

Université de Montréal

**ÉTUDES DES VOIES DE SIGNALISATION DE LA MÉLATONINE
ET SON IMPLICATION DANS LA SCOLIOSE IDIOPATHIQUE DE L'ADOLESCENT**

par

STEVE FORGET

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

Mars 2004

© Steve Forget, 2004



QH

506

U54

2004

v. 012

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Études des voies de signalisation de la mélatonine
et son implication dans la scoliose idiopathique de l'adolescent**

présenté par
Steve Forget

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean Vacher
président-rapporteur

Dr Alain Moreau
directeur de recherche

Dr René St-Arnaud
membre du jury

Résumé

Le lien entre la mélatonine et les pathologies osseuses est étroit. Les observations effectuées sur les modèles animaux ont montré qu'une carence en mélatonine induisait une scoliose similaire à celle observée chez les patients atteints de scoliose idiopathique adolescente (SIA). De plus, le déclin naturel de la synthèse de cette hormone lors du vieillissement pourrait jouer un rôle critique dans le développement de l'ostéoporose. Bien qu'il ait été suggéré que la mélatonine stimulait le métabolisme osseux, on ignore tout des mécanismes liés à sa signalisation au niveau de l'os. La présente étude met en évidence la présence d'une signalisation de la mélatonine chez les ostéoblastes et les ostéoclastes et que cette signalisation semble inhiber la résorption osseuse. Il a également été observé que chez les patients SIA testés, la signalisation de la mélatonine était défaillante. Les résultats de ces recherches ouvrent la voie vers la découverte de procédés pharmacologiques permettant de réguler efficacement le métabolisme osseux.

Mots clés : estrogène, MT2, ostéoblaste, ostéoclaste, ostéoporose, protéines Gi, RANK

Abstract

The link between melatonin and bone diseases is noteworthy. Studies made on animal models showed that a lack of melatonin induced a scoliosis similar to the one observed in adolescent idiopathic scoliosis (AIS) patients. Moreover, the natural decline of melatonin synthesis during aging could play a critical role in osteoporosis development. Even though it was suggested that melatonin stimulate bone formation, the signaling mechanism underlying such process remains largely unknown. The present study demonstrates the presence of melatonin signaling in osteoblasts and osteoclasts and reveals the inhibitory action of melatonin on osteoclast differentiation and activation. Dysfunction of melatonin signaling in all AIS patients tested was also observed. Those results set the milestones for pharmacological research aiming at effective regulation of bone metabolism.

Keywords : estrogen, Gi proteins, melatonin, MT2, osteoblast, osteoclast, osteoporosis, RANK, idiopathic scoliosis

Table des matières

Titre.....	ii
Identification du jury.....	iii
Résumé	iv
Abstract.....	v
Table des matières	vi
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Dédicace et remerciements	xii
CHAPITRE 1. Revue de littérature	1
1.1 Le tissu osseux.....	1
1.1.1 Les cellules squelettiques	1
1.1.1.1 Chondrocytes.....	1
1.1.1.2 Ostéoblastes	3
1.1.1.3 Ostéoclastes	3
1.1.2 Régulation du tissu osseux	4
1.1.2.1 Mécanismes d'ossification	4
1.1.2.1.1 Ossification endochondrale	4
1.1.2.1.2 Ossification intramembranaire	6
1.1.2.2 Remodelage osseux	6
1.1.2.2.1 Activation des précurseurs ostéoclastiques	7
1.1.3 Stimulation hormonale	8
1.1.3.1 Estrogènes.....	8
1.1.3.2 Mélatonine et métabolisme osseux.....	10
1.2 Mélatonine.....	11
1.2.1 Généralités	11
1.2.2 Signalisation	12

1.2.2.1 Récepteurs	12
1.2.2.1.1 Récepteurs membranaires.....	13
1.2.2.1.2 Récepteur cytosolique.....	14
1.2.2.1.3 Récepteurs nucléaires	14
1.2.2.2 Protéines G	15
1.3 Scoliose idiopathique adolescente (SIA).....	16
1.3.1 Généralités	16
1.3.2 Hypothèses étiologiques	18
1.3.2.1 Tissus connectifs.....	18
1.3.2.2 Tissu musculaire	18
1.3.2.3 Proprioception	18
1.3.2.4 Plaquettes.....	19
1.3.2.5 Endocrinologie.....	19
1.3.2.5.1 Mélatonine et scoliose idiopathique	19
CHAPITRE 2. Premier manuscrit.....	23
Dual action of melatonin signaling activity in bone metabolism	
Résumé	25
ABSTRACT	26
INTRODUCTION	28
METHODS	30
RESULTS	33
DISCUSSION.....	34
Figures	36
Acknowledgments	42
Reference List.....	43
CHAPITRE 3. Second manuscrit.....	46
Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis	
Résumé	49

ABSTRACT	50
INTRODUCTION	51
METHODS	52
RESULTS	55
DISCUSSION.....	58
Tables.....	61
Figures	65
Acknowledgments	72
Reference List.....	73
CHAPITRE 4. Discussion	77
4.1 Aspect fondamental	77
4.1.1 Récepteurs membranaires et couplage des protéines Gi	77
4.1.2 Régulation directe de l'activation des ostéoclastes par la mélatonine.....	78
4.1.2.1 Régulation du récepteur RANK	79
4.2 Aspect clinique	80
4.2.1 Scoliose idiopathique adolescente et mélatonine	80
4.2.1.1 Signalisation défailante	81
4.2.1.1.1 Responsabilité des récepteurs MT1 et MT2	82
4.2.1.1.2 Régulation post-traductionnelle des protéines Gi.....	83
4.2.2 Ostéopénie et ostéoporose	84
4.2.3 Mélatonine et estrogène.....	85
4.3 Perspectives	86
Bibliographie	89
<i>curriculum vitae</i>	i-1

Liste des tableaux

CHAPITRE 3. Second manuscrit

Table 3.1: Clinical data on patients with adolescent idiopathic scoliosis (AIS).	61
Table 3.2: Clinical data on control subjects.	62
Table 3.3: Basal and induced cAMP values measured in osteoblasts isolated from patients with AIS and control subjects.....	63
Table 3.4: Summary of clinical data present in individual AIS groups.	64

Liste des figures

CHAPITRE 1. Revue de littérature

Figure 1.1 : Lignage des cellules ostéoprogénitrices.....	2
Figure 1.2 : Maturation des chondrocytes dans la plaque de croissance d'un os long lors du processus d'ossification endochondrale.	5
Figure 1.3 : Principales régions de l'ostéoclaste en résorption.	7-A
Figure 1.4 : Systèmes ciblés par l'action de la mélatonine et symptômes observés chez les patients souffrant de SIA.	20

CHAPITRE 2. Premier manuscrit

Figure 2.1: Melatonin receptors expression analysis human osteoblasts and osteoclasts.	36
Figure 2.2: Immunodetection of MT1 and MT2 melatonin receptors in human osteoblasts and osteoclasts.	37
Figure 2.3: Identification of Gi proteins coupled to melatonin receptors in human osteoblasts.....	38
Figure 2.4: Identification of Gi proteins coupled to melatonin receptors in human osteoclasts.....	39
Figure 2.5: Effect of melatonin on osteoclastic bone resorption activity.....	40
Figure 2.6: Effect of melatonin on RANK expression in human osteoclasts.....	41

CHAPITRE 3. Second manuscrit

Figure 3.1: Evaluation of melatonin inhibitory effect on adenylyl cyclase activity in human osteoblasts.....	65
Figure 3.2: Evaluation of melatonin inhibitory effect on adenylyl cyclase activity in human osteoblasts.....	66
Figure 3.3: Detection of MT1 and MT2 melatonin receptors in human osteoblasts.....	67
Figure 3.4: Evaluation of Gpp(NH)p inhibitory effect on adenylyl cyclase activity in human osteoblasts.....	68
Figure 3.5: Detection of Gi proteins coupled to MT2 receptors.	69
Figure 3.6: Immunodetection of Gi proteins coupled to MT2 receptors in AIS.	70
Figure 3.7: Detection of phosphoserine residues in phosphorylated Gi proteins.....	71

Liste des sigles et abréviations

(en ordre alphabétique)

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPc : adénosine 3',5'-monophosphate cyclique

BSP : *bone sialoprotein*

ER : *estrogen receptor*

GDP : guanosine diphosphate

Gpp(NH)p : 5'-guanylylimidodiphosphate

GTP : guanosine triphosphate

IHH : *indian hedgehog*

IL : interleukine

M-CSF : *macrophage-colony stimulating factor*

MT : récepteur à mélatonine

OC : ostéocalcine

OPG : ostéoprotégérine

OSX : ostérix

PKA : protéine kinase AMPc-dépendante

PTH : *parathyroid hormone*

PTHrP : *parathyroid hormone related peptide*

RANK : *receptor activator of NF- κ B*

RANKL : *receptor activator of NF- κ B ligand*

RT-PCR : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*

RZR/ROR : une famille de récepteurs nucléaires (*nuclear orphan receptor*)

SIA : scoliose idiopathique adolescente

TGF : *transforming growth factor*

TNF : *tumor necrosis factor*

TRAP : *tartrate-resistant acid phosphatase*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

Dédicace et remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes collègues et amis du milieu pour les enrichissantes discussions scientifiques et moins scientifiques.

Je ne peux passer sous silence les remerciements à mon directeur, Alain « the Boss » Moreau, pour m'avoir donné la chance et les coups de fouet nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je tiens finalement à remercier et à dédier ce travail à mes parents, Danielle et Jean-Paul ; ma Grand-Mère, GMHLB ; ma marraine, Carole et plus récemment ma tendre moitié, Anik. Merci à vous pour avoir cru en moi depuis le début, même quand moi-même j'y croyais moins, et pour avoir eu confiance sans jamais laisser paraître une seule particule d'anxiété (!?!).

CHAPITRE 1. REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Le tissu osseux

Jadis considéré comme un tissu inerte voir fossilisé, le tissu osseux a longtemps été négligé par la communauté scientifique. Néanmoins, les découvertes effectuées ces dix dernières années lui ont fait vivre un nouvel essor. En plus de son rôle structural de soutien corporel et de protection des organes, le tissu osseux remplit également un rôle métabolique de stockage des minéraux tel le calcium et le phosphate. Le maintien de ces fonctions nécessite une régulation étroite entre la prolifération, la différenciation et l'activité métabolique des cellules composant le tissu osseux.

1.1.1 Les cellules squelettiques

Le squelette est composé de différents types cellulaires remplissant chacun un rôle bien défini dans la formation et/ou le maintien des structures osseuses et cartilagineuses. Le cartilage est constitué d'un type cellulaire appelé chondrocyte alors que l'os est formé de deux types distincts soit les ostéoblastes et les ostéoclastes.

1.1.1.1 Chondrocytes

Le rôle des chondrocytes est de synthétiser le tissu cartilagineux servant aux articulations ainsi que celui servant de matrice pour le mécanisme d'ossification endochondrale (section 1.2.1.1). L'expression des facteurs de transcriptions Sox9, L-Sox5 et Sox6 oriente les cellules ostéoprogénitrices, elles-mêmes issues des cellules pluripotentes mésenchymateuses, vers une différenciation chondroblastique (Bi & coll., 1999 et Smits & coll., 2001). Sous le contrôle de Sox9, les chondrocytes synthétisent d'abord le collagène de type II, principalement présent dans le cartilage articulaire, et lors de leur transformation en chondrocytes hypertrophiés, ils réduisent la production du collagène de type II au profit du collagène de type X, essentiellement présent dans la formation de la matrice cartilagineuse lors de l'ossification endochondrale (Lefebvre & coll., 1998) (figure 1.1).

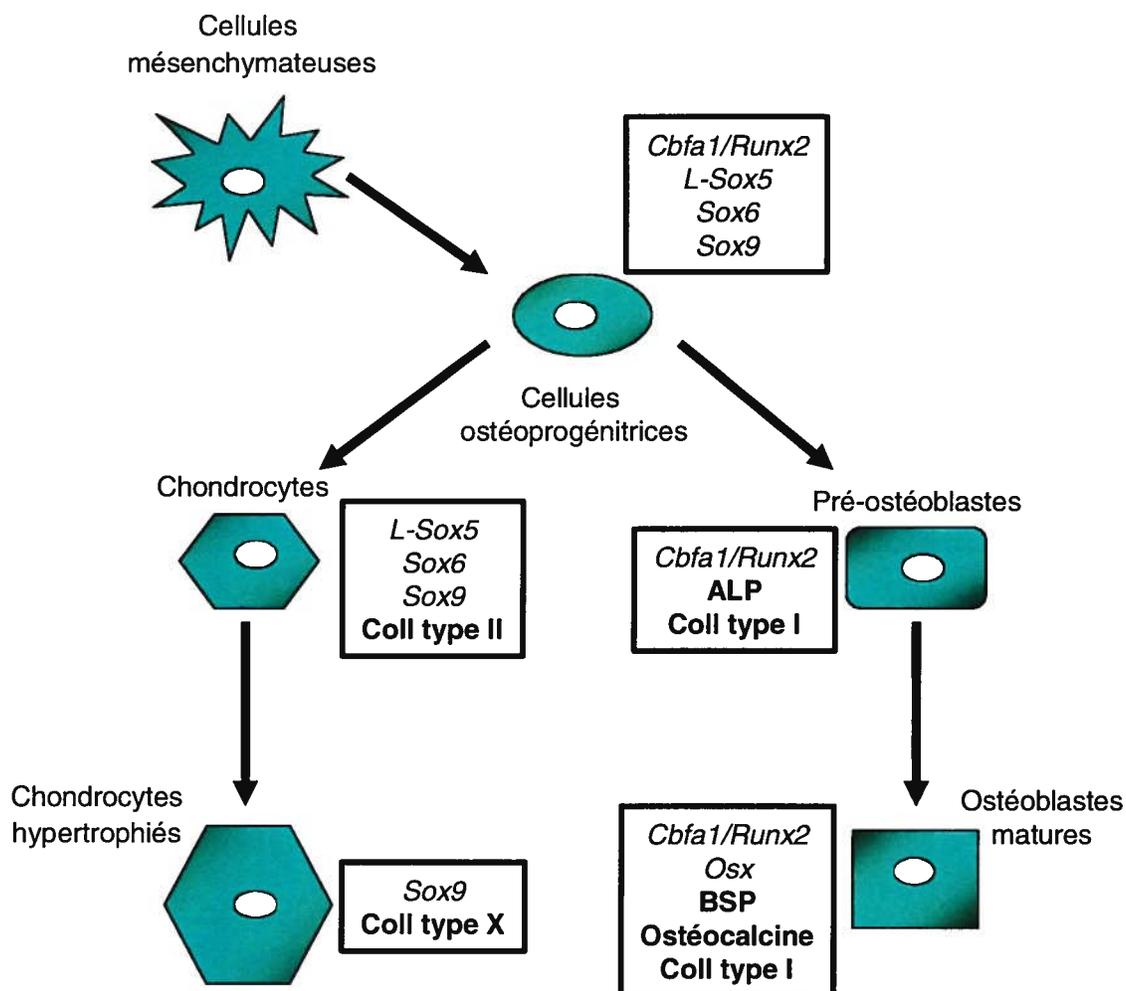


Figure 1.1 : Lignage des cellules ostéoprogénitrices.

Les gènes en italique sont les facteurs de transcription et ceux en caractères gras sont les marqueurs de différenciation principalement synthétisés par les différents types cellulaires.

1.1.1.2 Ostéoblastes

Issus de la lignée des précurseurs ostéoblastiques, qui proviennent également des cellules souches mésenchymateuses, les ostéoblastes sont les seules cellules responsables de la minéralisation de la matrice osseuse par la synthèse de molécules telles que le collagène de type I, la sialoprotéine osseuse et l'ostéocalcine (figure 1.1). Les travaux de l'équipe de Karsenty ont largement contribué à améliorer notre compréhension des facteurs contrôlant l'ossification par la découverte du facteur de transcription Cbfa1, aussi connu sous le nom de Runx2. Il a en effet été observé que l'inactivation génique de Cbfa1/Runx2 provoque une absence totale de minéralisation des éléments squelettiques causée par un défaut de différenciation ostéoblastique chez les souris knock-out pour Cbfa1/Runx2 (Ducy & coll., 1997). Récemment, un autre facteur de transcription, nommé Ostérix (Osx), a été identifié comme étant également essentiel au processus de différenciation ostéoblastique puisque son inactivation conduit à une perte de différenciation des ostéoblastes, ce qui mène à une absence de minéralisation osseuse. En effet, les cellules précurseurs des ostéoblastes de la souris *Osx*^{-/-} présentent une réduction importante de l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique précoce tels le collagène de type I et une absence des marqueurs de différenciation terminale tel que l'ostéocalcine. Les niveaux d'expression de Cbfa1/Runx2 sont toutefois normaux dans les cellules du mutant *Osx*^{-/-}, et comme Ostérix n'est pas exprimé dans le mutant *Cbfa1/Runx2*^{-/-}, il a été conclu que ces deux facteurs de transcription oeuvraient de concert dans la différenciation ostéoblastique et que Cbfa1/Runx2 se trouvait en amont d'Ostérix (Kazuhisa & coll., 2002).

1.1.1.3 Ostéoclastes

Contrairement aux ostéoblastes et aux chondrocytes, les ostéoclastes sont des cellules multinucléées d'origine hématopoïétique non pas responsables de la synthèse mais bien de la résorption osseuse. Les ostéoclastes sont des cellules géantes de 10 à 100 µm issues de la fusion de plusieurs précurseurs ostéoclastiques et possédant de 4 à 20 noyaux. L'ostéoclastogenèse des promonocytes est initiée par l'activation du récepteur RANK (*receptor activating NK-κB*), un récepteur de la famille des TNF (*tumor necrosis factor*). Ainsi, il a été démontré par Franzoso et coll. (Franzoso & coll., 1997) que la transmission du signal induisant la différenciation des ostéoclastes est

dépendante du facteur de transcription NF- κ B et de la protéine TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*) puisque leur inactivation abouti à un phénotype d'ostéopétrose avec absence d'ostéoclastogenèse. On ne connaît pas encore de marqueurs moléculaires spécifiques aux ostéoclastes ; ces cellules ne sont donc identifiables que sur une base morphologique, phénotypique et fonctionnelle tel que le test TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*). La capacité des ostéoclastes à dégrader de l'os ou de la dentine *in vitro* reste le critère le plus convaincant puisque seules ces cellules, ainsi que les odontoclastes de la dent, remplissent une telle fonction.

1.1.2 Régulation du tissu osseux

1.1.2.1 Mécanismes d'ossification

1.1.2.1.1 Ossification endochondrale

L'ossification endochondrale est le type d'ossification prépondérant chez les vertébrés supérieurs; il est impliqué dans la formation du squelette appendiculaire (os longs des membres) et axial. Ce processus se réalise en plusieurs étapes de prolifération et de différenciation subséquentes. Suite à la condensation de cellules mésenchymateuses indifférenciées au site de chaque élément squelettique, les cellules subissent une première étape de prolifération. Il s'ensuit une étape de différenciation où les cellules centrales de la masse cellulaire se différencient en chondrocytes synthétisant une matrice cartilagineuse de collagène de type II et où les cellules périphériques s'aplatissent pour former une multi-couche qui sera à l'origine du « bone collar ». Les chondrocytes prolifèrent par la suite longitudinalement à l'os formant ainsi des colonnes de cellules et il s'ensuit une vague de différenciation, du centre de l'os vers les extrémités (épiphyse). Les chondrocytes proximaux deviennent hypertrophiés produisant ainsi de moins en moins de collagène de type II au profit du collagène de type X (figure 1.2).

