

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine vétérinaire

Titre de la thèse en Français : Contribution à l'évaluation non invasive de l'os équin par ultrasonographie quantitative et marqueurs biochimiques osseux

Titre de la thèse en Anglais : Contribution to the non invasive assesement of equine bone by quantitative ultrasound and biochemical bone markers

Candidat : Bianca Carstanjen

Promoteur : Prof. Olivier Lepage

Co-promoteur : Dr Hélène Amory

Département et Service :

Département des Sciences Cliniques, Service de Médecine interne des grands Animaux,
Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 19 décembre 2003

Composition du jury :

Membres internes à la Faculté de Médecine vétérinaire: H. Amory, M. Balligand, J.-F. Beckers,
A. Gabriel, P. Lekeux, O. Lepage, D. Serteyn, F. Snaps, J. Sulon.

Membres externes à la Faculté de Médecine vétérinaire: R. François, D. Uebelhart
(Université de Zurich)

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les pathologies squelettiques se rencontrent fréquemment chez les chevaux de sport et de loisir et constituent un problème social et économique important pour l'industrie équine. Les jeunes chevaux de course sont particulièrement prédisposés à développer des pathologies de surcharge tel que le «sore shin» ou les fractures. Différentes techniques sont actuellement disponibles pour évaluer le tissu osseux chez le cheval, mais la détection précoce des maladies osseuses, leur suivi et l'évaluation *in vivo* du métabolisme osseux posent encore problème. L'ultrasonographie quantitative est une technique d'évaluation non invasive du tissu osseux, elle constitue une alternative aux techniques basées sur les radiations ionisantes. L'évaluation de l'os au moyen des ultrasons a été décrite chez le cheval il y a une vingtaine

d'années (Pratt, 1980). Mais, au défaut, les caractéristiques techniques du matériel limitaient les possibilités d'utilisation et les informations que l'on peut en tirer chez le cheval (McCartney *et al.*, 1987; Buckingham *et al.*, 1992). La technologie de l'ultrasonographie quantitative a progressé au cours des dernières années et à l'heure actuelle, de nouveaux appareils sont sur le marché. Le métabolisme osseux peut également être évalué par le dosage de différents marqueurs biochimiques (marqueurs de la formation ou de la résorption osseuse) dans le sérum, le plasma ou l'urine. De nombreux kits de dosages immunologiques de marqueurs osseux ont été validés chez le cheval, mais la plupart d'entre eux ne sont pas spécifiques et ainsi ne fournissent que des résultats plus ou moins précis. L'objectif de ce présent travail est d'apporter une contribution à l'étude des techniques d'évaluation non invasives du tissu osseux, notamment l'ultrasonographie quantitative et le dosage des marqueurs osseux biochimiques. Un appareil d'ultrasonographie quantitatif multi-site à

transmission axiale (Omnisense™, Sunlight Ltd., Rehovot ; Israel) a été testé chez le cheval. Le métacarpien principal du cheval est principalement investigué dans cette étude parce qu'il est un os bien étudié chez le cheval (Stover *et al.*, 1992) et parce que les pathologies du métacarpien principal sont fréquentes chez le cheval (Nunamaker, 1996). Les marqueurs biochimiques donnent des informations concernant le métabolisme osseux du squelette entier, mais dans l'espèce équine, ce sont surtout des marqueurs non spécifiques qui sont utilisés. Deux marqueurs osseux ont été investigués dans cette étude ; l'ostéocalcine, un marqueur de l'activité des ostéoblastes (Risteli et Risteli, 1993) et le télopeptide carboxy-terminal du collagène de type I généré par l'action des métalloprotéinases (CTX-MMP) (Delmas *et al.*, 2000). Ce peptide, anciennement nommé ICTP, est libéré durant la dégradation du collagène de type I (Risteli *et al.*, 1993).

