sugioka, Y., The Role Of Cartilage Canals: Experimental Study Using Rabbits' Femoral Heads. *Nihon Seikeigeka Gakkai zasshi* 1990, *64*, 1105-1110.
- [19] Arkill, K. P., Winlove, C. P., Solute transport in the deep and calcified zones of articular cartilage. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2008, *16*, 708-714.
- [20] Milz, S., Putz, R., Quantitative morphology of the subchondral plate of the tibial plateau. *J Anat* 1994, *185 ( Pt 1)*, 103-110.
- [21] Srinivas, V., Bohensky, J., Zahm, A. M., Shapiro, I. M., Autophagy in mineralizing tissues: microenvironmental perspectives. *Cell Cycle* 2009, *8*, 391-393.
- [22] Nilsson, O., Marino, R., De Luca, F., Phillip, M., Baron, J., Endocrine Regulation Of The Growth Plate. *Horm Res* 2005, *64*, 157-165.
- [23] Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J., Larsen, P. R., Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 2002, *23*, 38-89.



- [24] Lazar, M. A., Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 1993, *14*, 184-193.
- [25] O'Shea, P. J., Harvey, C. B., Suzuki, H., Kaneshige, M., *et al.*, A thyrotoxic skeletal phenotype of advanced bone formation in mice with resistance to thyroid hormone. *Molecular endocrinology* 2003, *17*, 1410-1424.
- [26] Murphy, E., Williams, G. R., The Thyroid And The Skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004, *61*, 285-298.
- [27] Shaikh, M. A., Naeem, Z., Alshahat, A. A., Shaikh, F. A., Arif, S., Growth plate changes associated with Hypothyroidism amongst the pre and postnatal rats. *International journal of health sciences* 2013, *7*, 31-43.
- [28] Stevens, D. A., Hasserjian, R. P., Robson, H., Siebler, T., *et al.*, Thyroid Hormones Regulate Hypertrophic Chondrocyte Differentiation And Expression Of Parathyroid Hormone-Related Peptide And Its Receptor During Endochondral Bone Formation. *J Bone Miner Res* 2000, *15*, 2431-2442 ST - Thyroid hormones regulate hypertroph.
- [29] Boersma, B., Otten, B. J., Stoelenga, G. B., Wit, J. M., Catch-up growth after prolonged hypothyroidism. *Eur J Pediatr* 1996, *155*, 362-367.
- [30] Dumitrescu, A. M., Refetoff, S., The syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone. *Biochimica et biophysica acta* 2013, *1830*, 3987-4003.
- [31] Takeda, K., Balzano, S., Sakurai, A., DeGroot, L. J., Refetoff, S., Screening of nineteen unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone for known point mutations in the thyroid hormone receptor beta gene and the detection of a new mutation. *The Journal of clinical investigation* 1991, *87*, 496-502.
