

2M11.3172.1

Université de Montréal

**Étude fonctionnelle des protéines G inhibitrices dans
la signalisation de la mélatonine au niveau osseux : implication dans
l'étiopathogenèse de la scoliose idiopathique.**

par

Bouziane Azeddine

Laboratoire de Génétique Moléculaire de l'Os et des Malformations
Musculo-Squelettiques
Hôpital Sainte-Justine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Biologie Moléculaire

Mai 2004

© **Bouziane Azeddine**, 2004



QH

506

U54

2004

V.009

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Étude fonctionnelle des protéines G inhibitrices dans
la signalisation de la mélatonine au niveau osseux : implication dans
l'étiopathogenèse de la scoliose idiopathique.**

présenté par
Bouziane Azeddine

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr John Di Battista
président-rapporteur

Dr Alain Moreau
Directeur de recherche

Dr Julio Fernandez
membre du jury

Résumé

La scoliose idiopathique (SIA) est une maladie complexe du rachis dont l'étiologie demeure inconnue. Parmi plusieurs hypothèses postulées, l'hypothèse neuroendocrinienne suggérant que la scoliose soit causée par une carence en mélatonine a suscité beaucoup d'intérêt. Cette hypothèse découle de l'observation que l'ablation de la glande pinéale chez le poulet et plus récemment chez le rat bipédale induit une scoliose. Toutefois ce rôle est controversé puisque la plupart des études ne montrent aucune variation significative des taux de mélatonine circulante chez les patients atteints de SIA. Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ont permis de démontrer pour la première fois un dysfonctionnement de la voie de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA. Il a été démontré que ce défaut est du à une phosphorylation accrue des protéines G inhibitrices (Gi) dont l'origine n'est pas encore définie. Cette phosphorylation anormale nous a conduit à investiguer la possibilité que celle-ci soit causée par une surexpression d'une kinase ou l'inactivation d'une phosphatase. Dans cette perspective, nous avons donc entrepris de déterminer et caractériser les protéines contenues dans le complexe formé par les récepteurs à mélatonine afin de mieux comprendre la signalisation de cette hormone dans l'os. Ceci pourrait permettre de déterminer l'origine du défaut de signalisation observé chez certains patients SIA. Outre une amélioration des connaissances sur cette pathologie, ce projet pourrait aboutir au développement des tests moléculaires pour le dépistage des scolioses et de pharmacothérapies pouvant prévenir ou réduire les déformations scoliotiques chez les enfants et adolescents.

Mots clés : scoliose, mélatonine, récepteurs couplés aux protéines G, ostéoblaste, protéines Gi.

Abstract

Idiopathic scoliosis is a complex disease of the spine; its aetiology is still unknown. Among several postulated hypothesis, The neuroendocrine hypothesis involving a melatonin deficiency as the source for AIS has generated a great interest. This hypothesis stems from the fact that experimental pinealectomy in chicken, and more recently in rats maintained in a bipedal mode, produces a scoliosis. The biological relevance of melatonin in idiopathic scoliosis is controversial since no significant decrease in circulating melatonin level has been observed in a majority of studies. Analysis of melatonin signal transduction in musculoskeletal tissues of AIS patients demonstrated for the first time a defect occurring in a cell autonomous manner in osteoblasts from AIS patients suffering of the most severe form of that disease. Molecular analysis showed that this dysfunction is triggered by an increased phosphorylation of Gi proteins inactivating their function. Gi protein phosphorylation could be caused either by activating mutations in kinases or loss-of-function mutations in phosphatases modulating Gi protein activity. Identification of proteins involved in melatonin signalling pathway could lead to a better characterisation of this pathway and to determine what cause this dysfunction. In addition to an improvement of knowledge on this pathology this project could lead to the development of molecular assays for scoliosis screening and pharmacotherapy that can prevent or bloc progression of the spinal deformation.

Keywords : scoliosis, melatonin, GPCR, osteoblast, Gi proteins.

Table des matières

Titre	ii
Identification du jury.....	iii
Résumé	iv
Abstract	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Dédicace	xiii
Remerciements	xiv
CHAPITRE 1. Revue de la littérature	1
1.1 Scolioses.....	1
1.1.1 Définition	1
1.1.2 Types de scoliose	2
1.1.2.1 Scoliose idiopathique	4
1.1.2.1.1 Scoliose idiopathique infantile.....	4
1.1.2.1.2 Scoliose idiopathique juvénile	4
1.1.2.1.3 Scoliose idiopathique adolescente.....	4
1.1.3 Étiologie de la scoliose.....	5
1.1.3.1 Facteurs génétiques	5
1.1.3.2 Éléments structuraux du rachis	7
1.1.3.3 Facteurs neurologiques.....	8
1.1.3.4 Facteurs musculaires	9
1.1.3.5 Facteurs endocriniens.....	10
1.1.3.5.1 Facteurs de croissance.....	10
1.1.3.5.2 La mélatonine.....	10
1.1.3.5.3 Les estrogènes	11
1.2 Mélatonine.....	12
1.2.1 Généralités.....	12

1.2.1.1	La glande pinéale	12
1.2.1.2	Synthèse de la mélatonine	12
1.2.2	Rôles physiologiques de la mélatonine	15
1.2.2.1	Effets hormonaux	15
1.2.2.1.1	Régulation du rythme circadien	15
1.2.2.1.2	Régulation du rythme saisonnier.....	15
1.2.2.1.3	Adaptation de la rétine à la lumière	16
1.2.2.1.4	Métabolisme osseux	16
1.2.2.1.5	Autres effets physiologiques	18
1.2.2.2	Voie de signalisation	19
1.2.2.2.1	Récepteurs membranaires	20
1.2.2.2.2	Récepteur cytosoliques.....	21
1.2.2.2.3	Récepteurs nucléaires.....	21
1.3	Protéines G.....	22
1.3.1	Classification des protéines G.....	23
1.3.1.1	La famille des $G_{\alpha i/o}$	23
1.3.1.2	La famille des $G_{\alpha q}$	24
1.3.1.3	La famille des $G_{\alpha 12}$	25
1.3.1.4	La famille des $G_{\alpha s}$	25
1.3.2	Rôles des protéines G.....	26
1.3.3	Modifications post-traductionnelles modulant la fonction des protéines Gi	26
1.3.4	Maladies causées par un dysfonctionnement des protéines G	28
1.4	Mécanismes régulant la voie de signalisation de la mélatonine.....	29
1.4.1	Régulation par phosphorylation	30
1.4.2	Régulation par des interactions protéine – protéine	31
1.4.2.1	Contribution des protéines d'échafaudage	32
CHAPITRE 2. Matériels et méthodes.....		34
2.1	Plan de cette étude.....	34
2.2	Matériels.....	34
2.2.1	Critères d'inclusion des patients scoliotiques et sujets témoins.....	34
2.3	Méthodes	35

2.3.1	Culture primaire d'ostéoblastes.....	35
2.3.2	Test d'AMPc	38
2.3.3	Préparation des extraits membranaires d'ostéoblastes	39
2.3.4	Isolement des protéines membranaires	39
2.3.5	Co-immunoprécipitations.....	40
2.3.6	Western blot	41
2.3.7	Détermination de la localisation des récepteurs MT1 et MT2	41
2.3.8	Analyses statistiques	42
CHAPITRE 3. Résultats		43
3.1	Étude de la voie de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA.....	43
3.1.1	Les ostéoblastes de patients scoliotiques présentent-ils un défaut de signalisation dans la voie de signalisation de la mélatonine ?	43
3.1.2	Détermination de la densité et la localisation des récepteurs à mélatonine MT1 et MT2.....	47
3.1.3	Analyse de la fonction des protéines Gi.....	49
3.1.3.1	Tests d'AMPc en utilisant le Gpp(NH)p.....	49
3.1.3.2	Détermination du couplage préférentiel des protéines Gi avec le récepteur MT2.....	49
3.1.3.3	Analyse des protéines Gi chez les ostéoblastes de patients scoliotiques	53
3.2	Détermination des protéines interagissant avec le récepteur MT2	56
CHAPITRE 4. Discussion		61
4.1	Aspect fondamental.....	61
4.1.1	Mise en évidence d'une signalisation fonctionnelle de la mélatonine dans les ostéoblastes humains.....	61
4.1.2	Couplage préférentiel des protéines Gi au récepteur MT2	61
4.1.3	Régulation de la phosphorylation des protéines Gi.....	62
4.1.4	Modèles pouvant expliquer les différentes interactions entre le récepteur MT2 et ses partenaires.....	65
4.1.4.1	Interaction de MT2 avec Rack1	65
4.1.4.2	Rôles de PKC δ dans la signalisation de la mélatonine	66
4.1.4.3	Rôles de PTP μ dans la signalisation de la mélatonine	67

4.1.4.4	Rôles de Src dans la signalisation de la mélatonine.....	68
4.2	Aspect clinique.....	70
4.2.1	Dysfonctionnement de la voie de signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes de patients scoliotiques.	70
4.2.2	La mélatonine pourrait-elle être la seule cause de la scoliose ?.....	70
4.2.3	Causes du dysfonctionnement de la voie de signalisation de la mélatonine	74
4.2.3.1	Implication des récepteurs MT1 et MT2 ?.....	74
4.2.3.2	Phosphorylation des protéines Gi.....	74
4.2.4	Ce dysfonctionnement est-il spécifique aux ostéoblastes ?.....	75
4.2.5	Implication possible des estrogènes comme facteur aggravant ?.....	76
4.3	Perspectives : applications en clinique.....	77
4.3.1	Tests de dépistage.....	77
Bibliographie	78

Liste des tableaux

Chapitre 1 Revue de la littérature

TABLEAU 1.1 CLASSIFICATION DES SCOLIOSES	3
--	---

Chapitre 2 Matériels et méthodes

TABLEAU 2.1 DONNÉES CLINIQUES DES PATIENTS PRÉSENTANT UNE SCOLIOSE IDIOPATHIQUE ADOLESCENTE (SIA).....	36
TABLEAU 2.2 DONNÉES CLINIQUES DES SUJETS TÉMOINS.....	37

Chapitre 3 Résultats

TABLEAU 3.1 VALEURS BASALES ET INDUITES D'AMPC MESURÉES CHEZ LES OSTÉOBLASTS ISOLÉS DE PATIENTS SCOLIOTIQUES SIA ET DE SUJETS TÉMOINS.....	44
--	----

Liste des figures

Chapitre 1 Revue de la littérature

FIGURE 1.1 SCHÉMA DE LA SYNTHÈSE DE LA MÉLATONINE	14
---	----

Chapitre 3 Résultats

FIGURE 3.1 ÉVALUATION DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA MÉLATONINE SUR L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE D'AMPC CHEZ LES OSTÉOBLASTES HUMAINS	45
FIGURE 3.2 ÉVALUATION DE L'EFFET INHIBITEUR DE LA MÉLATONINE SUR L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE D'AMPC CHEZ LES OSTÉOBLASTES HUMAINS	46
FIGURE 3.3 DÉTECTION DES RÉCEPTEURS À MÉLATONINE MT1 ET MT2 CHEZ L'OSTÉOBLASTE	48
FIGURE 3.4 : ÉVALUATION DE L'EFFET INHIBITEUR DU GPP(NH)P SUR L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE D'AMPC CHEZ LES OSTÉOBLASTES HUMAINS.....	50
FIGURE 3.5 DÉTERMINATION DU COUPLAGE PRÉFÉRENTIEL DES PROTÉINES GI AU RÉCEPTEUR À MÉLATONINE MT2 CHEZ LES OSTÉOBLASTES HUMAINS DE LA LIGNÉE CELLULAIRE MG63	51
FIGURE 3.6 DÉTECTION DES RÉSIDUS SÉRINE PHOSPHORYLÉS DANS LES PROTÉINES GI	
FIGURE 3.7 DÉTECTION DES PROTÉINES GI COUPLÉES AU RÉCEPTEUR À MÉLATONINE MT2.....	54
FIGURE 3.8 DÉTECTION DES PROTÉINES GI COUPLÉES AU RÉCEPTEUR À MÉLATONINE MT2.....	55
FIGURE 3.9 INTERACTION ENTRE MT2 ET PKC Δ	57
FIGURE 3.10 INTERACTION ENTRE MT2 ET RACK1	58
FIGURE 3.11 INTERACTION ENTRE MT2 ET PTPM	59
FIGURE 3.12 INTERACTION ENTRE MT2 ET SRC	60

Chapitre 4 Discussion

FIGURE 4.1 CASCADE MOLÉCULAIRE RÉGULANT LA PHOSPHORYLATION DES PROTÉINES GI	63
FIGURE 4.2 SYSTÈMES CIBLÉS PAR L'ACTION DE LA MÉLATONINE ET SYMPTÔMES OBSERVÉS CHEZ LES PATIENTS SCOLIOTIQUES.....	73

Liste des sigles et abréviations

(en ordre alphabétique)

- AKAP : A-kinase anchoring protein
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc : adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ARNm : acide ribonucléique messenger
ER : *estrogen receptor*
GDP : Guanosine diphosphate
GPCR : protéines couplées aux protéines G
Gpp(NH)p : 5'-guanylylimidodiphosphate
GTP : guanosine triphosphate
GTP γ S : guanosine (γ -thio) triphosphate
HIOMT : hydroxyindole-O-méthyltransférase
MT : récepteur à mélatonine
NAT : N-acétyl tranférase
OCIF : Osteoclast inhibiting factor
OPG : ostéoprotégérine
OSX : ostérix
PKA : protéine kinase AMPc-dépendante
PKC : protein kinase C
PTP : protein tyrosin phosphatase
Rack1 : receptor for activating protein kinase C 1
RANK : *receptor activator of NF- κ B*
RANKL : receptor activator of NF- κ B ligand
RGS : regulatory G protein signaling
RT-PCR : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*
RZR/ROR : une famille de récepteurs nucléaires (*nuclear orphan receptor*)
SIA : scoliose idiopathique adolescente
SCN : noyau suprachiasmatique
TNF : Tumor necrosis factor

Dédicace

À la mémoire de mon père, feu Moussa qui n'a ménagé aucun effort tout au long de sa vie pour que nous ayons, moi et ma famille, une vie relativement parfaite.

À ma très chère mère que Dieu la protège.

À ma tendre moitié et épouse que je remercie fortement pour son amour et d'être à mes cotés.

À mes frères et sœurs.

À tous mes amis et collègues, plus particulièrement mohmadou, Catherine et Saadallah que je remercie pour leur réconfort lors de mes crises de nerf.

Remerciements

J'exprime ma reconnaissance et mes sincères remerciements à mon directeur le Dr Alain Moreau, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et m'avoir accordé la chance de prouver que je mérite une place dans un laboratoire de recherche. Je le remercie pour sa clairvoyance, son professionnalisme et plus particulièrement, pour le dynamisme qu'il a essayé de me transmettre tout au long de mes travaux. Ses conseils et sa grande disponibilité étaient d'une grande aide pour la réalisation de ce travail.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire. Je les remercie pour les discussions enrichissantes qu'on a eues ensemble ainsi que pour la bonne ambiance qui règne dans le laboratoire.

Je remercie encore une fois ma femme d'avoir supporté mon indisponibilité tout au long de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie vivement tous mes amis et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je me dois aussi de remercier la fondation Yves Cotrel de l'institut de France de son support financier

CHAPITRE 1. REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Scolioses

1.1.1 Définition

Le mot scoliose vient du grec skolios = tortueux. Les anciens auteurs avaient bien conscience de ce caractère tortueux acquis par le rachis atteint de scoliose. Au fil du temps, avec le développement des techniques de dépistage, notamment l'avènement de la radiographie, que peu à peu médecins et chirurgiens ont oublié cette réalité et ont essentiellement caractérisé la scoliose par une courbure bidimensionnelle de la colonne vertébrale puisque la radiographie n'offre qu'une projection plane de la déformation. Depuis 20 ans, les médecins et les chirurgiens qui prennent en charge les scolioses redécouvrent cette torsion du rachis et la scoliose a retrouvé son caractère tridimensionnel. C'est à dire que cette déformation de la colonne vertébrale ne se lit plus dans un plan frontal uniquement, mais que la déformation est reconnue aussi dans le plan sagittal et dans un plan coronal.

Aujourd'hui la scoliose se définit tel que proposé par le Dr Jean Dubousset (Dubousset, 1999) :

« Déformation rachidienne consistant en un déplacement relatif progressif d'un élément constitutif (vertèbre) par rapport à son adjacent, se produisant dans les trois plans de l'espace (frontal, sagittal et coronal) sans perte de la continuité ostéoligamentaire et se développant sur tout ou partie de la colonne vertébrale, essentiellement pendant la période de croissance ».

Il introduit ici la notion de période de croissance qui est fondamentale quand on considère un patient atteint de scoliose. On peut donc presque imputer une 4^{ème} dimension à la scoliose car celle-ci va évoluer dans le temps en fonction de la croissance potentielle du rachis.

Chaque vertèbre subit donc un déplacement : dans le plan frontal en inclinaison latérale, dans le plan sagittal en extension et dans le plan horizontal (ou coronal) en rotation axiale. L'ensemble de ces trois déplacements se traduit par une torsion du rachis. Les

mécanismes automatiques de rééquilibration globale du rachis pour maintenir l'horizontalité du regard, sont à l'origine des contre-courbures.

1.1.2 Types de scoliose

Dans la littérature, c'est plutôt la classification selon l'étiologie qui est privilégiée. On divise les types de scoliose en deux grandes classes : structurales et non-structurales. Dans la première, plusieurs sous-classes sont retrouvées. L'une d'entre-elles regroupe jusqu'à 80 % des scoliose rencontrées en clinique. Il s'agit des scoliose idiopathiques dont la cause est encore inconnue. Il existe aussi d'autres scoliose dites secondaires telles que les scoliose causées par une malformation congénitale des vertèbres, les scoliose d'origine neuromusculaire (neurofibromatose), les scoliose dues à des maladies du tissu conjonctif ou des dystrophies musculaires (dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)). On retrouve également des scoliose causées par des tumeurs neurologiques, des scoliose post-chirurgicales ou en post-radiothérapie, mais celles-ci ne représentent qu'une minorité des cas (**Tableau 1.1**).

Les scoliose peuvent être différenciées aussi selon le patron de courbure, on distingue les scoliose thoraciques droites, thoraciques gauches, lombaires droites, lombaires gauches et des doubles scoliose thoraco-lombaires. Les mécanismes favorisant la formation d'un type de courbure chez un individu sont inconnus.

Tableau 1.1 Classification des scolioses

➤	Idiopathique :
	<ul style="list-style-type: none"> • Infantile : moins de 3 ans • juvénile : 3 – 10 ans • Adolescente : 11 ans et plus
➤	Neuromusculaire :
❖	Neuropathique :
	<ul style="list-style-type: none"> • Neurones moteurs supérieurs Ataxie de Freiderich
❖	Myopathique :
	<ul style="list-style-type: none"> • Arthrogryposis • Dystrophie musculaire (Duchenne, Becker)
➤	Scolioses secondaires à certaines anomalies osseuses :
	<ul style="list-style-type: none"> • Malformation (hémivertèbre) • Segmentation anormale (unilatérale ou bilatérale) • Anomalies lombo-sacrales
➤	Traumatisme :
	<ul style="list-style-type: none"> • Accidentel • Contractures extra-spinales • Traumatisme idiopathique (chirurgical, radiothérapie)
➤	Désordres du tissu connectif :
	<ul style="list-style-type: none"> • Neurofibromatose • Ostéogénèse imparfaite • Syndrome de Marfan
➤	Dysplasies squelettiques :
	<ul style="list-style-type: none"> • Diastrophique, Spondyloepiphyséale
➤	Métabolique :
	<ul style="list-style-type: none"> • Rachitisme, Homocystinurie
➤	Arthrite rhumatoïde
➤	Mécanique :
➤	Infection : aigue ou chronique
➤	Néoplastique : os et tissus neuronaux.

(Adapté de Burgoyne et Fairbanks, 2001)

1.1.2.1 Scoliose idiopathique

Les scolioses sont dites idiopathiques après un diagnostic d'élimination, c'est-à-dire après un examen entièrement négatif en ce qui concerne une cause paralytique ou neurologique et une radiographie qui élimine une malformation congénitale. Il y a cependant de nombreux caractères positifs de la scoliose idiopathique qui permettent de la reconnaître rapidement. On distingue plusieurs types de scolioses idiopathiques selon l'âge d'apparition (**Tableau 1.1**).

1.1.2.1.1 Scoliose idiopathique infantile

Courbure spinale développée durant les trois premières années de vie. La majorité de ces scolioses se résorbent par elles-mêmes (70-90%) par un mécanisme encore inconnu, mais certaines peuvent progresser. Dans ces rares cas, il s'agit le plus souvent (70% des cas) d'un enfant de sexe masculin avec une courbure thoracique gauche. Pour les courbes progressives de plus de 50° en angle de Cobb une chirurgie s'impose (Burgogyne et Fairbank, 2001).

1.1.2.1.2 Scoliose idiopathique juvénile

Représente environ 12 à 21% des scolioses idiopathiques. Il s'agit d'une courbure spinale développée entre l'âge squelettique de trois ans et le début de la puberté (3-10 ans). Les fillettes sont davantage touchées dans une proportion de 4/1. La majorité des courbes sont thoraciques droites. De plus, 70% des sujets nécessitent une intervention et jusqu'à 35 % des jeunes atteints devront éventuellement subir une correction chirurgicale (Tolo & coll., 1978).

1.1.2.1.3 Scoliose idiopathique adolescente

Il s'agit en général d'une courbure spinale se présentant au moment ou après la puberté et avant la maturité squelettique (10 et 25 ans). Toutefois, c'est entre 12 et 16 ans que se situe la période critique pour la progression de la courbure. On peut trouver tous les types de courbes, mis à part les thoraciques gauches qui sont très rares (Shwend & coll., 1995). Normalement, lorsque la croissance squelettique est achevée, la progression de la courbure demeure stable. C'est seulement plus tard dans la vie, lorsque des changements dégénératifs surviennent, que la progression peut reprendre

d'une quinzaine de degrés et causer un syndrome d'entrapement nerveux. Les corsets sont souvent utilisés pour les jeunes adolescents avec des courbes variant entre 30 et 40°. Généralement, les cas dont la courbe est supérieure à 50° nécessitent une chirurgie (Burgogyne et Fairbank, 2001).

1.1.3 Étiologie de la scoliose

Les recherches étiologiques au sujet de la scoliose idiopathique sont nombreuses et souvent contradictoires. Son origine est probablement multifactorielle, associant :

- des facteurs génétiques (des familles à scoliose sont connues), toutefois le mécanisme lié à sa transmission héréditaire demeure inconnu (Wise & coll., 1999; Justice & coll., 2003).
- des troubles du métabolisme du collagène et des protéoglycanes (des publications associent certaines scolioses idiopathiques avec des phénotypes de type Marfan). L'hyperlaxité articulaire est fréquente chez les scoliotiques (Miller & coll., 1994).
- des facteurs hormonaux (la mélatonine pourrait être impliquée, la calmoduline présente dans les plaquettes serait un indicateur de la progression de la scoliose (Lowe & coll., 2000)), et des facteurs de croissance (on connaît l'évolutivité des scolioses en période de croissance rapide du rachis) (Brodner & coll., 2000).
- des facteurs neurologiques centraux en particulier du système proprioceptif et de l'équilibre (de nombreuses études font état de perturbations de la proprioceptivité et de l'oculomotricité chez le scoliotique) (Barrack & coll., 1984).
- enfin de facteurs biomécaniques (la scoliose ayant une auto-aggravation à partir d'un certain seuil angulaire et de déformation anatomique structurale) (Veldhuizen & coll., 2000).

1.1.3.1 Facteurs génétiques

Il y a longtemps que les médecins ont remarqué que la scoliose survenait dans certaines familles avec une haute fréquence. Plusieurs études ont essayé de trouver une composante génétique à la scoliose mais jusqu'à présent les résultats des travaux réalisés dans ce sens sont controversés et le mode de transmission reste un sujet de débat. Certains proposent une transmission liée au chromosome X tandis que d'autres une transmission autosomale.

Garland a été le premier à étudier la transmission de la maladie chez des familles à forte incidence de scoliose. Il a reconstitué un arbre généalogique sur cinq générations et il a montré que la scoliose se transmettait de façon dominante chez ces familles (Garland, 1934). La première étude portant sur un grand nombre de cas (660 cas) est due en 1936 à Faber qui conclut à une transmission dominante (Faber, 1936). Wynne-Davies arrive à la même conclusion après l'étude de 2000 individus dont les parents du premier degré sont cliniquement examinés et les radiographies sont effectuées sur les sujets qu'on suspecte d'avoir une scoliose (Wynne-Davies R 1968). Dans une autre étude de 2869 cas Wynne-Davies et Riseborough ont conclu en une transmission multifactorielle (Riseborough et Wynne-Davies, 1973).

Des observations de jumeaux tous deux porteurs d'une scoliose ont été rapportées à de nombreuses reprises. Ces études ont montré que si l'un des jumeaux est scoliotique l'autre a de forte chance de l'être aussi (73% dans le cas des jumeaux homozygotes et 36% pour les jumeaux hétérozygotes) (Cowell & coll., 1972; Willners, 1994). Harrington a étudié la corrélation mère-fille porteuse de scoliose. Il a conclu que 27% des filles de mères scoliotiques, présentant une courbure supérieure à 15°, sont scoliotiques (Harrington P, 1977). L'hypothèse d'une transmission liée au chromosome X est supportée par les travaux de Cowell qui a étudié 17 familles (192 individus) et a retrouvé dans 69% des cas une atteinte de la mère ou du père et dans 36% des cas une atteinte des frères et soeurs. Si la mère est atteinte, le fils ou la fille peuvent être atteints. Si le père est atteint, toutes les filles sont atteintes, mais aucun fils ne l'est. Les résultats de cette étude sont présentés comme étant compatibles avec un mode de transmission lié au sexe (Cowell & coll., 1972). Les études de liaison effectuées par Miller et coll. ne supportent pas cette hypothèse d'hérédité liée au chromosome X puisque l'analyse de quatorze familles composées de 136 individus n'ont montré aucune liaison avec le chromosome X (Miller & coll., 1998). Toutefois, il est possible qu'une interaction d'un gène sur le chromosome X n'affecte que les filles ou plus souvent les filles en raison d'un phénomène appelé inactivation non-aléatoire du chromosome X ce qui ne se produit pas chez les porteurs du XY. Malheureusement aucune étude n'a été réalisée à ce niveau chez les patients scoliotiques.

Des études de liaison ont identifié plusieurs loci de susceptibilité. Entre autres, les travaux de Wise ont montré des évidences pour la liaison de la scoliose avec les chromosomes 6p, 10q, 4q et 18q avec des LOD scores respectifs de 1,42 ($p=0,02$), 2,55 ($p = 0,033$), 5,08 ($p = 0,015$) et 6,33 ($p = 0,002$) (Wise & coll., 2000). Chan & coll. ont identifié un autre locus de susceptibilité localisé sur le chromosome 19 (Chan V & coll., 2002).

1.1.3.2 Éléments structuraux du rachis

Puisque la scoliose est une déformation de la colonne vertébrale, il est possible qu'un défaut dans l'une des composantes de cette structure pourrait en être la cause. Ceci est d'ailleurs supporté par l'existence d'une scoliose dans des maladies affectant le tissu conjonctif comme la maladie de Marfan, d'Ehlers-Danlos, l'homocystinurie et l'ostéogenèse imparfaite (Miller & coll., 1994). Ceci suggère qu'un défaut au niveau du collagène ou des protéoglycans puisse causer la genèse d'une scoliose. Les résultats des travaux effectués sur ces composantes sont controversés. Pedrini et coll. ont trouvé une diminution de 25% dans les niveaux de glycosaminoglycans et une augmentation de collagène de 25% dans le disque intervertébrale au sein du *nucleus pulposis* de patients scoliotiques comparés aux sujets normaux (Pedrini & coll., 1973). Ces travaux sont supportés par ceux de Zaleske (Zaleske & coll., 1980) et Taylor (Taylor & coll., 1981).