Dans ce travail les hypothèses suivantes ont été testées : 1) l'appareil d'ultrasonographie quantitative multi-sites à transmission axiale permet-il de mesurer les propriétés de l'os cortical chez le cheval ? ; 2) l'ultrasonographie quantitative peut-elle fournir des informations sur les propriétés de l'os équin autres que la densité minérale osseuse mesurée par absorptiométrie biphotonique au même niveau ? ; 3) l'ultrasonographie quantitative du métacarpien principal ainsi que les marqueurs biochimiques permettent-ils d'étudier l'influence de différents paramètres physiologiques et pathologiques sur le squelette des jeunes pur-sang de course à l'entraînement ? ; 4) la structure primaire de l'ostéocalcine équine a-t-elle une homologie élevée avec l'ostéocalcine des autres espèces ? ; 5) un dosage radio-immunologique spécifique pour l'ostéocalcine équine permet-il d'obtenir des résultats plus accurates que ceux obtenus à l'aide de kits de dosage radio-immunologique de l'ostéocalcine bovine (hétérologue) ?

RÉSULTATS

Les résultats de nos études ont permis de démontrer que l'appareil d'ultrasonographie quantitative multi-sites à transmission axiale permet de mesurer avec précision les propriétés de l'os cortical superficiel du métacarpien principal, du radius et du tibia chez le cheval non tranquillisé et en position debout. Les chevaux présentent une vitesse des ultrasons la plus basse en face dorsale et la plus élevée en face latérale du métacarpien principal. Les différences de vitesses des ultrasons peuvent s'expliquer par la géométrie, la structure et les propriétés biomécaniques du métacarpien principal dans cette espèce. De plus, une étude *ex vivo* a montré que la présence de tissus mous n'influence pas les valeurs de vitesses des ultrasons obtenues. Les valeurs de vitesse des ultrasons obtenues en utilisant l'huile de silicone comme milieu de couplage sont supérieures à celles obtenues avec du gel à ultrasons. Cette

observation pourrait s'expliquer par la plus grande viscosité de l'huile de silicone et par la tendance à la formation de micro bulles d'air lors de l'emploi de gel à ultrasons. Dans une étude *ex vivo* sur le métacarpien principal du cheval, les valeurs de vitesse des ultrasons ont été comparées aux mesures de densité minérale osseuse mesurée par absorptiométrie biphotonique au même niveau. Les deux techniques ont permis de mesurer avec précision les caractéristiques du métacarpien principal et une corrélation modérée a été observée entre les valeurs obtenues par les deux techniques. Ces résultats amènent à penser que ces deux méthodes ne mesurent pas les mêmes propriétés de l'os et pourraient être utilisées de manière complémentaire dans les protocoles d'évaluation de l'os cortical. L'ultrasonographie quantitative a par la suite été utilisée pour étudier l'influence de différents facteurs physiologiques et pathologiques sur le métacarpien principal de jeunes pur-sang de course à l'entraînement. Chez le jeune pur-sang, les valeurs de vitesse des ultrasons obtenues à la face dorsale du métacarpien principal étaient significativement plus faibles que celles obtenues du côté médial ou latéral. La diminution au cours de la saison d'entraînement des valeurs de vitesse des ultrasons obtenues sur la face dorsale pourrait être due à un processus de modelage osseux important en rapport avec l'exercice. Chez nos chevaux pur-sang, des différences de vitesse des ultrasons entre membres ont seulement été observées au niveau de la face dorsale du métacarpien principal pendant l'entraînement. Ces différences pourraient être dues à leur programme d'entraînement. Les valeurs de vitesse des ultrasons obtenues en face dorsale du métacarpien diminuent avec l'âge, ce qui pourrait correspondre à une augmentation du processus de modelage osseux et l'accumulation d'os à cet endroit. Les juments de notre étude présentaient des valeurs de vitesse des ultrasons significativement plus élevées que celles des étalons au niveau de la face dorsale du métacarpien principal. L'intensité de l'entraînement ne s'est pas avéré influencer significativement les valeurs de vitesse des ultrasons obtenues durant les neuf mois d'entraînement. Cependant, chez les chevaux soumis à un entraînement intense, les mesures de vitesse des ultrasons au niveau de la face dorsale du métacarpien principal étaient plus faibles que celles obtenues chez les chevaux soumis à un entraînement faible ce qui pourrait être expliqué par un accroissement du processus de modelage sur la face dorsale du métacarpien principal suite à un exercice intense. Sur le nombre limité de cas évalués dans notre étude la pathologie « sore shin » ne s'est pas révélée ayant un effet significatif quant aux mesures de vitesse des ultrasons obtenues au niveau du métacarpien principal. Dans une autre étude, l'effet de divers facteurs physiologiques sur certains marqueurs osseux ont été évalués chez des jeunes pur-sang soumis à différentes intensités d'entraînement. Les pur-sang de deux ans présentaient des concentrations sériques en ostéocalcine et