- [32] Usala, S. J., Menke, J. B., Watson, T. L., Wondisford, F. E., *et al.*, A homozygous deletion in the c-erbA beta thyroid hormone receptor gene in a patient with generalized thyroid hormone resistance: isolation and characterization of the mutant receptor. *Molecular endocrinology* 1991, *5*, 327-335.
- [33] Ferrara, A. M., Onigata, K., Ercan, O., Woodhead, H., *et al.*, Homozygous thyroid hormone receptor  $\beta$ -gene mutations in resistance to thyroid hormone: three new cases and review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab* 2012, *97*, 1328-1336.
- [34] Segni, M., Gorman, C. A., The aftermath of childhood hyperthyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001, *14 Suppl 5*, 1277-1282; discussion 1297-1278.
- [35] Vestergaard, P., Mosekilde, L., Hyperthyroidism, bone mineral, and fracture risk--a meta-analysis. *Thyroid* 2003, *13*, 585-593.
- [36] Robson, H., Siebler, T., Stevens, D. A., Shalet, S. M., Williams, G. R., Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology* 2000, *141*, 3887-3897.
- [37] Stevens, D. A., Hasserjian, R. P., Robson, H., Siebler, T., *et al.*, Thyroid hormones regulate hypertrophic chondrocyte differentiation and expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor during endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* 2000, *15*, 2431-2442.
- [38] Ishikawa, Y., Genge, B. R., Wuthier, R. E., Wu, L. N., Thyroid hormone inhibits growth and stimulates terminal differentiation of epiphyseal growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1998, *13*, 1398-1411.
- [39] Robson, H., Siebler, T., Stevens, D. A., Shalet, S. M., Williams, G. R., Thyroid Hormone Acts Directly On Growth Plate Chondrocytes To Promote Hypertrophic Differentiation And Inhibit Clonal Expansion And Cell Proliferation. *Endocrinology* 2000, *141*, 3887-3897.
- [40] Barnard, J. C., Williams, A. J., Rabier, B., Chassande, O., *et al.*, Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis. *Endocrinology* 2005, *146*, 5568-5580.
- [41] Adams, S. L., Cohen, A. J., Lassova, L., Integration Of Signaling Pathways Regulating Chondrocyte Differentiation During Endochondral Bone Formation. *J Cell Physiol* 2007, *213*, 635-641.
- [42] Wang, L., Shao, Y. Y., Ballock, R. T., Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 2007, *22*, 1988-1995.