Au niveau des disques, Beard a montré qu'il existait un déficit de collagène de type III mais des niveaux inchangés de collagène de type I (représentant 90% du collagène de la matrice extracellulaire) et de type II (Beard & coll., 1981). Par contre plusieurs études n'ont trouvé aucune anomalie au niveau des composantes du rachis. Ennecting et Harrington ont étudié l'histologie et la structure des éléments vertébraux mais n'ont décelé aucune anomalie chez les patients scoliotiques comparés au sujets normaux. Ils ont conclu que la scoliose aurait une cause extra-osseuse et que les modifications observées au niveau du rachis seraient une conséquence plutôt qu'une cause de la scoliose (Ennecting & Harrington, 1969). Oegema pour sa part a analysé les niveaux de concentration des protéoglycans dans les disques vertébraux et n'a trouvé aucune différence significative entre les patients scoliotiques et les sujets normaux (Oegema & coll., 1983).

D'autres chercheurs se sont attardés à étudier le système des fibres élastiques (2^{ème} composant majeur de la matrice extracellulaire). Echenne a étudié les anomalies du tissu élastique chez les scoliotiques et a retrouvé 28 élastopathies cutanées sur 34 cas (Echenne & coll., 1988). Miller & coll. ont analysé les ligaments de 23 patients scoliotiques. Dix-huit d'entre eux présentaient une anomalie des fibres élastiques (Miller & coll., 1994).

Une analyse génétique des gènes codant pour les différentes composantes de la matrice extracellulaire notamment le collagène de type I et II, la fibrilline 15 et l'élastine type I et II réalisée par les groupes de Miller et de Carr a exclu toute implication de ces gènes dans l'étiopathogénèse de la scoliose (Miller & coll., 1996; Carr & coll., 1992).

En conclusion, si des maladies du tissu conjonctif favorisent à l'évidence la survenue d'une scoliose, il a été difficile aux chercheurs de prouver si les anomalies des composantes du rachis observées chez les patients scoliotiques sont préexistantes avant la survenue de la scoliose ou bien en sont la conséquence.

1.1.3.3 Facteurs neurologiques

L'intégration du contrôle postural se fait au niveau du système nerveux central (SNC) et dépend d'information provenant de trois sources : les informations proprioceptives provenant des membres supérieurs et inférieurs indiquant la position vis-à-vis du sol et dans l'espace, les afférents visuels et les signaux vestibulaires (Sahlstrand & coll., 1980). Ces informations sont intégrées dans le tronc cérébral et le cervelet via les cordons postérieurs de la moëlle. Un défaut dans l'une de ces sources ou bien dans le SNC induit un défaut de posture et ainsi pourrait induire une scoliose. Plusieurs études ont montré des anomalies de fonctionnement de l'équilibre et des anomalies de la sensation. Toutefois, le problème est la difficulté de différencier si ces défauts sont des causes ou des effets de la scoliose.

Yamada a réussi à induire la scoliose chez des rats bipèdes en détruisant l'hypothalamus postérieur et une partie du cervelet par stéréotaxie électrique (Yamada & coll., 1969). Dans une autre étude réalisée sur 150 scoliotiques, il a observé 79% d'anomalies de fonctionnement de l'équilibre portant autant sur la proprioception que sur les réflexes oculomoteurs tandis que seulement 5% des sujets témoins présentaient ces anomalies (Yamada & coll, 1984).

1.1.3.4 Facteurs musculaires

Plusieurs études ont suggéré une implication d'un défaut musculaire dans l'étiopathogénèse de la scoliose idiopathique. Plusieurs changements morphologiques et biochimiques dans les muscles de patients scoliotiques ont été documentés. Spencer et Eccles sont les premiers à décrire les fibres musculaires de type I (contraction lente) et ceux de type II (contraction rapide) (Spencer & coll., 1976). Reuber a étudié par électromyographie les muscles paravertébraux du côté convexe et du côté concave de la courbure. Il n'a remarqué aucune différence significative de l'activité électromyographique des muscles des deux côtés de la courbure chez les patients ayant un angle de Cobb inférieur à 25° (Reuber & coll., 1983). Au-dessus de 25° l'activité côté convexe est plus élevée que côté concave. Pour les auteurs, l'asymétrie retrouvée est secondaire à la courbure. Ils ont constaté une diminution des fibres de type II chez leurs patients scoliotiques. Bylund a trouvé une distribution normale des deux types de fibres sur le côté convexe de la courbure alors que sur le côté concave il y a diminution des fibres de type I (Bylund & coll., 1987). Ford a montré une diminution des fuseaux musculaires dans les muscles paraspinaux des patients scoliotiques testés (Ford, D, M & coll., 1988). Les études histologiques réalisées par Yarom & coll. ont montré une atrophie modérée des fibres de type I dans les muscles paravertébraux du côté concave mais aussi au niveau d'autres muscles (Yarom & Robin, 1979).

En résumé aucune conclusion convaincante ne peut être tirée de ces expériences pour déterminer si ces anomalies sont primitives et causent la scoliose ou bien celles-ci sont encore des conséquences de la maladie.

1.1.3.5 Facteurs endocriniens

1.1.3.5.1 Facteurs de croissance

La scoliose est une maladie qui touche les enfants en pleine croissance. D'où la possibilité d'une implication des hormones de croissance dans l'induction de la scoliose. Plusieurs études ont rapportées un lien entre la scoliose et les hormones de croissance. Nordwall et Willner ont montré que les patients scoliotiques ont une taille plus grande que les sujets témoins du même âge (Nordwall et Willner, 1975). Willner & coll. ont expliqué cette différence par une augmentation des niveaux d'hormones de croissance chez les filles scoliotiques comparées aux filles témoins (Willner & coll., 1976). Par contre Misol & coll. n'avaient pas trouvé de différences significatives des concentrations sanguines d'hormones de croissance entre les patients scoliotiques et les sujets normaux (Misol & coll., 1971). Plusieurs autres études se sont attardées sur l'implication des hormones de croissance dans la scoliose idiopathique mais n'ont eu aucune conclusion convaincante démontrant avec certitude cette implication (Ahn & coll., 2002).

1.1.3.5.2 La mélatonine

La première expérience mettant en cause la mélatonine dans l'étiopathogénèse de la scoliose date de 1959 lorsque Thillard a découvert fortuitement que l'ablation de la glande pinéale, glande produisant la mélatonine, chez le poulet induisait le développement d'une scoliose (Thillard MJ, 1959). Ce résultat a été reproduit par Dubousset en 1983. Ce dernier a montré que l'injection de doses quotidiennes de mélatonine prévient le développement de la scoliose chez les poulets pinéaléctomisés (Dubousset & coll., 1983). Machida a pu reproduire les mêmes résultats (Machida & coll., 1993).

En 1987, Machida et Dubousset ont mesuré le taux de mélatonine circulante chez les patients scoliotiques et l'ont comparé aux sujets témoins. Ils ont constaté que les patients avec une scoliose progressive avaient une diminution de 35% des taux de mélatonine par rapport aux sujets témoins ou aux patients avec une scoliose stable (Machida & coll., 1996). D'autres groupes n'ont pas trouvé de différences significatives

des taux de mélatonine chez les scoliotiques versus les témoins (Hilibrand & coll. 1996; Bagnall & coll., 1996).

Machida a repris ces travaux en utilisant le rat bipédal comme modèle animal. En effet, les rats bipédales pinéaléctomisés (dont les pattes avant ont été amputées chirurgicalement) développaient une scoliose mais pas les quadrupèdes. L'injection quotidienne de mélatonine prévenait le développement de la scoliose chez les rats bipédales. Il a été conclu que la position bipède chez le poulet comme chez l'homme joue un rôle important dans le développement et l'aggravation de la scoliose (Machida & coll., 1999). Ces travaux ont été confirmés plus récemment en utilisant les souris (bipèdes et quadrupèdes) de la souche C57Bl/6, souris présentant un défaut dans la synthèse de la mélatonine. Cette méthode élégante a démontré que c'est vraiment une carence en mélatonine qui est responsable de la formation de la scoliose et l'aggravation de celle-ci par les conditions biomécaniques (condition posturale bipède) (Machida & coll., 2003).

En conclusion, on ne peut exclure que la scoliose puisse être d'origine multifactorielle. Toutefois, la difficulté principale des études étiologiques découle du fait qu'on ne peut pas tracer une ligne claire entre les causes et les effets de la scoliose.

1.1.3.5.3 Les estrogènes

Au Québec et ailleurs dans le monde la scoliose affecte quatre fois plus de filles que de garçons (Shohat & coll., 1988). Cette prévalence chez les filles soulève plusieurs questions concernant une implication possible des estrogènes dans l'étiopathogénèse de la maladie. Plusieurs évidences laissent croire à cette implication. En effet, les estrogènes sont bien connus pour leur effet sur le métabolisme osseux, d'un autre côté la scoliose affecte dans 75% des cas les jeunes filles à la puberté où la production d'estrogènes commence à devenir plus importante. Une troisième évidence découle du lien antagoniste entre la signalisation des estrogènes et celle de la mélatonine. Plus récemment les travaux de Inoue & coll. ont montré un lien entre le polymorphisme des récepteurs nucléaires aux estrogènes et le degré de sévérité de la courbe chez les patients SIA (Inoue & coll., 2002).

1.2 Mélatonine

1.2.1 Généralités

La mélatonine (5-methoxy N-acétyltryptamine) est une hormone synthétisée par la glande pinéale, isolée pour la première fois par Lerner en 1958 (Lerner & coll., 1958) et connue au début pour son rôle dans l'agrégation pigmentaire chez le Xénope. Actuellement ses rôles sont nombreux passant de son rôle le plus important et le plus étudié soit le maintien du rythme circadien et le sommeil jusqu'à son implication dans plusieurs maladies tel que le cancer et certaines maladies immunitaires.

1.2.1.1 La glande pinéale

La glande pinéale (aussi appelée épiphyse) a été décrite au troisième siècle par Herophile, mais nous devons attendre jusqu'au 19ème siècle pour que son anatomie soit connue, notamment par les travaux d'Ahlborn et Rabl-Ruckhardt qui ont décrit son anatomie, son histologie et son innervation. C'est au début du 20ème siècle que le rôle physiologique de cette glande a commencé à être élucidé (Borjigin, & Snyder, 1999).

1.2.1.2 Synthèse de la mélatonine

La mélatonine est synthétisée dans la glande pinéale à partir du tryptophane. Sa synthèse est contrôlée par la lumière et se déroule pendant la période nocturne. Les deux enzymes transformant le tryptophane en sérotonine (tryptophane hydroxylase et décarboxylase) sont exprimés de façon ubiquitaire. Donc la sérotonine peut être synthétisée dans plusieurs tissus alors que la distribution des deux autres enzymes impliquées dans la cascade produisant la mélatonine est limitée à certains tissus spécialisés dans la synthèse de la mélatonine.

La sérotonine, synthétisée entre autres dans les pinéalocytes, est acétylée par l'arylalkylamine-N-acétyltransférase (NAT) pour donner la N-acétylsérotonine. Cette dernière est ensuite méthylée par l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) pour donner la mélatonine (**Fig.1.1**). Ces deux enzymes, toutes deux spécifiques de cette voie de synthèse, présentent des profils d'activité différents (Klein & coll., 1971).

L'HIOMT présente des variations négligeables entre le jour et le soir. Les travaux de Klein & Weller ont montré des variations très importantes du rythme de la NAT. Les taux nocturnes de cette enzyme sont de 50 à 100 fois plus élevés que les taux diurnes, ce qui fait de cette molécule l'enzyme limitante dans la biosynthèse de la mélatonine (Klein & Weller 1973). Cette enzyme est soumise à de nombreux mécanismes de régulation transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle en fonction de l'espèce considérée permettant à l'enzyme d'être active seulement pendant la période d'obscurité. L'activité de la NAT est fortement régulée par l'alternance lumière/obscurité contrairement à l'HIOMT qui présente une activité constitutive tout au long du cycle nyctémère. Chez le rat, une exposition à un flash lumineux pendant la période d'obscurité entraîne une inhibition dans les 15 minutes de l'activité de la NAT (Axelrod & coll., 1965). Il en est de même chez l'homme (Klein & Weller, 1972).

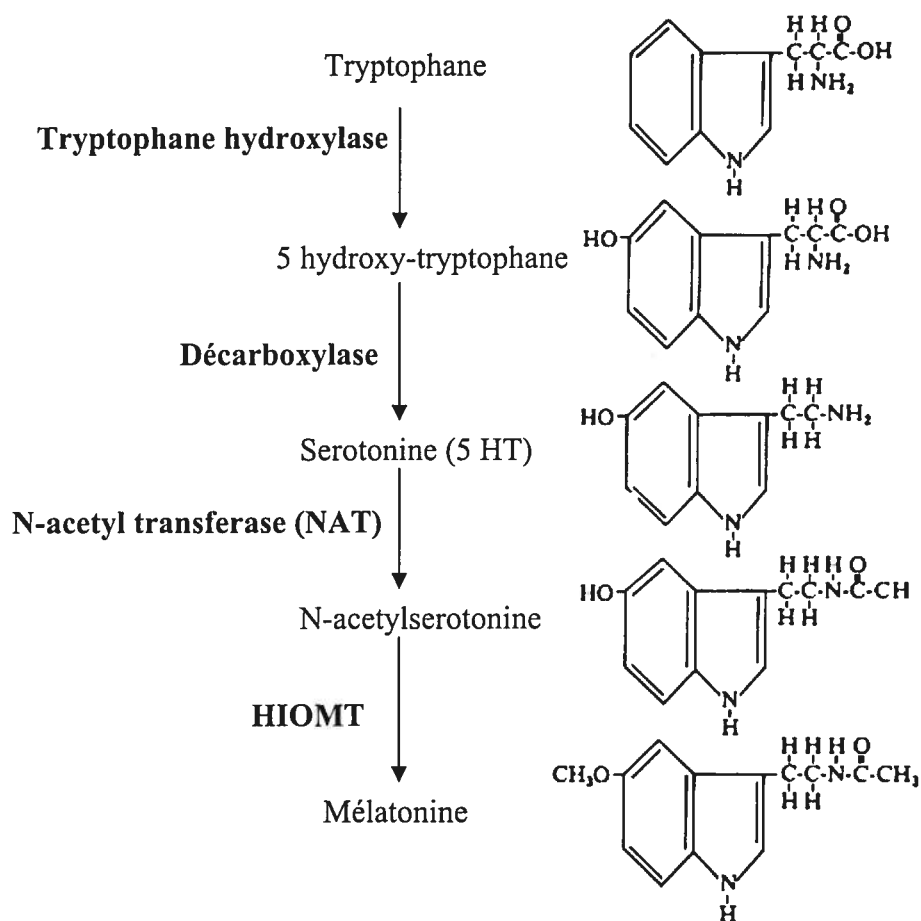


Figure 1.1 Schéma de la synthèse de la mélatonine Après que le tryptophane pénètre dans la cellule il est hydroxylé pour donner le 5-hydroxytryptophane, puis décarboxylé pour donner le 5 hydroxytryptamine ou sérotonine. Celle-ci est acétylée par l'arylalkylamine-N-acétyltransférase (NAT) pour donner la N-acétylsérotonine. Cette dernière est ensuite méthylée par l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) pour donner la mélatonine.

(Adapté d'après Simonneaux & Ribelayga, 2003)

1.2.2 Rôles physiologiques de la mélatonine

Comme mentionné précédemment la mélatonine était connue au début pour son rôle dans l'agrégation pigmentaire puis comme agent anti-oxydant. De nos jours elle suscite un intérêt particulier vu son implication dans divers processus biologiques. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis l'étude et le clonage des récepteurs à mélatonine. Les études d'expression et de localisation ont montré l'existence de ces récepteurs dans plusieurs tissus notamment dans le cerveau. Ces études ont été réalisées afin de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la mélatonine module le rythme circadien et le sommeil.

1.2.2.1 Effets hormonaux

1.2.2.1.1 Régulation du rythme circadien

Chez tous les mammifères étudiés jusqu'à présent la sécrétion de la mélatonine varie selon le cycle lumière/obscurité. Elle est synthétisée durant la phase obscure, indépendamment que l'activité de l'organisme soit nocturne ou diurne. La pinéaléctomie chez plusieurs animaux non mammifères, poissons, amphibiens et lézards abolit partiellement ou totalement le rythme circadien (Cassone, 1998). Chez d'autres espèces ce rythme n'est aboli qu'après l'enlèvement des yeux, la deuxième plus importante source de mélatonine. Par contre chez les mammifères il a été conclu que le taux de mélatonine circulante a un effet limité sur le rythme circadien.

Plusieurs études ont montré un lien direct entre la mélatonine et le noyau supra chiasmatique (qui dirige l'horloge biologique (Moore 1996)) contenant des récepteurs à mélatonine (Vanecek & coll., 1987), d'un autre côté le noyau supra chiasmatique pourrait utiliser la mélatonine comme messenger pour transmettre le message circadien dans tous les tissus contenant des récepteurs à mélatonine (Pévet & coll., 1996).

1.2.2.1.2 Régulation du rythme saisonnier

L'adaptation des animaux à différentes saisons implique des changements dans le statut reproductif, le comportement alimentaire, la couleur et la qualité de la fourrure et la préparation pour l'hibernation. Ces changements sont cruciaux pour la survie de certains animaux. La plupart des animaux utilisent la longueur des photopériodes

comme marqueurs saisonniers. Chez les mammifères la présence de la glande pinéale est nécessaire pour le maintien de ces changements saisonniers. En effet, la pinéaléctomie induit une perte partielle ou totale de la synchronisation du cycle annuel. L'apport exogène de mélatonine peut mimer les effets de l'alternance des photopériodes chez les animaux pinéaléctomisés (Kennaway & coll., 1987). Jusqu'à présent les mécanismes moléculaires régissant l'effet de la mélatonine sur le rythme circannuel ne sont pas encore complètement élucidés.

1.2.2.1.3 Adaptation de la rétine à la lumière

La mélatonine est synthétisée de façon rythmique dans les photorécepteurs de la rétine même *in vitro* dans des conditions adéquates (Tosini & Menaker, 1996). La mélatonine peut agir soit directement sur la rétine par le contrôle du mouvement des granules mélanosomales contenues dans l'épithélium rétinale pigmenté (retinal pigment epithelium) soit indirectement par l'inhibition de la sécrétion de dopamine par les cellules amacrines. La dopamine de son côté inhibe la synthèse de la mélatonine dans la rétine (Dubocovich & coll., 1997).

1.2.2.1.4 Métabolisme osseux

Les premières études démontrant un lien entre la mélatonine et le métabolisme osseux sont celles réalisées par Csaba et Bokey, qui ont montré que la mélatonine agit sur le métabolisme du calcium (Csaba & Bokey, 1977). Ceci pourrait être expliqué par l'effet de la mélatonine sur la sécrétion de la calcitonine et l'hormone parathyroïde (Shoumura & coll., 1992).

Une autre évidence vient des travaux de Conti et coll. qui ont démontré l'existence de fortes concentrations de mélatonine dans les cellules de la moëlle osseuse de souris et de l'homme (Conti & coll., 2000) ainsi qu'une forte activité de la NAT principale enzyme nécessaire pour la synthèse de la mélatonine. Ceci a été présenté comme une évidence en faveur d'une synthèse de mélatonine dans la moëlle osseuse (Conti & coll., 2000).

Des essais *in vitro* ont montré un effet direct de la mélatonine sur les cellules osseuses. En effet la mélatonine stimule la prolifération et la synthèse du collagène de type I (Nakade & coll., 1999) ainsi que la différenciation et la formation osseuse (Roth & coll., 1999). Cette caractéristique pourrait expliquer les différences de masse osseuse existant entre les souche murine C57BL et C3H, présentant respectivement la plus faible et la plus haute densité osseuse chez les souris (Chen & Kalu, 1999). Les souris C57BL ont une déficience dans la synthèse de la mélatonine par contre les souris C3H sont des surproductrices de la mélatonine (Von Gall & coll., 2000).

La mélatonine pourrait aussi agir sur l'activité des ostéoclastes. Ces cellules se différencient à partir de précurseurs hématopoïétiques de la lignée macrophage-monocyte et acquièrent la capacité unique de résorber la matrice calcifiée de l'os. Un grand nombre de facteurs de croissance, de cytokines et d'hormones modulent le développement et l'activité de ces cellules (Nakamura & coll., 2003). Nombre d'altérations génétiques induites chez des souris conduisent à une ostéopétrose secondaire à un effondrement de la résorption osseuse dépendant d'un défaut de développement et/ou d'activité des ostéoclastes. Des travaux récents ont enfin permis de mettre en évidence la voie principale de communication entre les ostéoblastes et les ostéoclastes, avec pour médiateurs l'ostéoprotégérine (OPG) ainsi que RANK (pour Receptor Activating NFkB) et son ligand RANKL dont l'équilibre détermine la différenciation et l'activité des ostéoclastes (Teitelbaum SL & coll., 2003). L'ostéoprotégérine ou osteoclast inhibiting factor (OCIF) est une glycoprotéine membre de la superfamille des récepteurs du TNF produite en particulier par les ostéoblastes. La mélatonine inhibe au niveau de l'ARNm l'expression de RANK et augmente l'expression de l'ostéoprotégérine dans les ostéoblastes de souris MC3T3-E1 (Koyama & coll., 2002). Ceci a pour effet d'induire une inhibition de la résorption osseuse (inhibition d'ostéoclastes) et une stimulation de la formation osseuse (stimulation des ostéoblastes).

Ces résultats sont controversés puisque les travaux de Suzuki et Hattori ont démontré que la mélatonine inhibe l'activité des ostéoblastes lorsque cultivés en présence d'ostéoclastes (système en co-culture d'écaillés de poissons rouges) (Suzuki et

Hattori 2002). Ils ont défendu leurs résultats en argumentant que les expériences précédentes ont été réalisées sur des cultures d'ostéoblastes seuls alors qu'*in vivo* les interactions ostéoblastes/ostéoclastes sont importantes dans les activités de régulation des deux types cellulaires (Suzuki et Hattori 2002).

1.2.2.1.5 Autres effets physiologiques

Actuellement la mélatonine suscite un grand intérêt vu son implication dans divers processus biologiques. Il est donc impossible de traiter de tous ces rôles dans cette section. C'est pourquoi une liste des principaux rôles que peut jouer la mélatonine sera présentée.

Parmi les premiers rôles attribués à la mélatonine, celui d'anti-oxydant dû à la molécule elle-même et ne nécessite aucun intermédiaire ni aucune signalisation puisque la mélatonine est une hormone lipophile, il a été proposé que la mélatonine pénètre dans la cellule pour protéger les macromolécules (protéines, ADN) des effets toxiques des radicaux libres. Cette propriété peut expliquer les effets anti-vieillesse observés lors de la transplantation d'une glande pinéale à des souris âgées (Pierpaoli & Regelson, 1994) puisque les niveaux de mélatonine diminuent avec l'âge et que les radicaux libres sont impliqués dans le processus du vieillissement et du cancer. Reiter a suggéré que le maintien de la mélatonine à des doses élevées peut ralentir les effets du vieillissement et les altérations causées par le cancer (Reiter & coll., 2000).

Le rôle de la mélatonine dans l'étiopathogénèse du cancer du sein a été introduit par Cohen & coll. (Cohen & coll., 1978). Le rôle anti-cancérigène de la mélatonine est surtout étudié dans les cancers mammaires répondant aux estrogènes. En effet, des travaux *in vitro* ont démontré que la mélatonine inhibe la prolifération des cellules MCF-7 (cellules tumorales de seins humains) et stimule leur apoptose (Cos & coll., 2002).

Il a été démontré que la mélatonine module la sécrétion de certains neurotransmetteurs ainsi que la réponse post-synaptique (Carneiro & coll., 1994). De plus, la mélatonine peut stimuler la vasoconstriction induite par la norépinephrine dans

l'artère caudale du rat (Evans & coll., 1992) et aussi moduler via ses récepteurs la fonction des récepteurs GABA (Wan & coll., 1999).

La mélatonine a aussi des effets sur le système immunitaire. Plusieurs cellules immunocompétentes possèdent des récepteurs membranaires et/ou nucléaires de la mélatonine (Rafii-El-Idrissi & coll 1998). L'apport exogène de la mélatonine induit une stimulation générale du système immunitaire, incluant une augmentation de l'activité des cellules T, la croissance lymphocytaire et la réponse humorale (Liebman & coll., 1997). Des travaux réalisés *in vitro* ont montré que la mélatonine agit sur les cellules T auxiliaires, les cellules NK (natural killer) ainsi que sur la production d'interféron gamma et d'interleukine II. De plus, comme le nombre et l'activité des cellules T, B et NK présente des changements en fonction du rythme circadien et saisonnier, la mélatonine pourrait être l'agent modulateur de ces changements (Nelson & Drazen, 2000).

D'autres travaux plus récents suggèrent l'implication de la mélatonine dans plusieurs autres maladies, entre autres l'Alzheimer (Matsubara & coll., 2003), certains désordres psychologiques (désordres bipolaires, comportement suicidaire, anorexie, schizophrénie) (Pacchierotti & coll., 2001) et des crises épileptiques dont la mélatonine constitue un éventuel traitement (Fauteck & coll., 1999).

La multiplicité des effets de la mélatonine peut être due à l'expression de ses récepteurs dans un grand éventail de cellules. Le ciblage de ces récepteurs par des agonistes ou antagonistes spécifiques constitue un grand potentiel thérapeutique.

1.2.2.2 Voie de signalisation

La mélatonine est une hormone sécrétée durant la phase obscure. Elle est distribuée aux différents tissus via le flux sanguins et exerce son action sur les cellules par l'intermédiaire de récepteurs à mélatonine. Il existe trois types de récepteurs, des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (MT1 et MT2), un récepteur cytosolique de la famille des quinones réductases (MT3) et un récepteur nucléaire de la famille des récepteurs orphelins RZR/ROR (avec plusieurs isoformes).

La régulation des voies de signalisation de la mélatonine est complexe puisqu'elle doit tenir compte de plusieurs paramètres. D'un côté la diversité des récepteurs à mélatonine et leur localisation multiple dans un grand nombre de tissus cibles. S'ajoute à cela les variations des taux de mélatonine de façon circadienne et saisonnière.

1.2.2.2.1 Récepteurs membranaires

Le développement d'un ligand marqué [125 I] iodomélatonine a permis d'identifier des sites de fixation de la mélatonine à haute affinité. D'ailleurs, ce composé a permis d'identifier et de caractériser les récepteurs à mélatonine dans plusieurs tissus (Morgan, 1994). Jusqu'à présent, chez les mammifères on connaît deux types de récepteurs membranaires à mélatonine MT1 (anciennement appelé Mel_{1A}) et MT2 (anciennement Mel_{1B}). Ils sont classifiés comme des sous types uniques vu leur structure moléculaire et leur localisation chromosomique (Skinner & coll., 2000, Kokkola & Laitinen, 1998). MT1 est abondant au niveau du cerveau. On croit que c'est ce récepteur qui est responsable de la régulation du rythme circadien (Vanecek & coll., 1998). Ceci est supporté par les études d'inactivations géniques de MT2 chez la souris et par des mutations naturelles chez le hamster de Sibérie (Weaver & coll., 1996; Jin & coll., 2003), ainsi que par le fait que par hybridation *in situ* dans le cerveau humain on détecte l'ARNm de MT1 et pas celui de MT2 (Weaver & Reppert, 1996). En plus de son expression dans le cerveau, MT1 est exprimé dans une grande variété de tissus. Il peut être couplé à plusieurs isoformes de protéines G : G_{iα2}, G_{iα3} et G_{αq} (Brydon & coll., 1999, Witt-Enderby & coll., 2001), G_{αs}, G_{αz} et G_{α16} (Chan AS & coll., 2002), Il a été démontré que MT1 peut avoir un effet inhibiteur sur la voie de l'AMPc ce qui induit une diminution de l'activité de PKA et de la phosphorylation de CREB (Witt-Eberly & coll., 1998). Par contre dans les cellules Cos-7, MT1 stimule la voie de l'AMPc par sa liaison avec les protéines G_{αs} (Chan AS & coll., 2002).