Les chondrocytes pré-hypertrophiés synthétisent *Indian hedgehog* (ihh), un facteur ayant comme rôle l'induction de la différenciation des cellules mésenchymateuses du « bone collar » en ostéoblastes ainsi que l'induction, chez les cellules du périchondre, de la sécrétion de PTHrP (*parathyroid hormone related peptide*), un second facteur agissant directement sur les chondrocytes afin d'accélérer

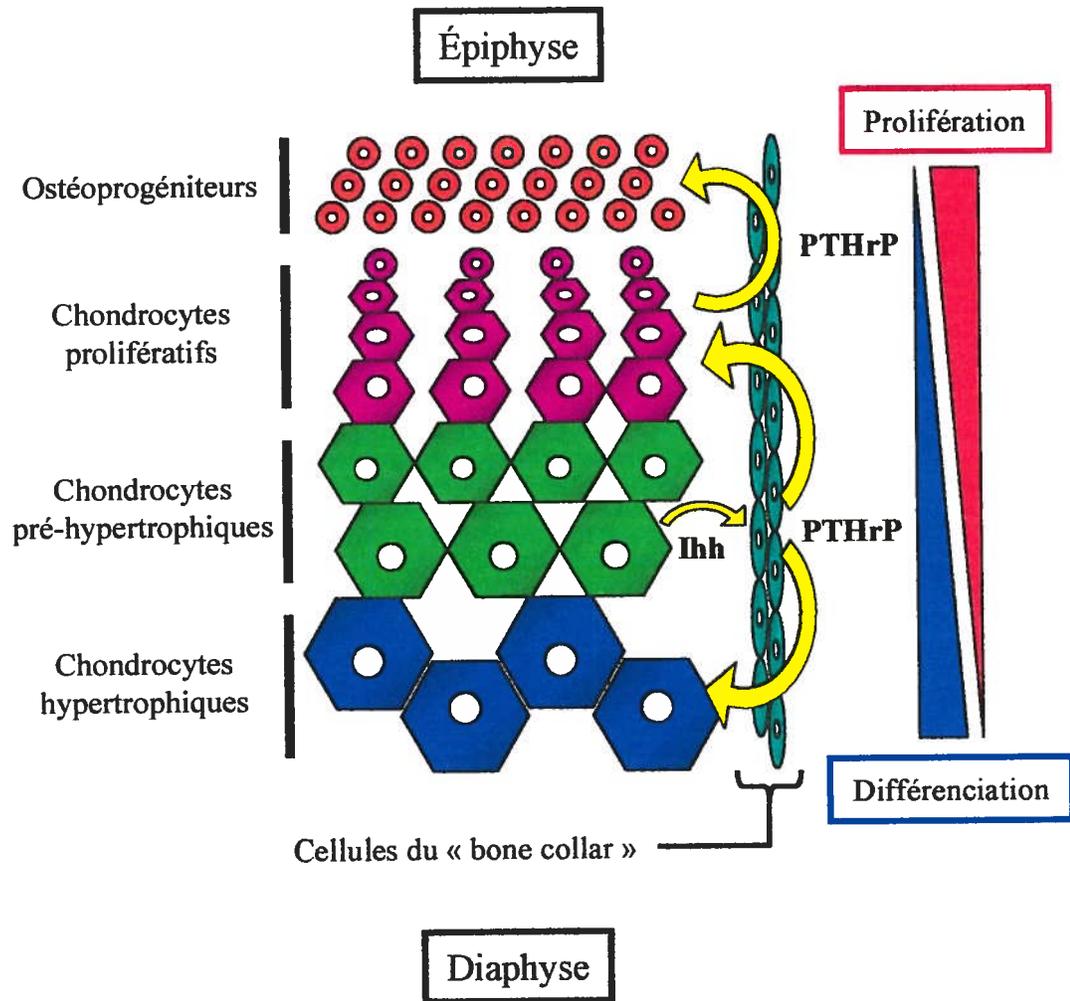


Figure 1.2 : Maturation des chondrocytes dans la plaque de croissance d'un os long lors du processus d'ossification endochondrale.

leur prolifération et de ralentir leur différenciation terminale (Weir & coll., 1996). Le récepteur de PTHrP, PPR (*PTH/PTHrP receptor*) est davantage exprimé par les chondrocytes pré-hypertrophiques que par les chondrocytes prolifératifs. L'expression constitutive de PPR induit un retard dans la différenciation des chondrocytes prolifératifs en chondrocytes hypertrophiques alors que l'absence de ce récepteur accélère ce processus (Lanske & coll., 1996). Dans les deux cas, un phénotype d'os courts est observé et cette condition est retrouvée en clinique chez des patients souffrant de différentes maladies connues sous le terme de chondrodysplasies. Ceci illustre bien l'importance de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des chondrocytes dans le processus d'ossification endochondrale. L'étape finale de ce type d'ossification est initiée par la sécrétion de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) par les chondrocytes hypertrophiques. Le VEGF est un puissant facteur angiogénique comportant plusieurs isoformes ayant des propriétés spécifiques et essentielles au processus de vascularisation du tissu osseux (Gerber & coll., 1999). L'afflux de sang dans le tissu osseux permet le recrutement d'ostéoclastes au centre de l'os afin de résorber les chondrocytes hypertrophiés calcifiés et ainsi laisser l'espace nécessaire à la colonisation par les ostéoblastes.

1.1.2.1.2 Ossification intramembranaire

L'ossification intramembranaire a lieu dans les os plats comme la plupart des os du crâne et dans la partie latérale des clavicules. Les condensations de cellules mésenchymateuses vont, dans ce type d'ossification, se différencier directement en ostéoblastes pour ainsi commencer immédiatement la synthèse osseuse sans la formation préalable d'une matrice cartilagineuse. Les mécanismes régulant ce type d'ossification sont moins bien connus et impliqueraient d'autres facteurs de transcription comme *msx1* et *msx2* (Satokata & coll., 2000).

1.1.2.2 Remodelage osseux

Les différentes fonctions du squelette, particulièrement celle de réserve de minéraux tels le calcium et le phosphate, exigent du tissu osseux qu'il soit dynamique et ce sont les ostéoblastes ainsi que les ostéoclastes qui sont responsables du remodelage osseux. À ce jour, le modèle le plus accepté présente les ostéoblastes comme les

principaux responsables du recrutement et de l'activation des ostéoclastes par la sécrétion de différentes molécules ayant une activité paracrine (Simonet & coll., 1997; Lacey & coll., 1998 et Teitelbaum, 2000). Suite à un stimulus chimiotactique, les promonocytes migrent à l'extérieur des vaisseaux sanguins jusqu'à la surface à résorber. Par la suite, les précurseurs ostéoclastiques se fusionnent entre eux et adhèrent à la surface osseuse où ils se polariseront pour former trois domaines spécialisés. La zone d'attachement (1) en périphérie de la cellule établit un contact hermétique entre l'ostéoclaste et la matrice osseuse formant ainsi un micro-environnement permettant à la bordure plissée (2) de concentrer la sécrétion des produits dégradant la matrice osseuse et d'acidifier ce milieu. La zone basolatérale (3) contient la majorité des récepteurs, transporteurs et canaux ioniques nécessaires à la régulation de la fonction de l'ostéoclaste.

1.1.2.2.1 Activation des précurseurs ostéoclastiques

L'activation des précurseurs ostéoclastiques est sous le contrôle de trois facteurs clés synthétisés par les ostéoblastes et les cellules stromales soit M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*), RANKL, le ligand du récepteur RANK (*receptor activating NF- κ B*), et l'ostéoprotégérine (OPG), l'antagoniste du récepteur RANK. Il a été démontré que l'addition de M-CSF et de RANKL est suffisante à l'induction de la différenciation complète des promonocytes en ostéoclastes *in vitro*. L'ostéoprotégérine est une protéine soluble dont la structure est similaire à celle du récepteur RANK et peut donc lier le ligand RANKL. L'ostéoprotégérine joue le rôle de récepteur-leurre en entrant en compétition avec le RANK pour la liaison à RANKL et bloquant ainsi l'effet inducteur de RANKL sur l'ostéoclastogenèse (Simonet & coll., 1997 et Lacey & coll., 1998). RANKL existe sous forme transmembranaire et soluble, cette dernière résultant de la protéolyse de la forme transmembranaire par une métalloprotéase. Ainsi, l'interaction entre la forme membranaire de RANKL et les ostéoclastes nécessite un contact cellulaire entre ces dernières et les ostéoblastes. Ce contact joue un double rôle en permettant, dans un premier temps, de limiter l'activité des ostéoclastes au site à résorber et, dans un deuxième temps, en engendrant une concentration des facteurs solubles sécrétés par les ostéoblastes.

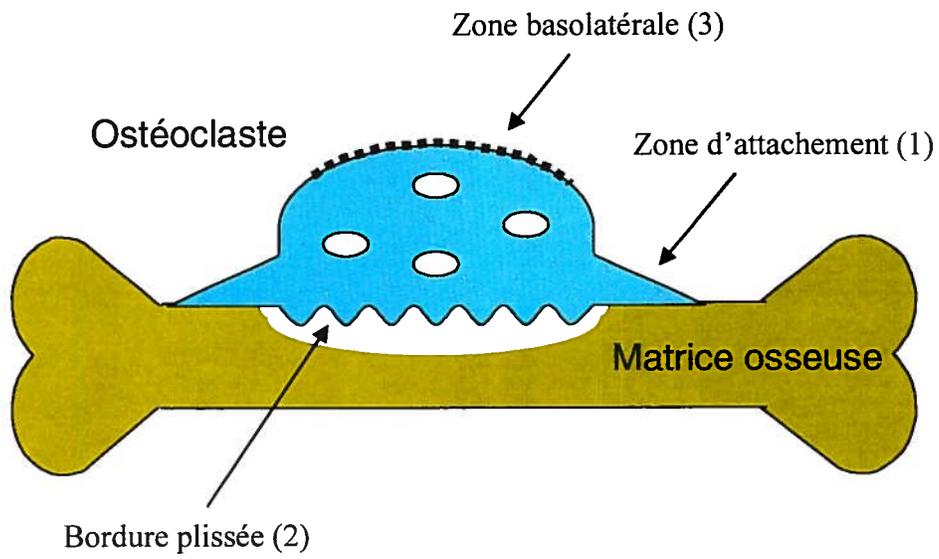


Figure 1.3 : Principales régions de l'ostéoclaste en résorption.

Il est intéressant de noter que les nombreux facteurs agissant sur l'ostéoclastogénèse tels que PTH et PTHrP, la vitamine D₃, TNF α , les glucocorticoïdes et certaines interleukines, dont l'IL-1, n'agissent qu'indirectement sur les précurseurs des ostéoclastes. En effet, la régulation de l'activation des ostéoclastes est majoritairement attribuée aux ostéoblastes par leur production de signaux solubles et/ou transmembranaires. Toutefois, nos travaux sur la mélatonine nous permettent de croire que cette hormone pourrait réguler le tissu osseux en agissant directement sur les deux types cellulaires en présence soit en stimulant la formation de matrice osseuse (ostéoblastes) et en bloquant la résorption osseuse (ostéoclastes).

1.1.3 Stimulation hormonale

De nombreuses hormones influencent la régulation du métabolisme osseux. Toutefois, une description exhaustive de ces différents facteurs alourdirait et sortirait du cadre de ce mémoire. Deux hormones, les estrogènes et la mélatonine, valent néanmoins la peine qu'on s'y attarde dû à leurs interactions mutuelles et leurs actions sur le métabolisme osseux.

1.1.3.1 Estrogènes

Il est depuis longtemps connu que les estrogènes ont un effet sur le métabolisme osseux. En effet, la diminution de la synthèse d'estrogène observée chez les femmes au moment de la ménopause conduit à un phénotype ostéoporotique. Dans un même ordre d'idée, il a été observé chez des patients mâles qu'une mutation de ER α , un récepteur nucléaire aux estrogènes, conduisait à un même phénotype d'ostéoporose (Smith & coll., 1994) soulignant ainsi l'implication des estrogènes dans la physiologie osseuse. D'autre part, il a été observé que les récepteurs nucléaires des estrogènes (ER α et ER β) sont présents chez les ostéoblastes (Ericksen & coll., 1988) et les ostéoclastes (Oursler & coll., 1991), indiquant ainsi une action directe de l'hormone sur les cellules osseuses. Parmi les effets observés, on note une augmentation des niveaux d'apoptose chez les ostéoclastes (Hughes & coll., 1996 et Weinstein & coll., 2000), une diminution de l'apoptose des ostéocytes, des ostéoblastes enfouis dans la matrice osseuse (Tomkinson & coll., 1997-1998 et Noble & coll., 1997), ainsi qu'une augmentation de la prolifération et de la synthèse de matrice osseuse par les ostéoblastes (Cheng & coll.,

1994). De nombreuses évidences indiquent toutefois que la fonction principale des estrogènes sur le métabolisme osseux est la suppression de l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes et que cette régulation est effectuée par la synthèse de facteurs paracrines par les ostéoblastes. En effet, les estrogènes font diminuer la synthèse des cytokines pro-résorption (IL-1 β , TNF α , IL-6, M-CSF, prostaglandine E2) et augmenter celles qui sont anti-résorption (récepteur antagoniste de l'IL-1, TGF β , OPG) (Manolagas & coll., 1995; Pacifici, 1996 et Jilka, 1998).

En plus des récepteurs nucléaires sus-mentionnés, la démonstration de l'existence d'un récepteur membranaire aux estrogènes a tout récemment été réalisée. En effet, l'évidence d'une signalisation rapide des estrogènes a permis à Qiu et coll. de mettre en évidence, dans des cellules neuronales, la présence d'un récepteur membranaire couplé à la protéine G α_q et dont l'activation entraîne une cascade moléculaire impliquant l'induction de la phospholipase C (PLC), une régulation positive de la protéine kinase C delta (PKC δ) ainsi que l'activation de l'adénylate cyclase VII (Qiu & coll., 2003). Il a également été démontré que les estrogènes pouvaient influencer les niveaux d'expression des différentes protéines G, elles-mêmes impliquées dans le contrôle de la transmission de plusieurs signaux hormonaux jouant également un rôle sur le métabolisme osseux (Papaioannou & coll., 1999).

Un autre fait intéressant à propos des estrogènes est leur signalisation croisée avec la mélatonine (sections 1.3.2 et 2). Plusieurs évidences semblent indiquer une interaction antagoniste mutuelle entre ces deux molécules. En effet, il a été démontré chez la rate que les estrogènes interfèrent avec la synthèse de la mélatonine en inhibant une des enzymes essentielles à sa formation soit la N-acétyltransférase (Okatani & coll., 1998). De plus, il a été observé que les estrogènes influencent négativement la régulation de MT1 dans les cellules ovariennes de la rate (Clemens & coll., 2001). Par ailleurs, il a été observé dans les cellules MCF7, une lignée cellulaire du cancer du sein, que la mélatonine régulait négativement la transcription des récepteurs nucléaires aux estrogènes (Mollis & coll., 1994) et qu'elle inhibait également la liaison de ER pour son

site de d'attachement à l'ADN et ce, même en présence de son ligand, les estrogènes (Rato & coll., 1999). Ces résultats mettent en évidence l'antagonisme mutuel existant entre les estrogènes et la mélatonine.

1.1.3.2 Mélatonine et métabolisme osseux

Très peu d'études se sont attardées au rôle joué par la mélatonine dans la physiologie osseuse. Toutefois, quelques études récentes ont démontré que des doses supra-pharmacologiques de mélatonine (50-100 μ M) induisait, chez les ostéoblastes *in vitro*, l'augmentation de la synthèse de collagène de type I et leur prolifération (Nakade & coll., 1999). Il a d'autre part été démontré que des doses moins importantes de mélatonine, seulement 5 fois la dose physiologique (10 nM), induisaient *in vitro*, chez les cellules MC3T3-E1, une lignée cellulaire ostéoblastique provenant de la calotte crânienne de souris, une augmentation du taux de minéralisation ainsi qu'un accroissement de l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique tels que la phosphatase alcaline, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse et, dans une moindre mesure, l'ostéocalcine. Il a également été démontré, dans ce même essai, que l'addition de toxine pertussique ou de luzindole, des inhibiteurs des récepteurs membranaires de mélatonine (section 2.2.1.1), inhibait la réponse ostéoblastique à la mélatonine (Roth & coll., 1999). On doit néanmoins noter que ces marqueurs possèdent tous un site de reconnaissance pour les RZR/ROR, une catégorie de récepteurs nucléaires liant la mélatonine (section 2.2.1.3). Des résultats contraires ont cependant été obtenus par Suzuki et coll. en utilisant des écailles de poisson rouge comme modèle de co-culture d'ostéoblastes et d'ostéoclastes. Ils ont en effet démontré que, dans ce système *in vitro*, des doses pharmacologiques de mélatonine (100 nM) inhibaient l'activité ostéoblastique et ostéoclastique concluant ainsi que la mélatonine régulaient directement l'activité des ostéoclastes sans l'intermédiaire des ostéoblastes (Suzuki & coll., 2002). Il a parallèlement été suggéré que l'activité anti-oxydante de la mélatonine pouvait contribuer à bloquer la résorption osseuse en s'attaquant directement aux enzymes lytiques sécrétées par les ostéoclastes pour cataboliser la matrice osseuse. (Reiter & coll., 2001). Il a toutefois été démontré de façon plus élégante par Koyama et coll. que l'augmentation de la masse osseuse observée *in vivo*, lors de l'administration de doses

pharmacologiques de mélatonine, était également causée par une suppression de l'activité de résorption des ostéoclastes mais, dans ce cas-ci, causée par une augmentation de l'expression d'ostéoprotégérine et une diminution de celle de RANKL par les ostéoblastes (Koyama & coll., 2002).

La contribution physiologique de la mélatonine sur l'acquisition de la masse osseuse a également été démontrée par l'étude de différentes lignées de souris. En effet, deux modèles animaux appuient fortement l'hypothèse d'un rôle physiologique de la mélatonine dans le métabolisme osseux. Les souris C3H, sur-productrices de mélatonine, et les souris C57BL/6, déficientes en synthèse de mélatonine, possèdent respectivement la densité osseuse la plus élevée et la plus faible parmi un large éventail de lignées de souris analysées (von Gall & coll., 2000).

Bien qu'il ait été démontré que l'augmentation de la masse osseuse, observée chez les animaux traités à la mélatonine, pouvait être causée par la régulation des ostéoclastes par les ostéoblastes sous l'influence de la mélatonine et/ou par la capacité de cette hormone à interférer directement avec les enzymes ostéolytiques, la démonstration d'une signalisation intrinsèque de la mélatonine chez les ostéoclastes reste à être réalisée.

1.2 Mélatonine

1.2.1 Généralités

La mélatonine (*N*-acétyl-5-méthoxytryptamine) est un dérivé de l'acide aminé tryptophane et sa structure fut caractérisée par Lerner et coll. en 1958. Initialement isolée à partir de la glande pinéale de bovin, la mélatonine fut longtemps considérée comme étant spécifique aux vertébrés et à leur glande pinéale mais il s'avère que cette hormone est présente dans tout les règnes du vivant : des Bactéries jusqu'aux Animaux en passant par les Protistes, les Mycètes et les Végétaux. De plus, des sites de synthèse extra-pinéale, de moindre importance en terme de production, tels que la rétine, les lentilles, le tube digestif, la peau et la moelle osseuse furent également découverts chez les vertébrés (Stefulj & coll., 2001).

De nombreuses fonctions sont attribuées à la mélatonine. La plus ancienne de ces fonctions est très probablement celle d'anti-oxydant qui est attribuable à la molécule intrinsèque sans aucune nécessité de signalisation hormonale et qui explique la présence de cette hormone chez certains organismes unicellulaires (Pöggeler & coll., 1991). La mélatonine devint par la suite multi-fonctionnelle, occupant des rôles aussi diversifiés que la régulation du rythme circadien (Schuster & coll., 2000), de la pression sanguine (Doolen & coll., 1998), de l'implication dans l'oncogenèse comme agent immunomodulateur (Ram & coll., 2002), de la physiologie rétinienne (Dubocovich & coll., 1997) et ovarienne (Clemens & coll., 2001), de la reproduction saisonnière (Schuster & coll., 2000) et, plus récemment, sur le métabolisme osseux (Nakade & coll., 1999; Roth & coll., 1999; Koyama & coll., 2002 et Suzuki & coll., 2002).

Les niveaux de mélatonine fluctuent selon un cycle quotidien et annuel. Ainsi, il a été observé que cette hormone est présente en plus grande concentration durant les heures d'obscurité et que ces périodes sont plus longues durant les mois d'hiver (Reiter, 1991). Parallèlement, il a été démontré que, lors des périodes de haute concentration de mélatonine, l'affinité des cellules pour la mélatonine était réduite due à une diminution du nombre de récepteurs présents à la membrane plasmique. Cette dernière observation démontre la présence d'un système de régulation des voies de signalisation de la mélatonine.