- [43] Allain, T. J., Yen, P. M., Flanagan, A. M., McGregor, A. M., The isoform-specific expression of the tri-iodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts. *European journal of clinical investigation* 1996, 26, 418-425.
- [44] Williams, G. R., Actions Of Thyroid Hormones In Bone. *Endokrynol Pol* 2009, 60, 380-388.
- [45] Milne, M., Quail, J. M., Rosen, C. J., Baran, D. T., Insulin-like growth factor binding proteins in femoral and vertebral bone marrow stromal cells: expression and regulation by thyroid hormone and dexamethasone. *Journal of cellular biochemistry* 2001, 81, 229-240.
- [46] Stevens, D. A., Harvey, C. B., Scott, A. J., O'Shea, P. J., *et al.*, Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone. *Molecular endocrinology* 2003, 17, 1751-1766.
- [47] Miura, M., Tanaka, K., Komatsu, Y., Suda, M., *et al.*, A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)(2)D(3) in osteoclast formation. *Biochemical and biophysical research communications* 2002, 291, 987-994.
- [48] Miura, M., Tanaka, K., Komatsu, Y., Suda, M., *et al.*, Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate. *J Bone Miner Res* 2002, 17, 443-454.
- [49] Allain, T. J., Chambers, T. J., Flanagan, A. M., McGregor, A. M., Tri-iodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *J Endocrinol* 1992, 133, 327-331.
- [50] Flamant, F., Samarut, J., Thyroid Hormone Receptors: Lessons From Knockout And Knock-In Mutant Mice. *Trends Endocrinol Metab* 2003, 14, 85-90 ST - Thyroid hormone receptors: lessons fro.
- [51] Bassett, J. H., O'Shea, P. J., Chassande, O., Samarut, J., *et al.*, Analysis Of Skeletal Phenotypes In Thyroid Hormone Receptor Mutant Mice. *Scanning* 2006, 28, 91-93.
- [52] O'Shea, P. J., Duncan Bassett, J. H., Srisantharajah, S., Ying, H., *et al.*, Contrasting Skeletal Phenotypes In Mice With An Identical Mutation Targeted To Thyroid Hormone Receptor A1 Or B. *Molecular endocrinology* 2005, 19, 3045-3059.
- [53] O'Shea, P. J., Kim, D. W., Logan, J. G., Davis, S., *et al.*, Advanced bone formation in mice with a dominant-negative mutation in the thyroid hormone receptor  $\beta$  gene due to activation of Wnt/ $\beta$ -catenin protein signaling. *The Journal of biological chemistry* 2012, 287, 17812-17822.
- [54] Bochukova, E., Schoenmakers, N., Agostini, M., Schoenmakers, E., *et al.*, A mutation in the thyroid hormone receptor alpha gene. *N Engl J Med* 2012, 366, 243-249.
- [55] van Mullem, A., van Heerebeek, R., Chrysis, D., Visser, E., *et al.*, Clinical phenotype and mutant TR $\alpha$ 1. *N Engl J Med* 2012, 366, 1451-1453.
- [56] Stevens, D. A., Williams, G. R., Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation. *Mol Cell Endocrinol* 1999, 151, 195-204.
- [57] Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., *et al.*, Regulation Of Rate Of Cartilage Differentiation By Indian Hedgehog And Pth-Related Protein. *Science* 1996, 273, 613-622 ST - Regulation of rate of cartilage diffe.
- [58] St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A. P., Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999, 13, 2072-2086.
- [59] Ornitz, D. M., FGF Signaling In The Developing Endochondral Skeleton. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005, 16, 205-213 ST - FGF signaling in the developing endoc.
- [60] Sahni, M., Ambrosetti, D. C., Mansukhani, A., Gertner, R., *et al.*, FGF Signaling Inhibits Chondrocyte Proliferation And Regulates Bone Development Through The Stat-1 Pathway. *Genes Dev* 1999, 13, 1361-1366.
- [61] Xiao, L., Naganawa, T., Obugunde, E., Gronowicz, G., *et al.*, Stat1 Controls Postnatal Bone Formation By Regulating Fibroblast Growth Factor Signaling In Osteoblasts. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279, 27743-27752.
- [62] Krejci, P., Salazar, L., Goodridge, H. S., Kashiwada, T. a., *et al.*, Stat1 And Stat3 Do Not Participate In FGF-Mediated Growth Arrest In Chondrocytes. *Journal of cell science* 2008, 121, 272-281.
- [63] Teixeira, C. C., Agoston, H., Beier, F., Nitric Oxide, C-Type Natriuretic Peptide And Cgmp As Regulators Of Endochondral Ossification. *Developmental biology* 2008, 319, 171-178 ST - Nitric oxide, C-type natriuretic pepti.