Le développement d'antagonistes sélectif pour MT2 a permis d'éclaircir le rôle que joue ce récepteur. Jusqu'à présent on sait que MT2 est impliqué dans la physiologie rétinienne (Dubocovich & coll., 1997), la modulation du rythme circadien (Dubocovich

& coll., 1998), la dilatation des vaisseaux cardiaques (Doolen & coll., 1998) et la réponse inflammatoire dans la microcirculation (Lotufo & coll., 2001). Son expression a été détectée chez l'ostéoblaste et l'ostéoclaste par RT-PCR (Forget & coll., soumis JBMR février 2004) ainsi que par immuno-histochimie chez l'ostéoblaste humain (voir Fig3.3).

1.2.2.2 Récepteur cytosoliques

Les études d'affinité ont permis d'isoler du foie de hamster syrien une protéine dont l'affinité pour la mélatonine est égale à celle de MT1/2 (Molinari & coll., 1996). Cette protéine nommée MT3 présente 95% d'homologie avec la quinone réductase 2 humaine, enzyme connue pour son rôle dans la détoxification cellulaire (Nosjean & coll., 2000). C'est par des études de liaison avec un radioligand qu'on a pu montrer que MT3 est exprimé dans le foie, les reins, le cerveau, le tissu adipeux brun, le cœur, les muscles squelettiques, les poumons, l'intestin et la rate de plusieurs espèces (hamster, souris et chien) (Nosjean & coll., 2001). Des études récentes ont montré que MT3 pourrait être impliqué dans la régulation de la pression intraoculaire chez le lapin (Pintor & coll., 2001) et la réponse inflammatoire dans la microvasculature (Lotufo & coll., 2001).

1.2.2.3 Récepteurs nucléaires

La mélatonine est une molécule très lipophile d'où l'hypothèse de l'existence de récepteurs mélatoninergiques nucléaires. Il a été démontré que la mélatonine lie et active les récepteurs RZR/ROR α (Becker-André & coll., 1994) et RZR β (Carlberg & coll., 1994). Ces deux récepteurs ont un patron d'expression spatio-temporel différent. Ce qui suggère qu'ils ont des fonctions différentes et sont impliqués dans différents processus biologiques. Ils font partie d'une minorité de récepteurs nucléaires capables de se lier à l'ADN en monomères sur une séquence consensus RGGTCA (R= A ou G) nommée RZREs (Calberg & coll., 1994). Théoriquement cette séquence peut exister tous les 33 Kpb, ce qui suggère que RZREs existe dans une grande variété de promoteurs. Les gène candidats les plus intéressants sont l'enzyme pro-inflammatoire 5-lipoxygénase (Steinhilber & coll., 1995), l'inhibiteur du cycle cellulaire P21 et la sialoprotéine osseuse BSP (Schröder & coll., 1996).

On trouve dans tous les tissus au moins une des quatre isoformes de RZR/ROR (ROR α 1, RZR α 2, ROR α 3, et ROR γ). Toutefois, les plus hauts niveaux d'expression sont trouvés dans les cellules lymphoïdes (cellules B et T), les neutrophiles et la peau (Becker André & coll., 1993). Chez la souris, RZR/ROR est exprimé durant le développement embryonnaire et postnatal dans les cellules du cervelet, dans le bulbe olfactif et dans le thalamus et l'hippocampe (Sashihara & coll., 1996)

RZR β est exprimé dans la rétine et le cerveau. Il a tendance à s'exprimer dans les régions du cerveau responsables des voies sensorielles plutôt que celles impliquées dans le contrôle moteur (Park & coll., 1997). Durant le développement embryonnaire les niveaux d'expression de RZR β dans le noyau supra chiasmatique changent (Park & coll., 1997). Dans la glande pinéale l'expression de RZR β est régulée par l'AMPC de façon circadienne (Baler & coll., 1996). De plus, l'inactivation génique de RZR β chez la souris induit des changements dans le rythme circadien (Andre & coll., 1998).

1.3 Protéines G

Les protéines G (guanine nucleotide binding protein) font partie de la superfamille des GTPases qui sont conservées des bactéries jusqu'aux mammifères et jouent un rôle important dans plusieurs processus de régulation cellulaire (Gilman, 1995) via la régulation de l'activité de plusieurs effecteurs comme des enzymes ou des canaux ioniques. Le changement d'activité de ces effecteurs induit un changement dans les fonctions cellulaires allant des effets à court terme comme le contrôle du flux de sécrétion, le tonus musculaire ou le processus métabolique jusqu'aux effets à long terme comme la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire.

Les protéines G sont composées de trois sous-unités d'où leur appellation d'hétérotrimériques. Ces sous-unités sont G α , G β et G γ (Hepler & Gilman, 1992). La sous-unité α possède une activité GTPasique homologue aux autres membres de la superfamille des GTPases. Les sous-unités β et γ forment un complexe indissociable et représentent une unité fonctionnelle.

Afin de transmettre le signal d'un récepteur activé à un effecteur, la protéine G passe par un cycle d'activation/inactivation qui permet à la protéine G de fonctionner comme interrupteur moléculaire. À l'état basal les sous-unités α sont associées au GDP ainsi qu'aux sous-unités $\beta\gamma$. Sous cette forme la protéine G peut être recrutée par un récepteur activé. Cette interaction a pour conséquence la dissociation du GDP de la sous-unité α . Le GDP est ensuite remplacé par le GTP. En liant le GTP, la sous-unité α subit des changements de conformation qui mènent à la dissociation de la sous-unité α du dimère $\beta\gamma$. Les sous-unités α et $\beta\gamma$ peuvent maintenant interagir avec des effecteurs et réguler ainsi leurs fonctions. L'arrêt du signal se fait par la stimulation de l'activité GTPasique de la sous unité α qui hydrolyse le GTP en GDP + Pi.

1.3.1 Classification des protéines G

En général les protéines G sont classées selon la sous-unité α mais au fil des années on remet en doute cette classification après la découverte des nombreux rôles joués par le dimère $\beta\gamma$ (Clapham & Neer, 1997).

Jusqu'à présent on a identifié au moins 23 sous-unités α codées par 17 gènes différents classés en 4 familles différentes ($G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{12}$) (Vanderbeld & Kelly 2000, Morris & Malbon 1999). Pour les sous-unités β , 6 différents types moléculaires ont été décrits et 12 pour la sous unité γ (Schwindinger & Robishaw, 2001; Vanderbled & Kelly, 2000). Théoriquement l'association entre ces différentes unités peut engendrer un très grand nombre de combinaisons. Toutefois, on ne trouve pas toute ces combinaisons dans la nature. Ceci contribue probablement à la diversité des signaux intracellulaires activés par les récepteurs couplés aux protéines G.

1.3.1.1 La famille des $G\alpha_{i/o}$

Les membres les plus exprimés de cette famille sont Gi1, Gi2 et Gi3. Leur rôle principal est l'inhibition des adénylates cyclases (Sunahara & coll., 1996). Ces protéines ont une concentration intracellulaire élevée. Elles sont une source importante de complexes $\beta\gamma$ qui régulent une grande variété d'effecteurs dans la cellule.

Les similarités fonctionnelles entre les différents isoformes des Gi (Gi1, Gi2 et Gi3) suggèrent que leurs fonctions sont partiellement redondantes. En effet la régulation de l'inhibition des adénylates cyclases via les récepteurs GPCR dans les cellules primaires dérivées de souris déficientes en $G\alpha_2$ ainsi que des cellules souches embryonnaires $G\alpha_2(-/-)$ est médiée par $G\alpha_1$ et $G\alpha_3$ (Raymond & coll., 1994), de plus Birnbaumer & coll. ont montré qu'il n'y a aucun changement phénotypique dans les souris déficientes en $G\alpha_1$ ou $G\alpha_3$ (Rudolph & coll., 1996). Par contre l'inactivation génique de la sous-unité $G\alpha_2$ induit le développement d'une maladie qui ressemble à une pathologie qui affecte l'homme appelée maladie inflammatoire des intestins (Inflammatory Bowel Disease) (Rudolph & coll., 1995). Des croisements entre les souris déficientes en ces différents isoformes des protéines Gi devrait fournir plus de détails afin d'élucider les relations fonctionnelles entre ces différentes protéines.

$G\alpha_o$ est la sous unité des protéines G la plus abondante dans les neurones où elle constitue 0,5% des protéines membranaires. Malgré cette abondance relative, le rôle de cette protéine est peu connu et il semblerait que les effets de l'activation de $G\alpha_o$ sont médiés par ses sous-unités $\beta\gamma$. Cette protéine est aussi présente dans d'autres tissus mais à des concentrations plus faibles comme le cœur et le pancréas (Catterall & coll., 2000).

$G\alpha_z$, insensible à la toxine pertussique est exprimée dans plusieurs tissus comme le cerveau, les plaquettes ou la glande surrénale (Fields & Casey, 1997; Ho & Wong, 2001). Cette protéine peut inhiber les adénylates cyclases I et V et est reconnue par plusieurs protéines RGS. Son inactivation a montré qu'elle joue un rôle dans l'activation des plaquettes et dans le système nerveux centrale (Yang & coll., 2000).

1.3.1.2 La famille des $G\alpha_q$

Cette famille est composée de quatre membres exprimés à partir de gènes individuels et dont le patron d'expression est différent. $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ sont exprimés de façon ubiquitaire (Exton, 1996; Rhee, 2001), tandis que la sous unité murine $G\alpha_{15}$ et son homologue humain $G\alpha_{16}$ sont exprimés uniquement dans certaines cellules hématopoïétiques. $G\alpha_{14}$ est exprimée dans certains organes comme le rein, les testicules et les poumons (Amatruda & coll., 1991; Wilkie & coll., 1991). Les récepteurs activant

les membres de cette famille ne font pas la distinction entre $G\alpha_q$ et $G\alpha_{11}$ malgré les différences entre elles (Wange & coll., 1991; Wu & coll., 1992). Les membres de cette famille régulent l'activité de l'isoforme β de la phospholipase C. L'inactivation génique de $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ et $G\alpha_{15/16}$ n'induit aucun changement phénotypique (Davignon & coll., 2000). Les souris déficientes en $G\alpha_q$ développent une ataxie avec des déficits de coordination motrice et un défaut fonctionnel dans le cortex cérébral (Offermanns & coll., 1997; Offermanns & coll., 1998).

1.3.1.3 La famille des $G\alpha_{12}$

Cette famille est constituée des protéines $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ et sont exprimées de façon ubiquitaire (Strathmann et Simon, 1990). Il a été difficile d'étudier cette famille puisque les récepteurs activant les membres de cette famille activent aussi les protéines G de la famille des $G\alpha_q$. Afin de contourner ce problème des mutants constitutivement actifs de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ ont été utilisés et ont permis d'identifier le rôle de ces protéines dans l'induction et l'activation de JNK (c-Jun N-terminal kinase), de la pompe Na^+/H^+ et la phospholipase D ainsi que leur capacité à former des fibres de stress d'actine de manière dépendante de Rho (Buhl & coll., 1995; Dhanasekaran & Dermott, 1996; Hooley & coll., 1996). Plusieurs études ont montré l'interaction de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec d'autres protéines comme des facteurs d'échange de nucléotide de Rho (p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF et LARG) (Hart & coll., 1998; Fukahara & coll., 2001; Suzuki & coll., 2003), Btk (Bruton's tyrosine kinase), une Ras GTPase activating protein (Gapl) (Jiang & coll., 1998; Vaiskunaitė & coll., 2000). Récemment un lien entre $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$ et les cadhérines a été découvert. L'interaction de $G\alpha_{12}$ et $G\alpha_{13}$ avec le domaine cytoplasmique des cadhérines induit la libération de l'activateur de transcription β -caténine (Meigs & coll., 2002).

1.3.1.4 La famille des $G\alpha_s$

Les deux membres majeurs de cette famille sont G_s et G_{olf} . Le gène codant pour G_s est ubiquitaire et produit quatre variantes par épissage alternatif, deux formes, une courte $G\alpha_{s-S}$ et l'autre longue $G\alpha_{s-L}$. Ces deux formes sont structurellement très proches et leurs fonctions sont redondantes (Freissmuth & coll., 1991). Tous les isoformes connus d'adénylates cyclases sont activés par $G\alpha_s$. Cette voie de signalisation induit une

augmentation des taux intracellulaires d'AMPc par l'activation des adénylates cyclases lorsque stimulées par une $G\alpha_s$ et existe dans toutes les cellules (Sunahara & coll., 1996).

1.3.2 Rôles des protéines G

Les voies de signalisation impliquant les protéines G existent dans toutes les cellules de mammifères. Le grand nombre d'études effectuées ces dernières années sur ces protéines a révélé leur importance, leur grand rôle dans plusieurs processus biologiques ainsi que la complexité et la précision avec lesquelles le message est transduit à travers ces protéines. Selon le type de protéine G impliqué et du type cellulaire on peut avoir des réponses différentes voir opposées. La régulation du fonctionnement de ces protéines est très complexe, car en plus des récepteurs qui activent les protéines G et les effecteurs activées par celles-ci, il existe une multitude de facteurs modulant l'activité de ces protéines G. Ces facteurs sont regroupés dans une famille des régulateurs de protéines G, RGS (regulators of G protein signaling) (Berman & Gilman, 1998).

Les protéines G sont importantes pour le bon fonctionnement du système nerveux. Plusieurs neurotransmetteurs et hormones exercent leurs effets via des récepteurs couplés aux protéines G. Le développement des nouvelles techniques de biologie moléculaire notamment l'avènement du ciblage génique (knock-out) a permis d'étudier le rôle de chaque type de protéine G. Par exemple les souris déficientes en $G\alpha_o$ sont petites, faibles et souffrent de troubles moteurs, neurologiques et de comportements (Jiang & coll., 1998). Les souris déficientes en $G\alpha_z$ répondent anormalement aux médicaments psycho actifs (Yang & coll., 2000). Par ces techniques le rôle essentiel et central des protéines G au niveau du système immunitaire, des systèmes sensoriels, du cœur ainsi que plusieurs autres organes a pu être révélé (Revue dans Offermanns, 2003).

1.3.3 Modifications post-traductionnelles modulant la fonction des protéines G_i

Comme toute autre protéine les protéines G subissent des modifications post-traductionnelles affectant leur localisation et leurs fonctions. Parmi ces modifications l'ajout d'acides gras, la myristilation et la palmylation des sous-unités α et la prénylation des sous-unités γ . Ces modifications sont stables. Les études de mutagenèse

ont montré que ces modifications affectent la localisation des protéines G (Casey & coll., 1995). Les sous-unités α peuvent être à la fois palmitylées et myristilées sur leur extrémité N-terminale. Ces modifications sont requises pour l'association de ces protéines à la membrane et ainsi à la transmission du signal (Linder & coll., 1993). Un autre effet de la palmytation a été décrit par Tu & coll. Ils ont montré que la palmytation des protéines G α z induit une diminution d'affinité de GzGAP, une RGS qui stimule l'activité GTPasique de G α z, d'où une prolongation dans la durée d'activation de Gz (Tu & coll., 1997). Cet effet a été aussi démontré pour G α i-1 pour laquelle la palmytation inhibe son interaction avec RGS4 (Tu & coll., 1997). G α i-1 peut aussi être myristilée. L'inhibition de la myristilation par le 2-hydroxymyristate ne prévient ni la palmytation ni la liaison de la protéine à la membrane dans les cellules Cos-7 (Iiri & coll., 1996). Les mutants G α i-1 incapables d'être palmytilés se retrouvent uniquement dans le cytoplasme. Cela prouve que la palmytation est essentielle pour le recrutement de ces protéines à la membrane (Iiri & coll. 1996).

L'autre modification majeure des protéines G est la phosphorylation. En effet plusieurs évidences montrent que cette modification s'effectue au niveau des sous-unités α (Bushfield & coll., 1990). Les études effectuées sur G α i-2 montrent que cette protéine est inactivée par une phosphorylation dépendante de la protéine kinase C (Bushfield & coll., 1990). En effet l'utilisation d'activateurs et d'inhibiteurs de PKC a montré que l'activité de PKC est proportionnelle à l'activité inhibitrice de G α i-2 sur les adénylates cyclases (Strasheim & coll., 1994). Les analyses par phosphoamines ont montré que dans la majorité des cas c'est une phosphorylation de résidus sérine qui est mise en jeu (Bushfield & coll., 1990). La PKC peut aussi phosphoryler G α z sur des résidus sérine Ser¹⁶ et Ser²⁷ dans la partie N-terminale de ces protéines (Lounsbury & coll., 1993).

PKC est une sérine/thréonine kinase qui comprend 11 membres. Elle est retrouvée dans la membrane ou le compartiment intracellulaire (Nishizuka & Nakamura, 1995). Elle joue un rôle important dans la signalisation cellulaire. Elle peut être activée directement par le phorbol ester (Castagna & coll., 1982), ainsi que par plusieurs stimuli, entre autres le DAG (diacyl glycerol), un second messenger produit par la

phospholipase C (Berridge & coll., 1984), la mélatonine (Benitez King G, 2000), les estrogènes (Qiu & coll., 2003) et par une phosphorylation sur des résidus tyrosine médiée par Src (Joseloff & coll., 2002).

La localisation de PKC au niveau de la membrane est médiée par son interaction avec Rack1 (Receptor for Activated Protein Kinase C 1) qui est une protéine d'échafaudage qui ne lie que la forme active de PKC et est responsable de sa translocation vers la membrane plasmique où elle possède plusieurs substrats (Schechtman & Mochly-Rosen, 2001).

D'autres études s'intéressant aux kinases modulant l'activité des protéines Gi ont montré que Gαz est le substrat d'une autre kinase nommée PAK (p21-activated protein kinase). Cette phosphorylation s'effectue sur l'un des résidus sérine phosphorylés par la PKC soit le résidu Ser¹⁶ (Wang & coll., 1999). Les protéines Gi peuvent aussi être phosphorylée sur des résidus tyrosine par la tyrosine kinase du récepteur d'insuline (Zick & coll., 1986), ainsi que par une kinase de la famille des tyrosines kinases Src, soit pp60^{c-src} (Hausdorff & coll., 1992).

La phosphorylation des sous-unités Gα empêche leur liaison avec les sous-unités Gβγ. Inversement Gβγ inhibe la phosphorylation des sous-unités Gα. (Kozasa & Gilman, 1996). Ceci s'explique par le fait que la phosphorylation s'effectue sur la partie N terminale des sous-unités Gα puisque Gβγ se lie à cette partie. Cette phosphorylation peut aussi bloquer l'interaction des sous-unités Gα avec des protéines régulatrices RGS, comme RGSZ1, RET-RGS1 et GAIP (Wang & coll., 1998).

1.3.4 Maladies causées par un dysfonctionnement des protéines G

Les protéines G jouent un rôle central dans plusieurs systèmes biologiques. Un défaut dans la fonctionnalité de ces protéines peut induire des effets très variés et même néfastes pour tout l'organisme. Par exemple, lors de l'infection par le vibrion cholerae, les toxines secrétées par cette bactérie induisent une ADP-ribosylation des sous unités Gαs, ce qui résulte en une hyper activation de ces protéines qui induit un mouvement

transluminal excessif d'eau et d'électrolytes provoquant une diarrhée incontrôlable parfois fatale qui caractérise la maladie du choléra (Gilman, 1987).

Un autre cas d'hyper fonctionnalité des protéines G est celui du syndrome de McCune-Albright (dysplasie fibreuse). Ce syndrome est caractérisé par une puberté précoce, une pigmentation 'café au lait' et plusieurs endocrinopathies. Ce syndrome est causé par une mutation activatrice des sous-unités $G_{\alpha s}$ (Weinstein & Shenker, 1993).

Comme l'hyperactivité, la perte de fonction des protéines G cause certaines maladies. Par exemple la bactérie *Bordetella pertussis* produit une toxine qui stabilise le complexe hétérotrimérique des protéines G à leur état inactif par une ADP-ribosylation de l'extrémité C-terminal des sous-unités $G_{\alpha i}$ (UI, M & Katada, 1990). Cela induit une inactivation des protéines G puisque elles ne peuvent pas se dissocier du dimères $\beta\gamma$.

Chez l'homme une maladie impliquant les protéines G est la pseudohypoparathyroidisme de type 1a. Cette maladie est caractérisée par une obésité, un retard mental et une anomalie des os. L'étude étiopathogénique a montré qu'elle est causée par une perte de fonction des protéines Gs (Weinstein & coll., 1998).

Chez la souris, l'inactivation génique de la sous-unité $G_{\alpha i 2}$ induit le développement d'une maladie qui ressemble à une pathologie qui affecte l'homme appelée maladie inflammatoire des intestins (Rudolph & coll., 1995). Cette maladie idiopathique est caractérisée par plusieurs symptômes. Entre autres des maux abdominaux, la fièvre, la diarrhée, la perte de poids (Podolsky, 2002) et une diminution de la masse osseuse (Lichtenstein, 2003). L'étiologie de cette maladie demeure inconnue. Le mécanisme induisant la perte osseuse chez les patients atteints de cette maladie est inconnu mais pourrait être la conséquence de l'inflammation des intestins affectant la réabsorption des minéraux notamment le phosphate et le calcium.

1.4 Mécanismes régulant la voie de signalisation de la mélatonine

La régulation de la voie de signalisation de la mélatonine est très complexe, puisqu'elle doit prendre en considération plusieurs paramètres. D'un coté la sécrétion de

la mélatonine varie selon un rythme circadien et saisonnier (Vanecek & coll., 1987) et d'un autre son action varie d'un tissu à un autre (Pévet, 1998). Cette régulation peut intervenir à différents niveaux de la cascade et implique plusieurs protéines régulatrices dont la plupart sont des kinases (PKC, PKA), des phosphatases (PP1A, PP2B) ou des protéines régulatrices qui modulent les interactions protéine-protéine (protéines d'échafaudage telle que AKAP).

1.4.1 Régulation par phosphorylation

La phosphorylation joue un très grand rôle dans la régulation de l'activité d'une multitude de protéines. Ce type de modification post-traductionnelle joue un rôle d'interrupteur moléculaire car une protéine peut être activée ou inactivée par phosphorylation d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés et vice versa. De plus, la phosphorylation sur différents sites peut éventuellement privilégier une voie aux dépens d'une autre.

Les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont parmi les cibles pouvant être phosphorylées soit par des sérine/thréonine kinases (Freedman & Lefkowitz, 1996) ou bien des tyrosine kinases (Malbon & Karoor, 1998). Cette phosphorylation intervient lors du phénomène de désensibilisation, un mécanisme utilisé par les cellules pour contrer une stimulation prolongée par un ligand. Les résidus phosphorylés forment un domaine de liaison avec des β -arrestines. Ces protéines se lient au récepteur et induisent un arrêt du signal transmis par celui-ci. Ce mécanisme implique un découplage des protéines G et/ou une internalisation de ce récepteur (Krupnick & Benovic, 1998).

Dans le cas des récepteurs à mélatonine, on observe *in vitro* une désensibilisation après une stimulation de 5h et plus alors que les niveaux élevés de mélatonine sont maintenus chez l'homme durant 8h (Reiter & coll., 1991). La désensibilisation des récepteurs à mélatonine MT1 et MT2 peut être homologue, c'est-à-dire que la persistance de la stimulation par la mélatonine va induire l'activation des kinases responsables de la phosphorylation des récepteurs qui vont phosphoryler leurs cibles et ainsi induire la désensibilisation. Par contre lors de la désensibilisation hétérologue, ces kinases sont activées par une autre voie qui est indépendante de la

mélatonine comme les variations des photopériodes et en réponse aux estrogènes (Witt-Enderby & coll., 2003).

Plusieurs kinases ont été rapportées de part leur implication dans la phosphorylation des GPCR. Parmi les plus étudiées on retrouve des sérine/thréonine kinases notamment la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) (Freedman & Lefkowitz, 1996). Ces deux kinases jouent un rôle déterminant dans plusieurs voies de signalisation. Il existe aussi une famille de kinases spécifique pour les GPCR : les GRKs (G-protein coupled Receptor Kinase) (Bunemann & Hosey, 1999). C'est une famille qui comprend 6 membres. Au niveau de l'ostéoblaste on retrouve quatre isoformes GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6 (Spurney & coll., 2002)

Peu de choses sont connues sur les mécanismes de déphosphorylation des récepteurs couplés aux protéines G par les phosphatases. Les études effectuées sur les récepteurs β -adrénergiques montrent que ces récepteurs sont déphosphorylés par une phosphatase de la famille des protéines phosphatases PP-2A (Lefkowitz, 1998). Cette déphosphorylation nécessite un pH acide ce qui implique que cette déphosphorylation est effectuée à l'intérieur des vésicules après internalisation des récepteurs. Chez la drosophile, une phosphatase codée par le gène *rdgC* (retinal degeneration C) a été isolée. C'est une sérine/thréonine phosphatase capable de déphosphoryler la rhodopsine. Sa séquence N-terminale présente une forte homologie avec le domaine catalytique des protéines phosphatases PP1, 2A et 2B (Vinos & coll., 1997).

Un autre niveau de régulation de la voie de signalisation de la mélatonine par phosphorylation est la phosphorylation des protéines G_i couplées aux récepteurs à mélatonine MT1 et MT2 (section 1.3.3). La déphosphorylation des protéines G_i est assuré par des phosphatases de la famille des protéines phosphatases PP1 et PP2A (Bushfield & coll., 1991)

1.4.2 Régulation par des interactions protéine – protéine

Les interactions protéine-protéine sont très importantes pour la régulation d'une multitude de voies de signalisation. La transmission du signal implique l'activation de

protéines en cascade et ceci nécessite un contact direct entre ces protéines. Ce rôle est facilité par l'existence dans différentes protéines de domaines protéiques capables d'interagir entre eux. Toutefois, à la complexité de ces interactions s'ajoute la possibilité de retrouver différents partenaires d'interaction dans différents compartiments cellulaires en fonction de différents stimuli ou du cycle cellulaire. Afin que ces protéines interagissent entre elles, elles doivent être présentes dans le même compartiment, ceci est facilité par l'existence de transporteurs ou protéines d'échafaudage pouvant transloquer une protéine d'un compartiment à un autre. L'autre niveau de complexité est qu'une protéine peut interagir avec plusieurs partenaires et selon le complexe formé avoir des effets différents voir opposés. La découverte des protéines d'échafaudage a permis de mieux comprendre les mécanismes que les cellules ont développés pour contrer ces difficultés. La régulation de la voie de signalisation de la mélatonine par ces protéines est encore peu étudiée.

1.4.2.1 Contribution des protéines d'échafaudage

AKAP (A-Kinase Anchoring Protein) est l'une des protéines d'échafaudage pouvant interagir avec les GPCRs. AKAP possède plusieurs domaines de liaison protéiques, ce qui lui permet de lier plusieurs protéines à la fois. Cette protéine peut lier et transloquer vers la membrane plasmique les protéines PKA, PKC et la calcineurine (PP2B). AKAP se lie aussi aux récepteurs GPCRs (Malbon & coll., 2004). Cette protéine joue un rôle important surtout pour les protéines régulées par phosphorylation et déphosphorylation puisque elle lie des kinases et des phosphatases (Coghlan & coll., 1995).