en CTX-MMP plus élevées que celles des pur-sang de trois ans. Nous n'avons pas observé de variations liées au sexe sur les concentrations sériques en ostéocalcine et en CTX-MMP. L'intensité de l'entraînement ne s'est révélée influencer significativement les concentrations sériques en ostéocalcine et en CTX-MMP, ni le rapport ostéocalcine/CTX-MMP chez des pur-sang de deux et trois ans. Les chevaux ont montré une diminution significative du rapport ostéocalcine/CTX-MMP dans les six premières semaines d'entraînement, ce qui suggère une augmentation de la résorption osseuse induite par la mise à l'exercice. Ceci pourrait être dû au fait que l'effet maximum de la charge de l'exercice sur le métabolisme osseux apparaît durant la phase d'adaptation à l'entraînement physique. L'os répond par une augmentation de la résorption ostéoclastique suivie d'une formation osseuse ostéoblastique. Dans notre étude, les chevaux de course de deux ans ont réagi à l'entraînement par une augmentation de la formation osseuse entre le second et le troisième cycle de prélèvement, comme le suggère l'augmentation significative du rapport ostéocalcine/CTX-MMP obtenue à ce moment. Par contre, les pur-sang de course âgés de trois ans ont répondu plus tardivement à la mise au travail soit entre le troisième et le quatrième cycle de prélèvement, par une augmentation parallèle de la formation et de la résorption osseuse, avec pour conséquence un rapport ostéocalcine/CTX-MMP inchangé. Pendant les mois d'hiver qui ont précédé cette étude, l'entraînement des chevaux de trois ans a été réduite à un travail de faible intensité. Le squelette bien adapté des chevaux de trois ans a pu revenir au stade de pré-entraînement durant les mois d'hiver, et peut donc avoir réagi à la mise à l'exercice de manière similaire à celui des chevaux de deux ans non entraînés. Les chevaux de deux et de trois ans de notre étude ont montré une diminution de la formation et la résorption osseuse caractérisée par un rapport ostéocalcine/CTX-MMP inchangé entre le quatrième et sixième cycle de prélèvements. La diminution concomitante de la formation et la résorption osseuse dans les deux groupes d'âge peut s'expliquer par la diminution avec l'augmentation de l'âge des concentrations sériques en ces deux marqueurs. Sur le faible nombre de chevaux investigués la pathologie « sore shin » n'est pas révélé jouer un effet significatif quant aux valeurs sériques en ostéocalcine, en CTX-MMP et sur le rapport ostéocalcine/CTX-MMP. L'ostéocalcine a été isolée à partir de tissu cortical osseux de poulain. Après déminéralisation osseuse et extraction acide, la protéine a été purifiée par chromatographie en phase greffée apolaire C_{18} , par chromatographie de filtration sur gel, et par chromatographie échangeuse d'ions. La séquence en acides aminés de l'ostéocalcine équine a été déterminée, elle correspond à : YLDHWLGA(HYP)APYPDPL(GLA)PRR(GLA)VC(GLA)LNPDCDELAD HIGFQEAYRRFYGPV. L'ostéocalcine équine contient 49 acides aminés dont trois sont des résidus acides gamma-carboxyglutamiques en position 17, 21 et