1.2.2 Signalisation

En plus des nombreux rôles mentionnés précédemment, la mélatonine peut également activer ou bien inhiber une même voie de signalisation selon le type cellulaire en présence. Il est plausible de croire que la dualité de cette réponse à la mélatonine provienne, du moins en partie, de la diversité même des éléments intervenant dans la signalisation (récepteurs, effecteurs, etc).

1.2.2.1 Récepteurs

La diversité d'action de la mélatonine fait intervenir de nombreux récepteurs et comme il s'agit d'une hormone lipophile, elle a la capacité de traverser librement et sans assistance les membranes plasmiques et nucléaires, lui permettant ainsi de lier des

récepteurs de nature membranaire (MT1, MT2), cytosolique (MT3) et nucléaire (ROR/RZR).

1.2.2.1.1 Récepteurs membranaires

Les récepteurs MT1 et MT2 font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (section 2.2.2) et possédant sept domaines transmembranaires. Il a été démontré que le récepteur MT1 était exprimé dans une grande variété de tissus alors que l'expression de MT2 semble légèrement plus restreinte (Witt-Enderby & coll., 2003). Bien que davantage d'études aient été concentrées sur la caractérisation du récepteur MT1, l'utilisation récente d'antagonistes plus spécifiques pour le récepteur MT2, tel que le luzindole, a grandement accéléré l'acquisition des connaissances à son sujet. Les récepteurs MT1 et MT2 sont entre autre exprimés dans l'hypothalamus et les vaisseaux sanguins et y sont respectivement responsables de la régulation du cycle circadien (Dubocovich & coll., 1998) et de la constriction des vaisseaux (Doolen & coll., 1998). L'activation des récepteurs MT1 et/ou MT2 engendre des mécanismes moléculaires tels que l'inhibition des adénylates cyclases (Niles & coll., 1990), la stimulation de la protéine kinase C (Witt-Enderby & coll., 2001), de la phospholipase C et de l'hydrolyse du phosphatidyl-inositol (Ho & coll., 2001), ainsi que la modulation des canaux potassiques (Geary & coll., 1997), de la formation de l'acide arachidonique (Godson & coll., 1997) et des MAP kinases (Hazlerigg & coll., 1996).

La dimérisation des récepteurs couplés aux protéines G est un phénomène qui semble être courant pour ce type de récepteur (Bouvier, 2001). Ayoub et coll. ont démontré que les récepteurs MT1 et MT2 arborent également ce phénotype. En effet, il semble que ces récepteurs, lorsque co-exprimés *in vitro*, se retrouvent de façon prédominante sous forme de dimère (homo et hétéro) même en absence de ligand. Certaines évidences laissent croire que l'activation de ces récepteurs par leur ligand n'est pas provoquée par la faculté de ce dernier de réguler l'oligomérisation des récepteurs mais bien à sa capacité d'induire un changement conformationnel des récepteurs (Bouvier, 2001).

La signalisation de la mélatonine fait l'objet d'une étroite régulation. De ce fait, certaines évidences ont démontré que l'expression des récepteurs à mélatonine peut être régulée de façon homologue (par l'activité même de la mélatonine) ou hétérologue (indépendamment de la mélatonine). Cette dernière méthode de régulation implique des phénomènes tels que le cycle jour/nuit, qui fut observé par la fluctuation de la densité des récepteurs à MT1 et MT2 chez le rat pinéalectomisé (section 3.1.1) (Masson-Pevet & coll., 2000), ainsi que par l'influence d'autres hormones telles les estrogènes dont il a été fait mention précédemment (Clemens & coll., 2001). Dans un même ordre d'idée, il a été démontré qu'une exposition de plus de cinq heures à des doses pharmacologiques de mélatonine entraînait une désensibilisation des cellules pour l'hormone en question, suggérant ainsi une régulation homologue. Le découplage des protéines G (Witt-Enderby & coll., 2001), la phosphorylation (Krupnick & coll., 1998), la sous-expression (Schuster & coll., 2001) et l'internalisation (Santini & coll., 2002) des récepteurs sont les différentes stratégies décrivant ce type de régulation.

1.2.2.1.2 Récepteur cytosolique

Structurellement et fonctionnellement très différent des récepteurs MT1 et MT2, le récepteur MT3 est un récepteur dit pharmacologique puisqu'il peut lier la mélatonine et ses dérivés. Initialement découvert chez le hamster, le récepteur MT3 est intra-cellulaire et possède 95% d'homologie avec la quinone réductase 2 humaine dont le rôle est la détoxification cellulaire (Nosjean & coll., 2000). Son rôle en tant que récepteur est encore nébuleux quoique certaines évidences lui attribuent un rôle dans la régulation de la pression intraoculaire chez le lapin (Pintor & coll., 2001) ainsi que dans la réponse inflammatoire microvasculaire (Lotufo & coll., 2001). Il n'existe encore aucune indication permettant de croire que le récepteur MT3 jouerait un quelconque rôle dans le métabolisme osseux.

1.2.2.1.3 Récepteurs nucléaires

La sous-famille RZR/ROR des récepteurs nucléaires orphelins est composée de trois gènes : $ROR\alpha$, comprenant quatre variantes provoquées par un épissage alternatif ($ROR\alpha1$, $ROR\alpha2$, $ROR\alpha3$ et $RZR\alpha$), $RZR\beta$ et $ROR\gamma$ (Giguère &

coll., 1994). Ces récepteurs possèdent une activité transcriptionnelle constitutive (positive ou négative selon le promoteur et le type cellulaire) et cette activité peut être intensifiée par le ligand. Cette activité constitutive des récepteurs nucléaires a permis à certains groupes de recherche d'étudier ces récepteurs sans même se soucier du ligand et c'est dans cette optique que Meyer et coll. ont démontré l'implication de ROR α dans l'expression de la sialoprotéine osseuse murine et de l'ostéocalcine humaine. De plus, ils ont également observé que la souris mutante *staggerer* (sg), laquelle comporte une délétion à l'intérieur du gène codant pour ROR α , présente un phénotype ostéopénique, suggérant ainsi un rôle de ce récepteur dans la biologie osseuse. Ainsi, il a d'une part été démontré que la mélatonine pouvait lier les membres de la sous-famille de récepteurs ROR/RZR (Wiesenberg & coll., 1995 et Rafii-El-Idrissi & coll., 1998) et, d'autre, part que ces récepteurs sont impliqués dans le métabolisme osseux par la présence de sites de reconnaissance de ces facteurs de transcription dans de nombreux promoteurs de gènes spécifiques aux ostéoblastes. Toutefois, la démonstration *in vivo* à l'effet que c'est bien la mélatonine qui est le ligand responsable de l'activation des ROR/RZR, lors de leur implication dans la physiologie osseuse, reste à être effectuée.

1.2.2.2 Protéines G

Les protéines G forment une famille de protéines GTPases trimériques constituées de trois sous-unités (α , β , γ) dont la classification fonctionnelle est définie par la sous-unité alpha ($G\alpha$). De nombreux types de récepteurs sont couplés aux protéines G : les récepteurs adrénergiques, de l'angiotensine, à sérotonine et à mélatonine pour ne nommer que ceux-ci, et leur fonctionnement est sensiblement identique pour chaque récepteur. La liaison du ligand au récepteur provoque le relargage du GDP de la sous-unité $G\alpha$ et cette réaction est catalysée par une enzyme GEF (*guanine nucleotide-exchange factor*). Puisque la concentration intracellulaire de GTP est supérieure à celle du GDP, le remplacement de cette dernière au niveau de la $G\alpha$ se produit spontanément et provoque la dissociation de la sous-unité $G\alpha$ des sous-unités $G\beta\gamma$. Bien que le dimère $G\beta\gamma$ puisse avoir un rôle de régulateur, cette fonction est davantage attribuée au complexe $G\alpha$ -GTP. La durée de vie de l'effecteur $G\alpha$ dépend de sa fonction GTPasique intrinsèque et celle-ci est accélérée par les *GTPase-*

activating protein (GAP). L'hydrolyse du GTP en GDP retourne $G\alpha$ à sa forme inactive et provoque sa réassociation avec $G\beta\gamma$ (Morris & Malbon, 1999). Les protéines G sont impliquées dans la régulation de plusieurs effecteurs tels que les adénylates cyclases, la phosphodiesterase $GMPC$, les phospholipases C et A_2 , les canaux ioniques (K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Cl^-) et la phosphoinoside 3-kinase. Il a été démontré que les récepteurs à mélatonine MT1 et MT2 pouvaient être couplés aux protéines $G\alpha_2$, $G\alpha_3$ et $G\alpha_q$ (Brydon & coll., 1999), $G\alpha_s$, $G\alpha_z$ et $G\alpha_{16}$ (Ho & coll., 2001 et Chan & coll., 2002). Dans un même ordre d'idée, l'expression des protéines $G\alpha_s$, $G\alpha$ et $G\alpha_q$ a été observée dans les ostéoblastes (Quarles & Siddhanti, 1996).

1.3 Scoliose idiopathique adolescente (SIA)

1.3.1 Généralités

La scoliose idiopathique adolescente est une déformation de la colonne vertébrale, dans les trois dimensions, caractérisée par des courbures latérales et des rotations des corps vertébraux (Lonstein, 1994) dont les causes sont encore inconnues. Ajoutons à cette définition une dimension temporelle où cette déformation tend à progresser dans le temps. En effet, il semble que la progression de la déformation scoliothique coïncide avec la phase de croissance rapide observée durant la puberté. Un fait intéressant à noter est que la déformation scoliothique semble avoir un patron de courbure qui est statistiquement non-attribuable au hasard. En effet, plus de 90% des courbures thoraciques sont dirigées vers la droite alors que plus de 70% des courbures lombaires sont dirigées vers la gauche. Dans le cas des scolioses doubles, elles sont à plus de 90% thoraciques droites et lombaires gauches (Rinsky & Gamble, 1988).

Les scolioses ne sont pas des maladies particulièrement rares puisqu'environ 4% de la population est diagnostiquée avec une scoliose ayant une courbure de plus de 10° d'angle de Cobb, une mesure largement utilisée en orthopédie pour décrire l'amplitude de la rotation des corps vertébraux et qui est, par le fait même, un indice de la sévérité de la scoliose (Cobb JR, 1948). Bien que des scolioses de l'ordre de 10° ne causent souvent qu'un problème cosmétique mineur, des courbures plus sévères et non-traitées, de l'ordre de 30° et plus, peuvent entraîner des symptômes plus graves allant de

difficultés de mobilité jusqu'à compromettre la fonction pulmonaire. Les traitements pour les scolioses idiopathiques vont du simple suivi (aucun traitement) jusqu'à la chirurgie correctrice (plus de 50°) en passant par le port de corsets (25°-35°). Les chirurgies correctrices sont très invasives et peuvent comporter l'insertion de vis pédiculaires, de tiges de titane ainsi que la fusion de corps vertébraux sur plusieurs niveaux. Aux États-Unis, il se pratique en moyenne 120 000 chirurgies par année (2002) et le coût relié à ce type d'intervention varie de 50 000 \$US à 125 000 \$US. Ainsi, malgré un marché annuel d'environ 10 milliards de dollars US, on ne connaît toujours pas les causes de la scoliose idiopathique.

Les études de génétique effectuées sur l'étiologie de la SIA ont mis en relief une augmentation de l'incidence de l'ordre de 2 à 11 fois en fonction des antécédents familiaux, sans toutefois être capables d'en identifier le mode de transmission (Riseborough & Wynne-Davis, 1973). De plus, malgré que la SIA afflige davantage les filles que les garçons, dans un ratio de quatre pour un (Shohat & coll., 1988), les études en vue de déterminer si cette maladie est liée au chromosome X sont contradictoires et semblent indiquer que la majorité des cas ne soient pas reliés au chromosome X (Miller & coll., 1996 et Justice & coll., 2003). D'ailleurs, plusieurs loci de susceptibilité pour la SIA furent récemment découverts sur des chromosomes autosomes (Axenovich & coll., 1999; Wise & coll., 2000 et Chan & coll., 2002).

La SIA est diagnostiquée par l'exclusion des autres causes possibles de scolioses; c'est-à-dire qu'une scoliose ne pouvant être attribuable à des causes déjà connues, telles qu'une neurofibromatose, dystrophie musculaire de Duchenne, etc, est alors considérée comme une scoliose idiopathique. Ainsi, l'ensemble des scolioses idiopathiques, c'est-à-dire plus de 80% de la totalité des scolioses, est fort probablement un ensemble hétérogène d'étiologies menant à une déformation scoliotique commune (Bagnall, communication personnelle 2002). Il s'agit là de la première difficulté lors de l'étude de l'étiologie de la scoliose idiopathique adolescente. De plus, la déformation du rachis fait intervenir de nombreux éléments tissulaires différents (os, muscles, ligaments, système nerveux, disques intervertébraux) et il devient donc ardu de déterminer lesquels de ces événements causent la déformation et lesquels en sont

simplement les conséquences. Une autre difficulté est le manque de modèles animaux adéquats pour la SIA puisque la posture bipède de l'être humain semble mettre à l'avant-plan la contribution du paramètre bio-mécanique comme facteur aggravant.

1.3.2 Hypothèses étiologiques

1.3.2.1 Tissus connectifs

Les recherches sur l'étiologie de la SIA ont mis de l'avant plusieurs hypothèses. Il a été suggéré que des défauts structurels au niveau des tissus connectifs (ligaments, disques intervertébraux) pourraient être en cause dans la déformation observée chez les patients atteints de SIA comme c'est le cas pour d'autres types de scoliose (syndrome de Marfan, syndrome de Ehlers-Danlos, ostéogenèse imparfaite). Toutefois, malgré l'observation d'anomalies au niveau de la distribution du collagène (Beard & coll., 1981), des glucoaminoglycans (Zaleske & coll., 1980) et du ratio sulfate de kératine/sulfate de chondroïtine (Ghosh & coll., 1980), ces études ont failli dans leur démonstration à l'effet que ces défauts du tissu connectif étaient la cause et non une conséquence de la déformation chez les patients atteints de SIA.

1.3.2.2 Tissu musculaire

Un autre type de scoliose non-idiopathique, la dystrophie musculaire de Duchenne, a donné naissance à une hypothèse suggérant qu'une musculature para-spinale défaillante pourrait être l'agent étiologique de la SIA. Toutefois, les études effectuées en ce sens ont conclu que l'asymétrie de la musculature para-spinale observée était causée par un stress constant des muscles provoqué par la déformation scoliootique et non l'inverse (Zetterberg & coll., 1983 et Slager & coll., 1987).

1.3.2.3 Proprioception

D'autres études ont mis en cause une défaillance des éléments de proprioception du système nerveux chez les patients SIA. Bien qu'un nombre significatif d'anomalies aient été observées par des tests d'équilibre mettant à l'épreuve la fonction vestibulaire (Sahlstrand et coll., 1978) ou par résonance magnétique du cerveau de ces patients (Geissele & coll., 1991), la démonstration du lien de causalité

entre ces anomalies et la déformation scoliothique du rachis des patients demeure encore incertaine.

1.3.2.4 Plaquettes

Des études ont démontré que les patients SIA exhibaient en moyenne un temps de saignement plus long. En effet, un défaut au niveau de la structure du collagène, qui joue un rôle important dans la contraction des tissus conjonctifs, semble être la source des défauts plaquettaires observés chez les patients SIA (Udén & coll., 1980). Bien que cette défaillance des plaquettes sanguine ne soient pas directement impliquées dans le mécanisme pathogénique de la déformation scoliothique, la similarité entre la fonction contractile des plaquettes et celle des muscles squelettiques suggère une défektivité généralisée des protéines contractiles (Meyer & coll., 1987 et Liebergall & coll., 1989).

1.3.2.5 Endocrinologie

L'hypothèse d'une étiologie endocrinienne a également été mise de l'avant suite aux observations cliniques montrant que les patients SIA étaient plus grands que la moyenne des individus normaux du même âge (Buric & Momcilovic, 1982), suggérant ainsi l'implication de l'hormone de croissance. En effet, il a été démontré par Ahl et coll. que les patients SIA âgés de 7-12 ans avaient des taux d'hormones de croissance significativement plus élevés que ceux des sujets contrôles. Ces taux plus élevés d'hormones de croissance peuvent être le reflet d'une défaillance primaire affectant entre autre la régulation de la synthèse de l'hormone en question. Il a été suggéré que la mélatonine, laquelle a la capacité de réguler la synthèse de l'hormone de croissance, pouvait également être en cause dans l'étiologie de la SIA (Hilibrand & coll., 1996).

1.3.2.5.1 Mélatonine et scoliose idiopathique

L'implication de la mélatonine dans l'étiologie de la SIA a suscité beaucoup d'intérêt compte tenu que son action s'étend à différents systèmes également touchés chez les patients SIA mais dont les symptômes passent généralement sous silence face à l'importance de la déformation du rachis. En effet, la grande majorité des patients SIA souffrent également d'ostéopénie, de troubles du sommeil, de problèmes

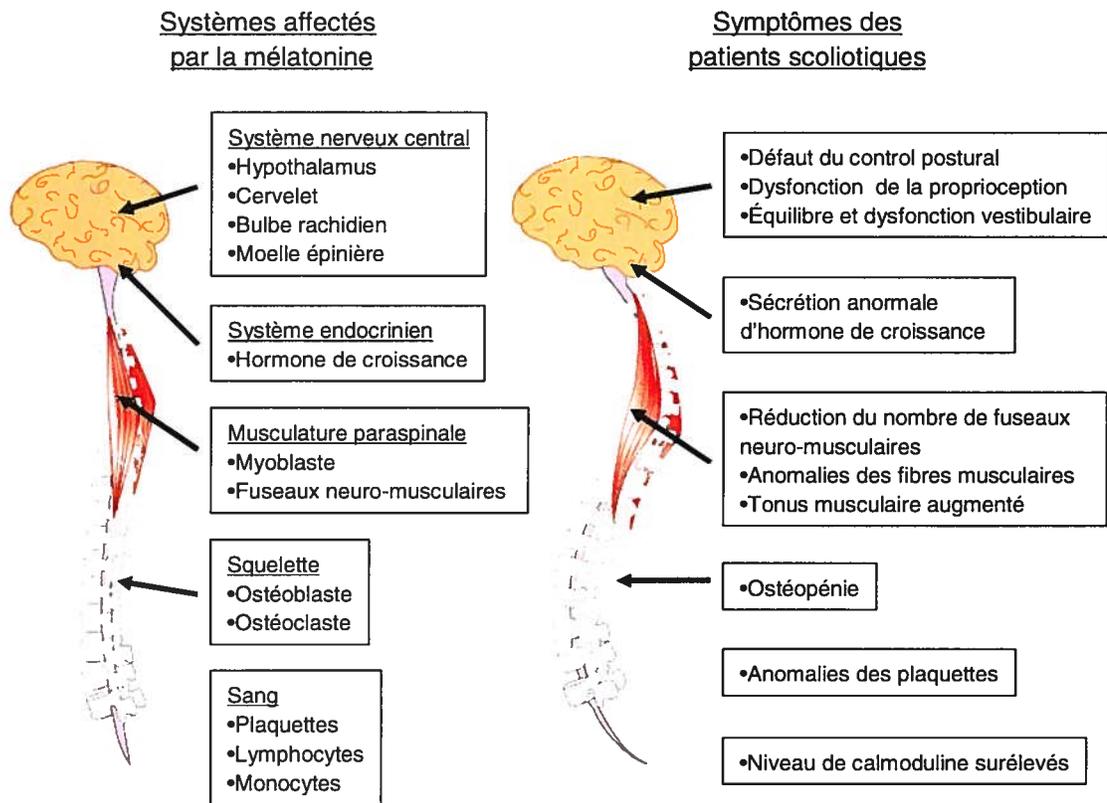


Figure 1.4 : Systèmes ciblés par l'action de la mélatonine et symptômes observés chez les patients souffrant de SIA.

d'équilibre, etc. Toutes ces anomalies proviennent de systèmes physiologiques qui sont régulés par l'action de la mélatonine (figure 1.3).