Rack1 joue également un rôle de protéine d'échafaudage et partage certaines propriétés avec l'AKAP (Edwards & Scott, 2000). Cette protéine joue un rôle dans la communication entre la voie des PKC et celle de l'AMPc (McCahill & coll., 2002). Rack1 ne lie que la forme active de PKC et est responsable de sa translocation d'un compartiment cellulaire à un autre où PKC peut exercer son action (Ron & Mochly-Rosen, 1994) en phosphorylant les récepteurs ainsi que les protéines G. Rack1, par sa fonction de protéine d'échafaudage pouvant transloquer PKC à la membrane cytoplasmique, peut jouer un rôle important dans la signalisation des protéines G. Rack1

interagit avec une multitude de protéines, dont entre autres des kinases de la famille Src (Chang & coll., 1998), une tyrosine phosphatase PTP μ (Mourton & coll., 2001). PTP μ est un récepteur tyrosine phosphatase impliqué dans les complexes d'adhésion via des interactions homophiliques. PTP μ recrute Rack1 dans ces complexes d'adhésion où il peut amener d'autres protéines avec lesquelles il interagit (Rosdahl & coll., 2002).

CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Plan de cette étude

Les études étiologiques afin de déterminer l'origine de la SIA ont montré une implication de la mélatonine dans cette étiologie (section 1.1.3.5.2). Chez le poulet l'absence de mélatonine après pinéaléctomie induit la scoliose, mais chez les patients SIA les concentrations de mélatonine circulantes sont normales.

2.1.1 Hypothèse de travail

Toutes ces données nous ont amenés à postuler l'hypothèse selon laquelle la scoliose idiopathique serait due chez l'homme à un dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine plutôt qu'à une carence en mélatonine. En d'autres termes même si la mélatonine est présente chez les patients SIA, elle n'arrive pas à exercer son action sur les tissus normalement ciblés par cette hormone.

2.1.2 objectifs

Afin de vérifier la fonctionnalité de cette voie de signalisation, des tests d'AMPC ont été effectués sur des ostéoblastes provenant de cultures primaires dérivées d'os de patients SIA et de sujets témoins. Nous nous sommes concentrés dans cette étude sur les patients SIA sévèrement atteints parce que ces patients ont plus de chances de présenter des anomalies importantes au niveau des cellules. Le choix des ostéoblastes comme modèle cellulaire s'explique d'une part par l'abondance de fragments osseux disponibles lors des chirurgies correctives effectuées sur les patients SIA sévèrement atteints et d'autre part parce que ces cellules répondent normalement bien à la mélatonine.

2.2 Matériels

2.2.1 Critères d'inclusion des patients scoliotiques et sujets témoins

Les caractéristiques cliniques des patients SIA et des sujets témoins analysés dans le cadre de ce projet sont indiquées respectivement dans les **tableaux 2.1** et **2.2**. Les évaluations cliniques ont été réalisées par les chirurgiens orthopédiques attachés à la clinique de la scoliose de l'hôpital Sainte Justine (Dr Benoît Poitras, Dr Hubert Labelle, Dr Charles Hilaire Rivard et Dr Guy Grimard). Toutes les variables cliniques indiquées

ont été obtenues au moment de la chirurgie. Les liens héréditaires ont été établis en questionnant les patients et leurs proches à savoir si d'autres membres de la famille avaient une déformation spinale. Cependant la présence de cette déformation n'a pas été validée par un examen médical. Tous les sujets ont participé à cette étude sur une base volontaire et ont signé un formulaire de consentement approuvé par le Comité d'éthique de l'hôpital Sainte Justine.

2.3 Méthodes

2.3.1 Culture primaire d'ostéoblastes

Les échantillons d'os sont obtenus au cours des chirurgies correctives effectuées sur des patients scoliotiques. Ils proviennent habituellement des vertèbres T3 à L4, suivant le type de chirurgie, à l'exception d'un patient DMD dont les cellules osseuses ont été dérivées à partir d'une biopsie de la crête iliaque. Les fragments de vertèbres constitués d'un mélange d'os cortical et d'os trabéculaire sont dans un premier temps traités à la collagénase (Worthington Lakewood NJ USA) afin d'éliminer les tissus mous encore attachés aux fragments osseux, puis réduits mécaniquement en petits fragments avec une pince coupante dans des conditions stériles. Ces fragments sont incubés à 37°C et 5% de CO₂, dans des boîtes de 10 cm (Corning, Life science). Le milieu utilisé pour leur croissance est le α MEM (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), contenant 10% de FBS (Invitrogen Burlington, ON, Canada) et 1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen). Les cellules émergent des fragments osseux en culture après 15 jours et les cultures deviennent confluentes après une période de prolifération d'environ 15 jours. Elles sont alors séparées par trypsination (trypsin, 0,25%, Invitrogen) puis cultivées dans d'autres pétris ou congelées dans l'azote liquide pour une utilisation ultérieure. D'autres ostéoblastes utilisés dans ce projet proviennent de la lignée cellulaire d'ostéosarcome humain (MG63, passages 10 à 20) (ATCC : American Type Culture Collection).

Tableau 2.1 Données cliniques des patients présentant une scoliose idiopathique adolescente (SIA)

Cas	Diagnostic	type de Courbe	Sexe	âge à la chirurgie	Angle de Cobb	Hérédité
1017	SIA	Lombaire g	M	16,5	45	Fille et cousine (f)
1033	SIA	Thoracolombaire g	F	16,0	37	Tante
1038	SIA	Thoracolombaire g	F	17,0	47	Non
1002	SIA	Thoracolombaire g	F	18,0	50	--
1024	SIA	Thoracique d	M	16,0	49	Non
1041	SIA	Thoracique d	M	15,5	48	Non
1061	SIA	Thoracique d	M	13,5	75	Non
1013	SIA	Thoracique d	F	15,0	54	Mère/tante (maternel)
1014	SIA	Thoracique d	F	15,0	30	Mère
1027	SIA	Thoracique d	F	16,5	57	Soeur
1019	SIA	Thoracique d	F	12,5	67	Tante/ cousine (f)
1066	SIA	Thoracique d	F	17,5	53	Tante
1025	SIA	Thoracique d	F	15,5	53	Non
1056	SIA	Thoracique d	F	18,5	34	Non
1065	SIA	Thoracique d	F	14,0	61	Non
1036	SIA	Thoracique d	F	13,0	48	Non
1040	SIA	Thoracique d	F	16,5	60	Non
1138	SIA	Thoracique d	F	15,0	67	Non
1057	SIA	Thoracique d	F	15,0	30	Non
1067	SIA	Thoracique d	F	14,5	32	Non
1084	SIA	Thoracique d	F	16,0	43	Non
1007	SIA	Thoracolombaire d	M	18,5	61	Mère
1043	SIA	Thoracolombaire d	F	14,0	50	Père
1022	SIA	Double scoliose g/d	M	17,5	46-30	Cousine (f)
1003	SIA	Double scoliose g/d	M	17,0	70-50	Non
1042	SIA	Double scoliose g/d	F	14,0	70-48	Mère / frère
1060	SIA	Double scoliose g/d	F	13,0	53-55	Grand-mère (paternelle)
1037	SIA	Double scoliose g/d	F	15,0	41-50	Mère
1008	SIA	Double scoliose g/d	F	16,5	51-30	Non
1023	SIA	Double scoliose g/d	F	19,0	29-35	Non
1059	SIA	Double scoliose g/d	F	14,5	57-65	Non
1011	SIA	Double scoliose g/d	F	19,0	45-60	Non
1012	SIA	Double scoliose g/d	F	12,0	74-56	Non
1032	SIA	Double scoliose g/d	F	11,5	57-38	Non
1047	SIA	Double scoliose g/d	F	18,5	23-35	Non
1058	SIA	Double scoliose g/d	F	14,5	90-66	Non
1006	SIA	Double scoliose g/d	F	12,5	61-46	Non
1064	SIA	Double scoliose g/d	F	15,0	90-90	Non
1029	SIA	Double scoliose g/d	F	14,5	56-53	Non
1053	SIA	Double scoliose g/d	F	13,5	48-42	Non
1020	SIA	Double scoliose g/d	F	13,0	59-57	Non

Le patron de courbure désigne l'emplacement de la déformation (thoracique ou lombaire) et son orientation (droite ou gauche).

L'angle de Cobb définit l'angulation d'une courbure scoliotique et est calculé à partir de l'intersection de la droite tangentielle au plateau supérieur de la vertèbre limite supérieure et de celle tangentielle au plateau inférieur de la vertèbre limite inférieure, cet angle renseigne sur le degré de sévérité des scolioses (Cobb, 1948).

Tableau 2.2 Données cliniques des sujets témoins

Cas	Diagnostic	type de Courbe	Sexe	âge à la chirurgie	Angle de Cobb	Hérédité
1055	Congénital	Lombaire g	F	18,5	53	Non
1004	Congénital	Thoracique d	M	14,0	45	Non
1026	Congénital	Thoracique d	M	13,0	70	Non
1028	Congénital	Thoracique d	F	7,5	75	Non
1016	Cancer / colonne V	Aucune	F	10,0	0	Non
1018	Cancer / colonne V	Thoracique g	F	16,5	19	Non
1005	Arnold-Chiari*	Thoracique g	M	20,0	51	Père
1009	DMD	Aucune	M	14,0	0	Non
1030	Paralysie Cérébrale	Double scoliose g/d	M	17,5	60-30	Non
1045	Marfan	Thoracolombaire g	F	19,5	38	Non
1044	Marfan / spondylo	Double scoliose g/d	F	13,0	0	Mère
1010	Neurofibromatose	Thoracolombaire d	F	16,0	115	Non
1001	Syndrome de Noonan	Thoracique d	F	19,0	49	Non
1035	spondylo	Lombaire g	F	19,0	0	Non
1062	spondylo	Lombaire d	F	16,5	0	Non
1031	spondylo	Thoracolombaire d	M	14,5	0	Non
1034	Cyphose Post traumatique	Thoracique d	F	18,0	40	Non

d= droite; g=gauche

Le patron de courbure désigne l'emplacement de la déformation (thoracique ou lombaire) et son orientation (droite ou gauche). L'angle de Cobb est défini par l'angulation d'une courbure scoliootique et est calculé à partir de l'intersection de la droite tangentielle au plateau supérieur de la vertèbre limite supérieure et de celle tangentielle au plateau inférieur de la vertèbre limite inférieure, cet angle renseigne sur le degré de sévérité des scoliooses (Cobb, 1948).

*Malformation Arnold-Chiari. Malformation caractérisée entre autres par une élongation de la moëlle, de l'amygdale cérébelleuse et du vermis ainsi que d'autres anomalies cérébrales.

2.3.2 Test d'AMPC

Afin de déterminer l'existence ou non d'un défaut de signalisation de la mélatonine, nous avons utilisé un test simple et particulièrement sensible nous permettant de mesurer la capacité de doses croissantes de mélatonine à inhiber l'accumulation intracellulaire d'AMPC stimulée par la forskolin (un agent diterpène) (Sigma, Oakville, ON, Canada). Les cellules sontensemencées en quadruplatat sur des plaques à 24 puits (5×10^4 cellules/puit, (Corning)) et sont incubées 48 heures jusqu'à confluence. Par la suite, les cellules sont incubées en présence du DMSO (Sigma, véhicule seul) ou bien en présence de la forskolin (10^{-5} M) pour augmenter la synthèse d'AMPC en stimulant de façon pharmacologique les adénylates cyclases. Les courbes d'inhibition sont obtenues en ajoutant au milieu des concentrations croissantes de mélatonine (Sigma) (10^{-11} M à 10^{-5} M) en présence de forskolin dans un volume final de 1 mL de α MEM contenant 0,2% de BSA. Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont récoltées mécaniquement à l'aide d'un grattoir stérile (Corning) dans 100 μ L de tampon Tris/EDTA (Tris 0.05M, EDTA 0.004M, pH=7.5) puis lysées avec un Polytron (Kinematica, Allemagne) pendant 10 sec à 19000 rpm. Les protéines du lysat sont inactivées par chauffage dans l'eau bouillante pendant 5 minutes afin de détruire les enzymes qui pourraient dégrader l'AMPC (phosphodiesterases). Les tubes sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 3 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. L'AMPC est dosé à l'aide du kit cyclic AMP [3 H] BiotrakTM Assay System (Amersham Biosciences Mississauga, ON, Canada) en suivant les directives du fabricant.

Des tests similaires ont été effectués en remplaçant la mélatonine par le 5'-guanylylimidodiphosphate (Gpp(NH)p) (Sigma), un analogue non hydrolysable du GTP, à des concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-4} M. Cette molécule active les protéines Gi directement (sans passer par l'un ou l'autre des récepteurs à la mélatonine) donc indépendamment de l'activité des récepteurs. Ce test permet de mettre en évidence des anomalies pouvant exister au niveau des protéines Gi liés aux récepteurs à la mélatonine. Les courbes d'inhibition et la détermination des niveaux en AMPC ont été réalisées tel que décrit pour la mélatonine.

2.3.3 Préparation des extraits membranaires d'ostéoblastes

Dans le but de caractériser les mécanismes et les molécules responsables du défaut de signalisation de la mélatonine observé chez les ostéoblastes dérivés des patients SIA, nous avons concentré nos efforts sur la caractérisation des complexes protéiques associés aux récepteurs MT2 car ce récepteur est celui qui semble être celui qui est fonctionnel et prédominant chez les ostéoblastes. Pour ce faire, des extraits membranaires d'ostéoblastes ont été préparés (voir méthode ci-bas) après avoir traité les ostéoblastes à l'aide de mélatonine ou d'inhibiteur de tyrosine kinase (génistein, herbimycine) et d'inhibiteur de tyrosine phosphatase (orthovanadate de sodium, Na_3VO_4). Le choix de ces inhibiteurs ainsi que la détermination du rôle des tyrosines kinase/phosphatases dans la signalisation de la mélatonine découle des travaux de Barrett & coll. suggérant que le contrôle principal régulant cette signalisation impliquerait une ou des tyrosine kinase/phosphatases (Barrett & coll., 2000). Les travaux de Poon chez le poulet supportent également une modulation de la contraction musculaire exercée par une signalisation de la mélatonine qui serait médiée par l'action d'une tyrosine kinase (Poon & coll., 2002). Nous avons donc également décidé d'évaluer l'effet de doses physiologiques d'estradiol ($17\text{-}\beta\text{-estradiol } 10^{-10}\text{M}$, Sigma) puisque un plus grand nombre de jeunes filles sont atteintes de SIA et que cette condition pathologique se manifeste cliniquement à l'adolescence au moment de la puberté. Nous croyons que les estrogènes pourraient contribuer à exacerber significativement des conditions préexistantes contribuant à la formation de scoliose.

2.3.4 Isolement des protéines membranaires

Pour chacune des conditions expérimentales mentionnées précédemment nous avons traité les cellules provenant de 5 contenants de 100 mm. Après un traitement de 24h les cellules sont lavées deux fois à l'aide de tampon PBS froid (4°C), puis récoltées mécaniquement par grattage et lysées mécaniquement dans $200 \mu\text{l}$ d'un tampon A (5 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF), 1% métabisulfite de sodium pH 7.4, 5% inhibiteur de protéase (Roche)). Les cellules sont à nouveau lysées mécaniquement au Polytron 5 sec à 30,000 rpm, puis centrifugées 5 min à $20,000\times g$ pour éliminer les débris cellulaires. Par la suite, le surnageant (1,5 mL) est transféré dans un tube à ultracentrifugation (Beckman) contenant un coussin de sucrose

35 % (10 mL). Ces tubes sont ensuite centrifugés à 29,000 rpm, à 4°C pendant 90 minutes (LB-70 M Ultracentrifugeuse, Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA, USA). Le culot membranaire est solubilisé dans le tampon B (50 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH 7.4) pour ensuite être centrifugé pendant 20 minutes à 13,000 rpm. Le culot est lavé une fois avec 500 µl de solution C (75 mM Tris, 12 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, pH 7.4), centrifugé 5 min et enfin resuspendu dans 200 µl d'une solution C + 1% Triton X100 et incubé toute la nuit sous agitation pour solubiliser les protéines.

2.3.5 Co-immunoprécipitations

Les échantillons sont centrifugés 30 min à 30,000 rpm, à 4° C afin de ne doser que les protéines solubles. Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford en utilisant le kit de dosage de protéines BioRad (BioRad, Mississauga, ON, Canada). Les protéines sont incubées en présence d'anticorps anti-MT2 (1 :80) toute la nuit (généreusement fournis par le Dr Debora Angeloni et le Professeur Franco Fraschini de l'Université de Milan, Italie). Les caractéristiques de ces anticorps ont été publiées précédemment (Angeloni & coll., 2000). Le lendemain 50 µl d'une suspension de billes de protéine A-sépharose (Sigma) sont ajoutés à tous les échantillons et le tout est incubé pendant 6 heures à 4°C avec agitation. Les échantillons sont ensuite lavés 4 fois avec une solution D (75 mM Tris, 12 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0,05% Triton, pH 7.4). Au dernier lavage le culot est soit resuspendu dans 30 µl de tampon de chargement E (70 mM Tris/HCl, 2% SDS, 4 mM urée, 40 mM Dithiothreitol (DTT) 10% glycérol, 0,05% bromophénol bleu, pH 6.8), ou bien dans 990 µl de solution C contenant 10 µl de Gpp(NH)p (10 mM) afin de relarguer les protéines G après une incubation d'une heure à 37°C avec agitation. Le surnageant est par la suite récupéré et incubé une heure à 37°C avec agitation après avoir ajouté 35 µl d'une suspension de protéines A-sépharose. La précipitation des protéines s'effectue par l'ajout de 500 µl de TCA 100% (concentration finale de 33%) à tous les échantillons et incubé 30 min sur glace. Par la suite les échantillons sont centrifugés 15 min à 13000rpm à 4°C, lavés 4 fois avec 500 µl de TCA 5%, puis un lavage avec 500 µl d'acétone 100%, et laissés sécher 10 min à l'air avant d'être resuspendu dans 10 µl de tampon de chargement E (70 mM Tris/HCl, 2% SDS, 4 mM urée, 40 mM dithiothreitol (DTT) 10% glycérol, 0,05% bromophénol bleu, pH 6.8).

2.3.6 Western blot

Les échantillons sont chauffés 5 min dans l'eau bouillante afin de dénaturer les protéines. Par la suite celles-ci sont séparées sur un gel SDS-polyacrylamide 10% ou de 6.5% (selon la taille des protéines à séparer) et transférées sur une membrane de nitrocellulose puis séchées à l'air. Les membranes sont par la suite bloquées à l'aide d'une solution de TBST 1X (0,5% NaCl, 0.01% Tris, 0,005% Tween) + 5% lait durant deux heures pour ensuite être mises en présence d'un anticorps primaires toute la nuit, à 4°C. Différents anticorps ont été utilisés à tour de rôle sur les membranes soit des anticorps anti-Gi1, anti-Gi2, anti-Gi3, anti-PTP μ et anti-Rack1 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), des anticorps anti-Src pan (BioSource Inc. Camarillo, CA, USA), anti-phosphosérine (Sigma), anti-PKC δ (Chemicon) et anti-phosphotyrosine (généreusement fourni par le Dr Mounib Elchebly du centre de recherche de l'hôpital Sainte Justine). Après incubation avec l'anticorps primaire un lavage de 2x 5 min puis une fois 15 min est effectué avec une solution de TBST 1X. Les membranes sont bloquées à nouveau puis incubées par la suite en présence du deuxième anticorps correspondant (anticorps secondaires) couplés à la peroxydase HRP (anticorps anti-souris, anticorps anti-lapin ou anticorps anti-chèvre (Biosource Inc. Camarillo, CA, USA)) durant 60 minutes à température ambiante. La révélation des membranes est effectuée par chemiluminescence à l'aide du kit BM Chemiluminescent blotting substrate POD selon les recommandations du fabricant (Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN, USA).

2.3.7 Détermination de la localisation des récepteurs MT1 et MT2

La localisation des récepteurs à mélatonine MT1 et MT2 a été déterminée par immunohistochimie sur des ostéoblastes provenant de sujets témoins ou de patients scoliotiques. Les cellules sont mises en culture (15,000 cellules/mL de milieu α MEM) dans des plaques spéciales pour immunohistochimie (Falcon culture slides 25mm x 75mm/Becton Dickinson Labware, NJ, USA) et incubé pendant 24 h jusqu'à la confluence. Une fois la confluence atteinte, les cellules sont fixées au méthanol 100% (-20°C) pendant 30 min à la température de la pièce puis lavées 3x 10 min avec du TBS-T 1x (8g NaCl, 0,2g KCl, et 0,3g Tris pour 1L pH=8) Les cellules sont bloquées avec une

solution de TBS-AT (TBS-T + 0,2% albumine) pendant 1 h, puis incubées en présence d'anticorps anti-MT1 ou anti-MT2 diluée 1:200 dans du TBS-AT pendant toute la nuit dans une chambre humide. Le lendemain les plaques sont lavées 3 x 10 min avec du TBS-T 1x puis bloquées à nouveau avec une solution de TBS-AT pendant une heure avant de les mettre en présence du deuxième anticorps (secondaire) qui est un anti-lapin biotinylé (Biosource Inc. Camarillo, CA, USA) dilué 1:200 dans du TBS-AT. Après 3 lavages de 10 min avec du TBS-T 1x, un troisième blocage est effectué avec du TBS-AT pendant 1h, puis incubée en présence d'un conjugué streptavidine couplé à un fluorochrome FITC (Biosource) dilué 1 :200 dans TBS-AT. Après 3 lavages de 10min avec du TBS-T 1x, un dernier lavage est réalisé après avoir détaché la partie supérieure des plaques. Finalement la lame est recouverte avec un polymère servant comme de lamelle chimique (AquaPerm Mounting Medium, IMMUON™ ThermoShandon Pittsburg PA). La lecture des lames a été effectuée avec un microscope confocale (LSM 510, Zeiss).

2.3.8 Analyses statistiques

Les résultats du test d'AMPC sont donnés en (pmoles/10⁵cellules) ± écart type. Le test de Mann-Whitney, un test non paramétrique, a été utilisé pour vérifier si la différence entre deux moyennes était significative. Ces valeurs sont significatives si P est inférieur à 0,05. Les données sont analysées à l'aide des logiciels StatView et Statistica.

CHAPITRE 3. RÉSULTATS

3.1 Étude de la voie de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA

3.1.1 Les ostéoblastes de patients scoliotiques présentent-ils un défaut de signalisation dans la voie de signalisation de la mélatonine ?

Chez les ostéoblastes provenant de sujets témoins, le traitement avec des doses croissantes de mélatonine induit une diminution de 60 à 70% des niveaux intracellulaires d'AMPc, tandis que chez les ostéoblastes de patients scoliotiques trois types de réponses ont été observées, ce qui a permis de les classer en trois groupes différents en fonction de leur réponse à la mélatonine (**Fig. 3.1 et 3.2**). Les ostéoblastes des patients du groupe 1 montrent une réponse atypique puisqu'en présence de doses croissantes de mélatonine les niveaux intracellulaires d'AMPc sont augmentés. Dans le deuxième groupe, les ostéoblastes des patients scoliotiques ne répondent pas au traitement à la mélatonine, même à des doses pharmacologiques ($10^{-7}M$) ou suprapharmacologiques ($10^{-5}M$). Le troisième groupe quant à lui regroupe des patients dont les ostéoblastes répondent partiellement au traitement à la mélatonine, mais n'atteignent pas les niveaux observés chez les ostéoblastes de sujet témoins. Toutefois, ce dernier groupe présente les plus hauts niveaux de base en AMPc et lorsque induit en présence de forskolin. Les niveaux d'AMPc de base et induits en présence de forskoline sont présentés dans le **tableau 3.1**.

Tableau 3.1 Valeurs basales et induites d'AMPc mesurées chez les ostéoblasts isolés de patients scoliotiques SIA et de sujets témoins

Cas	AMPc basal	AMP Induit	Cas	AMPc basal	AMP Induit
1017	0,01	12,06	1023	0,28	5,39
1033	2,01	21,77	1059	1,20	63,40
1038	0,10	15,84	1011	0,10	11,49
1002	0,16	3,81	1012	0,10	11,47
1024	0,10	24,52	1032	0,10	14,64
1041	0,01	3,50	1047	0,41	2,30
1061	0,01	11,90	1058	0,36	4,84
1013	0,10	16,36	1006	0,23	27,28
1014	0,10	19,85	1064	0,20	26,53
1027	0,40	12,20	1029	0,01	17,04
1019	0,88	48,95	1053	0,48	4,94
1066	0,26	31,71	1020	0,10	24,99
1025	0,70	20,37	1055	0,01	1,00
1056	0,46	61,08	1004	0,08	12,26
1065	0,01	14,70	1026	0,95	55,36
1036	0,10	15,84	1028	0,10	6,74
1040	0,01	13,35	1016	0,10	45,34
1138	0,03	3,41	1018	0,12	19,55
1057	0,40	16,78	1005	0,32	15,19
1067	0,10	21,20	1009	0,16	8,80
1084	0,10	20,81	1030	0,10	18,24
1007	0,10	22,74	1045	0,10	8,00
1043	0,90	18,70	1044	0,09	15,51
1022	0,10	4,45	1010	0,10	21,48
1003	1,90	67,78	1001	0,01	13,97
1042	0,03	51,64	1035	0,10	15,34
1060	0,19	7,25	1062	0,10	36,20
1037	0,10	9,18	1031	0,10	5,95
1008	0,10	69,91	1034	0,01	9,29

Les valeurs d'AMPc basales et induites sont exprimées en pmoles/ 5×10^4 cellules

L'encadré regroupe les valeurs obtenues pour les sujets témoins

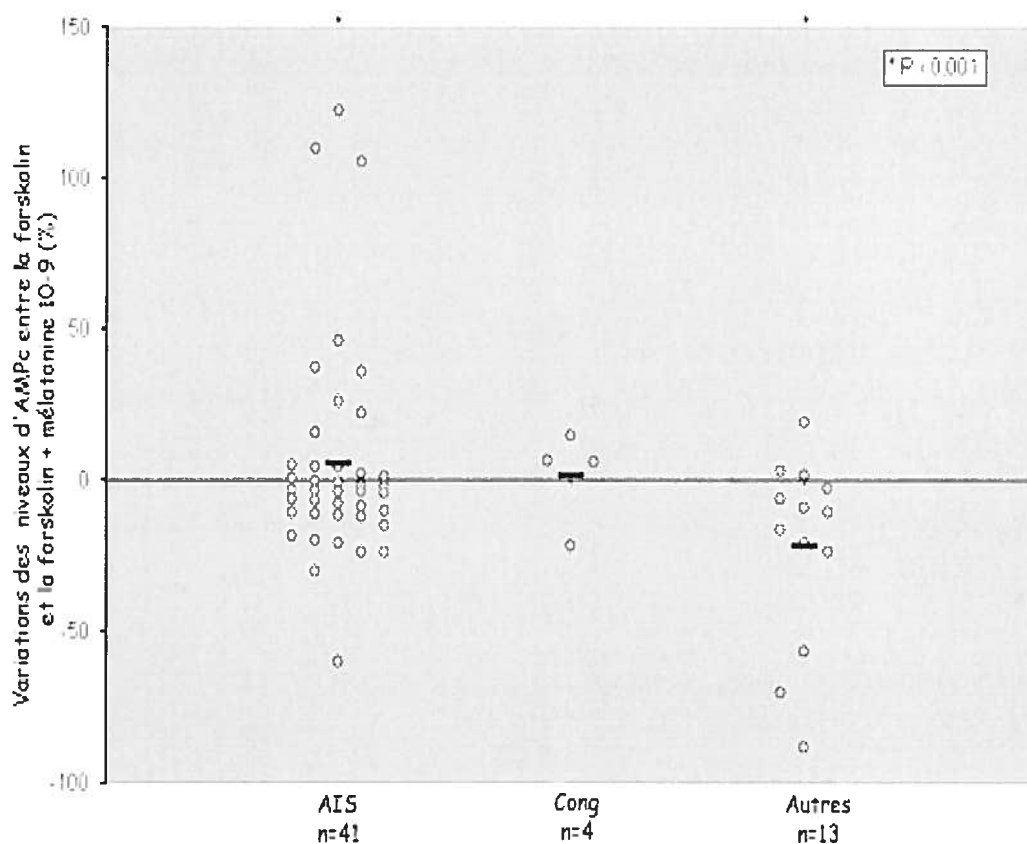


Figure 3.1 Évaluation de l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'accumulation intracellulaire d'AMPC chez les ostéoblastes humains. Distribution des données individuelles obtenues pour les ostéoblastes de chaque patient scoliotique et sujets témoins (scolioses congénitales, cong; et autres scolioses, autres). Les données correspondent au pourcentage des concentrations d'AMPC après traitement à la mélatonine ($10^{-9}M$) par rapport à la valeur de 100% qui est la concentration d'AMPC induite par la forskoline ($10^{-5}M$). La barre noire correspond à la moyenne de chaque groupe. La différence entre la moyenne du groupe scoliotique (AIS) est significativement plus élevée que celle obtenue avec le groupe témoin (autres) avec une probabilité $p < 0,001$.