24. La séquence révèle également la présence d'une hydroxyproline en position neuf et de deux cystéines en position 23 et 29. La masse moléculaire et le point isoélectrique de la protéine ont été calculés à partir de la séquence transcrite, ils correspondent respectivement à 5,732 kDa et à 4,45. L'homologie de séquence avec l'ostéocalcine bovine (98 %) et humaine (94 %) est élevée. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle la structure primaire de l'ostéocalcine a été fortement conservée au cours de l'évolution et explique les réactions croisées entre l'ostéocalcine équine et l'antisérum anti-ostéocalcine bovine produits sur lapin (PattersonAllen *et al.*, 1982). La purification et la caractérisation de l'ostéocalcine équine ont été suivies par la mise au point d'un dosage radio-immunologique utilisant la protéine purifiée pour la production du standard, du traceur et d'immunogène (production d'antisérum polyclonaux sur lapin). L'absence de réactions croisées entre l'antisérum produit et les autres constituants sériques ou osseux a été vérifiée par dosage radio-immunologique des différentes fractions obtenues après passage de sérum équin et d'extrait osseux sur une colonne de type gel filtration. La limite de détection a été calculée et correspond à 0,2 ng/mL. Des dilutions en série de différents sérums équins ont permis de montrer la linéarité des différents points de dilution et le parallélisme à la courbe de référence. Le test de récupération a permis d'obtenir des taux compris entre 93,9 et 107,9 %. Les coefficients de variation intra- et interdosage sont respectivement de 6,2 % et de 8,2 %. Ces valeurs indiquent que le dosage est reproductible. Le dosage radio-immunologique ici décrit est donc spécifique, sensible, linéaire, précis, exact et reproductible. Une bonne corrélation a été obtenue entre les valeurs déterminées à l'aide du dosage radio-immunologique de l'ostéocalcine équine et les valeurs obtenues à l'aide de deux kits de dosage radio-immunologique de l'ostéocalcine bovine. Les valeurs déterminées par le dosage radio-immunologique équin sont toutefois supérieures aux valeurs obtenues à l'aide des deux systèmes bovins.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'ultrasonographie quantitative multi-site peut être utilisée chez le cheval pour évaluer la partie superficielle de l'os cortical en différents endroits du squelette. En plus d'être une technique de densitométrie, les mesures d'ultrasonographie quantitative peuvent fournir des informations pertinentes sur les propriétés de l'os équin autres que la densité minérale telles que par exemple la micro-structure et l'élasticité de l'os. Cependant, une meilleure compréhension des interactions entre les ultrasons et l'os serait nécessaire pour améliorer la maîtrise de cette technique.

Les marqueurs biochimiques osseux donnent des informations sur le métabolisme osseux de l'ensemble du squelette. L'ostéocalcine équine purifiée constitue une bonne base pour la standardisation de son dosage en médecine vétérinaire équine ainsi que pour les recherches futures sur le métabolisme osseux chez le cheval.

Différentes études ont montré que des mesures d'ultrasonographie quantitative (Hans *et al.*, 1996) ainsi que de marqueurs osseux biochimiques (Garnero *et al.*, 1998) donnent des informations quant au risque de fracture qui ne dépend pas seulement de la densité minérale osseuse. Une combinaison de différentes techniques d'investigation osseuse indépendantes devrait cependant permettre d'identifier plus facilement les individus présentant un risque élevé. Notre étude sur le terrain n'a pas permis de déterminer de techniques permettant de détecter précocement les chevaux présentant des risques élevés de fracture ou de sore shin, mais a néanmoins ouvert des possibilités d'investigation osseuse prometteuses pour le futur. L'étude de pathologies induites expérimentalement devrait apporter des précisions quant au rôle que pourrait jouer l'ultrasonographie quantitative et les marqueurs osseux biochimiques dans le dépistage

précoce des pathologies osseuses chez le cheval. A l'avenir la combinaison de plusieurs techniques de dépistage précoce de pathologies osseuses chez le cheval de sport pourrait s'avérer utile pour optimiser la sélection des animaux à traiter.

REMERCIEMENTS

Equine Research Funds, Belgique.