- [64] Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miyazawa, T., *et al.*, Overexpression Of Cnp In Chondrocytes Rescues Achondroplasia Through A Mapk-Dependent Pathway. *Nat Med* 2004, *10*, 80-86 ST - Overexpression of CNP in chondrocytes r.
- [65] Yoon, B. S., Lyons, K. M., Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2004, *93*, 93-103.
- [66] Yoon, B. S., Ovchinnikov, D. A., Yoshii, I., Mishina, Y., *et al.*, Bmpr1a And Bmpr1b Have Overlapping Functions And Are Essential For Chondrogenesis In Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, *102*, 5062-5067 ST - Bmpr5061a and Bmpr5061b have overlapping fu.
- [67] Enomoto-Iwamoto, M., Nakamura, T., Aikawa, T., Higuchi, Y., *et al.*, Hedgehog Proteins Stimulate Chondrogenic Cell Differentiation And Cartilage Formation. *J Bone Miner Res* 2000, *15*, 1659-1668 ST - Hedgehog proteins stimulate chondrog.
- [68] Minina, E., Kreschel, C., Naski, M. C., Ornitz, D. M., Vortkamp, A., Interaction Of FGF, Ihh/Pthlh, And Bmp Signaling Integrates Chondrocyte Proliferation And Hypertrophic Differentiation. *Dev Cell* 2002, *3*, 439-449 ST - Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BM.
- [69] Liu, F., Kohlmeier, S., Wang, C. Y., Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal* 2008, *20*, 999-1009.
- [70] Church, V., Nohno, T., Linker, C., Marcelle, C., Francis-West, P., Wnt Regulation Of Chondrocyte Differentiation. *J Cell Sci* 2002, *115*, 4809-4818 ST - Wnt regulation of chondrocyte differ.
- [71] Tamamura, Y., Otani, T., Kanatani, N., Koyama, E., *et al.*, Developmental Regulation Of Wnt/Beta-Catenin Signals Is Required For Growth Plate Assembly, Cartilage Integrity, And Endochondral Ossification. *The Journal of biological chemistry* 2005, *280*, 19185-19195 ST - Developmental regulation of Wnt/bet.
- [72] Yates, K. E., Shortkroff, S., Reish, R. G., Wnt Influence On Chondrocyte Differentiation And Cartilage Function. *DNA Cell Biol* 2005, *24*, 446-457 ST - Wnt influence on chondrocyte differen.
- [73] Wuelling, M., Vortkamp, A., Transcriptional Networks Controlling Chondrocyte Proliferation And Differentiation During Endochondral Ossification. *Pediatr Nephrol* 2010, *25*, 625-631.
- [74] Solomon, L. A., Berube, N. G., Beier, F., Transcriptional Regulators Of Chondrocyte Hypertrophy. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2008, *84*, 123-130 ST - Transcriptional regulators of chondro.
- [75] Sato, S., Kimura, A., Ozdemir, J., Asou, Y., *et al.*, The Distinct Role Of The Runx Proteins In Chondrocyte Differentiation And Intervertebral Disc Degeneration: Findings In Murine Models And In Human Disease. *Arthritis and rheumatism* 2008, *58*, 2764-2775 ST - The distinct role of the Runx protei.
- [76] Atanda, A., Jr., Shah, S. A., O'Brien, K., Osteochondrosis: common causes of pain in growing bones. *Am Fam Physician* 2011, *83*, 285-291.
- [77] Atanda, A., Shah, S. A., O'Brien, K., Osteochondrosis: common causes of pain in growing bones. *Am Fam Physician* 2011, *83*, 285-291.
- [78] Leach, R. M., Monsonigo-Ornan, E., Tibial dyschondroplasia 40 years later. *Poult Sci* 2007, *86*, 2053-2058.
- [79] Olsson, S. E., Osteochondrosis in domestic animals. Introduction. *Acta Radiol Suppl* 1978, *358*, 9-14.
- [80] Busch, M. E., Wachmann, H., Osteochondrosis of the elbow joint in finishing pigs from three herds: associations among different types of joint changes and between osteochondrosis and growth rate. *Veterinary journal* 2011, *188*, 197-203.
- [81] Dämmrich, K., Relationship between nutrition and bone growth in large and giant dogs. *J Nutr* 1991, *121*, S114-121.
- [82] Forbes, A. P., Studies on the relation of the serum albumin to the formation of bone matrix. *The Journal of clinical investigation* 1947, *26*, 1181.
- [83] Rejnö, S., Strömberg, B., Osteochondrosis in the horse. II. Pathology. *Acta radiologica. Supplementum* 1978, *358*, 153-178.
- [84] Strömberg, B., Rejnö, S., Osteochondrosis in the horse. I. A clinical and radiologic investigation of osteochondritis dissecans of the knee and hock joint. *Acta radiologica. Supplementum* 1978, *358*, 139-152.