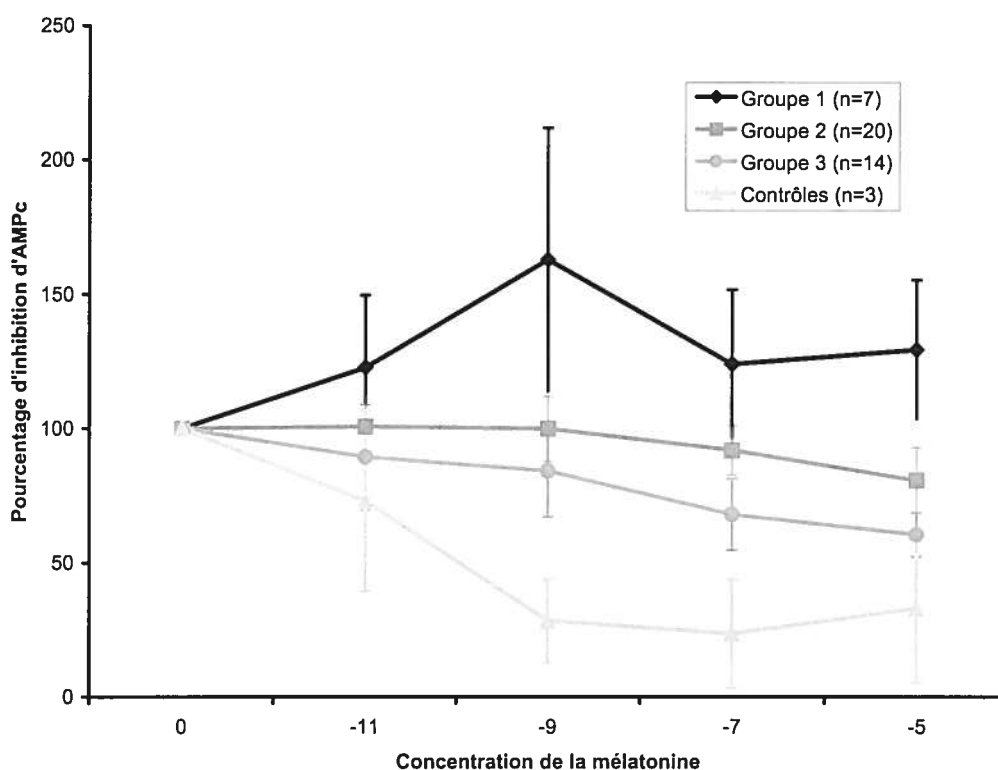


Figure 3.2 Évaluation de l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'accumulation intracellulaire d'AMPC chez les ostéoblastes humains. Effet de dose croissante de mélatonine (10^{-11} à 10^{-5} M) sur les niveaux d'AMPC induit par la stimulation avec la forskolin (10^{-5} M) chez les ostéoblastes de patients scoliotiques (groupes 1, 2 et 3) et de sujets témoins (contrôles). Les courbes représentent la valeur moyenne pour chacun des groupes \pm écart type. Les statistiques réalisées selon le test de Mann-Whitney prouvent que ces différences sont significatives. Groupe 1 versus groupe 2 ($p=0,017$ à la concentration 10^{-11} M, $p=0,00006$ à 10^{-9} M, $p=0,00066$ à 10^{-7} M et $p=0,00001$ à 10^{-5} M). groupe 1 vs groupe 3 ($p=0,010$ à la concentration 10^{-11} M, $p=0,000014$ à 10^{-9} M, $p=0,00001$ à 10^{-7} M et $p=0,00001$ à 10^{-5} M). groupe 2 vs groupe 3 ($p=0,0104$ à la concentration 10^{-11} M, $p=0,0067$ à 10^{-9} M, $p=0,00001$ à 10^{-7} M et $p=0,00001$ à 10^{-5} M).

3.1.2 Détermination de la densité et la localisation des récepteurs à mélatonine MT1 et MT2

La densité et la localisation des récepteurs à mélatonine MT1 et MT2 ont été déterminées par une méthode immunohistochimique en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre la partie C-terminale de MT1 et de MT2 afin de déterminer si le dysfonctionnement de la voie de signalisation observé chez les patients scoliotiques n'était pas occasionné par un problème de localisation ou de distribution des récepteurs à mélatonine. La figure 4 montre des images représentatives des résultats obtenus en microscopie confocale après incubation des cellules en présence d'anticorps anti-MT1 ou anti-MT2. Cette figure ne montre aucune différence dans la localisation ou la distribution des récepteurs MT1 et MT2 à la surface cellulaire entre les deux patients scoliotiques et le sujet témoin (**Fig.3.3**).

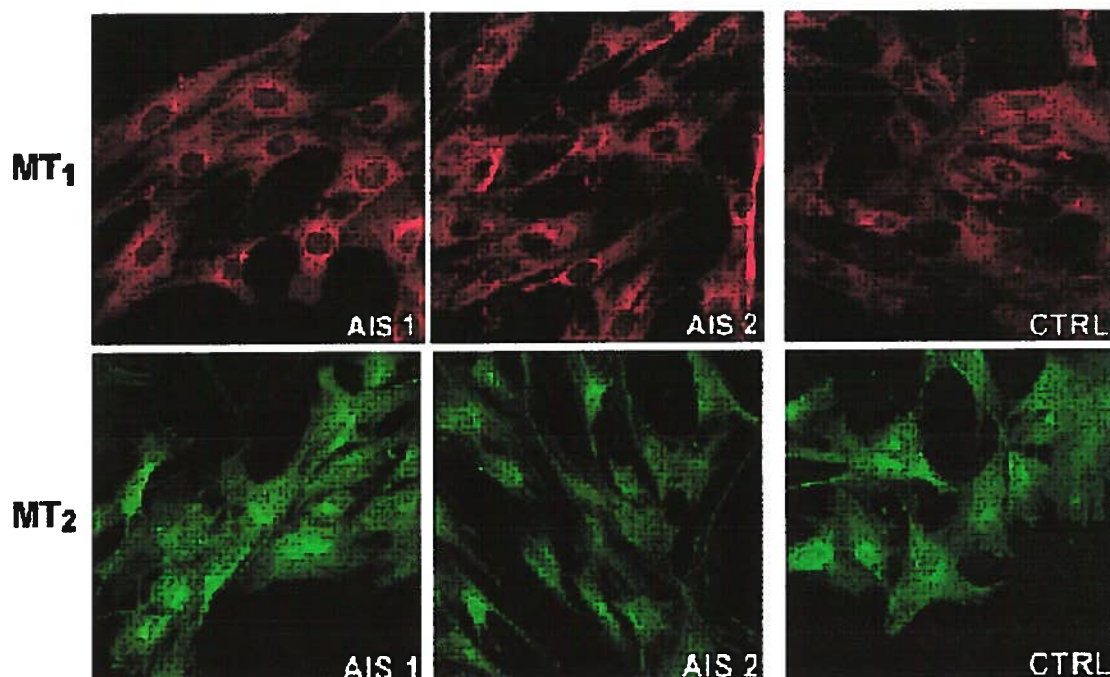


Figure 3.3 Détection des récepteurs à mélatonine MT1 et MT2 chez l'ostéoblaste

Les trois panneaux supérieurs montrent une détection du récepteur MT1 réalisée par immunohistochimie avec des anticorps anti-MT1 et les trois panneaux inférieurs correspondent à un essai similaire avec des anticorps anti-MT2 chez des ostéoblastes de patients scoliotiques (AIS1 et AIS2) versus un sujet témoin (CTRL). On remarque qu'il n'y a aucun changement significatif au niveau de la localisation et de la distribution de ces récepteurs entre les patients SIA (AIS1 et AIS2) et le sujet témoin (CTRL).

3.1.3 Analyse de la fonction des protéines Gi

3.1.3.1 Tests d'AMPC en utilisant le Gpp(NH)p

Le 5'-guanylylimidodiphosphate (Gpp(NH)p) est un analogue non hydrolysable du GTP, qui une fois associé à la sous-unité $G\alpha$ ne peut être hydrolysé par celle-ci, et reste ainsi constitutivement active. Des tests d'AMPC en remplaçant la mélatonine par le Gpp(NH)p ont été réalisés et ont montré que le Gpp(NH)p est incapable d'induire une inhibition des niveaux d'AMPC intracellulaires chez environ 50% des patients atteints de scoliose idiopathique ou ceux atteints de scoliose congénitale (**fig.3.4**). La **figure 3.4** présente la distribution des données individuelles obtenues pour les ostéoblastes de chaque patient scoliotique et sujet témoin (scolioses congénitales et autres scolioses). La comparaison entre les patients SIA et ceux atteints de scoliose congénitale ne montre aucune variation significative entre ces deux groupes suggérant un lien possible entre la scoliose idiopathique et certains types de scolioses congénitales.

3.1.3.2 Détermination du couplage préférentiel des protéines Gi avec le récepteur MT2

Afin de vérifier si le dysfonctionnement de la voie de signalisation de la mélatonine pourrait être occasionnée par une anomalie affectant la fonction des protéines Gi, nous avons analysés par co-immunoprécipitation le couplage de ces protéines au récepteur MT2 chez les ostéoblastes humains normaux (MG63) et chez les ostéoblastes de patients SIA. On s'est restreint à l'analyse du récepteur MT2 car ce récepteur est le plus abondant des deux chez les ostéoblastes (Forget & coll., soumis JBMR février 2004) et semble être celui qui est fonctionnel chez les ostéoblastes. Ces analyses de co-immunoprécipitation ont montré un couplage préférentiel des protéines Gi au récepteur MT2 et ce dans l'ordre $Gi3 > Gi2 > Gi1$ (**fig.3.5**). L'analyse de l'immunoblot a révélé l'existence de deux bandes immunoréactives représentant une forme à 43 kDa qui correspond à la forme non phosphorylée (active), et une autre forme à 60 kDa qui correspond à la forme phosphorylée (inactive). L'utilisation d'anticorps phosphospécifiques a confirmé qu'il s'agissait d'une phosphorylation au niveau d'au moins un résidu sérine (**Fig. 3.6**).

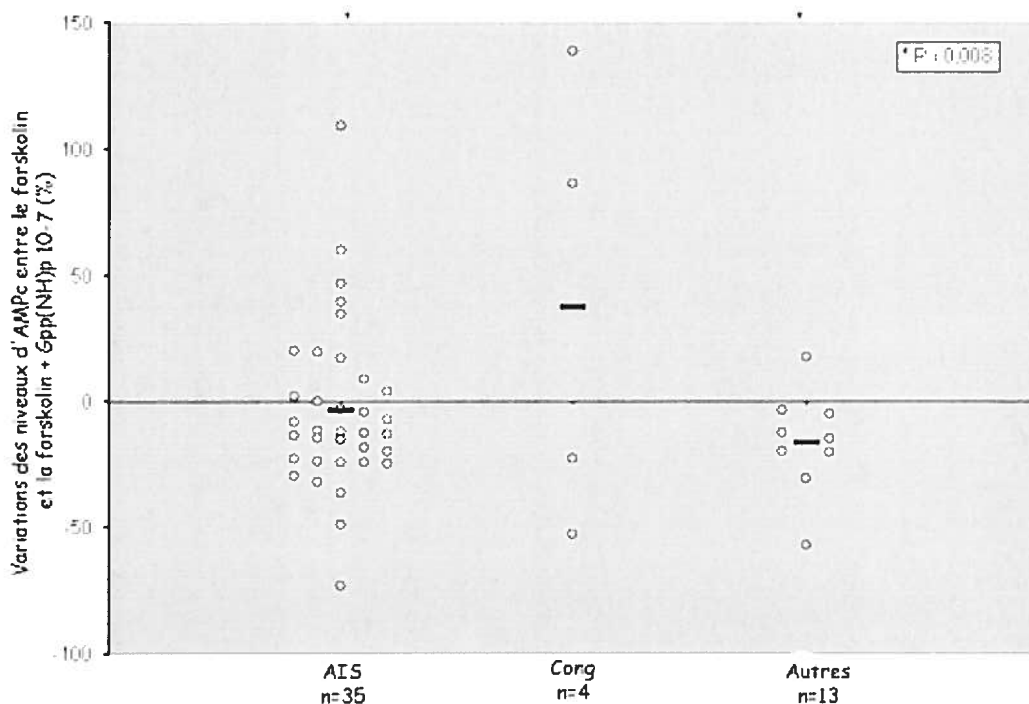


Figure 3.4 : Évaluation de l'effet inhibiteur du Gpp(NH)p sur l'accumulation intracellulaire d'AMPC chez les ostéoblastes humains. Distribution des données individuelles obtenues pour les ostéoblastes de chaque patient sciotique et sujets témoins (scolioses congénitales, cong; et autres scolioses, autres). Les données correspondent au pourcentage des concentrations d'AMPC après traitement au Gpp(NH)p (10^{-7} M) par rapport à la valeur de 100% qui est la concentration d'AMPC induite par la forskoline (10^{-5} M). La barre noire correspond à la moyenne de chaque groupe. La différence observée entre le groupe sciotique (AIS) et les sujets contrôles (autres) est significative avec une valeur de probabilité $p < 0,008$

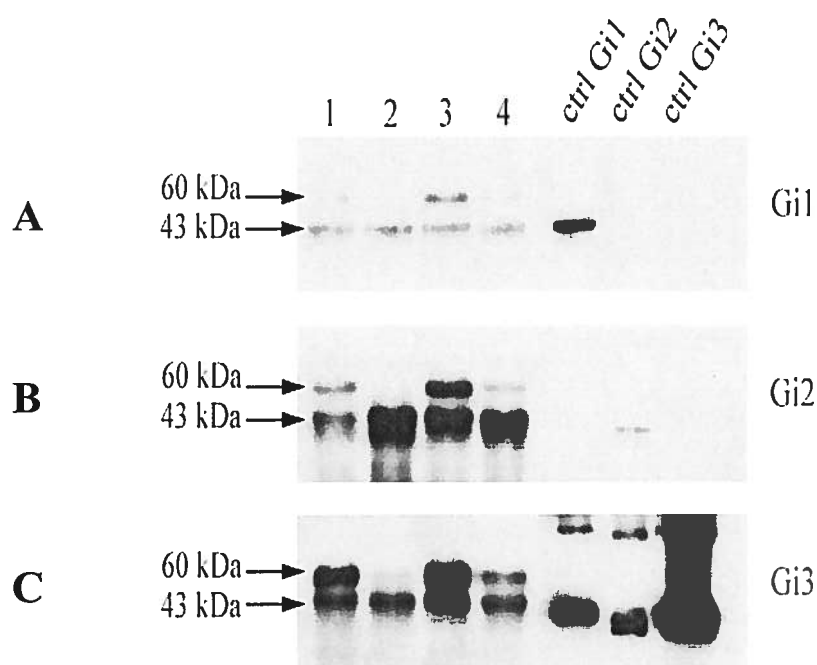


Figure 3.5 Détermination du couplage préférentiel des protéines Gi au récepteur à mélatonine MT2 chez les ostéoblastes humains de la lignée cellulaire MG63. Des analyses de co-immunoprécipitation ont été effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 en utilisant les fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes humains MG-63 traitées dans différentes conditions: colonne (1) non traité; colonne (2) traitées à la mélatonine; colonne (3) avec Na_3VO_4 , un inhibiteur de tyrosine phosphatase; colonne (4) avec la génistéine, un inhibiteur de tyrosine kinase. Les immunoblots ont été révélés par des anticorps spécifiques réagissant contre les protéines Gi1 (panneau A), contre les Gi2 (panneau B) et contre les Gi3 (panneau C). Notez la présence de deux bandes (43 kDa et 60 kDa) immunoréactives et représentant respectivement la bande non phosphorylée et la bande phosphorylée des protéines Gi. L'intensité des bandes révèle que les protéines Gi sont préférentiellement couplées au récepteur MT2 dans l'ordre suivant $\text{Gi3} > \text{Gi2} > \text{Gi1}$.

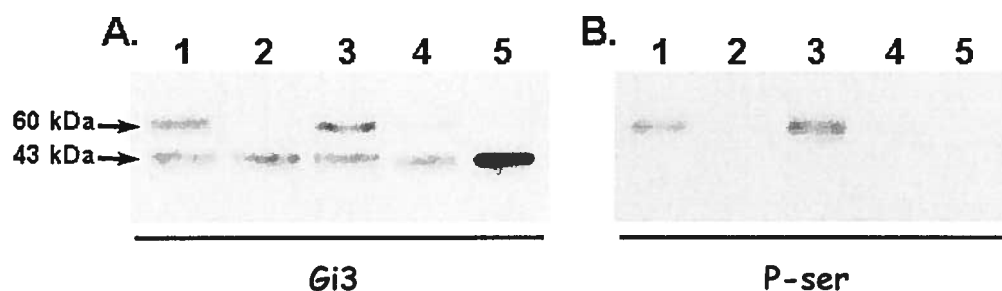


Figure 3.6 détection des résidus sérine phosphorylés dans les protéines Gi. Des analyses de co-immunoprécipitation ont été effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 en utilisant les fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes humains MG-63 traitées durant la nuit dans différentes conditions: colonne (1) non traité; colonne (2) traitées à la mélatonine; colonne (3) avec Na₃VO₄, un inhibiteur de tyrosine phosphatase; colonne (4) avec la génistéine, un inhibiteur de tyrosine kinase. Les immunoblots ont été révélés par des anticorps spécifiques réagissant contre les Gi3 (panneau A) puis traité afin d'enlever les anticorps primaires et secondaires et réutilisés en immunoblot avec des anticorps anti-phosphosérines (panneau B). Noter la présence d'une bande immunopositive pour l'antiphosphosérine correspondant à celle de 60 kDa sans traitement (colonne 1) ou lorsque traitée au Na₃VO₄ (colonne 3).

3.1.3.3 Analyse des protéines Gi chez les ostéoblastes de patients scoliotiques

Les essais de co-immunoprécipitation avec l'anticorps anti-MT2 ont permis de démontrer chez les patients scoliotiques un patron de phosphorylation des protéines Gi différent de celui observé chez les cellules normales (MG63). La **figure 3.7** montre le patron de phosphorylation des trois isoformes des protéines Gi (Gi1, Gi2 et Gi3) chez un sujet témoin et un patient SIA. Les trois isoformes ont le même patron de phosphorylation. Par exemple dans le cas de la protéine Gi2, en absence d'aucun traitement la forme phosphorylée est la plus abondante chez le patient SIA (colonne 5). Par contre le traitement à la mélatonine ou en présence de génistéine (un inhibiteur de protéines tyrosine kinases) induit la disparition de la bande phosphorylée des Gi chez l'ostéoblaste normal (MG63), alors que chez le patient SIA cette bande est toujours présente (colonne 6 et 8) malgré un traitement similaire. Le traitement à l'orthovanadate de sodium (Na_3VO_4), un inhibiteur de tyrosine phosphatases, induit l'augmentation de l'intensité des bandes phosphorylées des Gi, tel que prédit. De plus, nous avons observés chez un des patients SIA (1007) une diminution importante de protéine Gi3 couplée au récepteur MT2 en absence d'aucun traitement et en traitant avec la génistéine..

Les mêmes essais chez deux autres patients scoliotiques (1006 et 1008) montrent que la forme non phosphorylée est presque inexistante chez ces patients (**Fig. 3.8**). Les inhibiteurs généraux de tyrosines kinases (génistéine et herbimycine) sont incapables d'inhiber la forme phosphorylée des protéines Gi chez ces patients SIA ce qui est intéressant puisque ces deux inhibiteurs n'ont pas le même mode d'action. Chez le patient 1006 le traitement au Na_3VO_4 permet de diminuer la bande de 60 kDa.

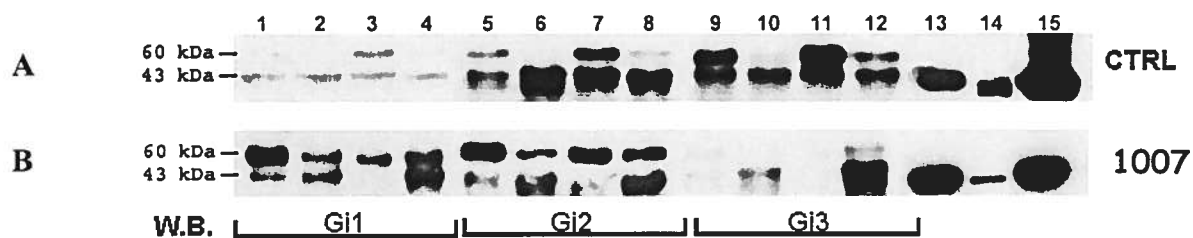


Figure 3.7 Détection des protéines Gi couplées au récepteur à mélatonine MT2.

Des analyses de co-immunoprécipitation ont été effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 en utilisant les fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes humains MG-63 (panneau A) et d'ostéoblastes de patient SIA (cas 1007, panneau B) traitées durant la nuit dans différentes conditions: colonne (1-5-9) non traité; colonne (2,6,10) traitées à la mélatonine; colonne (3,7,11) avec Na_3VO_4 , un inhibiteur de tyrosine phosphatase; colonne (4,8,12) avec la génistéine, un inhibiteur de tyrosine kinase. Les immunoblots ont été révélés par des anticorps spécifiques réagissant individuellement contre les protéines Gi à l'exception de l'anticorps anti-Gi3, qui réagit également contre les protéines Gi1 humaines. Les colonnes (1-4) sont révélées avec un anticorps anti-Gi1; colonne (5-8) avec anti-Gi2 et colonne (9-12) avec anti-Gi3. Les colonnes (13-15) correspondent respectivement aux protéines recombinantes Gi1-3 pures, utilisées comme contrôle de la spécificité des anticorps. Les bandes de 60 kDa et 43 kDa correspondent respectivement aux formes phosphorylées des Gi (inactives) et aux formes non phosphorylées (actives). On remarque une augmentation marquée de la phosphorylation des protéines Gi chez le patient SIA comparativement aux cellules témoins (MG63).

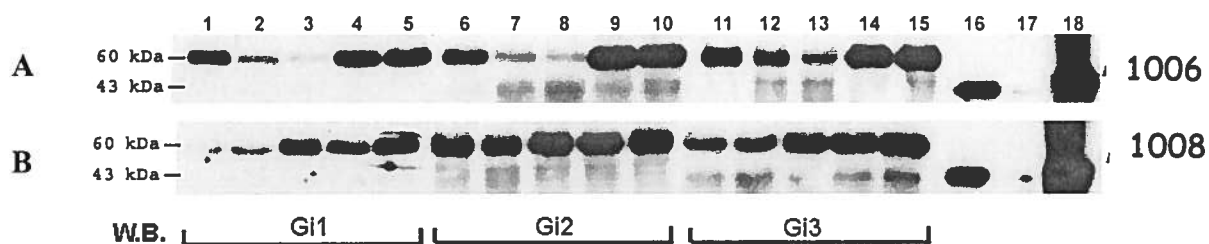


Figure 3.8 Détection des protéines Gi couplées au récepteur à mélatonine MT2.

Des analyses de co-immunoprécipitation ont été effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 en utilisant les fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes de patient SIA (cas 1006 et 1008) traitées durant la nuit dans différentes conditions: colonne (1,6,11) non traité; colonne (2,7,12) traitées à la mélatonine; colonne (3,8,13) avec Na_3VO_4 , un inhibiteur de tyrosine phosphatase; colonne (4,9,14) avec la génistéine, colonne (5,10,15) avec l'herbimycine, deux inhibiteurs de tyrosines kinases. Les immunoblots ont été révélés par des anticorps spécifiques réagissant individuellement contre les protéines Gi à l'exception de l'anticorps anti-Gi3, qui réagit également contre les protéines Gi1 humaines. Les colonnes (1-5) sont révélées avec un anticorps anti-Gi1; colonne (6-10) avec anti-Gi2 et colonne (10-15) avec anti-Gi3. Les colonnes (16-18) correspondent respectivement aux protéines recombinantes Gi1-3 pures, utilisées comme contrôle de la spécificité des anticorps. Les bandes de 60 kDa et 43 kDa correspondent respectivement aux formes phosphorylées des Gi (inactives) et aux formes non phosphorylées (actives).

3.2 Détermination des protéines interagissant avec le récepteur MT2

Afin de déterminer les protéines pouvant interagir avec le récepteur MT2, des analyses de co-immunoprécipitation effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 ont été réalisés sur des fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes de patients scoliotiques de la lignée MG63. La révélation a été effectuée à l'aide d'anticorps spécifiques des différentes protéines soupçonnées d'interagir avec MT2. La **figure 3.9** montre que PKC δ n'interagit pas avec le récepteur MT2 chez les cellules MG63 et les ostéoblastes du patient 1056, cette interaction existe chez les patients 1084 et 1138. chez ce dernier le traitement à la mélatonine induit la diminution de la bande représentant PKC δ . La **figure 3.10** montre que Rack1 interagit physiquement avec MT2 et que cette interaction n'est modulée ni par la mélatonine ni par l'estradiol. Les **figures 3.11** montre l'interaction de PTP μ avec MT2 chez les cellules MG63 ainsi que chez les ostéoblastes de patients 1007, 1008, 1006, 1038, 1013, 1002 et 1003. on remarque que la taille de la bande varie d'un patient à l'autre. La mélatonine n'a d'effet sur PTP μ que chez le patient 1038 chez lequel la taille de la bande représentant PTP μ est diminuée en présence de mélatonine. La **figure 3.12** montre que Src interagit avec MT2 et que cette interaction n'est modulée ni par la mélatonine ni par l'estradiol..

IP : MT2

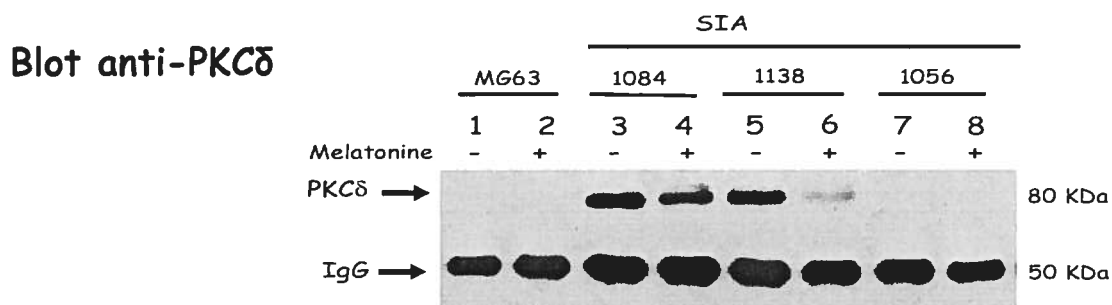


Figure 3.9 Interaction entre MT2 et PKC δ . Des analyses de co-immunoprécipitation ont été effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 sur des fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes de la lignée MG63 (colonne 1, 2), de patient scoliotique 1084 (colonne 3, 4), 1138 (5, 6) et 1056 (colonne 7, 8). Les cellules ont été mises en présence (+) ou en absence de mélatonine (10^{-9} M) (-). Les immunoblots ont été révélés par des anticorps spécifiques réagissant contre PKC δ (80kDa). La bande à 50kDa correspond à la chaîne lourde des IgG puisque l'immunoprécipitation a été réalisée avec un anticorps polyclonal produit chez le lapin et le western blot a été révélé avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la HRP.