RÉFÉRENCES

- BUCKINGHAM S.H., JEFFCOTT L.B., ANDERSON G.A., MCCARTNEY R.N. *In vivo* measurement of bone quality in the horse: estimates of precision for ultrasound velocity measurement and single photon absorptiometry. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 1992, **30**, 41-45.
- DELMAS P.D., EASTELL R., GARNEROP, SEIBEL M.J., STEPAN J. & THE COMMITTEE OF SCIENTIFIC ADVISORS OF THE INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos. Int.*, 2000, **11**, S2-17.
- GARNERO P., DARGENT-MOLINA P., HANS D., SCHOTT A.M., BREART G., MEUNIER P.J., DELMAS P.D. Do markers of bone resorption add to bone mineral density and ultrasonographic heel measurement for the prediction of hip fracture in elderly women? The EPIDOS prospective study. *Osteoporos. Int.*, 1998, **8**, 563-569.
- HANS D., DARGENT-MOLINA P., SCHOTT A.M., SEBERT J.L., COMIER C., KOTZKI P.O., DELMAS P.D., POUILLES J.M., BREART G., MEUNIER P.J. Ultrasonographic heel measurements to predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study. *Lancet*, 1996, **348**, 511-514.
- MCCARTNEY R.N., JEFFCOTT L.B. Combined 2.25 MHz ultrasound velocity and bone mineral density measurements in the equine metacarpus and their *in vivo* applications. *Med. Biol. Eng. Comp.*, 1987, **25**, 620-626.
- NUNAMAKER D.M. Metacarpal stress fractures. In: Nixon A.J. (ed) ; *Equine Fracture Repair*. W.B. Saunders : Philadelphia, 1996, 195-199.
- PATTERSON-ALLEN P., BRAUTIGAM C.E., GRINDELAND R.E., ASLING C.W., CALLAHAN P.X. A specific radioimmunoassay for osteocalcin with advantageous species cross-reactivity. *Anal. Biochem.*, 1982, **120**, 1-7.
- PRATT G.W. An *in vivo* method of ultrasonically evaluating bone strength. In : *Proceedings of the AAEP*, 1980, 295-306.
- RISTELI L., RISTELI J. Biochemical markers of bone metabolism. *Ann. Med.*, 1993, **25**, 385-393.

RISTELI J., ELOMAA I., NIEMI S., NOVAMO A., RISTELI L. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clin. Chem.*, 1993, **39**, 635-640.

STOVER S.M., POOL R.R., MARTIN R.B., MORGAN J.P. Histological features of the dorsal cortex of the third metacarpal bone mid-diaphysis during postnatal growth in thoroughbred horses. *J. Anat.*, 1992, **181**, 455-469.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

CARSTANJEN B., DETILLEUX J., AMORY H., LEPAGE O.M. Einsatz der quantitativen Ultraschallmetrie in der Knochendiagnostik beim Pferd. In : Proceedings of the 17th DVG Congress Pferdekrankheiten Hannover/ Germany, 2002, 249-252.

CARSTANJEN B., DUBOEUF F., AMORY H., BARTHEZ P., LEPAGE O.M. Equine third metacarpal bone assessment by quantitative ultrasound and dual-energy-x-ray absorptiometry. *Vet. Surg.*, 2001, **30**, 307-308.

CARSTANJEN B., DUBOEUF F., DETILLEUX J., AMORY H., BARTHEZ P., LEPAGE O.M. Quantitative ultrasound and dual-X-ray absorptiometry-measurements of the third metacarpal bone in horses. An *in vivo-ex vivo* study. *J. Bone Miner. Res.*, 2000, **15**, S529.

CARSTANJEN B., DUBOEUF F., DETILLEUX J., LEPAGE O.M. Equine third metacarpal bone assessment by quantitative ultrasound and dual energy x-ray absorptiometry: an *ex vivo* study. *J. Vet. Med. A*, 2003, **50**, 42-47.