Il existe de nombreux modèles animaux pour la scoliose idiopathique mais la majorité d'entre eux font appel à des blessures chirurgicales des tissus musculo-squelettiques rachidiens ou aux tissus neuronaux innervant ces derniers (Robin & Stein, 1975; Beguiristain & coll., 1980 et Thomas & Dave, 1985); ces modèles deviennent ainsi inadéquats à l'étude de la SIA puisque cette dernière ne survient pas à la suite d'un quelconque traumatisme. Toutefois, deux modèles présentent davantage d'intérêts pour la recherche de l'étiologie de la SIA; il s'agit du poulet et du rat bipède, tous deux pinéalectomisés (Machida & coll., 1993 et 1999).

Ces derniers modèles viennent appuyer l'hypothèse endocrinienne impliquant la mélatonine comme agent étiologique de la SIA. En effet, chez les vertébrés, la mélatonine circulante est essentiellement synthétisée au niveau de la glande pinéale. L'excision de cette glande chez le poulet et le rat bipède conduit à une déformation de la colonne vertébrale morphologiquement très similaire à celle observée chez les patients atteints de SIA. De plus, il a d'une part été démontré que l'administration de doses exogènes de mélatonine permettait de prévenir la déformation scoliothique suggérant que la scoliose ainsi induite par l'excision de la glande pinéale n'était pas causée par un artéfact chirurgical, mais bien par une carence en mélatonine (Machida & coll., 1993-1999). La venue du modèle bipède de souris C57BL/6 infirme davantage l'hypothèse de l'artéfact chirurgical puisque ces souris développent des scoliooses sans qu'il y ait eu ablation de la glande pinéale. Toutefois, des études similaires remettent en doute l'hypothèse du rôle de la mélatonine puisque, dans leur cas, seulement 56% des poulets pinéalectomisés développaient une scoliose et que le traitement à la mélatonine ne prévenait pas systématiquement la déformation du rachis (Bagnall & coll., 1999). Néanmoins, l'hypothèse de l'implication de la mélatonine fut tout récemment renforcée par les résultats de Machida et coll. où des souris C57BL/6J, déficientes en synthèse de mélatonine, arborent toutes un phénotype scoliothique lorsqu'elles sont chirurgicalement privées de leur membres antérieurs, les forçant ainsi à adopter une posture bipède (Machida & coll., 2003).

La carence en mélatonine n'est pas suffisante à elle seule pour induire une scoliose. En effet, on dénote l'importance de la charge biomécanique pour l'induction de la déformation scoliotique puisque ces modèles animaux se meuvent en mode bipédal et que le rat restant quadrupède ne développe aucune déformation spinale. Cette observation souligne l'implication du facteur bio-mécanique.

L'hypothèse d'une carence en mélatonine est toutefois remise en doute puisque la majorité des études s'entendent pour dire que les niveaux de mélatonine circulant chez les patients atteints de SIA sont normaux (Hilibrand & coll., 1996 et Brodner & coll., 2000). Néanmoins, puisque l'ensemble des scolioses idiopathiques adolescentes est fort probablement un ensemble hétérogène d'étiologie, il est envisageable que certains cas de SIA soient actuellement causés par une carence en mélatonine, mais que l'hétérogénéité des étiologies des sujets utilisés au cours de ces études banalisent les analyses statistiques. Il est toutefois plausible de croire que la majorité des cas de SIA soient causés par une défaillance moléculaire de la signalisation de la mélatonine plutôt que par un défaut de synthèse (Moreau & coll., 2003).

Il est cependant peu probable que le dysfonctionnement dans la signalisation de la mélatonine chez les patients atteints de SIA soit attribuable à une mutation au niveau des récepteurs membranaires puisque l'inactivation naturelle ou induite des récepteurs MT1 ou MT2 chez le hamster n'induit pas de scoliose (Weaver & coll., 1996 et Jin & coll., 2003). Toutefois, dans ce cas-ci, la posture quadrupède du hamster pourrait contribuer à réduire le stress biomécanique et donc prévenir le développement d'une scoliose facile à diagnostiquer. De plus, l'existence de polymorphismes naturels a été observée dans la population et les études de Morcuende et coll. ont mis en évidence l'absence de mutation spécifique du récepteur MT1 chez les patients scoliotiques (Morcuende & coll., 2003).

CHAPITRE 2. PREMIER MANUSCRIT**Dual action of melatonin signaling activity in bone metabolism**

Steve Forget, Da Shen Wang, Bouziane Azeddine, Debora Angeloni, Franco Fraschini et Alain Moreau.

Correspondance:

Dr Alain Moreau

Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine

Laboratoire de génétique Moléculaire de l'Os et des Malformations Musculo-Squelettiques (local 4734)

3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

Téléphone: (514) 345-4931 #3476

Télécopieur: (514) 345-4801

Courriel: amoreau@justine.umontreal.ca

(Manuscrit soumis au *Journal of Bone and Mineral Research* en date du 23 février 2004)

Accord des coauteurs

Étudiant : Steve Forget

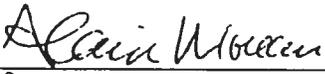
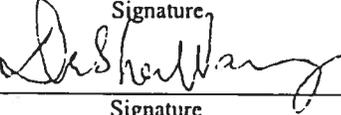
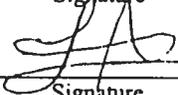
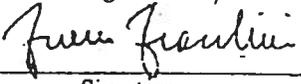
Programme : Maîtrise en Biologie Moléculaire (2-466-1-0)

Dual action of melatonin signaling activity in bone metabolism

Journal of Bone and Mineral Research

Soumis

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que *Steve Forget* inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre *études des voies de signalisation de la mélatonine et son implication dans la scoliose idiopathique de l'adolescent*

Dr Alain Moreau		10/02/2004
Coauteur	Signature	Date
Dr Da Shen Wang		10/2/2004
Coauteur	Signature	Date
M. Bouziane Azeddine		10/2/2004
Coauteur	Signature	Date
Dr Debora Angeloni		Jan 30, 2004
Coauteur	Signature	Date
Dr Franco Fraschini		29.01.2004
Coauteur	Signature	Date

Participation de l'étudiant

L'étudiant/auteur de ce mémoire a participé à la réalisation de l'article « **Dual action of melatonin signaling activity in bone metabolism** » en :

- participant à la rédaction du manuscrit ;
- effectuant la mise au point du protocole et les expériences de co-immunoprécipitation ;
- accomplissant certaines des expériences de RT-PCR ;
- réalisant le montage des figures et des tableaux ;
- participant à la révision du manuscrit.

Résumé

Il a été proposé que la régulation hormonale du métabolisme osseux par la mélatonine s'effectuait par la stimulation des ostéoblastes qui, à leur tour, inhibaient l'activité des ostéoclastes. Toutefois, on possède peu d'informations sur la signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes et sur la possibilité que l'inhibition de l'ostéoclastogénèse puisse être causée par une action plus directe de la mélatonine. Les modèles cellulaires utilisés dans ces expériences sont les MG-63, une lignée cellulaire ostéoblastique humaine, et des ostéoclastes dérivés des monocytes sanguins humains. Des analyses d'expression géniques par RT-PCR de ces modèles ont montré une prédominance du récepteur à mélatonine MT2. La co-immunoprécipitation des récepteurs MT1 et MT2, analysée par Western blot, a montré un couplage différentiel des protéines Gi selon le type cellulaire et selon le récepteur à mélatonine immunoprécipité. De plus, il a été constaté que des formes phosphorylées de ces protéines sont associées aux récepteurs et que l'ajout de mélatonine ($10^{-7}M$) provoque la perte de la forme phosphorylée. Il a été observé que le traitement à la mélatonine des ostéoclastes durant leur différenciation empêche la maturation de ces derniers alors que l'ajout de mélatonine à des ostéoclastes déjà matures inhibent leur activité de résorption osseuse. Cette inhibition semble être modulée par le récepteur MT2 puisque l'ajout de luzindole, un antagoniste spécifique de ce récepteur, bloque partiellement l'effet inhibiteur de la mélatonine sur la résorption osseuse. De plus, il a été observé qu'un traitement de 30 minutes à la mélatonine était suffisant pour inhiber presque totalement l'expression du récepteur RANK chez les ostéoclastes matures, suggérant ainsi la présence d'un mécanisme direct de régulation des ostéoclastes par la mélatonine. Ces résultats permettent de croire que le déclin de la synthèse de la mélatonine avec l'âge pourrait contribuer à augmenter les risques d'ostéoporose puisque la mélatonine semble jouer un rôle important dans le contrôle de l'ostéoclastogénèse et dans l'activation des ostéoclastes matures.

ABSTRACT

Melatonin signaling activity stimulates osteoblast differentiation and inhibits osteoclastogenic activity through MT2 melatonin receptor subtype in both cell types. Osteoclastogenesis inhibition by melatonin is mediated by a down-regulation of RANK expression.

Introduction: Hormonal modulation of bone metabolism by melatonin has been proposed to proceed through stimulation of osteoblast differentiation and subsequent osteoclast inhibition. However, little is known concerning melatonin signal transduction in osteoblasts and osteoclasts, where it could possibly exert a direct inhibiting action on osteoclastogenesis.

Methods: Expression analysis of both melatonin receptor subtypes was investigated by RT-PCR using RNA isolated from human osteoblast cell line MG-63 and human osteoclasts derived from the peripheral blood mononuclear cells. Gi proteins interacting with individual melatonin receptor subtypes were determined by co-immunoprecipitation assays with anti-melatonin receptor antibodies and Western blot with anti-Gi protein antibodies. Melatonin effect on osteoclastic resorption activity was evaluated with the pit resorption assay in presence of melatonin or in combination with luzindole, a MT2 melatonin receptor antagonist.

Results and Conclusions: MT2 receptor is the subtype predominantly expressed both in osteoblasts and osteoclasts. In human osteoblasts, two distinct forms of Gi proteins were found associated with this receptor subtype: a 43 kDa protein (unphosphorylated, active) and a 60 kDa protein (serine-phosphorylated, inactive), with the following affinity order: $Gi_3 > Gi_2$, while Gi_1 proteins hardly interacted with either melatonin receptors. Addition of melatonin ($10^{-7}M$) abrogated the interaction of phosphorylated Gi proteins and shifted the affinity order to $Gi_2 > Gi_3$. In human osteoclasts, MT2 receptor was found to couple almost exclusively with unphosphorylated Gi_3 proteins. However, in absence of melatonin, only tyrosine-phosphorylated Gi_1 proteins were found to interact with MT1 receptor subtype. Melatonin treatment of differentiating osteoclasts abrogated completely the maturation process and inhibited the formation of resorption pits by mature osteoclasts. Addition of luzindole relieves this inhibitory effect indicating

that it is mediated through MT2 receptor signaling. Moreover, short-term melatonin treatment almost completely abrogated the expression of RANK by mature osteoclasts, suggesting a direct mechanism of osteoclastogenesis inhibition by melatonin. Clearly, aging-associated melatonin decrease could lessen the inhibitory action of melatonin on osteoclastogenesis and contribute to development of osteoporosis.

Keywords: melatonin, MT2 receptor, Gi proteins, osteoblasts, osteoclasts, RANK, osteoporosis

INTRODUCTION

Bone formation is a continuous remodeling process involving resorption of old bone by osteoclasts and subsequent new bone deposition by osteoblasts. This process is regulated *in vivo* by a combination of growth factors and cytokines synthesized in the bone marrow microenvironment and by the action of systemic hormones like parathyroid hormone, estrogens or growth hormone. Among other hormones modulating bone-forming cells, melatonin attracted recently much the attention due to its natural decline with aging and its possible involvement in post-menopausal and senescence osteoporosis. Interestingly, many studies on bone mineral density further support the role of melatonin in bone formation *in vivo*. Studies on C3H and C57BL/6 inbred mouse strains showed that these mice exhibit the highest and lowest bone mineral density respectively amongst all strains tested^(1,2). It has been postulated that such difference could be mediated by their circulating melatonin level⁽³⁾. Indeed, the C3H mice are recognized to be melatonin pro-efficient, maintaining a high level of circulating melatonin while the C57BL/6 mice are melatonin-deficient, with very low values of circulating melatonin^(4,5). This deficiency is not complete and results from a mutation in a rate-limiting enzyme involved in melatonin synthesis⁽⁶⁾. Other studies demonstrated with more direct approaches that melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis of human bone cells *in vitro*, suggesting that melatonin may stimulate bone formation⁽⁷⁾. Indeed, expression analysis of MC3T3-E1 cells treated for several days with physiological doses of melatonin revealed that this hormone is able to stimulate the expression of key osteoblast-differentiation markers (osteocalcin and bone sialoprotein)⁽⁸⁾. Treatments of osteoblasts with luzindole, a melatonin receptor antagonist, blocked those effects indicating that they are mediated by signaling activity through the melatonin receptor subtype MT₂⁽⁸⁾. However, the molecular mechanisms whereby melatonin modulates bone metabolism remain unclear and controversial due to recent conflicting data. At least in one study melatonin was both inhibitory to osteoclastic and osteoblastic cells⁽⁹⁾. Suzuki *et al* using a goldfish scale culture, reported suppressive effects of melatonin on osteoblasts. Their results revealed that melatonin acts directly on the scale osteoclastic and osteoblastic cells where it suppresses the alkaline phosphatase (ALP) activity via down-regulation of estrogen-receptor (ER) and

insulin-like growth factor 1 (IGF-1) mRNAs expression⁽⁹⁾. *In vivo* studies in mice showed that daily melatonin treatments significantly increased bone mass predominantly through suppression of bone resorption instead of stimulation of bone formation⁽¹⁰⁾. This was further supported by *in vitro* studies showing that melatonin (1-500 μ M) treatment caused a dose-dependent reduction in the number and area of resorption pits formed by osteoclasts derived from bone marrow cells. It remains unclear whether melatonin interferes with osteoclast differentiation and/or its resorptive activity. Interestingly, investigation of the melatonin effect on MC3T3-E1 osteoblastic cell line showed that increasing doses of melatonin reduced the expression and synthesis of RANKL, an osteoclastogenic-activating factor secreted by the osteoblasts, and increased osteoprotegerin (OPG) mRNA and protein levels, a factor that inhibits the differentiation of osteoclast by acting as a decoy receptor for RANKL^(10,11). This was an indication that pharmacologic doses of melatonin cause bone resorption inhibition and bone mass increase in mice. It was suggested that melatonin mediates those skeletal effects via a down-regulation of RANKL-mediated osteoclast formation and activation. These considerations led us to investigate whether melatonin could directly regulate osteoclast function and how melatonin signaling selectively modulates osteoblast and osteoclast functions. Melatonin signaling pathways have been characterized in the brain, the pituitary gland and few other peripheral tissues better than in bone or other musculoskeletal tissues. Melatonin exerts its effects through specific, high-affinity receptors: MT1 and MT2⁽¹²⁻¹⁸⁾. These receptors are coupled to guanine nucleotide-binding proteins (G proteins), and their activation leads to the inhibition of adenylyl cyclases, which are responsible for the accumulation of cAMP⁽¹⁹⁾. The MT1 and MT2 receptor genes are evolutionary conserved up to mammals and several lines of evidence demonstrated that the MT1 receptor mediates the reproductive and circadian effects of melatonin^(5,6,20-22) while it was indirectly suggested that MT2 receptor was involved in bone metabolism regulation⁽⁸⁾. In this study, we examined i) what changes occur in Gi proteins coupled to melatonin receptor subtypes in human osteoblasts and osteoclasts and ii) how melatonin signaling exerts its effects on osteoclastogenesis. We show here that MT2 is the melatonin receptor subtype predominantly expressed both in osteoclasts and osteoblasts. Also, we show significant changes in the pattern of Gi proteins preferentially coupled to this receptor. Melatonin treatments blocked osteoclasts

maturation and inhibited bone resorption in mature osteoclasts by repressing the expression of RANK, the receptor for RANKL an osteoclast differentiation marker and activation factor.

METHODS

Cell culture and materials. MG-63 cell line (ATCC) was used as a source of human osteoblasts and cultured in DMEM media with 10% FBS (Invitrogen). Primary osteoclasts were derived from 10 ml of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy subjects. Anticoagulant-treated blood was layered on the Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) solution and centrifuged briefly. Differential pelleting rate results in differential layering of the various blood cell types. Because of their lower density, the lymphocytes were found at the interface between the plasma and the Ficoll-Paque, with other slowly-sedimenting particles (platelets and monocytes). Lymphocytes were then recovered from the interface and briefly washed with a balanced salt solution to remove any platelets, Ficoll-Paque and plasma. Cells were then counted and seeded at high density (1×10^6 cells per cm^2) in α -MEM with 10% FBS and antibiotics. After few days, remaining adherent cells started differentiating in osteoclasts, forming large multinucleate cells.

Expression analysis of human MT1 and MT2 melatonin receptor subtypes. Total cellular RNA was prepared from MG-63 cells and mature human osteoclasts by phenol/chloroform extraction. RT-PCR was performed using the following primers: 5'-CGTCCTCATCTTCACCATC-3' (forward), 5'-GAAACTTGGCAGTGCAGATA-3' (reverse) for human MT1 receptor; 5'-CTGGTGATCCTCTCCGTGCT-3' (forward), 5'-CAGATGAGGCAGATGTGCAGA-3' (reverse) for human MT2 receptor; 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3' (forward), 5'-TCATGATGG AGTTGAATGTAGTT-3' (reverse) for human β -actin. Expected sizes of the PCR products are depicted in Fig.1.

Melatonin receptor subtype localization and distribution. Immunohistochemistry (IHC) assays with anti-human MT1 and anti-human MT2 antibodies (1:200 dilution of primary antibodies; 1:100 dilution of anti-rabbit IgG biotinylated secondary antibodies; 1:200 dilution of Streptavidine-FITC conjugated or Streptavidine-Phycoerythrin conjugated, BioSource Inc.) were performed on methanol fixed MG-63 cells and human osteoclasts. Production and characterization of MT1 and MT2 antibodies are described elsewhere⁽²³⁾.

Membrane preparation, solubilization and melatonin receptor immunoprecipitation. Cells were grown to confluence in 10-cm tissue culture dishes, rinsed twice in ice-cold PBS, and scraped-off their plastic support in 2 ml of ice-cold buffer: 5 mM Tris (pH 7.4), 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail (2 tablets of CompleteTM /50 ml of buffer, Roche Diagnostic Corp.), then homogenized with a Polytron for 5 sec at 30,000 rpm. Lysate was centrifuged at 450 x g for 5 min at 4°C and supernatant (2 ml) was added on the top of 9 ml of 35% sucrose cushion in ultracentrifugation tubes (Beckman Instruments Inc.). Plasma membrane fractions were sedimented by ultracentrifugation at 150,000 x g for 90 min at 4°C, the membrane pellet was resuspended in 1 ml of ice cold buffer (50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail), then incubated with or without melatonin (10⁻⁷M) for 1 h at 25°C. Membranes were pelleted by centrifugation at 18,000 x g for 20 min at 4°C. The pellet was washed with ice-cold buffer (75 mM Tris (pH 7.4), 12 mM MgCl₂, 2 mM EDTA and a protease inhibitor cocktail), then resuspended in the same buffer added of 2% Triton X-100, and agitated overnight at 4°C. Non-solubilized membrane proteins and debris were removed by centrifugation at 18,000 x g for 20 min at 4°C. Protein concentration was measured the Bradford method (BioRad protein assay reagents). Triton X-100 concentration was adjusted to 0.2% and human MT2 antibodies were added to a final dilution of 1:80. Extracts were incubated for 18 h at 4°C with continuous gentle mixing. During the last 6 h, 50 µl of a 50% (v/v) Protein A-agarose suspension was added. After centrifugation for 1 min at 5000 x g, supernatants were decanted and the agarose beads washed five times with 1 ml of ice-cold buffer (75 mM Tris (pH 7.4), 12 mM MgCl₂, 2 mM EDTA plus protease inhibitor cocktail, 0,05% Triton X-100).