- [85] Jeffcott, L. B., Kold, S. E., Stifle lameness in the horse: a survey of 86 referred cases. *Equine veterinary journal* 1982, 14, 31-39.
- [86] Jeffcott, L. B., Osteochondrosis - An international problem for the horse industry. *Journal of Equine Veterinary Science* 1996, 16, 32-37.
- [87] Hoppe, F., Radiological investigations of osteochondrosis dissecans in Standardbred Trotters and Swedish Warmblood horses. *Equine Vet J* 1984, 16, 425-429.
- [88] Lindsell, C., Hilbert, B., McGill, C., A retrospective clinical study of osteochondrosis dissecans in 21 horses. *Aust Vet J* 1983, 60, 291-293.
- [89] Denoix, J. M., Jeffcott, L. B., McIlwraith, C. W., van Weeren, P. R., A review of terminology for equine juvenile osteochondral conditions (JOCC) based on anatomical and functional considerations. *Vet J* 2013.
- [90] Verwilghen, D., Busoni, V., Gangl, M., Franck, T., *et al.*, Relationship between biochemical markers and radiographic scores in the evaluation of the osteoarticular status of Warmblood stallions. *Res Vet Sci* 2009, 87, 319-328.
- [91] Donabedian, M., van Weeren, P. R., Perona, G., Fleurance, G., *et al.*, Early changes in biomarkers of skeletal metabolism and their association to the occurrence of osteochondrosis (OC) in the horse. *Equine veterinary journal* 2008, 40, 253-259.
- [92] Studer, S., Gerber, V., Straub, R., Brehm, W., *et al.*, [Prevalence of hereditary diseases in three-year-old Swiss Warmblood horses]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2007, 149, 161-171.
- [93] Philipsson, J., Andréasson, E., Sandgren, B., Dalin, G., Carlsten, J., Osteochondrosis In The Tarsocrural Joint And Osteochondral Fragments In The Fetlock Joints In Standardbred Trotters. II. Heritability. *Equine Vet J* 1993, 25, 38-41.
- [94] Dierks, C., Löhring, K., Lampe, V., Wittwer, C., *et al.*, Genome-wide search for markers associated with osteochondrosis in Hanoverian warmblood horses. *Mamm Genome* 2007, 18, 739-747.
- [95] Lampe, V., Dierks, C., Komm, K., Distl, O., Identification of a new quantitative trait locus on equine chromosome 18 responsible for osteochondrosis in Hanoverian warmblood horses. *J Anim Sci* 2009, 87, 3477-3481.
- [96] Van Weeren, P. R., Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M., Barneveld, A., The influence of birth weight, rate of weight gain and final achieved height and sex on the development of osteochondrotic lesions in a population of genetically predisposed Warmblood foals. *Equine veterinary journal. Supplement* 1999, 31, 26-30.
- [97] Donabedian, M., Fleurance, G., Perona, G., Robert, C., *et al.*, Effect of fast vs. moderate growth rate related to nutrient intake on developmental orthopaedic disease in the horse. *Anim Res* 2006, 55, 471-486.
- [98] Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M., Mol, J. A., Barneveld, A., Hormones, Growth Factors And Other Plasma Variables In Relation To Osteochondrosis. *Equine Veterinary Journal* 1999, 31, 45-54.
- [99] Vivrette, S. L., Reimers, T. J., Krook, L., Skeletal disease in a hypothyroid foal. *The Cornell veterinarian* 1984, 74, 373-386.
- [100] Irvine, C. H., Hypothyroidism in the foal. *Equine Vet J* 1984, 16, 302-306.
- [101] Allen, A. L., Hyperplasia of the thyroid gland and musculoskeletal deformities in two equine abortuses. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 1995, 36, 234-236.
- [102] Allen, A. L., Fretz, P. B., Card, C. E., Doige, C. E., The effects of partial thyroidectomy on the development of the equine fetus. *Equine veterinary journal* 1998, 30, 53-59.
- [103] Kreplin, C., Allen, A., Alberta. Congenital hypothyroidism in foals in Alberta. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 1991, 32, 751.
- [104] D'Amours, G. H., Taylor, S. M., Olfert, E. D., Simko, E., Allen, A. L., Evaluation of experimental methods to induce congenital hypothyroidism in guinea pigs for use in the study of congenital hypothyroidism in horses. *American journal of veterinary research* 2004, 65, 1251-1258.
- [105] Glade, M. J., Belling Jr., T. H., A Dietary Etiology For Osteochondrotic Cartilage. *Journal of Equine Veterinary Science* 1986, 6, 151-155.