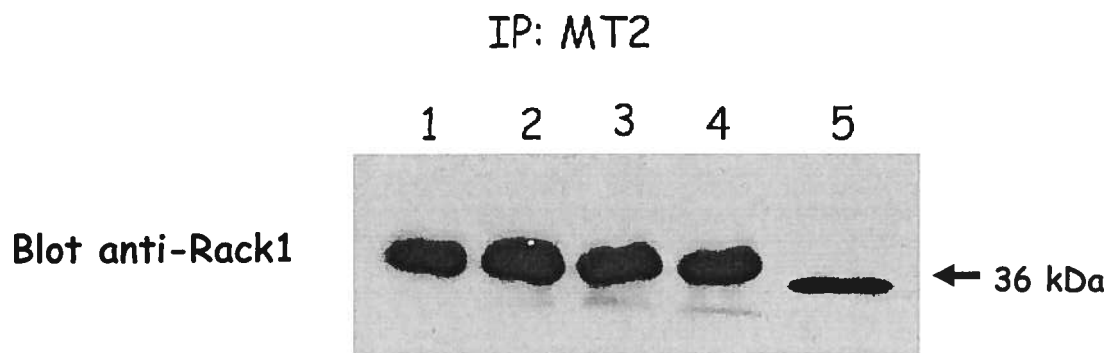


Figure 3.10 Interaction entre MT2 et Rack1. Des analyses de co-immunoprécipitation ont été effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 en utilisant les fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes de la lignée MG63. Les cellules ont été traitées durant la nuit dans différentes conditions: colonne (1) non traité; colonne (2) traitées à la mélatonine (10^{-9} M); colonne (3) avec l'estradiol (10^{-10} M), colonne (4) avec l'estradiol (10^{-10} M) + mélatonine (10^{-9} M). La colonne (5) contient la protéine recombinante purifiée de Rack1. Les immunoblots ont été révélés par des anticorps spécifiques réagissant contre Rack1.

IP : MT2

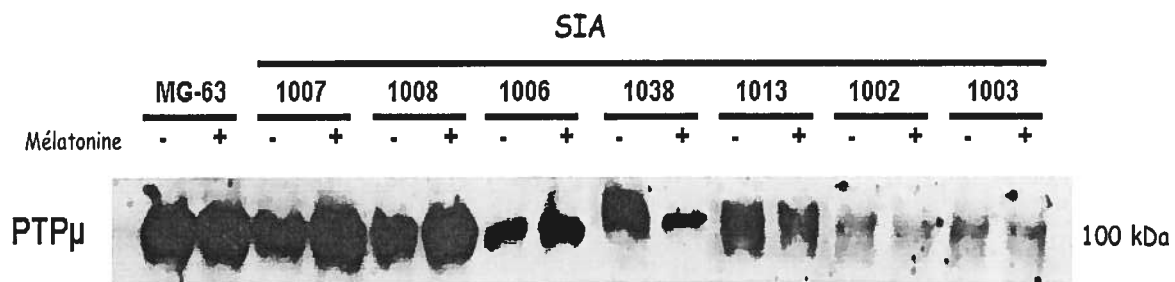


Figure 3.11 Interaction entre MT2 et PTP μ . Des analyses de co-immunoprécipitation ont été effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 en utilisant les fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes de la lignée MG63 et de patients scoliotiques. Les cellules ont été mises en présence (+) ou en absence de mélatonine (10^{-9} M) (-). Les immunoblots ont été révélés par des anticorps spécifiques réagissant contre PTP μ . Il est à

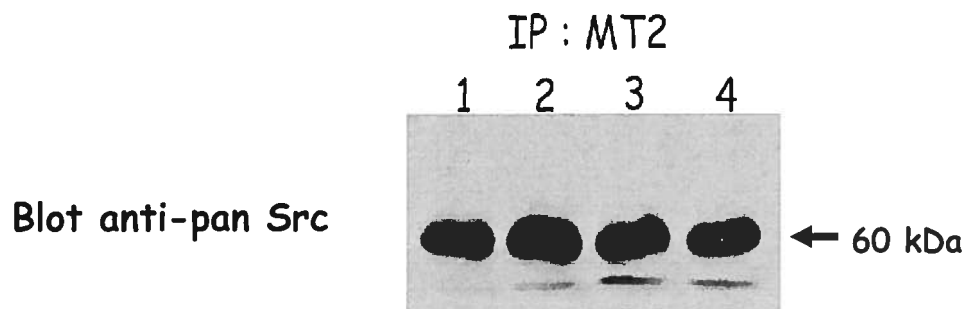


Figure 3.12 Interaction entre MT2 et Src. Des analyses de co-immunoprécipitation ont été effectuées avec des anticorps spécifiques anti-MT2 en utilisant les fractions membranaires purifiées à partir de cultures d'ostéoblastes de la lignée MG63. traitées durant la nuit dans différentes conditions: colonne (1) non traité; colonne (2) traitées à la mélatonine; colonne (3) avec l'estradiol, colonne (4) avec l'estradiol+mélatonine. Les immunoblots ont été révélés par des anticorps spécifiques réagissant contre pan Src.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire sont divisés en deux volets : l'un fondamental et l'autre clinique. Le volet fondamental consiste à caractériser la voie de signalisation de la mélatonine et les mécanismes de régulation de cette voie chez l'ostéoblaste. Le volet clinique porte sur l'implication d'un défaut de signalisation de la mélatonine observé chez les patients SIA dans l'étiopathogenèse de cette maladie.

4.1 Aspect fondamental

4.1.1 Mise en évidence d'une signalisation fonctionnelle de la mélatonine dans les ostéoblastes humains

Les effets de la mélatonine sur le tissu osseux sont variés et controversés (section 1.2.2.1.4). Les mécanismes par lesquels la mélatonine induit ces effets sont encore largement inconnus. Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ont permis de mettre en évidence l'existence d'une signalisation fonctionnelle de la mélatonine via ses récepteurs membranaires dans les ostéoblastes humains normaux. En effet, nos expériences d'immunohistochimie montrent que les deux récepteurs membranaires à mélatonine MT1 et MT2 sont exprimés et sont localisés à la surface des ostéoblastes humains normaux (**Fig. 3.3**). Les expériences de co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-MT2 ont révélé un couplage préférentiel des protéines Gi selon le récepteur membranaire. La capacité de la mélatonine à inhiber, de façon dose dépendante, l'accumulation d'AMPC intracellulaire produit par une stimulation des adénylates cyclases par la forskoline chez les ostéoblastes humains normaux montre que la voie de signalisation de la mélatonine est fonctionnelle dans ces cellules (**Fig. 3.2**). Toutefois, aucune investigation n'a été effectuée dans le cadre de ce projet afin d'étudier la signalisation de la mélatonine via ses récepteurs nucléaires ou cytoplasmiques.

4.1.2 Couplage préférentiel des protéines Gi au récepteur MT2

Nos expériences de co-immunoprécipitation montrent que les protéines Gi sont couplés aux récepteurs à mélatonine selon un ordre préférentiel décroissant $Gi3 > Gi2 > Gi1$ malgré que chez les ostéoblastes les sous-unités $G\alpha 2$ sont plus abondantes que les deux autres isoformes $G\alpha 1$ et $G\alpha 3$ (Susa & coll., 1997). Toutefois,

la signification et le rôle physiologique de ce couplage différentiel dans les ostéoblastes demeure encore obscure. Par contre, il ne semble pas que cela ait un rôle majeur puisque les fonctions des trois isoformes des protéines Gi peuvent être partiellement redondantes (voir section 1.3.1.1). Cette redondance est due à une augmentation de l'expression des isoformes existantes pour compenser le rôle de l'isoforme manquant. Toutefois les études de cinétique de recrutement du GTP par les sous-unités α montrent que les sous-unités $G\alpha_2$ lient le $GTP\gamma S$ plus rapidement que $G\alpha_1$ et $G\alpha_3$ (Carty & coll., 1990). Pour une bonne compréhension de ces mécanismes il faudrait étudier la signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes de souris déficientes en ces différents isoformes des protéines Gi (l'inactivation génique de chacun des trois isoformes des Gi a été réalisée (Offermans, 2003)). Une autre alternative serait d'utiliser la technique de siRNA afin d'inactiver chacun des isoformes des protéines Gi dans les ostéoblastes. Néanmoins, il est tentant de spéculer que malgré une certaine redondance, le couplage préférentiel de certaines protéines Gi, comme ici la G_i3 , puisse contribuer à une certaine forme de spécificité dans la signalisation de la mélatonine.

4.1.3 Régulation de la phosphorylation des protéines Gi

Nos expériences de co-immunoprécipitation montrent également que les protéines Gi couplées au récepteur MT2 existent sous deux formes, une forme phosphorylée et l'autre non phosphorylée. Le traitement des ostéoblastes par la mélatonine induit la disparition de la forme phosphorylée des protéines Gi (**Fig.3.5**). La mélatonine pourrait induire cet effet soit en activant une phosphatase ou en inhibant une kinase. La **figure 4.1** montre un schéma résumant les protéines pouvant réguler la phosphorylation des protéines Gi. Cette cascade a été construite à partir des données de la littérature et nos récentes expérimentations. Les protéines Gi peuvent être phosphorylées par PKC (Strassheim et Malborn, 1994), elle-même activée après une phosphorylation par une tyrosine kinase de la famille Src. Inversement PKC est inhibée par une ou plusieurs tyrosines phosphatase, PTP. La déphosphorylation des Gi se fait entre autres par une phosphatase de la famille des PP1 et PP2A (Bushfield & coll., 1990).

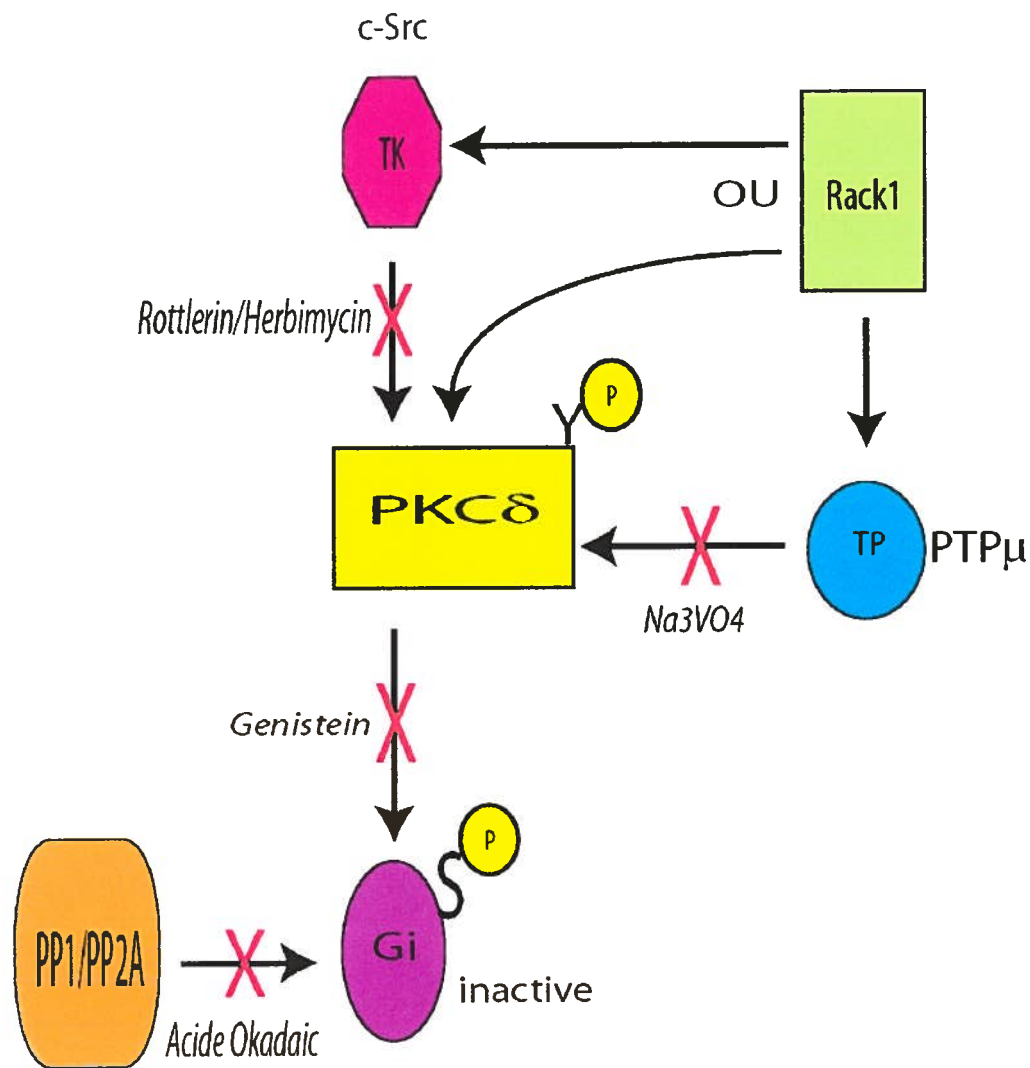


Figure 4.1 Cascade moléculaire régulant la phosphorylation des protéines Gi

Cascade moléculaire construite d'après les données de la revue de littérature et les résultats de nos expériences. Ces données ont été obtenues suite à l'utilisation des inhibiteurs correspondants de chaque molécule.

Afin d'étudier la voie de signalisation de la mélatonine nous avons décidé de vérifier la présence des protéines PKC δ , PTP μ , Rack1 et Src dans le complexe formé par MT2. Notre intérêt envers ce récepteur découle du fait qu'il est le plus abondant des deux récepteurs membranaires à mélatonine dans les ostéoblastes puisque les analyses d'expression par RT-PCR ont montré que le gène codant pour MT2 est fortement exprimé comparé à celui de MT1 (Forget & coll., soumis JBMR février 2004). Une autre évidence vient des travaux de Roth & coll. qui ont montré que l'effet de la mélatonine sur les ostéoblastes est inhibé par le luzindole, un antagoniste présentant une affinité plus grande pour le récepteur MT2 (Roth & coll., 1999). Ce récepteur forme un gros complexe protéique de 525 kDa (Barrett & coll., 1994) dont on connaît très peu les différents partenaires d'interaction. Les expériences effectuées en vue de définir ces partenaires ont révélé que le complexe formé par le récepteur MT2 contient les protéines Rack1, PKC δ , PTP μ et Src (**Fig. 3.9, 3.10, 3.11 et 3.12**). Notre intérêt envers PKC δ découle du fait que cette sérine/thréonine kinase peut phosphoryler les protéines Gi (du moins *in vitro*), qu'elle peut être localisée à la membrane via une protéine d'échafaudage appelée Rack1 (Receptor for Activated Protein Kinase C 1). De plus, l'activité de PKC δ est amplifiée par la phosphorylation de résidus tyrosine notamment par la tyrosine kinase Src. Par contre elle peut être inhibée par une tyrosine phosphatase PTP μ . Src est une tyrosine kinase intracellulaire qui participe à plusieurs voies de signalisation régulant la croissance, la différenciation et l'adhésion cellulaire (Chang & coll., 2001). PTP μ est un récepteur tyrosine phosphatase qui joue un rôle dans l'adhésion cellulaire via des interactions homophiliques (PTP μ d'une cellule se lie à PTP μ de la cellule adjacente) ou via son interaction avec les cadhérines (Mourton & coll., 2001). Compte tenu du rôle joué par ces protéines et que PTP μ et Src sont présentes dans des loci de susceptibilité pour la SIA, nous avons décidés de vérifier leur présence chez les ostéoblastes de patients scoliotiques et tester l'effet de la mélatonine sur ces protéines.

4.1.4 Modèles pouvant expliquer les différentes interactions entre le récepteur MT2 et ses partenaires

4.1.4.1 Interaction de MT2 avec Rack1

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet ont mis en évidence l'interaction de Rack1 avec le récepteur à mélatonine MT2. Rack1 est une protéine d'échafaudage dont les rôles ne sont pas encore tous élucidés. Rack1 est responsable entre autres de lier PKC sous sa forme active et de le transloquer d'un compartiment cellulaire à un autre. La localisation de Rack1 lui-même est modulée par plusieurs protéines. Il peut être recruté à la membrane via son interaction avec PTP μ (Mourton & coll., 2001) ou bien par sa liaison au dimère G $\beta\gamma$ (Chen & coll., 2004). Le rôle de Rack1 dans la signalisation de la mélatonine n'est pas connu. Toutefois, une des possibilités serait que Rack1 est présent dans le complexe formé par MT2 afin d'y localiser d'autres protéines avec lesquelles il interagit notamment PKC δ , PTP μ et Src. Toutes ces protéines sont présentes dans le complexe formé par MT2, mais on ignore si ces protéines interagissent directement avec MT2 ou bien si cette interaction est médiée par une des protéines du complexe. Il faudrait faire appel à d'autres techniques comme le BRET (bioluminescence resonance energy transfer) afin de trouver *in vivo* les protéines qui interagissent directement avec le récepteur MT2.

Un autre rôle que peut jouer Rack1 dans la signalisation de la mélatonine est la régulation de l'activité du dimère G $\beta\gamma$ libéré après recrutement et activation des protéines G i suite à une stimulation du récepteur par son ligand. En effet, les récents travaux de Chen & coll. ont montré que Rack1 est la première protéine à pouvoir moduler l'activité du dimère G $\beta\gamma$ libre puisque Rack1 lie ce dimère et l'inactive (Chen & coll., 2004). Inversement ce dimère est responsable de transloquer Rack1 vers la membrane plasmique. Toutefois, aucune différence n'est observée dans les niveaux de Rack1 présent dans le complexe formé par MT2 en présence ou en absence de mélatonine (**Fig 3.10**). Une interprétation possible serait que les dimères G $\beta\gamma$ libérés se lient à Rack1 sans affecter sa liaison au récepteur MT2. Il faudrait tester la présence du dimère G $\beta\gamma$ dans le complexe formé par MT2 suite à la stimulation par la mélatonine en incubant les membranes issues de l'immunoprécipitation réalisée à l'aide d'anticorps anti-MT2 avec des anticorps spécifiques dirigés contre le dimère G $\beta\gamma$.

4.1.4.2 Rôles de PKC δ dans la signalisation de la mélatonine

Peu de choses sont connues sur le rôle de PKC δ dans la signalisation de la mélatonine malgré que plusieurs études ont été effectuées dans le but de déterminer l'interaction de PKC avec la signalisation de la mélatonine. Toutefois, la plupart n'ont pas étudié une isoforme spécifique de PKC. Les rôles de PKC dans la signalisation de la mélatonine diffèrent d'une cellule à l'autre. D'une part, la mélatonine stimule PKC par l'induction d'un changement conformationnel de PKC δ suite à sa liaison directe sur l'enzyme dans les cellules de foie MDCK (Antòn-Tye & coll., 1998) ainsi que chez les cellules du neuroblastome de souris N1E-115 (Benitez-King & coll., 2000). D'autre part la mélatonine inhibe la signalisation en aval de PKC notamment l'inhibition de c-fos qui est stimulé par PKC dans les fibroblastes (L-cells) (Ross & coll., 1998). Chez les ostéoblastes l'effet de la mélatonine sur la signalisation de PKC n'est pas documenté. Toutefois la mélatonine et le PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, un activateur de PKC) stimulent la prolifération des ostéoblastes (Nakade & coll., 1999; Lampasso & coll., 2002), d'où la possibilité que l'effet de la mélatonine sur les ostéoblastes soit médié par une activation de PKC. À l'opposé PKC pourrait induire la diminution ou l'arrêt du signal transduit par la mélatonine car PKC pourrait inhiber les protéines Gi suite à leur phosphorylation et induire la désensibilisation des récepteurs à mélatonine (Freedman & Lefkowitz, 1996). Le mécanisme exact qui dirige la voie des PKC vers l'un ou l'autre de ces effets demeure inconnu.

Nos résultats montrent que PKC δ n'interagit pas avec MT2 dans les cellules MG63 par contre des résultats très récents ont permis de constater qu'il interagit avec ce récepteur dans les cellules de certains patients scoliotiques. Il serait donc possible que PKC δ soit impliqué dans l'un des mécanismes induisant le défaut de la voie de signalisation de la mélatonine. En effet, le recrutement de PKC δ dans le complexe peut induire la phosphorylation des protéines Gi et ainsi leur inactivation. Il est intéressant de mentionner que les trois patients testés appartiennent aux trois groupes de réponse à la mélatonine (#1084, groupe 3; #1138, groupe 1 et #1056, groupe 2). Cependant, à ce stade de nos recherches il est difficile de conclure que tous les patients du même groupe ont les mêmes interactions protéiques puisque ces trois patients sont les seuls à être

analysés du point de vue des interactions entre MT2 et PKC δ . L'analyse future de tous les patients pourrait nous aider à mieux comprendre ces interactions. De plus, on ne peut exclure que l'interaction de PKC δ avec le récepteur MT2 puisse moduler la localisation ou la fonction de ce récepteur chez certains patients SIA. Jusqu'à maintenant une telle interaction entre PKC δ et un récepteur couplé aux protéines G n'avait jamais été observé.

4.1.4.3 Rôles de PTP μ dans la signalisation de la mélatonine

Nous avons démontré pour la première fois une interaction entre PTP μ et un récepteur couplé aux protéines G (MT2). PTP μ est un récepteur tyrosine phosphatase connu pour être localisé dans les complexes d'adhésion entre les cellules. Il est possible qu'il soit recruté au récepteur MT2 via son interaction avec Rack1. En effet, la présence du complexe Rack1-PKC δ -PTP μ a été montrée dans les cellules neuronales (Rosdahl & coll., 2002). Ce complexe est nécessaire pour la prolifération de ces cellules. Les auteurs de cette étude ont suggéré que PTP μ pourrait réguler directement l'activité de PKC δ en le déphosphorylant puisque PKC δ est activé par une phosphorylation sur des résidus tyrosine, ou indirectement par compétition en recrutant Rack1 et ainsi modifier la localisation cellulaire de PKC δ (Rosdahl & coll., 2002). D'un autre côté PTP μ peut inhiber la phosphorylation de PKC δ en empêchant Src de se lier au complexe Rack1-PKC δ (Mourton & coll., 2001). Le rôle de PTP μ dans le complexe formé par MT2 pourrait être le même. En effet, le recrutement et l'activation de PTP μ pourrait induire l'inactivation de PKC δ et ainsi l'empêcher d'inactiver les protéines G α_i et d'induire la désensibilisation des récepteurs MT2 (Gilad & coll., 1997). Un autre rôle possible de PTP μ serait de déphosphoryler les protéines G α_i puisque plusieurs études ont montré que les sous-unités G α_i peuvent être phosphorylées sur des résidus tyrosine *in vitro* soit par la kinase du récepteur de l'insuline (Zick & coll., 1986) ou bien par Src (Hausdorff & coll., 1992). D'un autre côté plusieurs récepteurs couplés aux protéines G sont connus pour être phosphorylés sur des résidus tyrosine (Morris & Malbon, 1999) mais aucune évidence n'indique que le récepteur MT2 est lui aussi phosphorylé sur des résidus tyrosine puisque ce type de phosphorylation n'a pas été observé ni dans nos essais *in vivo* chez les ostéoblastes ni au niveau de la littérature. Fait intéressant, nos essais de co-immunoprécipitation montrent que les taux protéiques de PTP μ diffèrent d'un patient à

l'autre au niveau de la membrane plasmique et pourrait être chez certains patients à l'origine du défaut de signalisation observé. D'autres investigations seront nécessaires afin d'établir un lien directe entre cette phosphatase et la voie de signalisation de la mélatonine.

4.1.4.4 Rôles de Src dans la signalisation de la mélatonine

L'interaction de Src avec les récepteurs couplés aux protéines G a été bien étudiée surtout pour les récepteurs β -adrénergiques. Ces études ont montré que Src peut interagir avec ces récepteurs soit via sa liaison à la β -arrestine, une protéines d'échaffaudage recrutée suite à la phosphorylation des récepteur par les GRK, soit par sa liaison directe sur le récepteur. La liaison directe de Src sur ce récepteur s'effectue au niveau d'une séquence comprenant un motif SH2 (Src homology domain, Tyr-Gly-Asn-Gly) et nécessite la phosphorylation du récepteur sur le résidu ^{350}Y (Fan & coll., 2000). Cette séquence n'est pas présente dans le récepteur MT2 ce qui écarte la possibilité d'une liaison directe de Src sur le récepteur MT2. Toutefois, le complexe formé par le récepteur MT2 contient plusieurs substrats potentiels de Src notamment PKC δ et Rack1. La phosphorylation de PKC δ par Src induit l'amplification de son activité. Par contre la phosphorylation de Rack1 par Src génère un site de fixation pour Src ce qui induit sa séquestration et son inactivation par Rack1 (Chang & coll., 2002). Ce mécanisme pourrait constituer un rétrocontrôle développé par les cellules afin de prévenir le potentiel tumorigénique de l'hyperactivité de Src (Russello & Shore, 2003). Le mécanisme exact qui détermine le choix de Src entre ses substrats demeure inconnu.

Les travaux effectués dans le cadre de ce projet ont mis en évidence pour la première fois l'interaction de Rack1 et PTP μ avec un récepteur couplé aux protéines G et l'interaction de PKC δ et Src avec le récepteur à mélatonine MT2 dans un contexte pathologique comme la scoliose idiopathique. La détermination du rôle de chacune des protéines partenaires du récepteur MT2 dans la signalisation de la mélatonine nécessite l'approfondissement des recherches dans ce sens et pourrait aider à bâtir un modèle pouvant expliquer toutes ces interactions et leurs fonctions physiologiques. La **figure 4.2** montre un modèle hypothétique expliquant les interactions de MT2 avec ses différents partenaires.