Identification of Gi protein coupled to the human MT1 and MT2 receptor subtypes. Membranes (100 μ g protein) from first-passage human osteoblasts were incubated with or without melatonin (10^{-7} M) for 1 h at 25°C. For hormone-stimulated samples, all subsequent steps were performed in the continued presence of melatonin. Receptors were solubilized and precipitated with anti-MT2 specific antibodies as described above. G proteins were dissociated from immune complexes by treatments with Gpp(NH)p (0.1mM) for 1 h at 37°C. Supernatants were harvested and re-incubated with protein A-agarose to remove residual IgGs. Proteins in the supernatant were precipitated with trichloroacetic acid (33% final concentration, Sigma), 30 min at 4°C. Precipitated proteins were centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C. Pellets were washed twice with 5% TCA solution then once with ice-cold acetone, dried and denatured in 70 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2% SDS, 4 M urea, 40 mM dithiothreitol, 10% glycerol and 0,05% bromophenol blue for 5 min at 80°C. Samples were prepared for western blot (after 10% SDS-PAGE) with antibodies specific for different G protein subunits (1:400 dilution of primary antibodies; Santa Cruz Biotechnology Inc.; 1:10,000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, BioSource Inc.). Detection was done with an enhanced chemiluminescent kit (BM Chemiluminescent blotting substrate POD) according to the manufacturer's specifications (Roche Diagnostic Corp.). Phosphorylated Gi proteins coupled to MT2 receptor were studied with anti-phosphoserine (Sigma), anti-phosphothreonine (Sigma) or anti-phosphotyrosine antibodies (kind gift from Dr. Mounib Elchebly, Université de Montréal).

Pit resorption assays. Osteoclast resorption activity was measured by seeding at high density (1×10^6 cells per cm^2 , in α -MEM, 10% FBS and antibiotics) on a resorbable artificial bone analog (BioCoat™ Osteologic™ discs, BD Biosciences). Quantification of osteoclast resorption was determined after osteoclast maturation with a Microst™ apparatus (Millenium Biologix, Kingston, ON, Canada) with or without melatonin (10^{-9} M to 10^{-7} M), alone or in combination with luzindole (10^{-6} M), a MT2 receptor antagonist (Sigma).

Statistical analysis. Data were expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with the Mann-Whitney U-test. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Identification of melatonin receptor subtypes existing in human osteoblasts and osteoclasts. Expression analysis has demonstrated that melatonin receptor subtype MT2 is strongly expressed in human osteoblasts and osteoclasts while receptor subtype MT1 is hardly detectable in both cell types (**Fig.1**). However, the corresponding proteins were detected in both cell types by IHC method performed with antibodies designed against distinct MT1 and MT2 C-terminal epitopes (**Fig.2**).

Differential coupling in osteoblasts and osteoclasts of Gi proteins to melatonin receptors. Co-immunoprecipitation assays with specific antibodies against MT1 and MT2 melatonin receptor subtypes showed a predominant coupling of Gi₃ proteins with the MT2 receptor subtype in purified membrane fractions of osteoblasts treated or not with melatonin (**Fig. 3**). Interestingly, Western blot analysis with anti-Gi_{1,3} antibodies revealed the presence of two immunoreactive bands, 43 kDa and 60 kDa, corresponding respectively to the unphosphorylated and phosphorylated form of individual Gi protein. Immunodetection assays with specific anti-phosphoproteins antibodies were performed and confirmed the presence of at least one phosphoserine residue in the 60 kDa Gi proteins (**Fig. 3**). Interestingly, similar assays with human osteoclasts revealed a predominant coupling with Gi₃ proteins and a distinct post-translational modification pattern involving a tyrosine-phosphorylation only in Gi₁ proteins in absence of the ligand. In fact, melatonin treatment abrogated completely the interaction between tyrosine-phosphorylated Gi₁ proteins and MT1 receptor subtype (**Fig. 4**). Serine-phosphorylation of Gi proteins is indirectly modulated by a tyrosine kinase activity as shown by treatment of osteoblast cultures with genistein (a tyrosine kinase inhibitor) that prevented the formation of the 60 kDa Gi band in control cells (**Fig. 3**).

Effect of melatonin on osteoclast differentiation and resorption activity. The possible role of melatonin on osteoclast maturation was examined by adding physiological doses of melatonin (10^{-9} M) in cell cultures derived from PBMCs. Melatonin treatments in cell cultures derived from PBMCs abrogated completely osteoclasts maturation as evidenced by the lack of adherent cells after few days. However, treatment of mature osteoclasts with melatonin (10^{-9} M to 10^{-7} M) blocked osteoclast resorption *in vitro*, as evidenced by a significant reduction in the number and size of resorption pits (**Fig.5a-b**). Addition of luzindole, a MT2 receptor antagonist, partially relieved this inhibition indicating that effect was mediated in osteoclasts by the MT2 receptor (**Fig.5c**). Interestingly, short-term, *in vitro* exposure (30 min) of human osteoclasts to melatonin was sufficient to abrogate in osteoclasts the expression of RANK, the receptor for RANKL, indicating that both melatonin inhibitory effects could be mediated by a down-regulation of RANK (**Fig.6**).

DISCUSSION

Conflicting reports possibly related to the different doses utilized (physiological and pharmacological) of melatonin prove that little is known about how melatonin signal is transduced in bone metabolism. These considerations prompted us to investigate the mechanisms whereby melatonin modulates osteoblasts metabolism and eventually osteoclasts differentiation and/or resorptive activity and whether melatonin effects on human osteoclasts are mediated through a signaling activity or via its anti-oxidant property.

In the present study, we have demonstrated that melatonin receptor MT2 is the subtype predominantly expressed in osteoclasts and osteoblasts. Even though MT1 mRNA seems completely absent in figure 1, the fact is that it's expressed at very low levels in bone cells, which does not appears on the scanned picture, compared with its expression levels in brain cells in which it is predominant over MT2 receptor. Interestingly, co-IP assays with anti-MT1 and anti-MT2 antibodies revealed changes in the preferential coupling between Gi proteins and individual melatonin receptors in

human osteoblasts and osteoclasts. Moreover, post-translational modifications of Gi proteins involving serine-phosphorylation seem to occur only in osteoblasts, since no serine phosphorylated Gi proteins interacting with both melatonin receptors in human osteoclasts were detected. However, in human osteoclasts, phosphorylation of tyrosine residues in Gi₁ proteins was detected in Western blot in absence of the ligand. The biological significance of these distinct phosphorylations remains to be determined but it should be related to the differential effect of melatonin in osteoblasts and osteoclasts. Furthermore, the indirect control of Gi proteins by tyrosine kinases has been reported as well in other cell types⁽²⁴⁾ These results clearly indicate that melatonin signaling occurs both in osteoclasts and osteoblasts, mainly through MT2 receptor subtype, while changes observed in Gi proteins phosphorylation strongly argue for a distinct post-translational mechanism regulating Gi protein functions in both cell type. The biological relevance of that mechanism is further supported by the fact that phosphorylation of Gi proteins at their N-terminus is well known to block the formation of functional heterotrimers with G β and G γ subunits preventing, among others, the inhibition of adenylyl cyclase activity in presence of melatonin⁽²⁵⁾.

Melatonin and osteoclastogenesis. Incubating differentiating PBMCs cultures with physiological doses of melatonin abrogated completely the formation of osteoclasts. Interestingly, melatonin inhibited significantly the resorption activity in similar assays in mature osteoclasts derived from PBMCs, as evidenced by the reduced number and size of resorption pits following treatments. Moreover, this effect appears to be mediated by a melatonin signaling activity through the MT2 receptor subtype since addition of luzindole relieves the inhibitory effect of melatonin on human osteoclasts.

Our results indicate that the inhibitory effects of melatonin on osteoclastogenesis and resorption are probably caused by a transcriptional repression of RANK and mediated by its signaling activity since those effects are quickly observed following melatonin addition. This report is the first to show that modulation of osteoclastic differentiation and activity by melatonin proceed through RANK repression. Therefore, RANK represents a promising target for pharmacological interventions aimed at preventing osteoporosis progression.

Figures

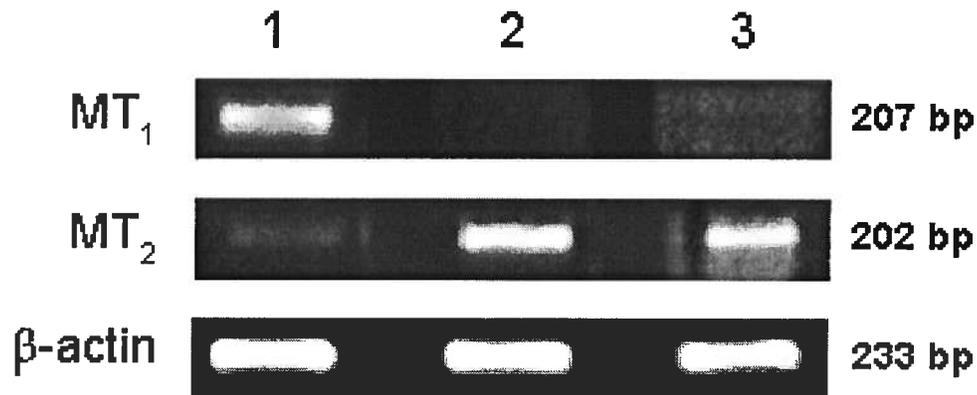


Figure 2.1: Melatonin receptors expression analysis in human osteoblasts and osteoclasts.

Expression analysis of melatonin receptor subtypes MT1 and MT2 was performed by semi-quantitative RT-PCR with RNA isolated from human osteoclasts (lane 2); human osteoblasts (lane 3). Lane 1 represents a positive control for MT1 subtype generated with RNA isolated from human brain. Note that only MT2 expression was detected in both bone-forming cells.

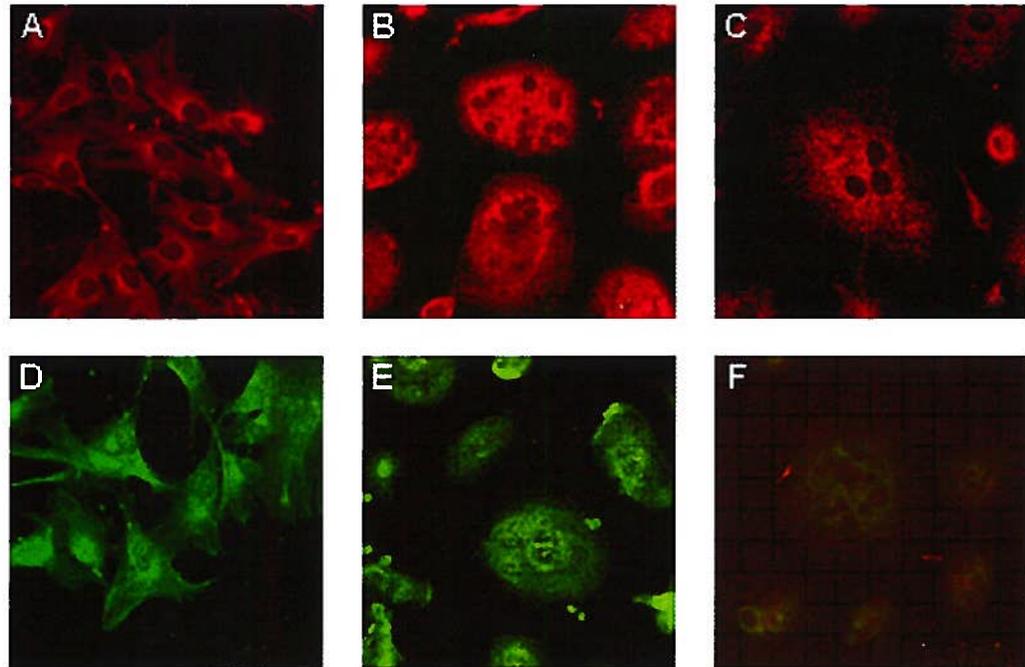


Figure 2.2: Immunodetection of MT1 and MT2 melatonin receptors in human osteoblasts and osteoclasts.

IHC experiments were performed on MG-63 osteoblast cell line (A, D) and human osteoclast cultures (B, C, E and F). Note that MT2 receptor was predominantly expressed in MG-63 osteoblasts (panel D), while in human osteoclasts both melatonin receptor subtypes were detected. Panel C represents an IHC experiment with antibodies recognizing a cell surface marker produced by mature osteoclasts confirming their cellular type while panel F represents a negative control where the primary antibody was omitted. Magnification 63X using a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

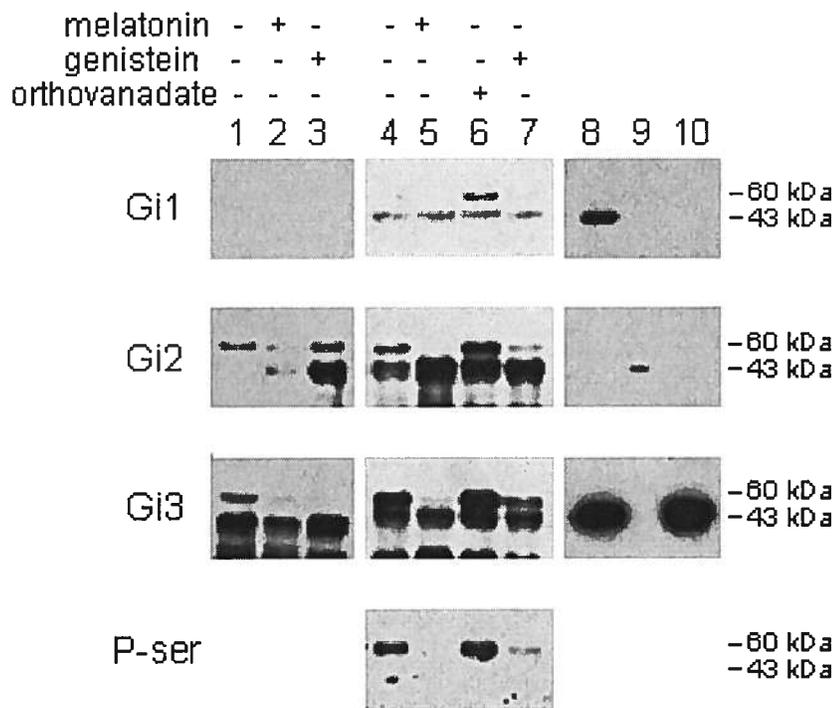


Figure 2.3: Identification of Gi proteins coupled to melatonin receptors in human osteoblasts.

Co-immunoprecipitation assays were performed with anti-MT1 (lanes 1-3) and anti-MT2 (lanes 4-7) antibodies using purified membrane fractions prepared from human MG-63 osteoblast cultures untreated (lane 1, 4) and treated overnight with melatonin (lane 2, 5), with genistein, a tyrosine kinase inhibitor (lane 3, 7) or with orthovanadate (Na_3VO_4), a tyrosine phosphatase inhibitor (lane 6). Purified recombinant Gi proteins were used as control for antibody specificity (lanes 8-10 corresponding to Gi_1 , Gi_2 and Gi_3 respectively). Immunoblots were revealed with specific antibodies reacting with individual Gi protein (as indicated) with the exception of anti- Gi_3 antibodies, which cross-react also with human Gi_1 proteins. Note that the lower immunoreactive bands correspond to unphosphorylated Gi proteins (43 kDa) while higher molecular weight bands represent phosphorylated forms of Gi proteins (60 kDa) respectively. Re-probing of each panel with pan anti-phosphoserine and anti-phosphotyrosine antibodies allowed the detection of phosphoserine residues in all Gi proteins coupled to MT2 receptor subtype in absence of ligand (lane 4) and when cells were treated with Na_3VO_4 (lane 6).

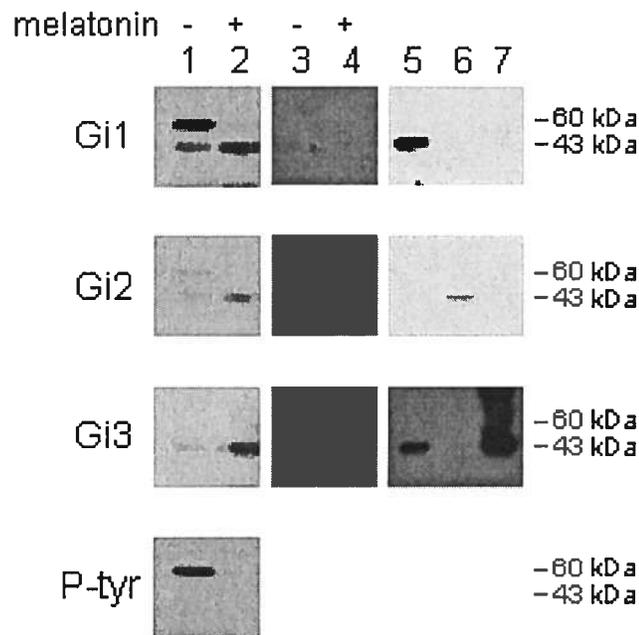


Figure 2.4: Identification of Gi proteins coupled to melatonin receptors in human osteoclasts.

Co-immunoprecipitation assays were performed with anti-MT1 (lane 1, 2) and anti-MT2 (lane 3, 4) antibodies using purified membrane fractions prepared from human osteoclast cultures untreated (lane 1, 3) and treated with melatonin (lane 2, 4). Purified recombinant Gi proteins were used as control for antibody specificity (lanes 5-7 corresponding to Gi₁, Gi₂ and Gi₃ respectively). Immunoblots were revealed with specific antibodies reacting with individual Gi proteins (as indicated) with the exception of anti-Gi₃ antibodies, which cross-react also with human Gi₁ proteins. Note that the lower immunoreactive bands correspond to unphosphorylated Gi proteins (43 kDa) while higher molecular weight bands represent phosphorylated forms of Gi proteins (60 kDa) respectively. Re-probing of each panel with pan anti-phosphoserine and anti-phosphotyrosine antibodies allowed the detection of phosphotyrosine residues in Gi₁ proteins coupled to MT1 receptor subtype in absence of ligand (lane 1).

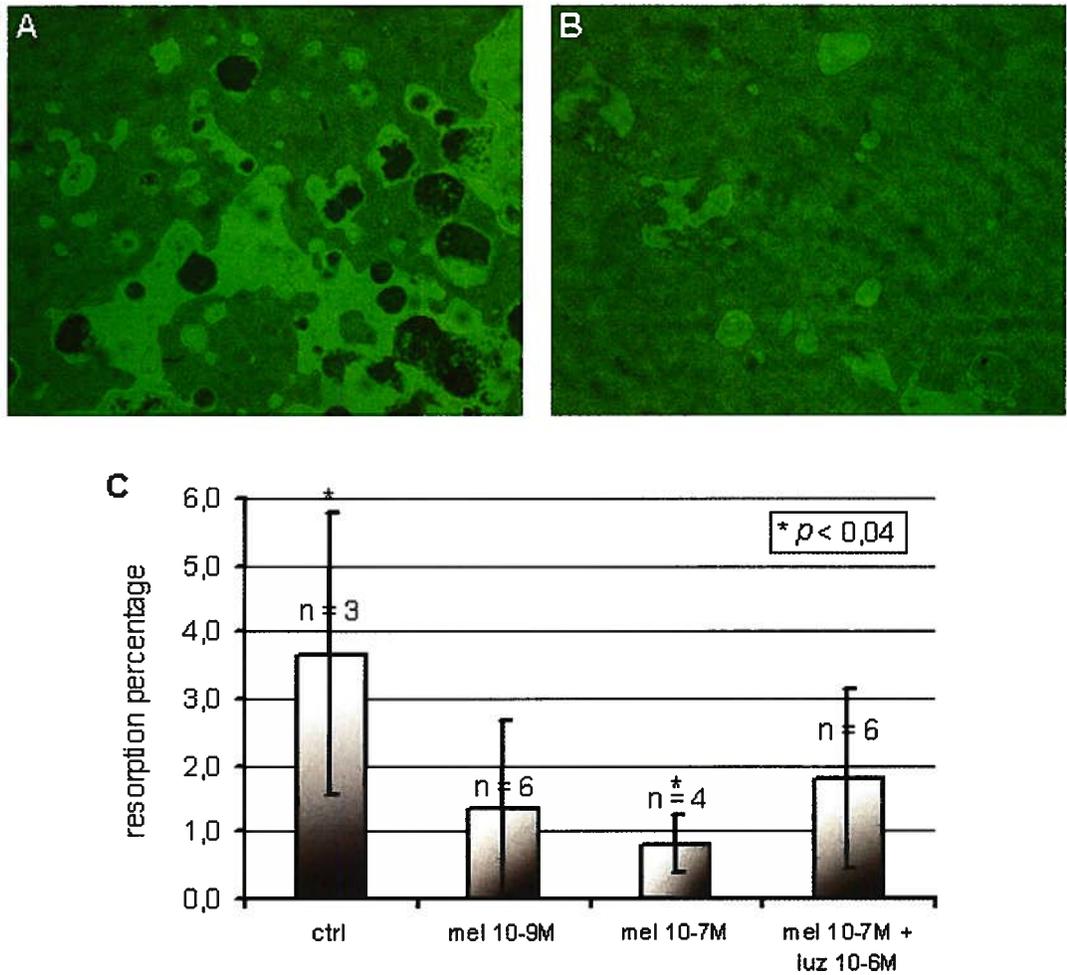


Figure 2.5: Effect of melatonin on osteoclastic bone resorption activity.