- [106] Jeffcott, L., Osteochondrosis in the horse--searching for the key to pathogenesis. *Equine Vet J* 1991, 23, 331-338.
- [107] McIlwraith, C., *Pratique Vétérinaire Equine* 2005, pp. 67-78.
- [108] Frantz, N. Z., Andrews, G. A., Tokach, M. D., Nelssen, J. L., *et al.*, Effect of dietary nutrients on osteochondrosis lesions and cartilage properties in pigs. *Am J Vet Res* 2008, 69, 617-624.
- [109] Pool, R., *Equine veterinary journal* 1993, pp. 5-12.
- [110] Grondalen, T., Osteochondrosis, arthrosis and leg weakness in pigs. *Nord Vet Med* 1974, 26, 534-537.
- [111] Desjardins, M. R., Hurtig, M. B., Cartilage healing: A review with emphasis on the equine model. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne* 1990, 31, 565-572.
- [112] Ytrehus, B., Carlson, C., Ekman, S., Etiology and pathogenesis of osteochondrosis. *Vet Pathol* 2007, 44, 429-448.
- [113] Henson, F., Davies, M., Jeffcott, L., *Veterinary Journal* 1997, pp. 53-62.
- [114] Jeffcott, L., Henson, F., Studies on growth cartilage in the horse and their application to aetiopathogenesis of dyschondroplasia (osteochondrosis). *Vet J* 1998, 156, 177-192.
- [115] Bravo, C., Kawamura, H., Yamaguchi, T., Hotokebuchi, T., Sugioka, Y., Experimental Osteochondritis Dissecans--The Role Of Cartilage Canals In Chondral Fractures Of Young Rabbits. *Fukuoka Igaku Zasshi* 1996, 87, 133-141.
- [116] Carlson, C. S., Meuten, D. J., Richardson, D. C., Ischemic necrosis of cartilage in spontaneous and experimental lesions of osteochondrosis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 1991, 9, 317-329.
- [117] Ytrehus, B., Andreas Haga, H., Mellum, C. N., Mathisen, L., *et al.*, Experimental ischemia of porcine growth cartilage produces lesions of osteochondrosis. *J Orthop Res* 2004, 22, 1201-1209.
- [118] Ytrehus, B., Grindflek, E., Teige, J., Stubsjøen, E., *et al.*, The effect of parentage on the prevalence, severity and location of lesions of osteochondrosis in swine. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2004, 51, 188-195.
- [119] Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C., Dolvik, N., Epiphyseal cartilage canal blood supply to the metatarsophalangeal joint of foals. *Equine Vet J* 2009, 41, 865-871.
- [120] Olstad, K., Ytrehus, B., Ekman, S., Carlson, C., Dolvik, N., Epiphyseal cartilage canal blood supply to the tarsus of foals and relationship to osteochondrosis. *Equine Vet J* 2008, 40, 30-39.
- [121] Olstad, K., Cnudde, V., Masschaele, B., Thomassen, R., Dolvik, N., Micro-computed tomography of early lesions of osteochondrosis in the tarsus of foals. *Bone* 2008, 43, 574-583.
- [122] Dierks, C., Lohring, K., Lampe, V., Wittwer, C., *et al.*, Genome-wide search for markers associated with osteochondrosis in Hanoverian warmblood horses. *Mamm Genome* 2007, 18, 739-747.
- [123] Studer, S., Gerber, V., Straub, R., Brehm, W., *et al.*, [prevalence of hereditary diseases in three-year-old swiss warmblood horses]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2007, 149, 161-171 ST - [Prevalence of hereditary diseases in.
- [124] Corbin, L. J., Blott, S. C., Swinburne, J. E., Sibbons, C., *et al.*, A genome-wide association study of osteochondritis dissecans in the Thoroughbred. *Mamm Genome* 2012, 23, 294-303.
- [125] Teyssedre, S., Dupuis, M. C., Guerin, G., Schibler, L., *et al.*, Genome-wide association studies for osteochondrosis in French Trotter horses. *Journal of animal science* 2012, 90, 45-53.
- [126] Cillero-Pastor, B., Ruiz-Romero, C., Caramés, B., López-Armada, M. J., Blanco, F. J., Proteomic Analysis By Two-Dimensional Electrophoresis To Identify The Normal Human Chondrocyte Proteome Stimulated By Tumor Necrosis Factor Alpha And Interleukin-1beta. *Arthritis and rheumatism* 2010, 62, 802-814 ST - Proteomic analysis by two-dimensional.
- [127] Desjardin, C., Balliau, T., Valot, B., Zivy, M., *et al.*, A method for proteomic analysis of equine subchondral bone and epiphyseal cartilage. *Proteomics* 2012, 12, 1870-1874.
- [128] Quignodon, L., Vincent, S., Winter, H., Samarut, J., Flamant, F., A point mutation in the activation function 2 domain of thyroid hormone receptor alpha1 expressed after CRE-mediated recombination partially recapitulates hypothyroidism. *Mol Endocrinol* 2007, 21, 2350-2360.