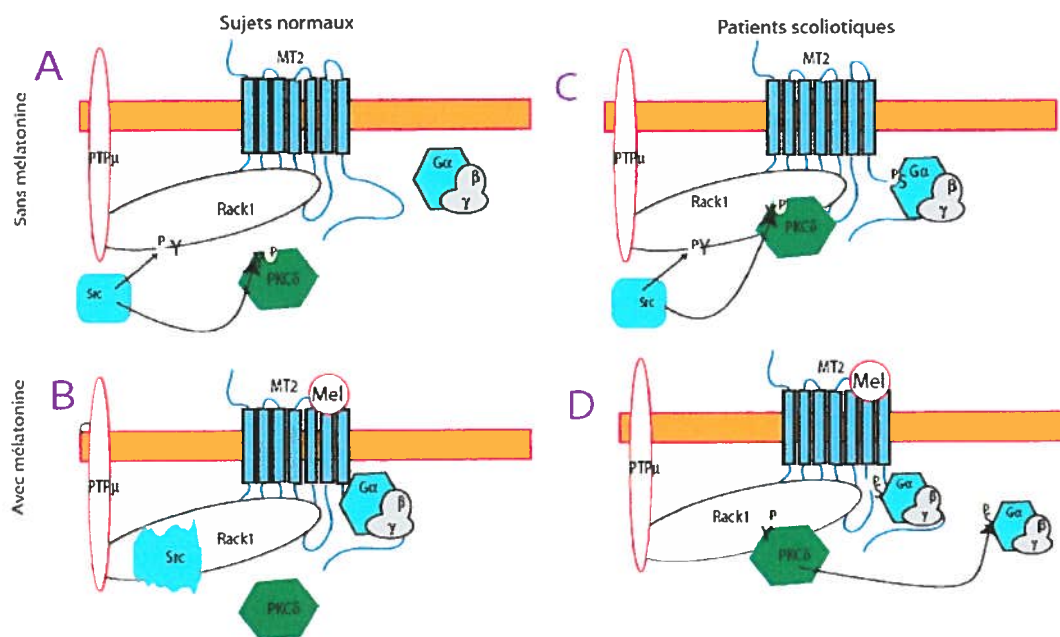


Figure 4.2 Modèles pouvant expliquer les interactions entre le récepteur MT2 et ses différents partenaires identifiés chez l'ostéoblaste normal et de patients scoliotiques. Le panneau A montre que chez les ostéoblastes de sujets normaux Rack1 interagit directement avec MT2 et c'est possiblement à travers cette protéine que PTP μ se retrouve dans le complexe formé par MT2. On ne peut exclure la possibilité d'une interaction directe entre PTP μ et MT2 mais nous n'avons pu démontrer jusqu'à maintenant une telle interaction. En présence du ligand aucun changement au niveau des interactions de MT2, Rack1 et PTP μ n'a été décelé (panneau B) dans nos conditions expérimentales chez les ostéoblastes normaux. On peut présumer dans ce cas que PKC δ n'est pas activée et que les protéines Gi sont recrutées et activées par le récepteur MT2 en présence de mélatonine. Src est bien connue pour activer PKC δ en le phosphorylant. Src peut aussi phosphoryler Rack1 ce qui induit un site de fixation de cette protéine sur Rack1. Src devient alors inactif suite à sa liaison à Rack1 (panneau B). Rack1 est connu comme facteur d'échafaudage pour la forme active de PKC δ . Dans nos conditions expérimentales on ne trouve pas de PKC δ dans le complexe formé par MT2 chez les ostéoblastes normaux. Toutefois, chez les patients scoliotiques, les protéines Gi sont hyperphosphorylées possiblement à cause de la présence de PKC δ dans le complexe lié au récepteur MT2 et chez au moins un patient (#1084 voir Fig 3.9) cette interaction demeure même en présence du ligand (panneau D), alors que chez un autre patient cette interaction entre PKC δ et MT2 est levée en présence de mélatonine. Il est donc possible que cette phosphorylation des protéines Gi soit médiée chez certains patients par un mécanisme impliquant PKC δ ce qui expliquerait le défaut de signalisation observé chez les patients scoliotiques.

4.2 Aspect clinique

L'étiologie de la scoliose idiopathique présente depuis des décennies un sujet de débat entre les chercheurs, mais c'est la première fois qu'un concept unificateur est développé et par lequel toutes les anomalies observées chez les patients SIA peuvent être expliquées. En effet, plusieurs études attribuent l'étiologie de la SIA à des causes multifactorielles. Nous avons découvert justement qu'un défaut systémique dans la signalisation de la mélatonine pourrait avoir un impact multiple voir multifactoriel en soi.

4.2.1 Dysfonctionnement de la voie de signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes de patients scoliotiques.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ont démontré pour la première fois un dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine chez tous les patients SIA testés. Ce défaut est intrinsèque à la cellule et possiblement causé par un défaut dans l'une ou l'autre des composantes de cette voie de signalisation dont l'identité reste à être déterminée. Cette possibilité est d'autant plus plausible compte tenu de l'existence d'au moins trois types de réponses dans les tests d'AMPC en présence de mélatonine suggérant l'existence de mutation distinctes dans l'un ou l'autre de ces composantes. D'ailleurs la découverte de plusieurs loci de susceptibilité pour la SIA tend à supporter l'existence de mutations distinctes et de l'implication possible de plus d'un gène impliqué dans cette condition pathologique.

4.2.2 La mélatonine pourrait-elle être la seule cause de la scoliose ?

Chez le poulet la diminution importante des niveaux de mélatonine suite à la pinéaléctomie induit une scoliose. Par contre chez le rat il faut que ce dernier adopte une posture bipédale pour qu'il devienne scoliotique après avoir subi une pinéaléctomie. Ceci démontre encore une fois la contribution importante du paramètre biomécanique dans l'induction et l'aggravation de la maladie. D'où la question à savoir si le défaut de signalisation de la mélatonine peut à lui seul être la cause de la SIA ? Les mécanismes induisant ce dysfonctionnement pourraient être différents d'un groupe de patient à un autre puisque nos résultats montrent qu'ils répondent différemment à la mélatonine (3

types de réponse dans nos tests d'AMPC, **Fig 3.2**). De plus, la comparaison entre les patients SIA et ceux atteints de scoliose congénitale ne montre aucune variation significative entre ces deux groupes suggérant un lien possible entre la scoliose idiopathique et certains types de scolioses congénitales. Cette observation est intéressante et supportée par les travaux de Purkiss & coll. qui ont observé une forte incidence (17,3%) de la scoliose idiopathique dans les familles atteintes de scoliose congénitale (Purkis & coll., 2002). Les auteurs de cette étude ont soulevé la possibilité d'un défaut génétique qui peut causer ou prédisposer les patients à développer soit une scoliose congénitale ou une SIA. Ces données suggèrent que le ou les mécanismes induisant la scoliose impliquent un ou plusieurs gènes interférant directement ou indirectement avec la voie de signalisation de la mélatonine. Par ailleurs plusieurs maladies complexes sont documentées pour être causées par la mutation d'un seul gène, l'exemple qui se rapproche à celui de la scoliose est la dystrophie musculaire de Duchenne qui est due à des mutations au niveau du gène codant pour la dystrophine. Cette maladie présente un phénotype aussi complexe que celui de la scoliose idiopathique (Yamashita & coll., 2001) et entraîne également la formation de scolioses sévères.

La **figure 4.3** résume les principaux tissus ciblés par l'action de la mélatonine. La majeure sinon la totalité de ces tissus sont affectés chez les patients SIA. Conséquemment l'ensemble des anomalies associées à la SIA pourraient s'expliquer par un défaut systémique de la voie de signalisation de la mélatonine. Par exemple la mélatonine est connue comme un antagoniste de la calmoduline (Benitez-King & coll., 1996). Une absence de signalisation de la mélatonine pourrait induire une augmentation des niveaux de calmoduline dans les plaquettes, cette augmentation est considérée par certains chercheurs comme un bon marqueur de l'évolution des scolioses (Kindsfater & coll., 1994) quoi que non encore démontré. Un autre exemple est l'induction de l'ostéopénie chez les patients SIA. En effet une des conséquences d'un défaut au niveau de la signalisation de la mélatonine est une augmentation d'AMPC intracellulaire, une molécule connue pour son effet inhibiteur de Cbfa1/Runx2 qui est un facteur de transcription nécessaire pour la différenciation des ostéoblastes (Tintut & coll., 1999).

L'anomalie principale qui caractérise la scoliose est la déformation de la colonne vertébrale. Actuellement, il est difficile d'expliquer pourquoi un défaut généralisé dans la voie de signalisation de la mélatonine induit cette déformation spécifique à la colonne. Cependant on pourrait spéculer que ce sont des contraintes mécaniques associées à un défaut de la proprioception qui sont à l'origine de cette déformation (Veldhuizen & coll., 2000). Le défaut de la proprioception serait engendré par un défaut de signalisation de la mélatonine. Les contraintes mécaniques sont engendrées par une asymétrie gauche-droite qui induit un déséquilibre au niveau de la colonne vertébrale (Sahlstrand & coll., 1980), ce qui explique pourquoi on n'observe pas de déformation au niveau des os des membres inférieurs et supérieurs. Il est également possible que la colonne vertébrale soit de par sa nature davantage exposée aux contraintes biomécaniques ce qui expliquerait la prévalence des déformations à cet endroit. Des travaux prometteurs sont d'ailleurs en cours dans le laboratoire du Dr Moreau afin d'expliquer au niveau moléculaire le ou les mécanismes pathogéniques sous-jacents à ces déformation du rachis.

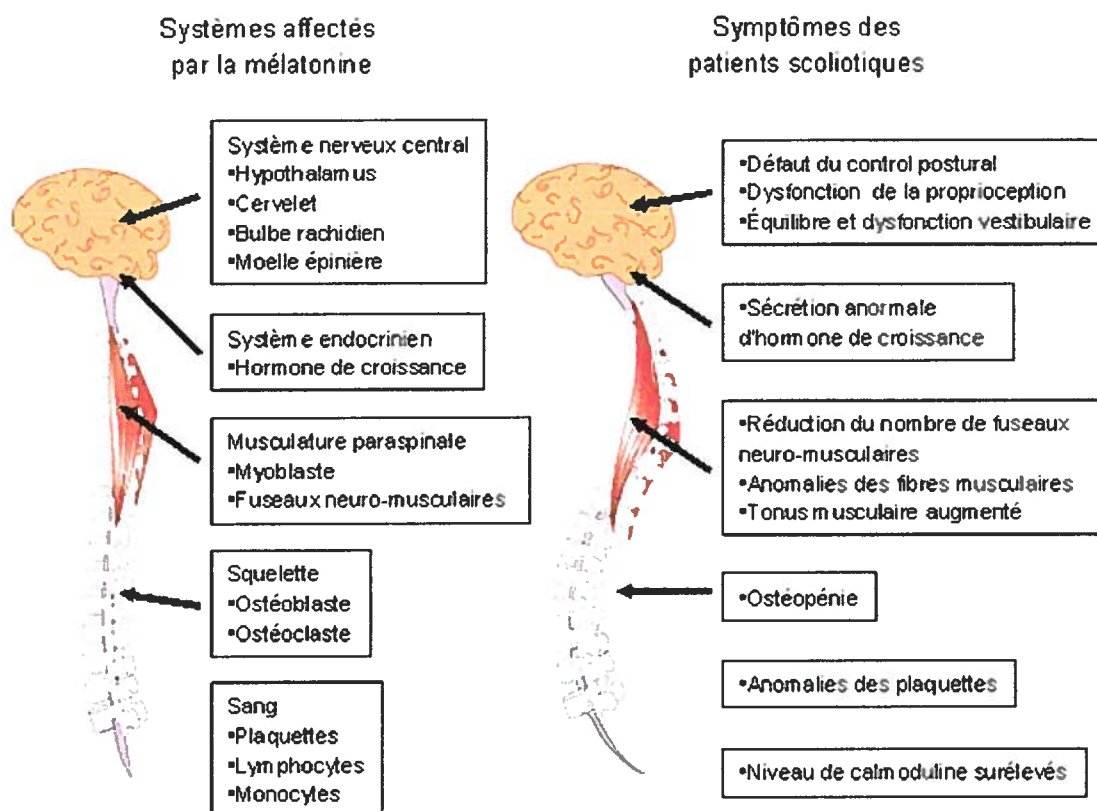


Figure 4.3 Systèmes ciblés par l'action de la mélatonine et symptômes observés chez les patients scoliotiques

Représentation schématique des effets physiologiques de la mélatonine chez les sujets normaux et leurs liens avec les pathologies observées chez les patients SIA. La figure de gauche présente les tissus ciblés par l'action de la mélatonine. Une défaillance de la signalisation de cette hormone au niveau de ces systèmes pourrait expliquer plusieurs anomalies présentées dans la figure de droite qui sont associés à la scoliose.

4.2.3 Causes du dysfonctionnement de la voie de signalisation de la mélatonine

4.2.3.1 Implication des récepteurs MT1 et MT2 ?

Nos expériences montrent que le dysfonctionnement observé chez les patients SIA n'est pas dû à un défaut au niveau des récepteurs. En effet les expériences d'immunohistochimie montrent qu'il n'y a aucune différence dans l'expression et la localisation des récepteurs à mélatonine MT1 et MT2 entre les ostéoblastes de sujets témoins et ceux des patients SIA. Toutefois, cela n'est pas une indication concrète que les récepteurs sont fonctionnels. Le deuxième argument réside dans l'incapacité de doses élevées de Gpp(NH)p d'inhiber l'accumulation d'AMPc intracellulaire chez les ostéoblastes de 50 % de patients scoliotiques. Puisque le Gpp(NH)p stimule directement les protéines Gi sans passer par le récepteur. Ceci suggère un défaut situé en aval des récepteurs MT1 et MT2.

Une étude récente réalisée sur 113 patients a montré que le récepteur MT1 n'est pas impliqué dans l'étiologie de la SIA (Morcuende & coll., 2003). Le gène codant pour le récepteur MT1 est situé dans le chromosome 4q, locus déjà identifié comme étant un locus de susceptibilité pour la SIA (Wise & coll., 2000). D'autres études ont montré que des mutations naturelles du récepteur MT2 chez le hamster ainsi que son inactivation génique chez la souris n'induisent pas de scoliose (Jin & coll., 2003; Weaver & coll., 1996). Cependant, il est possible que la posture en mode quadrupède du hamster et de la souris empêche la formation d'une scoliose comme dans le cas des rats pinéaléctomisés. Afin de vérifier cette hypothèse il faudrait répéter l'expérience de Machida et générer des souris adoptant une posture bipède suite à l'ablation chirurgicale des pattes avant pour chacune des lignées de souris KO pour MT1 ou MT2. On ne peut exclure la possibilité qu'un récepteur puisse particulièrement ou complètement compenser pour l'absence de l'autre.

4.2.3.2 Phosphorylation des protéines Gi

L'incapacité du Gpp(NH)p d'inhiber l'accumulation intracellulaire d'AMPc par la forskoline chez 50% des patients analysés a fortement suggéré la possibilité que le défaut de signalisation pourrait être causé par une perte de fonction au niveau des

protéines Gi. Nos expériences de co-immunoprécipitation montrent en effet que les protéines Gi couplées au récepteur MT2 chez les ostéoblastes de patients SIA sont hyperphosphorylées (Fig. 3.7 et 3.8). Les protéines Gi phosphorylées (particulièrement en position N-terminale) présentent une incapacité d'inhiber les adénylates cyclases (Strassheim et Malborn, 1994). La phosphorylation empêche aussi les sous-unités α des protéines Gi d'interagir avec les sous-unités $\beta\gamma$ ainsi qu'avec les RGS (Wang & coll., 1998). Le défaut de signalisation pourrait donc être causé en partie par cette phosphorylation accrue des protéines Gi les rendant inactives. Par contre, chez les patients qui répondent aux Gpp(NH)p ce serait un autre mécanisme qui induirait le défaut de signalisation. Aucune investigation n'a été réalisée dans ce projet afin d'identifier ce mécanisme.

4.2.4 Ce dysfonctionnement est-il spécifique aux ostéoblastes ?

Le choix des ostéoblastes comme modèle cellulaire pour l'évaluation de la voie de signalisation de la mélatonine est dû au fait que le tissu osseux est parmi les tissus les plus affectés chez les patients SIA puisque leurs colonnes vertébrales sont déformées et la plupart de ces patients sont ostéopéniques c'est-à-dire ont une masse minérale osseuse réduite (Cheng & coll., 1999). D'un autre côté les ostéoblastes répondent normalement bien à la mélatonine *in vivo* et *in vitro* (Roth & coll., 1999). Nos données préliminaires montrent que les ostéoblastes ne sont pas les seuls à être affectés par ce dysfonctionnement de la voie de signalisation de la mélatonine. Des tests d'AMPC effectués sur des cellules musculaires (myoblastes) et des chondrocytes isolées à partir des mêmes patients SIA ont montré que ces cellules présentaient le même défaut de signalisation de la mélatonine que celui observé chez les ostéoblastes. Il serait donc pertinent d'analyser tous les tissus déjà connus pour être une cible de la mélatonine, notamment dans le système nerveux afin de comprendre l'impact possible d'un défaut systémique de la signalisation de la mélatonine sur ces tissus et systèmes et déterminer leurs contributions respectives à la formation d'une scoliose. Dans cette perspective et pour de nombreuses raisons techniques et éthiques il faudrait développer des modèles animaux (souris bipèdes) dans lesquels la voie de signalisation de la mélatonine serait non fonctionnelle ou bien rendue non fonctionnelle dans un tissu donné. Par exemple l'administration quotidienne aux souris d'antagonistes hautement spécifique envers l'un

ou l'autre des récepteurs MT1 et MT2 (Dubocovich & coll., 1997) pourrait mimer un défaut de signalisation de la mélatonine. L'inactivation génique des deux récepteurs membranaires à mélatonine pourrait être un bon modèle d'étude du dysfonctionnement de la voie de signalisation de la mélatonine.

4.2.5 Implication possible des estrogènes comme facteur aggravant ?

Chez la femme la déficience en estrogène suite à la ménopause induit l'ostéoporose. En effet une baisse de la densité osseuse est observée chez les femmes ménopausées ainsi que chez les sujets mâles présentant une mutation dans le récepteur ER α , un récepteur nucléaire aux estrogènes (Smith & coll., 1994). Les travaux de Cheng & coll. ont montré que les estrogènes induisent une augmentation de la prolifération et de la synthèse de la matrice osseuse par une action directe sur les ostéoblastes via des récepteurs nucléaires aux estrogènes (Cheng & coll., 1994). Les estrogènes exercent leurs effets, dit génomiques, en modulant la transcription des gènes via les récepteurs nucléaires ER α et ER β (Church & coll., 1994). Parmi ces effets on retrouve également une modulation de l'expression des protéines G (Papaioannou & coll., 1999), l'inhibition de la synthèse de la mélatonine via l'inhibition de la N-acétyl-transférase, enzyme nécessaire à sa synthèse (Okatani & coll., 1998), et l'inhibition de l'expression des récepteurs MT1 (Clemens & coll., 2001). Les effets dits non génomiques des estrogènes sont modulés par la liaison des estrogènes sur leurs récepteurs membranaires couplés à une protéine G α_q . Cette liaison a pour effet d'activer plusieurs effecteurs, entre autres la phospholipase C (PLC) et la protéine kinase C delta (PKC δ), enzyme par laquelle les estrogènes peuvent moduler l'activité des protéines Gi.

Malgré que la mélatonine exerce les mêmes effets sur les ostéoblastes, au niveau moléculaire ces deux molécules ont un effet mutuellement antagoniste. L'effet antagoniste des estrogènes sur la mélatonine pourrait être plus prononcé dans les cellules dont la voie de signalisation de la mélatonine est non fonctionnelle, car les estrogènes peuvent induire une diminution de l'expression des protéines Gi, combiné à une inactivation causée par un accroissement de leur phosphorylation après stimulation des protéines kinase C. Ceci expliquerait la prévalence de la maladie à l'adolescence et le plus grand nombre de jeunes filles atteintes de SIA.

Les expériences de co-immunoprécipitation chez les ostéoblastes de la lignée MG63 montrent que le traitement à l'estradiol n'induit aucun changement dans les niveaux de PKC δ (Fig. 3.9). Une étude des effets des estrogènes sur les cellules de patients scoliotiques est en cours dans notre laboratoire et devrait fournir de nouveaux éléments pouvant permettre une meilleure compréhension du rôle des estrogènes dans les ostéoblastes et dans l'étiopathogenèse de la SIA.

4.3 Perspectives : applications en clinique

4.3.1 Tests de dépistage

La défaillance de la voie de signalisation observée chez les patients SIA ouvre la voie au développement d'un test de dépistage basé sur la fonctionnalité de cette voie. Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire ont mis l'emphase sur l'étude des ostéoblastes utilisés ici comme modèle cellulaire. La mise au point d'un test d'AMPC sur les lymphocytes issus d'un simple prélèvement sanguin pourrait constituer un test de dépistage peu coûteux pour identifier les enfants à risque de développer une scoliose sévère. Ce test devrait permettre d'élaborer de nouvelles approches thérapeutiques nous permettant d'intervenir plus précocement dans le traitement de cette pathologie et éventuellement prévenir les scoliose progressives et sévères.

Bibliographie

- Ahn UM, Ahn NU, Nallamshetty L, Buchowski JM, Rose PS, Miller NH, Kostuik JP, Sponseller PD. The etiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Am J Orthop.* 2002 Jul;31(7):387-95.
- Amatruda 3rd., T.T., Steele, D.A., Slepak, V.Z., Simon, M.I., 1991. Ga16, a G protein α -subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5587–5591.
- Andre, E., K. Gawlas, M. Steinmayr & M. Becker-Andre. 1998. A novel isoform of the orphan nuclear receptor ROR β is specifically expressed in pineal gland and retina. *Gene* 216: 277–283.
- Angeloni D, Longhi R, & Fraschini F. Production and characterization of antibodies directed against the human melatonin receptors Mel-1a (mt1) and Mel-1b (MT2). *Eur.J Histochem.* 2000;44:199-204.
- Antòn-Tay F, Ramirez G, Martinez I, Benitez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res.* 1998 May;23(5):601-6.
- Axelrod, J., R. J. Wurtman, & S. H. Snyder. Control of hydroxyindole-o-methyltransferase activity in the rat by environmental lighting. *J. Biol. Chem.* 240: 949–954, 1965.
- Baler, R., S. Coon & D.C. Klein. 1996. Orphan nuclear receptor RZR β : cyclic AMP regulates expression in the pineal gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 975–978.
- Bagnall KM, Raso VJ, Hill DL, Moreau M, Mahood JK, Jlang H, et al. Melatonin levels in idiopathic scoliosis. Diurnal and nocturnal serum melatonin levels in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996 ; 21 : 1974-8.
- Barrack RL, Whitecloud TS 3rd, Burke SW, Cook SD, Harding AF. Proprioception in idiopathic scoliosis. *Spine.* 1984 Oct; 9(7):681-5.

- Barrett P, MacLean A, Morgan PJ. Evidence for multiple forms of melatonin receptor-G-protein complexes by solubilization and gel electrophoresis. *J Neuroendocrinol.* 1994 Oct;6(5):509-15.
- Barrett P, Choi WS, Morris M, Morgan P. A role for tyrosine phosphorylation in the regulation and sensitization of adenylate cyclase by melatonin. *FASEB J.* 2000 Aug;14(11):1619-28.
- Beard HK, Roberts S, O'Brien JP. Immunofluorescent staining for collagen and proteoglycan in normal and scoliotic intervertebral discs. *J Joint Bone Surg Br* 1981; 63: 529-534.
- Becker-André, M., E. André & J.F. Delamarter. 1993. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 1371–1379.
- Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem.* 1994 Nov 18;269(46):28531-4.
- Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Jun 4;1290(2):191-6.
- Benitez-King G. PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. *J Pineal Res.* 2000 Aug;29(1):8-14.
- Berman D M. and Gilman A G, Mammalian RGS Proteins: Barbarians at the Gate *THE Journal OF Biological Chemistry* Vol. 273, No. 3, Issue of January 16, pp. 1269–1272, 1998
- Berridge, M.J. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220, 345±360.
- Borjigin J, Li X, Snyder SH. The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:53-65.

- Brodner W, Krepler P, Nicolakis M, Langer M, Kaider A, Lack W et Waldhauser F. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br* 2000; 82(3): 399-403.
- Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD et Jockers R. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 1999; 13(12): 2025-2038.
- Buhl, A.M., Johnson, M.L., Dhanasekaran, N., Johnson, G., 1995. Ga12 and Ga13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.* 270, 24631–24634.
- Bunemann M, Hosey MM. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol.* 1999 May 15;517 (Pt 1):5-23
- Burgoyne.W and J. Fairbanks The management of scoliosis. *Current Paediatrics*(2001) 11, 323d331
- Bushfield M, Griffiths SL, Murphy GJ, Pyne NJ, Knowler JT, Milligan G, Parker PJ, Mollner S, Houslay MD. Diabetes-induced alterations in the expression, functioning and phosphorylation state of the inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi-2 in hepatocytes. *Biochem J.* 1990 Oct 15;271(2):365-72.
- Bushfield M, Lavan BE, Houslay MD. Okadaic acid identifies a phosphorylation/dephosphorylation cycle controlling the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory protein Gi2. *Biochem J.* 1991 Mar 1;274 (Pt 2):317-21.
- Bylund P, Jansson E, Dahlberg E, Eriksson E. Muscle fiber types in thoracic erector spinae muscles. Fiber types in idiopathic and other forms of scoliosis. *Clin Orthop.* 1987 Jan;(214):222-8.
- Carlberg, C., R. Hooft Van Huijsduijnen, J. Staple, J.F. Delamarter & M. Becker-André. 1994. RZR_s, a novel class of retinoid related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol. Endocrinol.* 8: 757–770.
- Carneiro RC, Toffoleto O, Cipolla-Neto J, Markus RP. Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. *Eur J Pharmacol.* 1994 May 12;257(1-2):73-7.

- Carr AJ, Ogilvie DJ, Wordsworth BP, Priestly LM, Smith R, Sykes B. Segregation of structural collagen genes in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop*. 1992 Jan;(274):305-10.
- Carty DJ, Padrell E, Codina J, Birnbaumer L, Hildebrandt JD, Iyengar R. Distinct guanine nucleotide binding and release properties of the three Gi proteins. *J Biol Chem*. 1990 Apr 15;265(11):6268-73.
- Casey, P. J. Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem. Soc. Trans*. 23: 161–166, 1995.
- Cassone VM. Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiol Int*. 1998 Sep; 15(5):457-73.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. 1982 Jul 10;257(13):7847-51.
- Catterall, W.A., 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 16, 521–555.
- Chan AS, Lai FP, Lo RK, Voyno-Yasenetskaya TA, Stanbridge EJ et Wong YH. Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* 2002; 14(3): 249-257.
- Chan V, Fong GC, Luk KD, Yip B, Lee MK, Wong MS, Lu DD et Chan TK. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet* 2002; 71(2): 401-406.
- Chang BY, Conroy KB, Machleder EM, and Cartwright CA (1998) RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 18: 3245–3256.
- Chen C, Kalu DN. Strain differences in bone density and calcium metabolism between C3H/HeJ and C57BL/6J mice. *Bone*. 1999 Oct;25(4):413-20.
- Chen S, Dell EJ, Lin F, Sai J, Hamm HE. RACK1 regulates specific functions of Gβγ. *J Biol Chem*. 2004 Apr 23;279(17):17861-8. Epub 2004 Feb 12.

- Cheng JC, Guo X, Sher AH. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A longitudinal follow up study. *Spine*. 1999 Jun 15;24(12):1218-22.
- Cheng MZ, Zaman G et Lanyon LE. Estrogen enhances the stimulation of bone collagen synthesis by loading and exogenous prostacyclin, but not prostaglandin E₂, in organ cultures of rat ulnae. *JBMR* 1994; 9(6): 805-816.
- Church, C. J., P. J. Kushner, & G. L. Greene. The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Mol. Endocrinol.* 8:1407-1419 (1994).
- Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:167-203.
- Clemens JW, Jarzynka MJ et Witt-Enderby PA. Down-regulation of mt1 melatonin receptor in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sciences* 2001; 69(1): 27-35.
- Cobb JR. Outline study of scoliosis. In: *Instructional Course Letters*. American Academy of Orthopaedic Surgeons (1948). Mosby, St-Louis, 261-275.
- Coghlan VM, Perrino BA, Howard M, Langeberg LK, Hicks JB, Gallatin WM, Scott JD. Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science*. 1995 Jan 6;267(5194):108-11.
- Cohen M, Lippman M, Chabner B. Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer. *Lancet*. 1978 Oct 14;2(8094):814-6.
- Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 2000 May;28(4):193-202.
- Cos S, Mediavilla MD, Fernandez R, Gonzalez-Lamuno D, Sanchez-Barcelo EJ. Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro? *J Pineal Res.* 2002 Mar;32(2):90-6.
- Cowell H.R., Hall J.N., Mac Ewen G.D.: Genetic aspects of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop*, 1972, 86, 121-131.
- Csaba G, Bokay J. The effect of melatonin and corpus pineale extract on serum electrolytes in the rat. *Acta Biol.* 1977;28(1):143-4.