Panel A represents typical resorptive pits produced by human osteoclasts seeded on artificial bone matrix, while panel B represents mature osteoclasts treated in parallel with melatonin (10^{-7}M). Note the severe reduction in the size and the number of resorption pits in melatonin treated cells. Panel C, summarizes the effects of melatonin on osteoclast resorption. Note that melatonin inhibitory effect was significant at 10^{-7}M and addition of luzindole partially relieves the inhibition of resorption indicating the involvement of MT2 receptor subtype.

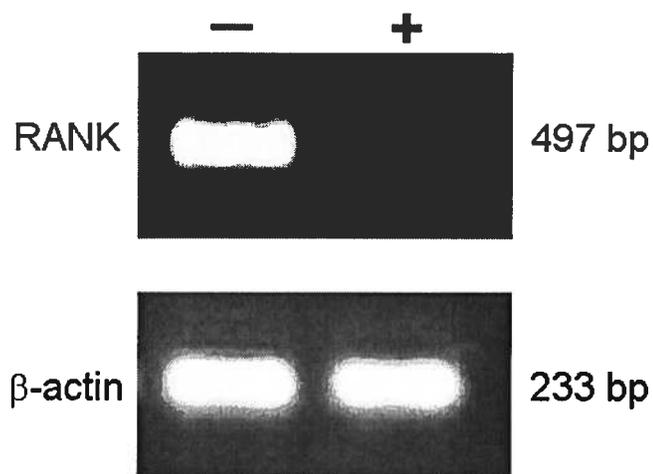


Figure 2.6: Effect of melatonin on RANK expression in human osteoclasts.

Expression analysis of RANK was performed by semi-quantitative RT-PCR with RNA isolated from human osteoclasts untreated (-) or treated for 30 min only with melatonin (10^{-7} M) (+). Note that melatonin treatment almost completely abrogated RANK expression in human osteoclasts.

Acknowledgments

The authors thank Mrs. Julie Joncas and Mrs. Ginette Lacroix for their technical support and helpful assistance. This work was supported by a research grant from the Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France to A.M. and A. Moreau is the recipient of a Scholarship from the FRSQ.

Reference List

1. Akhter MP, Iwaniec UT, Covey MA, Cullen DM, Kimmel DB, Recker RR 2000 Genetic variations in bone density, histomorphometry, and strength in mice. *Calcif Tissue Int* 67: 337-344.
2. Beamer WG, Shultz KL, Donahue LR, Churchill GA, Sen S, Wergedal JR, Baylink DJ, Rosen CJ 2001 Quantitative trait loci for femoral and lumbar vertebral bone mineral density in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred strains of mice. *J Bone Miner Res* 16: 1195-1206.
3. von Gall C, Lewy A, Schomerus C, Vivien-Roels B, Pevet P, Korf HW, Stehle JH 2000 Transcription factor dynamics and neuroendocrine signalling in the mouse pineal gland: a comparative analysis of melatonin-deficient C57BL mice and melatonin-proficient C3H mice. *Eur J Neurosci* 12: 964-972.
4. Siuciak JA, Fang JM, Dubocovich ML 1990 Autoradiographic localization of 2-[125I]iodomelatonin binding sites in the brains of C3H/HeN and C57BL/6J strains of mice. *Eur J Pharmacol* 180: 387-390.
5. Ebihara S, Marks T, Hudson DJ, Menaker M 1986 Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 231: 491-493.
6. Roseboom PH, Namboodiri MA, Zimonjic DB, Popescu NC, Rodriguez IR, Gastel JA, Klein DC 1998 Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol Brain Res* 63: 189-197.
7. Nakade O, Koyama H, Arijji H, Yajima A, Kaku T 1999 Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res* 27: 106-110.
8. Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI 1999 Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 274: 22041-22047.
9. Suzuki N, Hattori A 2002 Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J Pineal Res* 33: 253-258.

10. Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH 2002 Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 17: 1219-1229.
11. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C 2003 Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 34: 81-87.
12. Borjigin J, Li X, Snyder SH 1999 The pineal gland and melatonin: molecular and pharmacologic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 53-65.
13. Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R 1999 Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol* 13: 2025-2038.
14. van Meurs J, van Lent P, Stoop R, Holthuysen A, Singer I, Bayne E, Mudgett J, Poole R, Billingham C, van der KP, Buma P, van den BW 1999 Cleavage of aggrecan at the Asn341-Phe342 site coincides with the initiation of collagen damage in murine antigen-induced arthritis: a pivotal role for stromelysin 1 in matrix metalloproteinase activity. *Arthritis Rheum* 42: 2074-2084.
15. Kokkola T, Laitinen JT 1998 Melatonin receptor genes. *Ann Med* 30: 88-94.
16. Petit L, Lacroix I, de Coppet P, Strosberg AD, Jockers R 1999 Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 58: 633-639.
17. von Gall C, Stehle JH, Weaver DR 2002 Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* 309: 151-162.
18. Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S, Melan MA 2003 Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 72: 2183-2198.
19. Roka F, Brydon L, Waldhoer M, Strosberg AD, Freissmuth M, Jockers R, Nanoff C 1999 Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol Pharmacol* 56: 1014-1024.

20. Weaver DR, Liu C, Reppert SM 1996 Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10: 1478-1487.
21. Jin X, von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR 2003 Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol Cell Biol* 23(3): 1054-1060.
22. Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM 1997 Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19: 91-102.
23. Angeloni D, Longhi R, Fraschini F 2000 Production and characterization of antibodies directed against the human melatonin receptors Mel-1a (mt1) and Mel-1b (MT2). *Eur J Histochem* 44: 199-204.
24. Barrett P, Choi WS, Morris M, Morgan P 2000 A role for tyrosine phosphorylation in the regulation and sensitization of adenylate cyclase by melatonin. *FASEB J* 14: 1619-1628.
25. Chen CA, Manning DR 2001 Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* 20: 1643-1652.

CHAPITRE 3. SECOND MANUSCRIT**Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis**

Alain Moreau, Da Shen Wang, Steve Forget, Bouziane Azeddine, Debora Angeloni, Franco Frascini, Hubert Labelle, Benoît Poitras, Charles-Hilaire Rivard et Guy Grimard.

Correspondance:

Dr Alain Moreau

Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine

Laboratoire de génétique Moléculaire de l'Os et des Malformations Musculo-Squelettiques (local 4734)

3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

Téléphone: (514) 345-4931 #3476

Télécopieur: (514) 345-4801



(Manuscrit accepté dans *Spine* en date du 3 octobre 2003)

Accord des coauteurs

Étudiant : Steve Forget

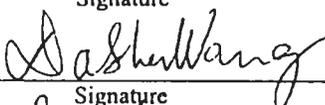
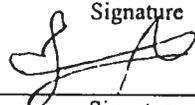
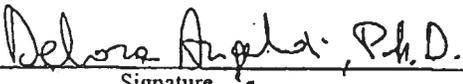
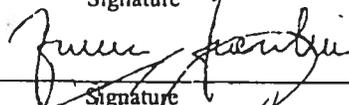
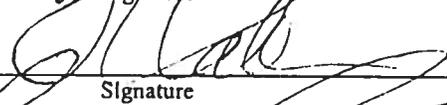
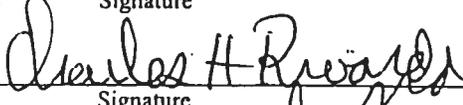
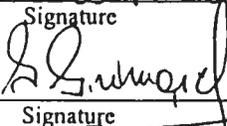
Programme : Maîtrise en Biologie Moléculaire (2-466-1-0)

Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis

Spine

Sous-presse

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que *Steve Forget* inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre *études des voies de signalisation de la mélatonine et son implication dans la scoliose idiopathique de l'adolescent*.

Dr Alain Moreau		10/2/2004
Auteur	Signature	Date
Dr Da Shen Wang		10/2/2004
Coauteur	Signature	Date
M. Bouziane Azeddine		10/2/2004
Coauteur	Signature	Date
Dr Debora Angeloni		Jan 30, 2004
Coauteur	Signature	Date
Dr Franco Fraschini		29.01.004
Coauteur	Signature	Date
Dr Hubert Labelle		5/2/04
Coauteur	Signature	Date
Dr Benoît Poitras		9/2/04
Coauteur	Signature	Date
Dr Charles-Hilaire Rivard		5/2/04
Coauteur	Signature	Date
Dr Guy Grimard		5/2/04
Coauteur	Signature	Date

Permission de l'éditeur*Spine Journal*

Loretta M. Pickett

Alain Moreau, Da Shen Wang, Steve Forget, Bouziane Azeddine, Debora Angeloni, Franco Fraschini, Hubert Labelle, Benoît Poitras, Charles-Hilaire Rivard et Guy Grimard.

Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis

Sous-presse

L'étudiant *Steve Forget* est autorisé à inclure l'article ci-dessus dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre *études des voies de signalisation de la mélatonine et son implication dans la scoliose idiopathique de l'adolescent*.

Loretta M. Pickett

Éditeur

Handwritten signature of Loretta Pickett in cursive script.

Signature

3/19/04

Date

Participation de l'étudiant

L'étudiant/auteur de ce mémoire a participé à la réalisation de l'article « **Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis** » en:

- effectuant la mise au point du protocole et les expériences de co-immunoprécipitation ;
- exécutant les analyses statistiques ;
- réalisant le montage des figures et des tableaux ;
- participant à la révision du manuscrit.

Résumé

L'observation à l'effet que les poulets pinéalectomisés développent des scolioses similaires à celles observés chez les patients SIA a permis de suggérer qu'une déficience en mélatonine pourrait être la cause de la SIA. Toutefois, le rôle de la mélatonine dans l'étiologie de cette maladie est controversé puisque la majorité des études cliniques ont mis en évidence des niveaux normaux de mélatonine circulante. Afin de déterminer si une dysfonction de la signalisation de la mélatonine dans les tissus ciblés par cette hormone est en cause dans la SIA, des cultures primaires d'ostéoblastes de 41 patients SIA et 17 sujets contrôles, non-scoliotiques ou atteints de scolioses non-idiopathiques, furent effectuées à partir d'échantillons prélevés lors de chirurgies correctives. La capacité de la mélatonine et du GppNHp, un analogue non-hydrolysable du GTP, de bloquer l'accumulation d'AMPc induite par un traitement à la forskolin a permis de démontrer un défaut de signalisation chez les cellules dérivées de tous les patients atteints de SIA. Les tests d'AMPc ont révélé que la signalisation de la mélatonine était défailante à divers degrés, ce qui a permis une classification des patients en trois groupes selon le type de réponse à la mélatonine observé, suggérant ainsi la présence de différentes mutations. Parallèlement, les récepteurs à mélatonine et les protéines Gi furent analysés par immunohistochimie et par co-immunoprécipitation afin de déterminer l'origine de ce défaut. Il en ressort que des modifications post-traductionnelles des protéines Gi, telle que la phosphorylation de résidus sérine, pourraient être considérées comme une cause possible de l'étiologie de la scoliose idiopathique adolescente.

ABSTRACT

Study Design: In vitro assays were performed with bone-forming cells isolated from 41 patients with adolescent idiopathic scoliosis (AIS) and 17 control subjects exhibiting another type of scoliosis or none. **Objective:** To determine whether a dysfunction of the melatonin-signaling pathway in tissues targeted by this hormone is involved in AIS. **Summary of Background Data:** Pinealectomy in chicken has led to the formation of a scoliotic deformity, thereby suggesting that a melatonin deficiency may be at the source of AIS. However, the relevance of melatonin in the etiopathogenesis of that condition is controversial since most studies have reported no significant change in circulating levels of melatonin in AIS patients. **Methods:** Primary osteoblast cultures prepared from bone specimens obtained intraoperatively during spine surgeries were used to test the ability of melatonin and Gpp(NH)p, a GTP analogue, to block cAMP accumulation induced by forskolin. In parallel, melatonin receptor and Gi protein functions were evaluated by immunohistochemistry and by co-immunoprecipitation experiments. **Results:** The cAMP assays demonstrated that melatonin signaling was impaired in osteoblasts isolated from AIS patients to different degrees allowing their classification in 3 distinct groups based upon their responsiveness to melatonin or Gpp(NH)p. **Conclusion:** Melatonin signaling is clearly impaired in osteoblasts of all AIS patients tested. Classification of AIS patients in 3 groups based on functional in vitro assays suggests the presence of distinct mutations interfering with the melatonin signal transduction. Post-translational modifications affecting Gi protein function, such as serine residues phosphorylation, should be considered as one possible mechanism in the etiopathogenesis of AIS.

Keywords: melatonin, cell signaling, idiopathic scoliosis, membranous receptors, Gi proteins, phosphorylation and osteoblast

INTRODUCTION

The etiology of adolescent idiopathic scoliosis (AIS), the most common form of scoliosis, is unclear. Several divergent hypotheses have been postulated to better define this etiology (reviewed in^{11;25;28;29;44}). Genetics, growth hormone secretion, connective tissue structure, muscle structure, vestibular dysfunction, melatonin deficiency, and platelet abnormalities are major areas of research²⁹. AIS affects mainly girls in number and severity, but despite the fact that several studies have suggested a genetic predisposition, the form of inheritance remains uncertain^{2;8;20;48}. 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^{30;31;34;46} that resembles in many aspects to the human disease. Post-pinealectomy treatments with melatonin, the major hormone of the pineal gland, prevents the formation of scoliosis in both animal models^{29,30}. However, the biological relevance of melatonin in AIS is controversial since: i) no significant decrease in circulating melatonin level has been observed in a majority of studies^{5;9;41}; ii) experimental pinealectomy did not lead systematically to a scoliosis in all pinealectomized chicken^{4;6;7;45} and iii) melatonin injections in pinealectomized animals did not always prevent the formation of a scoliosis³. Taken together, these reports raised doubts regarding the role of melatonin in AIS etiopathogenesis. These considerations led us to look instead at the melatonin signal transduction pathway since a defect of melatonin signaling activity could generate effects similar to a melatonin deficiency. For the present study, cells isolated from AIS patients and subjects suffering of other type of spinal deformity were compared owing to the property of melatonin to inhibit the accumulation of cAMP-induced by forskolin in normal cells due to the coupling of melatonin receptors to inhibitory guanine nucleotide-binding (Gi) proteins^{10;26;36;38;43}. The osteoblasts, the bone-forming cells, were selected to assess whether or not an alteration of melatonin signaling pathway occurs in AIS and accordingly to identify which component of the melatonin transduction machinery could be involved. The physiological relevance of the osteoblasts as cellular model for this study is further supported by the fact that: i) bone

is a well known tissue responding to melatonin^{12;35;40} and ii) a persistent osteopenia is often reported in AIS patients^{14-16;21}.

METHODS

Study design. The melatonin signal transduction pathway functionality was investigated in osteoblasts from a series of patients clinically well-defined with AIS (n=41) and compared with a series of age- and gender-matched subjects presenting another type of scoliosis (n=15), including congenital scoliosis (n=3) or none (n=2). An informed consent was obtained for each subject as approved by our Institutional Ethical Committee.

Clinical characteristics of AIS patients and control subjects. The clinical characteristics of the examined AIS and control subjects are shown in **Table 1** and **2** respectively. All patients with AIS and control subjects were previously examined by one of our orthopedic surgeons (B.P., H.L., C-H.R., G.G.). All the clinical variables indicated were obtained at the moment of the surgery. Hereditary links were established by asking the patients and their relatives about the presence or not of a spinal deformity affecting a family member.

Isolation of human osteoblasts. Osteoblasts were obtained intraoperatively from bone specimens originating from vertebrae in all cases (varying from T3 to L4 according to the surgical procedure performed) with the exception of case 41, where an iliac crest biopsy was performed on a DMD patient without a scoliosis (control subject). Bony fragments were mechanically reduced in smaller pieces with a bone cutter in sterile conditions, and incubated at 37°C in 5% CO₂ in a 10-cm culture dish, in presence of α -MEM medium containing 10% FBS (certified FBS, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). After a 30-day period, osteoblasts emerging from the bone pieces were separated at confluence from the remaining bone fragments by trypsinization.

Adenylyl cyclase activity assay in osteoblasts. The functionality of melatonin signaling was assessed by investigating the ability of Gi proteins to inhibit stimulated adenylyl cyclase activity in osteoblast cultures. Osteoblasts from patients with AIS and control subjects were seeded in quadruplet on 24-wells plate (5×10^4 cells/well) and incubated either with the vehicle alone, dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma, Oakville, ON, Canada) or forskolin (10^{-5} M, Sigma) to stimulate the cAMP formation. Inhibition curves of cAMP production were generated by adding melatonin to the forskolin-containing samples in concentrations ranging from 10^{-11} M to 10^{-5} M in a final volume of 1 ml of α -MEM media containing 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma). After a 30-minute incubation at 37°C , the cells were lysed and the sample centrifuged at 4°C . The cAMP content was determined in 200 μl aliquot of the supernatant using an enzyme immunoassay kit (Amersham-Pharmacia Biosciences, Mississauga, ON, Canada). All assays were performed in duplicate. The functionality of Gi proteins was assessed by investigating their ability to inhibit adenylyl cyclase activity in osteoblasts. To obtain inhibition curves of cAMP production, the non-hydrolysable analogue of GTP, Gpp(NH)p (guanilyl 5'-imidophosphate, Sigma), was added to the forskolin-containing samples in concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-4} M. The cAMP content was determined as described above in similar assays with melatonin.

Determination of human MT1 and MT2 localization. Receptor subtype localization and distribution were determined by immunohistochemistry (IHC) assays with anti-human MT1 and anti-human MT2 antibodies (1:200 dilution of primary antibodies; 1:100 dilution of anti-rabbit IgG biotinylated secondary antibodies; 1:200 dilution of Streptavidine-FITC conjugate or Streptavidine-Phycoerythrine conjugate, BioSource Inc. Camarillo, CA, USA) on methanol fixed human osteoblasts. Production and characterization of MT1 and MT2 antibodies were previously described elsewhere¹.

Membrane preparation, solubilization and human MT2 receptor immunoprecipitation. Cells were grown to confluence in 10-cm tissue culture dishes, rinsed twice in ice-cold PBS, and scraped-off their plastic support in 2 ml of ice-cold buffer: 5 mM Tris (pH 7.4), 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail (2 tablets of CompleteTM /50 ml of buffer, Roche Diagnostic Corp. Indianapolis, IN, USA), then

homogenized with a Polytron for 5 sec at 30,000 rpm. Lysate was centrifuged at 450 x g for 5 min at 4°C and supernatant (2 ml) was added on the top of 9 ml of 35% sucrose cushion in ultracentrifugation tubes (Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA, USA). Plasma membrane fractions were sedimented by ultracentrifugation at 150,000 x g for 90 min at 4°C and pellet membrane was resuspended in 1 ml of ice cold buffer: 50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, and a protease inhibitor cocktail, then incubated with or without melatonin (10⁻⁷M) for 1 h at 25°C. Membranes were pelleted by centrifugation at 18,000 x g for 20 min at 4°C. The pellet was washed with ice-cold buffer: 75 mM Tris (pH 7.4), 12 mM MgCl₂, 2 mM EDTA and a protease inhibitor cocktail, and then resuspended in the same buffer containing 1% Triton X-100, and agitated overnight at 4°C. Non-solubilized membrane proteins were removed by centrifugation at 18,000 x g for 20 min at 4°C. Protein determination was made by the method of Bradford using BioRad protein assay reagents (BioRad, Mississauga, ON, Canada). The Triton X-100 concentration was adjusted to 0,2% and human MT2 antibodies were added to a final dilution of 1:80. Extracts were incubated for 18 h at 4°C with continuous gentle mixing. During the last 6 h, 50 µl of a 50% (v/v) Protein A-agarose suspension were added. After centrifugation for 1 min at 5000 x g, supernatants were decanted and the agarose beads washed five times with 1 ml of ice-cold buffer: 75 mM Tris (pH 7.4), 12 mM MgCl₂, 2 mM EDTA protease inhibitor cocktail, and 0,05% Triton X-100.