[129] Denoix, J. M., Valette, J. P., Heiles, P., Ribot, X., Tavernier, L., Radiographic survey of juvenile osteoarticular lesions in

3 year old French breed horses: General results on 1180 horses. 2000, 32, 35-41.

[130] Bohndorf, K., Injuries at the articulating surfaces of bone (chondral, osteochondral, subchondral fractures and osteochondrosis dissecans). *European Journal of Radiology* 1996, 22, 22-29.

[131] Distl, O., The genetics of equine osteochondrosis. *Vet J* 2013.

[132] Lampe, V., Dierks, C., Komm, K., Distl, O., Identification of a new quantitative trait locus on equine chromosome 18 responsible for osteochondrosis in Hanoverian warmblood horses. *J Anim Sci* 2009, 87, 3477-3481.

[133] Jeffcott, L. B., Kold, S. E., Melsen, F., Aspects of the pathology of stifle bone cysts in the horse. *Equine Vet J* 1983, 15, 304-311.

[134] Jones, W. E., Osteochondrosis Ocd. *Journal of Equine Veterinary Science* 1994, 14, 71-71.

[135] Martin, J. A., Martini, A., Molinari, A., Morgan, W., et al., Mitochondrial electron transport and glycolysis are coupled in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2012, 20, 323-329.

[136] Blanco, F. J., Rego, I., Ruiz-Romero, C., The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011, 7, 161-169.

[137] Lisse, T. S., Thiele, F., Fuchs, H., Hans, W., et al., ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfecta. *PLoS Genet* 2008, 4, e7.

[138] Yoshida, H., ER stress and diseases. *The FEBS journal* 2007, 274, 630-658.

[139] Cameron, T. L., Bell, K. M., Tatarczuch, L., Mackie, E. J., et al., Transcriptional profiling of chondrodysplasia growth plate cartilage reveals adaptive ER-stress networks that allow survival but disrupt hypertrophy. *PLoS One* 2011, 6, e24600.

[140] de Brito, O. M., Scorrano, L., An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J* 2010, 29, 2715-2723.

[141] Sloet van Oldruitenborgh-Ooste, Mol, J. A., Barneveld, A., Hormones, growth factors and other plasma variables in relation to osteochondrosis. *Equine Vet J Suppl* 1999, 45-54.

[142] Rajpar, M. H., Mcdermott, B., Kung, L., Eardley, R., et al., Targeted Induction Of Endoplasmic Reticulum Stress Induces Cartilage Pathology. *PLoS genetics* 2009, 5.

[143] Gohda, T., Makita, Y., Shike, T., Tanimoto, M., et al., Identification of epistatic interaction involved in obesity using the KK/Ta mouse as a Type 2 diabetes model: is Zn-alpha2 glycoprotein-1 a candidate gene for obesity? *Diabetes* 2003, 52, 2175-2181.

[144] Zhang, B., Guo, Y. K., Li, S., Zhang, L. Z., et al., Genotype and haplotype analysis of the AZGP1 gene in cattle. *Molecular biology reports* 2012, 39, 10475-10479.

[145] Richardson, D. C., Zentek, J., Nutrition and osteochondrosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1998, 28, 115-135.

[146] Glade, M. J., Belling, T. H., Jr., Growth plate cartilage metabolism, morphology and biochemical composition in over- and underfed horses. *Growth* 1984, 48, 473-482.

[147] Semevolos, S. A., Brower-Toland, B. D., Bent, S. J., Nixon, A. J., Parathyroid hormone-related peptide and indian hedgehog expression patterns in naturally acquired equine osteochondrosis. *J Orthop Res* 2002, 20, 1290-1297.

[148] Semevolos, S. A., Strassheim, M. L., Haupt, J. L., Nixon, A. J., Expression patterns of hedgehog signaling peptides in naturally acquired equine osteochondrosis. *J Orthop Res* 2005, 23, 1152-1159.

[149] Zabek, T., Golonka, P., Fornal, A., Semik, E., IHH gene polymorphism among three horse breeds and its application for association test in horses with osteochondrosis. *Hereditas* 2013, 150, 38-43.

[150] Laverty, S., Ionescu, M., Marcoux, M., Boure, L., et al., Alterations in cartilage type-II procollagen and aggrecan contents in synovial fluid in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* 2000, 18, 399-405.

[151] Trumble, T. N., Scarbrough, a. B., Brown, M. P., Osteochondral Injury Increases Type II Collagen Degradation Products (C2c) In Synovial Fluid Of Thoroughbred Racehorses. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2009, 17, 371-374.

- [152] Frantz, N. Z., Friesen, K. G., Andrews, G. A., Tokach, M. D., *et al.*, Use of serum biomarkers to predict the development and severity of osteochondrosis lesions in the distal portion of the femur in pigs. *Am J Vet Res* 2010, *71*, 946-952.
- [153] Leichtle, A., Dufour, J. F., Fiedler, G. M., Potentials and pitfalls of clinical peptidomics and metabolomics. *Swiss Med Wkly* 2013, *143*, 0.
- [154] Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., *et al.*, Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2010, *12*, R86.