- Davignon, I., Catalina, M.D., Smith, D., Montgomery, J., Swantek, J., Croy, J., Siegelman, M., Wilkie, T.M., 2000. Normal hematopoiesis and inflammatory responses despite discrete signaling defects in Gal5 knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 20, 797–804.
- Dhanasekaran, N., Dermott, J.M., 1996. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal* 8, 235–245.
- Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML et Duckles SP. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1998; 345(1): 67-69.
- Dubousset J, Queneau P, Thillard MJ. Experimental scoliosis induced by pineal and diencephalic lesions in young chickens: Its relation with clinical findings. *Orthop Trans* 1983;7:7.
- Dubousset, J. Les scolioses dites idiopathiques. Définition - Pathologie - Classification - Étiologie." *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 183.4 (1999): 699-704.
- Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S et Sauri DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 355(3): 365-375.
- Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S et Masana MI. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* 1998; 12(12): 1211-1220.
- Echenne B, Barneon G, Pages M, Caillens JP, Guibal C, Jarrousse Y, Dimeglio A, Pous JG. Skin elastic fiber pathology and idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop.* 1988 Sep-Oct;8(5):522-8.
- Edwards AS, Scott JD. A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Apr;12(2):217-21.
- Enneking WF, Harrington P. Pathological changes in scoliosis. *J Bone Joint Surg Am.* 1969 Jan;51(1):165-84.

- Evans BK, Mason R, Wilson VG. Evidence for direct vasoconstrictor activity of melatonin in "pressurized" segments of isolated caudal artery from juvenile rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1992 Sep;346(3):362-5.
- Exton, J.H., 1996. Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 481–509.
- Faber A.: Untersuchungen über die Erblichkeit der Skoliose. *Arch Orthop Unfallchir* 1936, 36, 247-249.
- Fan G, Shumay E, Malbon CC, Wang H. c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):13240-7. Epub 2001 Jan 22.
- Fauteck J, Schmidt H, Lerchl A, Kurlmann G, Wittkowski W. Melatonin in epilepsy: first results of replacement therapy and first clinical results. *Biol Signals Recept.* 1999 Jan-Apr;8(1-2):105-10.
- Fields, T.A., Casey, P.J., 1997. Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem. J.* 321, 561–571.
- Ford DM, Bagnall KM, Clements CA, McFadden KD. Muscle spindles in the paraspinal musculature of patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine.* 1988 May;13(5):461-5.
- Forget Steve, Da Shen Wang, Bouziane Azeddine, Debora Angeloni, Franco Fraschini et Alain Moreau. Dual action of melatonin signaling activity in bone metabolism. Soumis à JBMR février 2004.
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res.* 1996;51:319-51; discussion 352-3.
- Freissmuth, M., Selzer, E., Marullo, S., Schutz, W., Strosberg, A.D., 1991. Expression of two human b-adrenergic receptors in *Escherichia coli*: functional interaction with two forms of the stimulatory G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8548–8552.

- Fukuhara, S., Chikumi, H., Gutkind, J.S., 2001. RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and RHO? *Oncogene* 20 (13), 1661–1668.
- Garland H.G.: Hereditary scoliosis. *Br Med J*, 1934, 1, 328-334.
- Gilad E, Matzkin H, Zisapel N. Inactivation of melatonin receptors by protein kinase C in human prostate epithelial cells. *Endocrinology*. 1997 Oct;138(10):4255-61.
- Gilman, A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615–649, 1987.
- Gilman AG. Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci Rep.* 1995 Apr;15(2):65-97.
- Harrington PR. The etiology of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop.* 1977 Jul-Aug;(126):17-25.
- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W.D., Gilman, A.G., Sternweis, P.C., Bollag, G., 1998. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Ga13. *Science* 280,2112–2114.
- Hausdorff WP, Pitcher JA, Luttrell DK, Linder ME, Kurose H, Parsons SJ, Caron MG, Lefkowitz RJ. Tyrosine phosphorylation of G protein alpha subunits by pp60c-src. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 1;89(13):5720-4.
- Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends Biochem Sci.* 1992 Oct;17(10):383-7.
- Hilibrand AS, Blakemore LC, Loder RT, Greenheld ML, Farley FA, Hensinger RN, et al. The role of melatonin in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996 ;21 : 1140-6.
- Ho, M.K., Wong, Y.H., 2001. G(z) signaling: emerging divergence from G(i) signaling. *Oncogene* 20, 1615–1625.
- Hooley, R., Yu, C.Y., Symons, M., Barber, D.L., 1996. Ga13 stimulates Na⁺-H⁺ exchange through distinct Cdc42- dependent and RhoA-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* 271, 6152–6158.

- Iiri, T., P. S. Backlund, JR., T. L. Jones, P. B. Wedegaertner, and H. R. Bourne. Reciprocal regulation of Gsa by palmitate and the bg subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14592–14597, 1996.
- Inoue M, Minami S, Nakata Y, Kitahara H, Otsuka Y, Isobe K, Takaso M, Tokunaga M, Nishikawa S, Maruta T, Moriya H. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis. *Spine*. 2002 Nov 1;27(21):2357-62.
- Jiang, Y., Ma, W., Wan, Y., Kozasa, T., Hattori, S., Huang, X.Y., 1998. The G protein Ga12 stimulates Bruton's tyrosine kinase and a rasGAP through a conserved PH/BM domain. *Nature* 395 (6704), 808–813.
- Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM et Weaver DR. Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 2003; 23(3): 1054-1060.
- Joseloff E, Cataisson C, Aamodt H, Ocheni H, Blumberg P, Kraker AJ, Yuspa SH. Src family kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic phenotype of skin keratinocytes. *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):12318-23. Epub 2002 Jan 25
- Justice CM, Miller NH, Marosy B, Zhang J et Wilson AF. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* 2003; 28(6): 589-594.
- Kindsfater K, Lowe T, Lawellin D, Weinstein D, Akmakjian J. Levels of platelet calmodulin for the prediction of progression and severity of adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am*. 1994 Aug;76(8):1186-92.
- Kennaway DJ, Earl CR, Shaw PF, Royles P, Carbone F, Webb H. Phase delay of the rhythm of 6-sulphatoxy melatonin excretion by artificial light. *J Pineal Res*. 1987;4(3):315-20.
- Klein DC, Weller JL, Moore RY. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Dec;68(12):3107-10.

- Klein, D. C., and J. L. Weller. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science* 177: 532–533, 1972.
- Klein D, Weller JL. Adrenergic-adenosine 3',5'-monophosphate regulation of serotonin N-acetyltransferase activity and the temporal relationship of serotonin N-acetyltransferase activity synthesis of 3H-N-acetylserotonin and 3H-melatonin in the cultured rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973 Sep; 186(3):516-27.
- Kokkola T, Laitinen JT. Melatonin receptor genes. *Ann Med.* 1998 Feb;30(1):88-94.
- Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T et Lau KH. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL mediated osteoclast formation and activation. *JBMR* 2002; 17(7): 1219-1229.
- Kozasa T, Gilman AG Protein kinase C phosphorylates G12 alpha and inhibits its interaction with G beta gamma. *J Biol Chem.* 1996 May 24;271(21):12562-7.
- Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:289-319.
- Lampasso JD, Marzec N, Margarone J 3rd, Dziak R. Role of protein kinase C alpha in primary human osteoblast proliferation. *J Bone Miner Res.* 2002 Nov;17(11):1968-76.
- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K, Daaka Y. Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol.* 1998;42:416-20.
- Lerner AB, Case JD et Takahashi Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.
- Lichtenstein Evaluation of Bone Mineral Density in Inflammatory Bowel Disease: Current Safety Focus *THE AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY* Vol. 98, No. 12, Suppl., 2003
- Liebmann PM, Wolfler A, Felsner P, Hofer D, and Schauenstein K (1997) Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol* 112:203–211.

- Linder, M. E., P. Middleton, J. R. Hepler, R. Taussig, A. G. Gilman, and S. M. Mumby. Lipid modifications of G proteins: a subunit is palmitoylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3675–3679, 1993.
- Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH et Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* 2001; 430(2-3): 351-357.
- Lounsbury, K. M., P. J. Casey, L. F. Brass, and D. R. Manning. Phosphorylation of G α in human platelets. Selectivity and site of modification. *J. Biol. Chem.* 266: 22051–22056, 1991.
- Lounsbury KM, Schlegel B, Poncz M, Brass LF, Manning DR. Analysis of G α by site-directed mutagenesis. Sites and specificity of protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* 1993 Feb 15;268(5):3494-8.
- Lowe TG, Edgar M, Margulies JY, Miller NH, Raso VJ, Reinker KA, Rivard CH. Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am.* 2000 Aug;82-A(8):1157-68
- Machida M, Dubousset J, Imamura Y, Iwaya T, Yamada T et Kimura J. An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Spine* 1993; 18(12): 1609-1615.
- Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. Melatonin: A possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996;21:1147–52.
- Machida M, Dubousset J, Yamada T et Kimura J. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy. *38th SRS meeting 2003*; résumé #78.
- Machida M, Murai I, Miyashita Y, Dubousset J, Yamada T et Kimura J. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats. *Spine* 1999; 24(19): 1985-1989.
- Malbon CC, Karoor V. G-protein-linked receptors as tyrosine kinase substrates: new paradigms in signal integration. *Cell Signal.* 1998 Sep;10(8):523-7.
- Malbon CC, Tao J, Wang HY. AKAPs (A-kinase anchoring proteins) and molecules that compose their G-protein-coupled receptor signalling complexes. *Biochem J.* 2004 Apr 1;379(Pt 1):1-9.

- Matsubara Etsuro , Mikio Shoji, Tetsuro Murakami, Takeshi Kawarabayashi, Koji Abe
Alzheimer's disease and melatonin. International Congress Series 1252 (2003) 395–
398
- McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ. The RACK1 scaffold
protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol*. 2002
Dec;62(6):1261-73.
- Meigs, T.E., Fields, T.A., McKee, D.D., Casey, P.J., 2001. Interaction of Ga 12 and Ga
13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for b-catenin
release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2), 519–524.
- Miller NH, Mims B, Child A, Milewicz DM, Sponseller PD et Blanton SH. Genetic
analysis of structural elastic fiber and collagen genes in familial adolescent idiopathic
scoliosis. *J Orthop Res* 1996; 14: 994-999.
- Miller NH, Mims B, Milewicz DM.: The potential role of the elastic fiber system in
adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 76 : 1193, 1994
- Miller NH, Sponseller PD, Bell J, et al. : X chromosome analysis in adolescent
idiopathic scoliosis. In research into spinal deformities 2: Proceeding of the 2nd
biannual meeting of the international research society of spinal deformities.
Burlington, VT, June 28-July 1, 1998. Amsterdam, IOS Press, 1998.
- Misol S, Ponseti IV, Samaan N, Bradbury JT. Growth hormone blood levels in patients
with idiopathic scoliosis. *Clin Orthop*. 1971 Nov-Dec;81:122-5.
- Molinari EJ, North PC, Dubocovich ML. 2-[125I]iodo-5-methoxycarbonylamino-N-
acetyltryptamine: a selective radioligand for the characterization of melatonin ML2
binding sites. *Eur J Pharmacol*. 1996 Apr 22;301(1-3):159-68.
- Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res*. 1996;73(1-2):125-30.
- Morcuende JA, Minhas R, Dolan L, Stevens J, Beck J, Wang K, Weinstein SL et
Sheffield V. Allelic variant of melatonin 1A receptor in patients with familial
adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2003; 28(17): 2025-2029.
- Morgan PJ, Barrett H, Howell E, Helliwell R (1994) Melatonin receptors: localization,
molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 24:101–146

- Morris AJ et Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 1999; 79(4): 1373-1430.
- Mourton T, Hellberg CB, Burden-Gulley SM, Hinman J, Rhee A, and Brady-Kalnay SM (2001) The PTPmu protein-tyrosine phosphatase binds and recruits the scaffolding protein RACK1 to cell-cell contacts. *J Biol Chem* 276:14896–14901.
- Nakade O, Koyama H, Ariji H, Yajima A et Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res* 1999; 27(2):106-110.
- Nakamura I, Rodan GA, Duong le T. Regulatory mechanism of osteoclast activation. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 2003;52(6):527-33.
- Nelson RJ and Drazen DL (2000) Melatonin mediates seasonal changes in immune function. *Ann NY Acad Sci* 917:404–415.
- Nishizuka Y, Nakamura S. Lipid mediators and protein kinase C for intracellular signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. 1995 Dec;22(1):S202-3.
- Nordwall A et Willner S, A study of skeletal age and height in girls with idiopathic scoliosis. *Clin orthop*. 1975 ; 110:6-0
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrang P, Canet E et Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 2000; 275(40): 31311-31317.
- Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrang P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2 . *Biochem Pharmacol*. 2001 Jun 1;61(11):1369-79.
- Oegema TR Jr, Bradford DS, Cooper KM, Hunter RE. Comparison of the biochemistry of proteoglycans isolated from normal, idiopathic scoliotic and cerebral palsy spines. *Spine*. 1983 May-Jun;8(4):378-84.
- Offermanns, S., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sun, W., Kurihara, H., Thompson, R.F., Inoue, Y., Kano, M., Simon, M.I., 1997. Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking Gαq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14089–14094.

- Offermanns, S., Zhao, L-P., Gohla, A., Sarosi, I., Simon, M.I., Wilkie, T.M., 1998. Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in Ga q/Ga 11-mutant mice. *EMBO J.* 17, 4304–4312.
- Offermanns S, G-proteins as transducers in transmembrane signalling *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 83 (2003) 101–130
- Okatani Y, Hayashi K, Watanabi K, Morioka N et Sagara Y. Effect of estrogen on melatonin synthesis in female peripubertal rats. *J Pineal Res* 1998; 24: 67-72.
- Pacchierotti C, Iapichino S, Bossini L, Pieraccini F, and Castrogiovanni P Melatonin in Psychiatric Disorders: A Review on the Melatonin Involvement in Psychiatry *Frontiers in Neuroendocrinology* 22, 18–32 (2001)
- Park, H.T., Y.J. Kim, S. Yoon, J.B. Kim & J.J. Kim. 1997. Distributional characteristics of the mRNA for retinoid Z receptor β (RZR β), a putative nuclear melatonin receptor, in the rat brain and spinal cord. *Brain Res.* 747: 332–337.
- Papaoannou S, Tumber AM, Meikle MC et McDonald F. G-protein signaling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1449: 284-292.
- Pedrini VA, Ponseti IV, Dohrman SC. Glycosaminoglycans of intervertebral disc in idiopathic scoliosis. *J Lab Clin Med.* 1973 Dec;82(6):938-50.
- Pévet P, Pitrosky B, Vuillez P, Jacob N, Teclemariam-Mesbah R, Kirsch R, Vivien-Roels B, Lakhdar-Ghazal N, Canguilhem B, and Masson-Pévet M (1996) The suprachiasmatic nucleus: the biological clock for all seasons, in *Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms*. *Progress in Brain Research* (Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA, and Mirmiran M eds) vol 111, pp 369–384, Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Pévet P (1998) Mélatonine et rythmes biologiques. *Thérapie* 53: 411–420
- Pierpaoli W, Regelson W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Jan 18; 91(2):787-91

- Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH et Peral A. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol* 2001; 416(3): 251-254.
- Podolsky D K. Inflammatory Bowel Disease N. Engl. J. Med., Aug 2002; 347: 417 - 429.
- Poon AM, Kravtsov GM, Pang SF. Receptor-mediated modulation of avian caecal muscle contraction by melatonin: role of tyrosine protein kinase. *J Pineal Res.* 2002 Apr;32(3):199-208.
- Purkiss SB, Driscoll B, Cole WG et al. Idiopathic scoliosis in families of children with congenital scoliosis. *Clin.Orthop.* 2002;27-31.
- Qiu J, Bosh MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK et Kelly MJ. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J Neurosci* 2003; 23(29): 9529-9540.
- Rafii-El-Idrissi M, Calvo JR, Harmouch A, Garcia-Maurino S et Guerrero JM. Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. *J Neuroimmunol* 1998; 86(2): 190-197.
- Raymond, J.R., Arthur, J.M., Casanas, S.J., Olsen, C.L., Gettys, T.W., Mortensen, R.M., 1994. α_2 adrenergic receptors inhibit cAMP accumulation in embryonic stem cells which lack *Gia2*. *J. Biol. Chem.* 269, 13073–13075.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991; 12(2): 151-180.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, and Gitto E (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A Review. *J Biomed Sci* 7:444–458.
- Reuber M, Schultz A, McNeill T, Spencer D. Trunk muscle myoelectric activities in idiopathic scoliosis. *Spine.* 1983 Jul-Aug;8(5):447-56.
- Rhee, S.G., 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 281–312.

- Riseborough E et Wynne-Davies R. A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts. *J Bone Joint Surg Am* 1973; 55: 974-983.
- Ron D and Mochly-Rosen D (1994) Agonists and antagonists of protein kinase C function, derived from its binding proteins. *J Biol Chem* 269:21395–21398.
- Rosdahl JA, Mourton TL, and Brady-Kalnay SM (2002) Protein kinase C delta (PKCdelta) is required for protein tyrosine phosphatase mu (PTPmu)-dependent neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci* 19:292–306.
- Ross AW, Webster CA, Thompson M, Barrett P, Morgan PJ. A novel interaction between inhibitory melatonin receptors and protein kinase C-dependent signal transduction in ovine pars tuberalis cells. *Endocrinology*. 1998 Apr;139(4):1723-30.
- Roth JA, Kim BG, Lin WL et Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 22041-22047.
- Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, Bradley A, Birnbaumer L. Gi2 alpha protein deficiency: a model of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol*. 1995 Nov;15(6 Suppl):101S-105S.
- Russello SV, Shore SK Src in human carcinogenesis. *Front Biosci*. 2003 Sep 1;8:s1068-73
- Sahlstrand T, Lidstrom J. Equilibrium factors as predictors of the prognosis in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop*. 1980 Oct;(152):232-6.
- Sashihara, S., P.A. Felts, S.G. Waxman & T. Matsui. 1996. Orphan nuclear receptor ROR α gene: isoform-specific spatiotemporal expression during postnatal development of brain.
- Schechtman D, Mochly-Rosen D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene*. 2001 Oct 1;20(44):6339-47.
- Schröder, M., C. Danielsson, I. Wiesenberg & C. Carlberg. 1996. Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR: they also bind COUP-TF. *J. Biol. Chem*. 271: 19732–19736.

- Schwend, R. M. et al. "Childhood Scoliosis - Clinical Indications for Magnetic-Resonance-Imaging." *Journal of Bone and Joint Surgery-American* Volume 77A.1 (1995): 46-53.
- Schwindinger, W.F., Robishaw, J.D., 2001. Heterotrimeric G-protein $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* 20 (13), 1653–1660.
- Shohat M, Shohat T, Nitzan M, Mimouni M, Kedem R et Danon YL. Growth and ethnicity in scoliosis. *Acta Orthop Scand* 1988; 59(3): 310-313.
- Shoumura S, Chen H, Emura S, Utsumi M, Hayakawa D, Yamahira T, Terasawa K, Tamada A, Arakawa M, Isono H. An in vitro study on the effects of melatonin on the ultrastructure of the hamster parathyroid gland. *Histol Histopathol.* 1992 Oct;7(4):715-8.
- Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev.* 2003 Jun;55(2):325-95.
- Skinner TM, Lopez-Corrales NL, Anderson SI, Loudon AL, Haley CS, Archibald AL. Genetic and physical mapping of the porcine melatonin receptor 1B gene (MTNR1B) to chromosome 9. *Cytogenet Cell Genet.* 2000;90(1-2):53-5.
- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB et Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Eng J Med* 1994; 331(16): 1056-1061.
- Spencer GS, Eccles MJ. Spinal muscle in scoliosis. Part 2. The proportion and size of type 1 and type 2 skeletal muscle fibres measured using a computer-controlled microscope. *J Neurol Sci.* 1976 Nov;30(1):143-54.
- Steinhilber, D., M. Brungs, O. Werz, I. Wiesenberg, C. Danielsson, J.-.Kahlen, S. Nayeri, M. Schröder & C. Carlberg. 1995. The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 270: 7037–7040.

- Strathmann, M., Simon, M.I., 1990. G protein diversity: a distinct class of a subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9113–9117.
- Strassheim, D., and C. C. Malbon. Phosphorylation of G_{i2} attenuates inhibitory adenylyl cyclase in neuroblastoma/glioma hybrid (NG-108–15) cells. *J. Biol. Chem.* 269: 14307–14313, 1994.
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:461-80.
- Susa M, Standke GJ, Jeschke M, Rohner D. Fluoroaluminate induces pertussis toxin-sensitive protein phosphorylation: differences in MC3T3-E1 osteoblastic and NIH3T3 fibroblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jun 27;235(3):680-4.
- Suzuki N et Hattori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J Pineal Res* 2002; 33(4): 253-258.
- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H., Kozasa, T., 2003. G_{12} activates Rho GTPase through tyrosinephosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci USA*
- Taylor TK, Ghosh P, Bushell GR. The contribution of the intervertebral disk to the scoliotic deformity. *Clin Orthop.* 1981 May;(156):79-90.
- Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003 Aug;4(8):638-49.
- Thillard MJ. Déformations de la colonne vertébrale consecutives a l'épiphyséctomie chez le Poussin. *Extrait des comptes Rendus de l'Association des Anatomistes* 1959; 751–8.
- Tintut Y, Parhami F, Le V, Karsenty G et Demer LL. Inhibition of osteoblast-specific transcription factor *Cbfa1* by the cAMP pathway in osteoblastic cells. Ubiquitin/proteasome-dependent regulation. *J Biol Chem* 1999; 274(41): 28875-28879.
- Tolo V T, Gillespie R. The characteristics of juvenile idiopathic scoliosis and results of its treatment. *J Bone Jt Surg* 1978; 60B: 181-188.

- Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*. 1996 Apr 19;272(5260):419-21.
- Tu, Y., J. Wang, and E. M. Ross. Inhibition of brain Gz GAP and other RGS proteins by palmitoylation of G protein α subunits. *Science* 278: 1132–1135, 1997.
- Ui, M., and T. Katada. Bacterial toxins as probes for receptor Gi coupling. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 24: 63–69, 1990.
- Vanderbeld B, Kelly GM. New thoughts on the role of the beta-gamma subunit in G-protein signal transduction. *Biochem Cell Biol.* 2000;78(5):537-50.
- Vaiskunaite, R., Adarichev, V., Furthmayr, H., Kozasa, T., Gudkov, A., Voynoyasenetskaya, T.A., 2000. Conformational activation of radixin by G13 protein α subunit. *J. Biol. Chem.* 275 (34), 26206–26212.
- Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 1987 Dec 1;435(1-2):359-62.
- Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998 Jul;78(3):687-721.
- Veldhuizen AG, Wever DJ, Webb PJ. The aetiology of idiopathic scoliosis: biomechanical and neuromuscular factors. *Eur Spine J.* 2000 Jun;9(3):178-84.
- Vinos J, Jalink K, Hardy RW, Britt SG, Zuker CS. A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function. *Science.* 1997 Aug 1;277(5326):687-90.
- von Gall C, Lewy A, Schomerus C, Vivien-Roels B, Pevet P, Korf HW et Stehle JH. Transcription factor dynamics and neuroendocrine signaling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur J Neurosci* 2000; 12(3): 964-972.
- Wan Q, Man HY, Liu F, Brauntton J, Niznik HB, Pang SF, Brown GM, Wang YT. Differential modulation of GABAA receptor function by Mel1a and Mel1b receptors. *Nat Neurosci.* 1999 May;2(5):401-3.
- Wang J, Ducret A, Tu Y, Kozasa T, Aebersold R, Ross EM. RGSZ1, a Gz-selective RGS protein in brain. Structure, membrane association, regulation by Galphaz

- phosphorylation, and relationship to a Gz gtpase-activating protein subfamily. *J Biol Chem.* 1998 Oct 2;273(40):26014-25.
- Wang J, Frost JA, Cobb MH, Ross EM. Reciprocal signaling between heterotrimeric G proteins and the p21-stimulated protein kinase. *J Biol Chem.* 1999 Oct 29;274(44):31641-7.
- Wange, R.L., Smrcka, A.V., Sternweis, P.C., Exton, J.H., 1991. Photoaffinity labeling of two rat liver plasma membrane proteins with [32P]g-azidoanilido GTP in response to vasopressin. Immunologic identification as a subunits of the Gq class of G proteins. *J. Biol. Chem.* 266, 11409–11412.
- Weaver DR, Liu C, et Reppert SM. Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1478-1487.
- Weaver, D. R., & S. M. Reppert. The Mel(1a) melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* 8: 109–112, 1996.
- Weinstein, L. S., and A. Shenker. G protein mutations in human disease. *Clin.Biochem.* 26: 333–338, 1993.
- Weinstein, L. S. Albright hereditary osteodystrophy, pseudohypoparathyroidism and Gs deficiency. *G Proteins Dis.* 1: 23–56, 1998.
- Wilkie, T.M., Scherle, P.A., Strathmann, M.P., Slepak, V.Z., Simon, M.I., 1991. Characterization of G-protein α subunits in the Gq class: expression in murine tissues and in stromal and hematopoietic cell lines. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 88, 10049–10053.
- Willner S, Nilson KO, Kastrup, et al. Growth hormone and somatomedin A in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Pediatr Scand* 1976; 65: 547-52
- Willner S.: Adolescent Idiopathic Scoliosis. Etiology in Weinstein S.L.(ed): *The Pediatric Spine: Principles and Practices.* New-York, Raven Press, 1994, p 445-462
- Wise CA, Barnes R, Gillum J et coll. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2000; 25: 2372-2380.

- Witt-Enderby PA, Masana MI, Dubocovich ML. Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mtl melatonin receptor. *Endocrinology*. 1998 Jul;139(7):3064-71.
- Witt-Enderby PA, Jarzynka MJ et Melan MA. Microtubules modulate melatonin receptor function. *Neurosci abstracts* 2001; 27: 142.
- Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S et Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003; 72(20): 2183-2198.
- Wu, D., Katz, A., Lee, C.H., Simon, M.I., 1992. Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors is mediated by the α subunits of Gq family. *J. Biol. Chem* 267, 25798–25802.
- Wynne-Davies R.: Familial (idiopathic) scoliosis. *J Bone Joint Surg*, 1968, 50B, 24-30
- Yamada K, Ikata T, Yamamoto H, Nakagawa Y, Tanaka H. Equilibrium function in scoliosis and active corrective plaster jacket for the treatment. *Tokushima J Exp Med*. 1969 Jun;16(1):1-7.
- Yamada K, Yamamoto H, Nakagawa Y, Tezuka A, Tamura T, Kawata S. Etiology of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop*. 1984 Apr;(184):50-7.
- Yamashita T, Kanaya K, Yokogushi K, Ishikawa Y, Minami R. Correlation between progression of spinal deformity and pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*. 2001 Jan-Feb;21(1):113-6.
- Yang, J., Wu, J., Kowalska, M.A., Dalvi, A., Prevost, N., O'Brien, P.J., Manning, D., Poncz, M., Lucki, I., Blendy, J.A., Brass, L.F., 2000. Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9984–9989.
- Yarom R, Robin GC. Studies on spinal and peripheral muscles from patients with scoliosis. *Spine*. 1979 Jan-Feb;4(1):12-21.
- Zaleske DJ, Ehrlich MG et Hall JE. Association of glycoaminoglycan depletion and degradative enzyme activity in scoliosis. *Clin Orthop* 1980; 148: 177-181.

Zick, Y., R. SagI-EisenberG, M. Pines, P. Gierschik, and A. M. Spiegel. Multisite phosphorylation of the a subunit of transducin by the insulin receptor kinase and protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9294–9297, 1986.