Identification of Gi protein coupled to the human MT2 receptor. Membranes (100 µg protein) from first passage human osteoblasts were incubated with or without melatonin (10⁻⁷M) for 1 h at 25°C. For ligand-stimulated samples, all subsequent steps were performed in the continued presence of ligand. Receptor were solubilized and precipitated with MT2 specific antibodies as described above. G proteins were dissociated from immune complexes by treatments with Gpp(NH)p (0.1mM) for 1 h at 37°C. Supernatants were harvested and re-incubated with protein A-agarose to remove residual IgGs. Proteins in the supernatant were precipitated with trichloroacetic acid (33% final concentration, Sigma), 30 min at 4°C. The precipitate was centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C. Pellets were washed twice with 5% TCA solution then once with ice-cold acetone, dried and denaturated in 70 mM Tris/HCl (pH 6.8), 2%

SDS, 4 M urea, 40 mM dithiothreitol, 10% glycerol and 0,05% bromophenol blue for 5 min at 80°C. Samples were subjected to 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose and immunoblotted using antisera specific for different G protein subunit (1:400 dilution of primary antibodies; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:10,000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, BioSource Inc. Camarillo, CA, USA). Reactive bands were visualized using an enhanced chemiluminescent kit (BM Chemiluminescent blotting substrate POD) according to the manufacturer's specifications (Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN, USA). Nitrocellulose membranes were immunoblotted to detect the presence of phosphorylated Gi proteins coupled to MT2 receptor using anti-phosphoserine (Sigma), anti-phosphothreonine (Sigma) or anti-phosphotyrosine antibodies (kind gift from Dr Mounib Elchebly, Université de Montréal).

Statistical analysis. Results from the cAMP accumulation assays are given as the mean (pmoles/10⁵ cells) ± SEM. A non-parametric test, the Sign test, was used to verify the significance between 2 means. Significance was defined as $P < 0.05$, and data were analyzed with StatView and Statistica softwares.

RESULTS

Our results define for the first time a dysfunction of melatonin signaling in bone-forming cells of AIS patients. Except from AIS osteoblasts, melatonin produced an inhibition of forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity detectable by a reduction of cAMP levels of about 60-70% (**Fig. 1-2**). In contrast, osteoblasts from patients with AIS showed a lack or a markedly reduced inhibition of forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity by melatonin (**Fig. 1-2**). Interestingly, osteoblasts isolated from AIS patients displayed three types of response in presence of varying concentrations of melatonin, which allowed a classification of AIS patients into 3 groups using this functional assay (**Fig. 2** and **Table 4**). In the first group, addition of melatonin increased cAMP accumulation in treated osteoblasts, which contrasted with the normal inhibitory values obtained with control subjects (**Fig. 2**) and those reported in the literature in many cell

lines. In the second group, osteoblasts from AIS patients did not respond to melatonin treatments even at pharmacological dose (10^{-7}M) or higher (10^{-5}M). Finally, the third group showed only a weak response toward melatonin treatment, although at physiological dose (10^{-9}M) no significant inhibition was measured. Basal and forskolin-induced cAMP values are reported for each AIS patient and control subject in **Table 3**. Comparison of basal and induced cAMP levels revealed increased values for basal cAMP in groups 2 and 3 while values for forskolin-stimulated cAMP levels were especially elevated in groups 1 and 3 (**Table 4**). Interestingly, analysis of cAMP levels in presence of a physiological dose of melatonin (10^{-9}M) revealed for AIS patients in group 1 and 2 a significant increase when compared with those obtained in group 3 and control subjects with *P*-values of 0,023 and 0,001 respectively (**Table 4**). However, analysis of clinical variables present in each AIS groups showed no significant association due to the limited number of patients in each group.

Determination of melatonin receptors MT1 and MT2 localization and function.

IHC assays performed with specific antibodies were performed to assess whether the dysfunction of melatonin signaling observed could be secondary to either a reduced level of melatonin receptors or to mutation affecting their functions. Comparison of individual melatonin receptor subtype allowed determining their respective localization in osteoblasts isolated from AIS patients and control subjects tested (**Fig. 3**). So far, no significant variation was observed in the localization or distribution of MT1 and MT2 receptor by confocal microscopy. In addition, results obtained by radioligand-binding assays with 2- ^{125}I -iodomelatonin indicated no alteration in ligand-receptor interaction (data not shown).

Analysis of Gi proteins functionality and coupling to melatonin receptor subtypes.

In vitro assays with Gpp(NH)p reduced cAMP levels in osteoblasts from control subjects in contrast to patients with AIS tested, which showed no inhibitory effect for a majority of AIS patients. The distribution of single data points obtained from each patient is reported in **Figure 4**. The values reported in **Figure 4** were detected after the administration of 10^{-7}M Gpp(NH)p, a GTP non-hydrolysable analogue. The results indicated that about 50% of AIS patients and those suffering of congenital scoliosis did

not show an inhibition of cAMP accumulation induced by forskolin in presence of increasing doses of Gpp(NH)p, which contrasted with the inhibitory curves generated with the osteoblasts from control subjects (data not shown). Co-immunoprecipitation assays with MT1 and MT2 antibodies reacting with individual melatonin receptor subtype showed a predominant coupling of Gi₃ proteins with the MT2 receptor subtype in purified osteoblast membrane fractions treated or not with melatonin (**Fig. 5 lanes 9, 10 and Fig. 6 lanes 11, 12**). Interestingly, Western blot analysis with Gi₁₋₃ antibodies revealed the presence of two immunoreactive bands, 43 kDa and 60 kDa, corresponding to the unphosphorylated and phosphorylated form of individual Gi protein respectively. Immunodetection assay with specific antibodies reacting with phosphoproteins were performed and confirmed the presence of at least one phosphoserine residue in 60 kDa Gi proteins (**Fig. 7**). Interestingly, similar assays with osteoblasts isolated from AIS patients revealed distinct phosphorylation patterns with and without melatonin addition (**Fig. 5 lanes 1, 2, 5, 6, 9, 10 and Fig. 6 lanes 1, 2, 6, 7, 11, 12**). Treatments of osteoblasts cultures with kinase or phosphatase inhibitors revealed that phosphorylation of serine residues in Gi proteins is indirectly modulated by a tyrosine kinase since treatments with genistein or herbimycin, two tyrosine kinase inhibitors, abrogated the formation of the 60 kDa Gi proteins in control cells (**Fig. 7 lane 4**). However, these inhibitors did not suppress Gi protein phosphorylation in osteoblasts isolated from AIS patients (**Fig. 5 lanes 4, 8, 12 and Fig. 6 lanes 4, 5, 9, 10, 14, 15**). Western blot analysis performed with respective membrane fractions using antibodies reacting against individual Gi proteins did not reveal any significant variation in the level of the three Gi proteins present in human osteoblast prior immunoprecipitation (data not shown).

DISCUSSION

At present there is no widely accepted model for the AIS pathogenesis. Nonetheless, the hypothesis of melatonin deficiency attracted much attention mainly due to the striking similarities in the spine deformation generated in pinealectomized animal models. However, the role of melatonin remains highly controversial due to the accumulation of conflicting reports originating from studies with AIS patients or animal models. These considerations led us to look beyond the melatonin deficiency hypothesis to investigate whether melatonin signal transduction is impaired in AIS. Indeed, it is conceivable that any mutation interfering with the normal signal transduction of melatonin could induce a scoliosis like a melatonin deficiency. Taking into account these considerations, we have demonstrated that the osteoblasts from patients with AIS showed hardly any capability to inhibit forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity in response to melatonin, clearly indicating an impairment of melatonin signaling in AIS. Determination of cAMP inhibitory curves in presence of melatonin allowed a functional classification of AIS patients into 3 groups based upon their responsiveness toward melatonin signal (**Fig. 2** and **Table 4**). Comparison of AIS patients with those with congenital scoliosis showed no significant variation in those assays suggesting a possible link between AIS and some type of congenital scoliosis. This observation is further supported by the work of Purkiss *et al.*, that reported a high rate of idiopathic scoliosis (17,3%) in families affected by congenital scoliosis³⁷. The authors of that study raised the possibility that one genetic defect can cause or predispose to the development of either a dysostosis (congenital scoliosis) or a dysplasia (idiopathic scoliosis) involving the spine. It cannot be ruled-out that both disorders could be caused by two gene defects, one for AIS and one for congenital scoliosis, which could both interfere with the normal signal transduction of melatonin. In the case of AIS, the great phenotypic heterogeneity observed is most likely caused by more than one gene defect directly or indirectly interfering with melatonin signal transduction. Such assumption is further supported experimentally by our functional assays demonstrating at least three types of response in cAMP assays with melatonin in AIS patients tested and the fact that different loci of susceptibility have been already identified in humans^{2;23;32;33;48}. Taken together these data strongly indicate that more than one gene is involved in AIS

etiopathogenesis. Furthermore, the detection of a melatonin signaling dysfunction in osteoblasts isolated from AIS patients strongly argue in favor of a cell autonomous defect involved in AIS rather than a consequence caused by that condition.

Mechanisms underlying a melatonin-signaling dysfunction in AIS. Melatonin receptors are unlikely involved in such dysfunction since experimentally we did not observed any type of alteration in the distribution or function of both melatonin receptor. Furthermore, natural and engineered mutations in single or both melatonin receptors did not lead to the formation of a scoliosis in mice and hamsters⁴⁷. Nonetheless, the quadripedal condition of those animals could prevent or reduce the formation of a spinal deformity caused by mutations in those receptors^{18;22;27;39}. The impaired capability to inhibit forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity even in presence of Gpp(NH)p, a non-hydrolysable GTP analogue, indicated that the apparent impairment of melatonin signaling could be rather caused by a reduced functionality of Gi proteins as evidenced at least for 50% of AIS patients tested. It is well known that Gi protein activation by this non-hydrolysable GTP analogue inhibits the production of cAMP^{10;26;36;38;43}. Therefore, a deficiency of the Gi protein-mediated inhibitory system could be the cause of the dysfunction in melatonin signal transduction in osteoblasts from patients with AIS (Fig. 4). Considering the multiplicity of GTP-binding proteins present in osteoblasts²⁴, it remains unlikely that one particular G-protein is involved in such defect. However, the use of that non-hydrolysable GTP analogue is of interest owing to a preferential affinity of Gpp(NH)p towards Gi proteins in the range of concentrations used has been evidenced^{17;19}, and the fact that Gi proteins are commonly 10 times more abundant than Gs in a variety of cells and tissues²⁴. It cannot be ruled-out that changes in Gi proteins affinity for GTP and Gpp(NH)p could be also triggered by post-translational modifications of Gi proteins involving serine residues phosphorylation. Phosphorylation of Gi proteins at their N-terminus is well know to block the formation of functional heterotrimers with G β and G γ subunits preventing the inhibition of adenylyl cyclase activity either in presence of melatonin or Gpp(NH)p¹³. Interestingly, the detection of only phosphorylated forms of Gi proteins coupled to MT2 receptors further support the involvement of aberrant post-translational modifications inactivating Gi protein function as shown in osteoblasts isolated from three distinct AIS

patients (Fig. 5-6). Results obtained with tyrosine kinase inhibitors, genistein or herbimycin, suggested that increased phosphorylation of Gi proteins could be caused by the loss-of-function of a phosphatase that remains to be determined. It cannot be ruled-out that activating mutations either in a tyrosine kinase or a downstream serine kinase could generate also a similar effect. Taken together these results could provide a plausible mechanism whereby higher levels of cAMP were detected in osteoblasts isolated from AIS patients. The accumulation of high levels of cAMP in osteoblasts is known to suppress osteoblastic function through proteolytic degradation of Cbfa1/Runx2, a key transcription factor essential for the formation of bone⁴².

Is bone the only tissue where melatonin signal transduction is impaired in AIS?

We began our analysis of melatonin signaling with osteoblasts not only because bone tissue is well known to respond to melatonin *in vitro* and *in vivo*^{12;35;40}, but also because the persistent osteopenia often observed in AIS patients and in pinealectomized animals suggested that bone tissue is particularly affected in AIS^{3;14;16;21}. More recently, the histomorphometric data of Cheng *et al.*, on iliac crest biopsies and vertebrae of scoliotic patients showed that the osteoblasts and osteoclasts, the two bone-forming cell types, are impaired in their differentiation and/or functions in patients with AIS¹⁵. However, it is unlikely that bone is the only tissue affected in AIS patients since melatonin signaling activities have been demonstrated in many tissues and systems. Preliminary data obtained by similar assays with skeletal myoblasts, isolated from the same pool of patients and control subjects, revealed that melatonin signaling is also impaired in muscle cells from patients with AIS (Moreau *et al.*, manuscript in preparation). In that perspective, it will be important to assess the contribution of each individual tissue and system where this neuro-hormone exerts its function to determine whether or not AIS pathogenesis is triggered by a systemic defect in melatonin signaling and the causes of such dysfunction.

Tables

Table 3.1: Clinical data on patients with adolescent idiopathic scoliosis (AIS).

Case	Diagnosis	Curve Pattern	Gender	Age at surgery	Cobb Angle	Heredity
1	AIS	L lumbar	M	16,5	45	daughter of cousin (f)
2	AIS	L thoracolumbar	F	16,0	37	aunt
3	AIS	L thoracolumbar	F	17,0	47	No
4	AIS	L thoracolumbar	F	18,0	50	na
5	AIS	R thoracic	M	16,0	49	No
6	AIS	R thoracic	M	15,5	48	No
7	AIS	R thoracic	M	13,5	75	No
8	AIS	R thoracic	F	15,0	54	mother / aunt (maternal)
9	AIS	R thoracic	F	15,0	30	mother
10	AIS	R thoracic	F	16,5	57	sister
11	AIS	R thoracic	F	12,5	67	aunt / cousin (f)
12	AIS	R thoracic	F	17,5	53	aunt
13	AIS	R thoracic	F	15,5	53	No
14	AIS	R thoracic	F	18,5	34	No
15	AIS	R thoracic	F	14,0	61	No
16	AIS	R thoracic	F	13,0	48	No
17	AIS	R thoracic	F	16,5	60	No
18	AIS	R thoracic	F	15,0	67	No
19	AIS	R thoracic	F	15,0	30	No
20	AIS	R thoracic	F	14,5	32	No
21	AIS	R thoracic	F	16,0	43	No
22	AIS	R thoracolumbar	M	18,5	61	mother
23	AIS	R thoracolumbar	F	14,0	50	father
24	AIS	R/L double scoliosis	M	17,5	46-30	cousin (f)
25	AIS	R/L double scoliosis	M	17,0	70-50	No
26	AIS	R/L double scoliosis	F	14,0	70-48	mother / brother
27	AIS	R/L double scoliosis	F	13,0	53-55	grand-mother (paternal)
28	AIS	R/L double scoliosis	F	15,0	41-50	mother
29	AIS	R/L double scoliosis	F	16,5	51-30	No
30	AIS	R/L double scoliosis	F	19,0	29-35	No
31	AIS	R/L double scoliosis	F	14,5	57-65	No
32	AIS	R/L double scoliosis	F	19,0	45-60	No
33	AIS	R/L double scoliosis	F	12,0	74-56	No
34	AIS	R/L double scoliosis	F	11,5	57-38	No
35	AIS	R/L double scoliosis	F	18,5	23-35	No
36	AIS	R/L double scoliosis	F	14,5	90-66	No
37	AIS	R/L double scoliosis	F	12,5	61-46	No
38	AIS	R/L double scoliosis	F	15,0	90-90	No
39	AIS	R/L double scoliosis	F	14,5	56-53	No
40	AIS	R/L double scoliosis	F	13,5	48-42	No
41	AIS	R/L double scoliosis	F	13,0	59-57	No

R, right ; L, left

Table 3.2: Clinical data on control subjects.

Case	Diagnosis	Curve Pattern	Gender	Age at surgery	Cobb Angle	Heredity
42	Congenital	L lumbar	F	18,5	53	No
43	Congenital	R thoracic	M	14,0	45	No
44	Congenital	R thoracic	M	13,0	70	No
45	Congenital	R thoracic	F	7,5	75	No
46	Cancer / spine	none	F	10,0	0	No
47	Cancer / spine	L thoracic	F	16,5	19	No
48	Arnold-Chiari malformation	L thoracic	M	20,0	51	father
49	DMD	none	M	14,0	0	No
50	Cerebral Paralysis	R/L double scoliosis	M	17,5	60-30	No
51	Marfan	L thoracolumbar	F	19,5	38	No
52	Marfan / spondylo	R/L double scoliosis	F	13,0	0	mother
53	Neurofibromatosis	R thoracolumbar	F	16,0	115	No
54	Noonan Syndrome	R thoracic	F	19,0	49	No
55	spondylo	L lumbar	F	19,0	0	No
56	spondylo	R lumbar	F	16,5	0	No
57	spondylo	R thoracolumbar	M	14,5	0	No
58	Post traumatic kyphosis	R thoracic	F	18,0	40	No

R, right ; L, left

Table 3.3: Basal and induced cAMP values measured in osteoblasts isolated from patients with AIS and control subjects.

Case	Basal cAMP	Induced cAMP	Case	Basal cAMP	Induced cAMP
1	0,01	12,06	30	0,28	5,39
2	2,01	21,77	31	1,20	63,40
3	0,10	15,84	32	0,10	11,49
4	0,16	3,81	33	0,10	11,47
5	0,10	24,52	34	0,10	14,64
6	0,01	3,50	35	0,41	2,30
7	0,01	11,90	36	0,36	4,84
8	0,10	16,36	37	0,23	27,28
9	0,10	19,85	38	0,20	26,53
10	0,40	12,20	39	0,01	17,04
11	0,88	48,95	40	0,48	4,94
12	0,26	31,71	41	0,10	24,99
13	0,70	20,37	42	0,01	1,00
14	0,46	61,08	43	0,08	12,26
15	0,01	14,70	44	0,95	55,36
16	0,10	15,84	45	0,10	6,74
17	0,01	13,35	46	0,10	45,34
18	0,03	3,41	47	0,12	19,55
19	0,40	16,78	48	0,32	15,19
20	0,10	21,20	49	0,16	8,80
21	0,10	20,81	50	0,10	18,24
22	0,10	22,74	51	0,10	8,00
23	0,90	18,70	52	0,09	15,51
24	0,10	4,45	53	0,10	21,48
25	1,90	67,78	54	0,01	13,97
26	0,03	51,64	55	0,10	15,34
27	0,19	7,25	56	0,10	36,20
28	0,10	9,18	57	0,10	5,95
29	0,10	69,91	58	0,01	9,29

Basal and induced cAMP values are given as pmoles/5x10⁴ cells

Table 3.4: Summary of clinical data present in individual AIS groups.