CARSTANJEN B., LANGLOIS P., DETILLEUX J., AMORY H., LEPAGE O.M. Speed of Sound measurements of the third metacarpal bone in young exercising Thoroughbreds. In : Proceedings of the 1st World Orthopaedic Veterinary Congress, Munich/ Germany, 2002, 60.

CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., DELIGNETTE-MULLER M.L., LANGLOIS P., AMORY H. Multi-

site quantitative ultrasound measurements of the third metacarpal bone in young Thoroughbred horses. In: Lindner A. (ed), The Elite Dressage and Three-Day-Event Horse. Conference on equine sports medicine and science 2002, Lensing Druck Dortmund, Germany, 97-98.

CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., DETILLEUX J., DUBOEUF F., AMORY H. Multi-site quantitative ultrasound a method for non invasive assessment of bone in horses. *Am. J. Vet. Res.*, 2002, **63**, 1464-1469.

CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., HARS O, LANGLOIS P., DUBOEUF F., AMORY H. Speed of sound measurements of the third metacarpal bone of race trained Thoroughbreds. *Bone*, 2003, **33**, 411-418.

CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., HARS O, LANGLOIS P., DUBOEUF F., AMORY H. Speed of sound measurements of the third metacarpal bone of race trained Thoroughbreds. In : Proceedings of the 38th annual scientific meeting of the ACVS, Washington DC/USA, 2003.

- CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., LANGLOIS P. Quantitative ultrasound: a non invasive method for bone assessment in Thoroughbred horses. *Equine Vet. Sci.*, 1999, **19**, 556.
- CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., SULON J., HARS O., AMORY H., REMY B., LANGLOIS P. Serum osteocalcin and CTX-MMP concentrations in young exercising thoroughbred racehorses. In : Proceedings of the 13th annual scientific meeting of the ECVS, Prague/ Czech Rep., 2004, 262-263.
- CARSTANJEN B., LEPAGE O.M., SULON J., HARS O., AMORY H., REMY B., LANGLOIS P. Serum osteocalcin and CTX-MMP concentrations in young exercising thoroughbred racehorses. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2005, **52**, 114-120.
- CARSTANJEN B., SULON J., BANGA-MBOKO H., BECKERS J.F., REMY B. Development and validation of a radioimmunoassay for equine osteocalcin. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2003, **24**, 31-41.
- CARSTANJEN B., SULON J., BANGA-MBOKO H., WATTIEZ R., AMORY H., LEPAGE O.M., REMY B. Isolation and radioimmunoassay formation of equine osteocalcin : preliminary results. *Biotech. Agron. Soc. Environ.* 2002, **6**, 8-9.
- CARSTANJEN B., SULON J., BANGA-MBOKO H., WATTIEZ R., AMORY H., LEPAGE O.M., REMY B. Development and validation of a radioimmunoassay for equine osteocalcin. *Vet. Surg.*, 2002, **31**, 500.
- CARSTANJEN B., WATTIEZ R., AMORY H., LEPAGE O.M., REMY B. Isolement et caractérisation de l'ostéocalcine équine. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 31-38.
- CARSTANJEN B., WATTIEZ R., AMORY H., LEPAGE O.M., REMY B. The isolation and characterization of equine osteocalcin. *Bone*, 2001, **28**, S150.
- CARSTANJEN B., WATTIEZ R., AMORY H., LEPAGE O.M., REMY B. The Isolation and Characterization of osteocalcin in horses. *Vet. Surg.* 2002, **31**, 299.
- GRAFENAU P., CARSTANJEN B., LEPAGE O.M. Osteocalcin : a biochemical marker of bone formation in equine medicine. *Vet. Med.-Czech.*, 2000, **45**, 209-216.
- LEPAGE O.M., CARSTANJEN B. Quantitative ultrasound and biochemical markers for equine bone assessment. *Proceedings of the 10th annual ESVOT Congress, Munich/ Germany*, 2000, 127.
- LEPAGE O.M., CARSTANJEN B., UEBELHART D. Non-invasive assessment of equine bone : an update. *Vet. J.*, 2001, **161**, 10-22.