Patients	Mean Age	Curve type	n	Mean Cobb's angle	Basal cAMP	Induced cAMP	Induced cAMP + melatonin (10^{-9} M)
<u>Group 1</u>							
M 43%	17,5	Thoracic	3	44			
F 57%	16,0	Double scoliosis	2	49-30			
		Thoracolumbar	2	56	0,11	23,09	42,5*
		Lumbar	0	na			
<u>Group 2</u>							
M 10%	14,5	Thoracic	9	56			
F 90%	15,5	Double scoliosis	9	55-51			
		Thoracolumbar	2	41	0,31	15,62	17,9*
		Lumbar	0	na			
<u>Group 3</u>							
M 14%	17,0	Thoracic	5	45			
F 86%	14,5	Double scoliosis	7	61-55			
		Thoracolumbar	1	50	0,40	24,85	19,10*
		Lumbar	1	45			
<u>Congenital scoliosis</u>							
M 50%	13,5	Thoracic	3	63			
F 50%	13,0	Double scoliosis	0	na			
		Thoracolumbar	0	na	0,29	18,85	16,1
		Lumbar	1	53			
<u>Control</u>							
M 31%	16,5	Thoracic	4	40			
F 69%	16,5	Double scoliosis	2	60-30			
		Thoracolumbar	3	77	0,10	16,72	15,20*
		Lumbar	2	na			
		none	2	na			

R, right ; L, left ; na, not available ; cAMP values are given as pmoles/ 5×10^4 cells

*Statistical significance : group 1 vs group 3 (P -value = 0,023) ; group 1 vs contrl (P -value = 0,023) ; group 2 vs group 3 (P -value = 0,001) and group 2 vs control (P -value = 0,001).

Figures

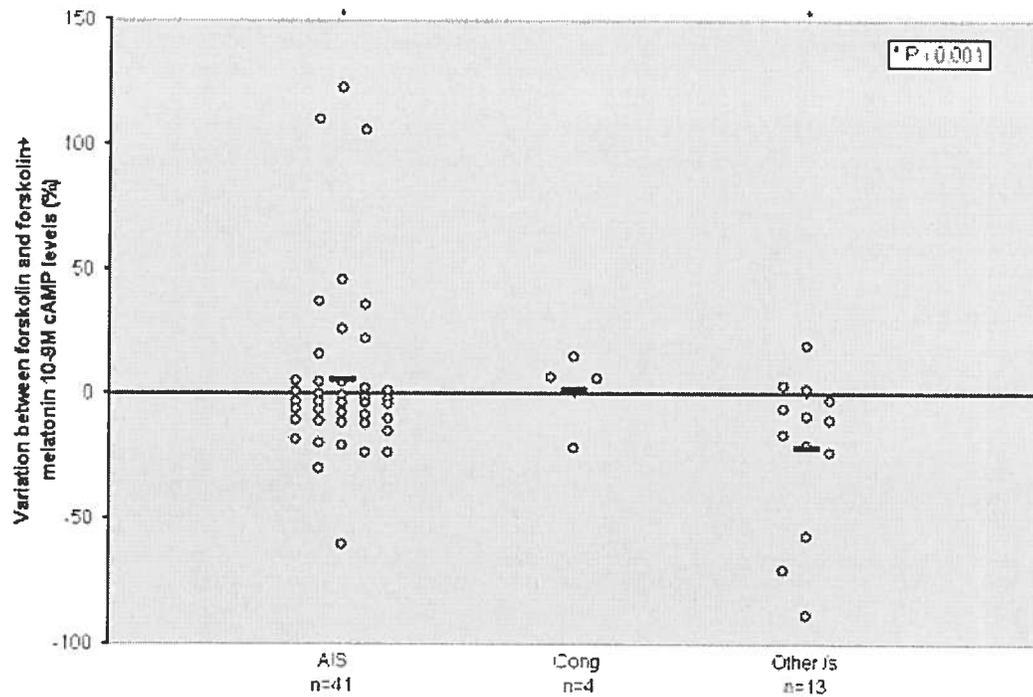


Figure 3.1: Evaluation of melatonin inhibitory effect on adenylyl cyclase activity in human osteoblasts.

Distribution of single data points obtained for each AIS patients and control subjects (congenital scoliosis, cong; and other scoliotic type, other/s) tested at physiological dose of melatonin (10^{-9} M) on forskolin-stimulated osteoblasts. The black bars represent the mean of each group.

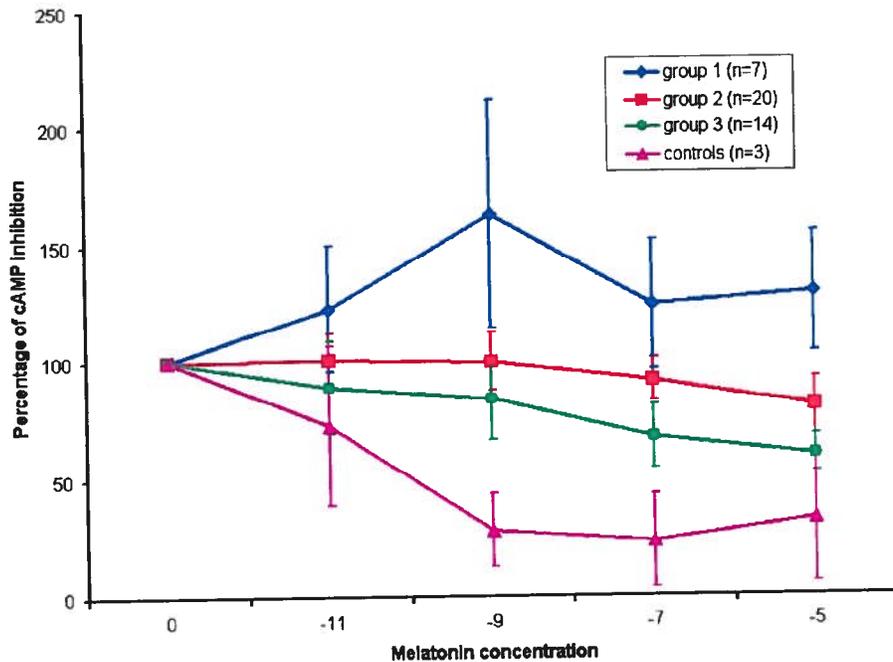


Figure 3.2: Evaluation of melatonin inhibitory effect on adenylyl cyclase activity in human osteoblasts.

Representative experiments showing the effect of increasing concentrations of melatonin (10^{-11} M to 10^{-5} M) on forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity in osteoblasts from control subject and patients with AIS (group 1, 2 and 3). Data are expressed as mean \pm SEM.

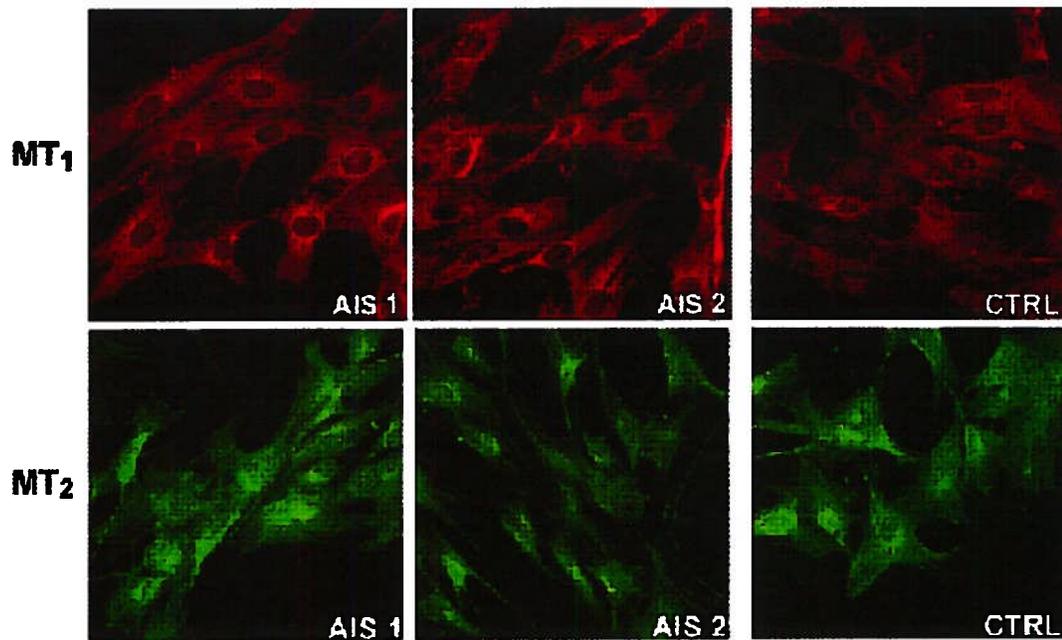


Figure 3.3: Detection of MT1 and MT2 melatonin receptors in human osteoblasts. Panels illustrate representative IHC experiments performed with MT1 receptor antibodies (upper panels) and MT2 receptor antibodies (lower panels) on primary human osteoblast cultures prepared from patients with AIS (AIS1-2) and compared with a control subjects. Note that in both cases no significant change was observed between subjects analyzed. Magnification 63X using a Zeiss LSM 510 confocal microscope.

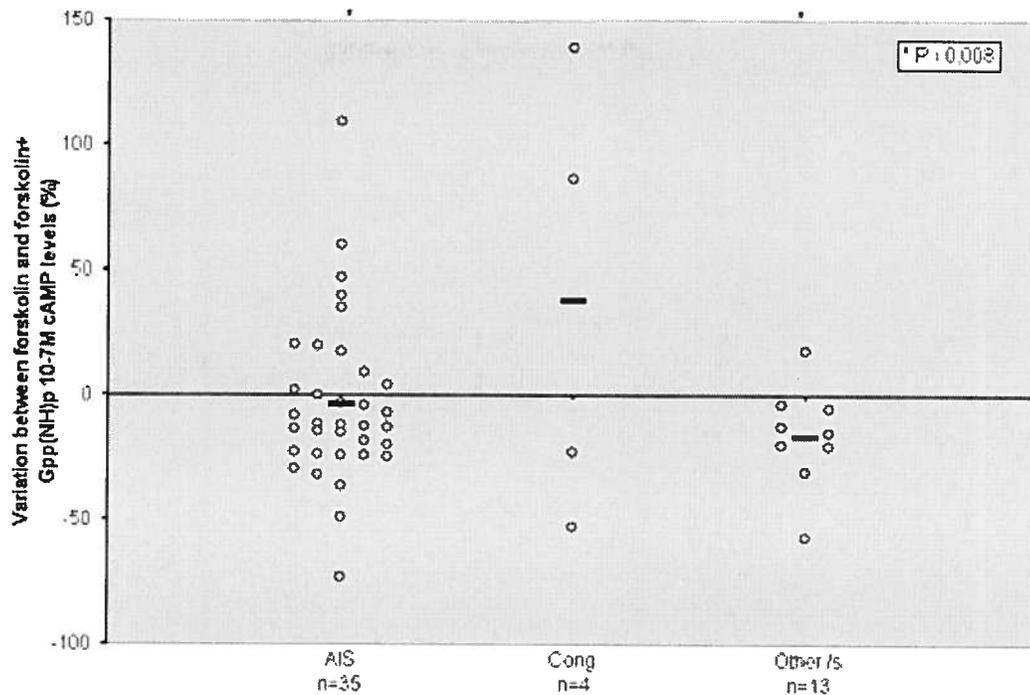


Figure 3.4: Evaluation of Gpp(NH)p inhibitory effect on adenylyl cyclase activity in human osteoblasts.

Distribution of single data points obtained for each AIS patients and control subjects in presence of Gpp(NH)p (10^{-9} M) on forskolin-stimulated osteoblasts. The black bars represent the mean of each group.

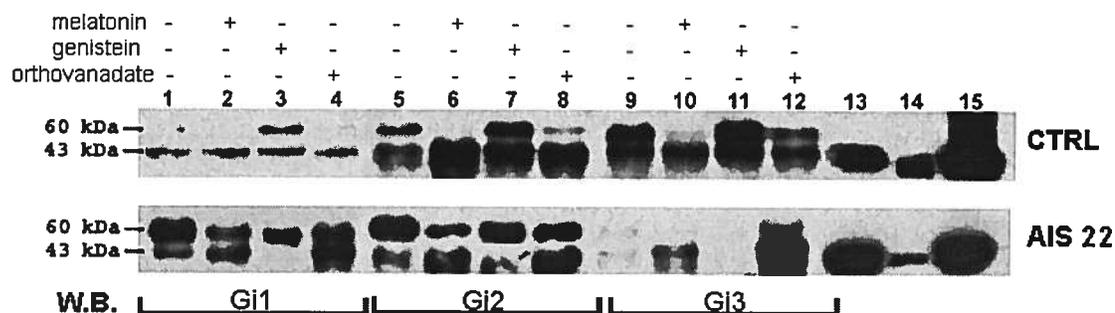


Figure 3.5: Detection of Gi proteins coupled to MT2 receptors.

Co-immunoprecipitation assays were performed with specific anti-MT2 antibodies using purified membrane fractions prepared from human MG-63 osteoblast culture (**panel A**) and osteoblast cultures from AIS patient (case 22, **panel B**) treated overnight in different conditions: Lanes 1, 5, 9) untreated; lanes 2, 6, 10) with melatonin; lanes 3, 7, 11) with Na_3VO_4 , a tyrosine phosphatase inhibitor; and lanes 4, 8, 12) with genistein, a tyrosine kinase inhibitor. Immunoblots were revealed with specific antibodies reacting with individual Gi with the exception of anti-Gi₃ antibodies, which cross-react also with human Gi₁ proteins. Lanes 1-4 with anti-Gi₁; lanes 5-8 with anti-Gi₂ and lanes 9-12 with anti-Gi₃. Lanes 13-15 correspond to purified recombinant Gi₁₋₃ proteins respectively and were used as control for antibody specificity. The 60 kDa and 43 kDa bands correspond to the phosphorylated (inactive) and unphosphorylated (active) forms of Gi proteins respectively. Note the changes in the phosphorylation patterns occurring in Gi proteins from AIS patient, showing increased phosphorylation and distinct regulation by kinase and phosphatase inhibitors tested.

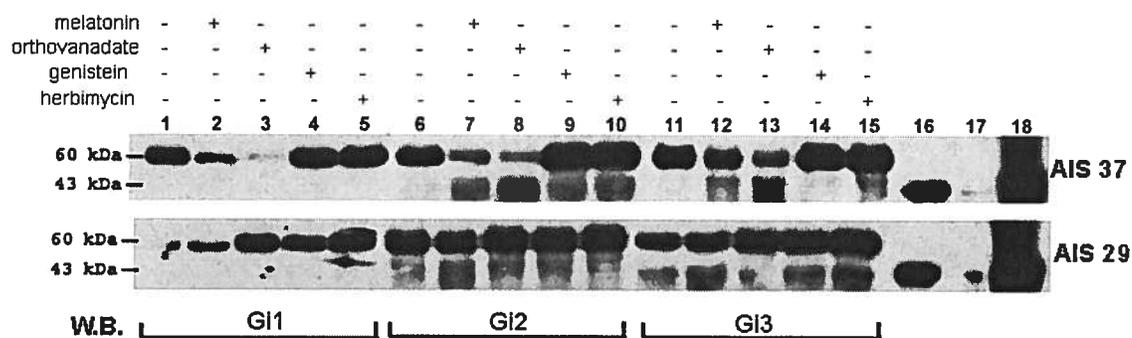


Figure 3.6: Immunodetection of Gi proteins coupled to MT2 receptors in AIS.

Co-immunoprecipitation assays were performed with specific anti-MT2 antibodies using purified membrane fractions prepared from human osteoblast cultures isolated from AIS patient (**panel A**, case 37; **panel B**, case 29) treated overnight in different conditions: Lanes 1, 6, 11) untreated; lanes 2, 7, 12) with melatonin; lanes 3, 8, 13) with Na_3VO_4 , a tyrosine phosphatase inhibitor; lanes 4, 9, 14) with genistein, a tyrosine kinase inhibitor; and lanes 5, 10, 15) with herbimycin, another tyrosine kinase inhibitor. Immunoblots were revealed with specific antibodies reacting with individual Gi with the exception of anti-Gi₃ antibodies, which cross-react also with human Gi₁ proteins. Lanes 1-5 with anti-Gi₁; lanes 6-10 with anti-Gi₂ and lanes 11-15 with anti-Gi₃. Lanes 16-18 correspond to purified recombinant Gi₁₋₃ proteins respectively and were used as control for antibody specificity. The 60 kDa and 43 kDa bands correspond to the phosphorylated (inactive) and unphosphorylated (active) forms of Gi proteins respectively. Note that both AIS patients show a predominant coupling with phosphorylated Gi proteins.

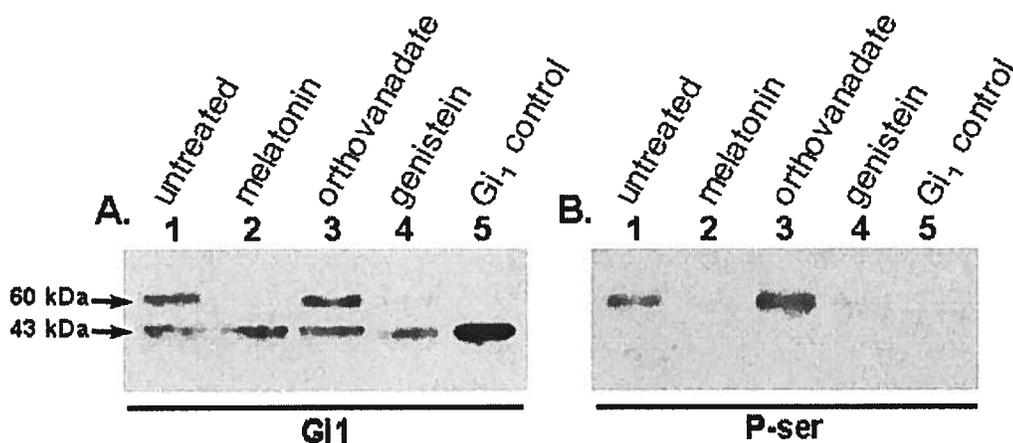


Figure 3.7: Detection of phosphoserine residues in phosphorylated Gi proteins.

Co-immunoprecipitation assays were performed with specific anti-MT2 antibodies using purified membrane fractions prepared from human MG-63 osteoblast cultures and immunoblot was revealed with specific antibodies reacting with anti-Gi₁ antibodies (**panel A**). Then, the immunoblot performed with MG-63 (control osteoblasts) was stripped and re-probed with antibodies recognizing phosphoserine residues (**panel B**). Numbering corresponds to cell cultures conditions: 1) untreated; 2) with melatonin; 3) with Na₃VO₄, a tyrosine phosphatase inhibitor; and 4) with genistein, a tyrosine kinase inhibitor. Lane 5 in both panels corresponds to purified recombinant Gi₁ proteins used as control. Note that only the 60 kDa forms (lanes 1 and 3) were detected with anti-phosphoserine antibodies while addition of melatonin (lane 2) or genistein (lane 4), a tyrosine kinase inhibitor, abrogate the formation of phosphorylated Gi proteins.

Acknowledgments

The authors thank the subjects and families who participated in this study and the physicians who referred the subjects. Thanks are also owed to Ms. Kareen Letellier, Mrs. Julie Joncas and Mrs. Ginette Lacroix for their technical support and helpful assistance. This work was supported by a research grant from the Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France to A.M. and H.L. and also from Start-up funds from the Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine to A.M.

This work was supported by a research grant from La Fondation Yves Cotrel de l'Institut de France (to A.M. and H.L.)

Reference List

1. Angeloni D, Longhi R, and Frascini 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.
2. Axenovich TI, Zaidman AM, Zorkoltseva IV et al. Segregation analysis of idiopathic scoliosis: demonstration of a major gene effect. *Am.J.Med.Genet.* 1999;86:389-94.
3. Bagnall K, Raso VJ, Moreau M et al. The effects of melatonin therapy on the development of scoliosis after pinealectomy in the chicken. *J.Bone Joint Surg.Am.* 1999;81:191-9.
4. Bagnall KM, Beuerlein M, Johnson P et al. Pineal transplantation after pinealectomy in young chickens has no effect on the development of scoliosis. *Spine* 2001;26:1022-7.
5. Bagnall KM, Raso VJ, Hill DL et al. Melatonin levels in idiopathic scoliosis. Diurnal and nocturnal serum melatonin levels in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996;21:1974-8.
6. Beuerlein M, Wang X, Moreau M et al. Development of scoliosis following pinealectomy in young chickens is not the result of an artifact of the surgical procedure. *Microsc.Res Tech.* 2001;53:81-6.
7. Beuerlein M, Wilson J, Moreau M et al. The critical stage of pinealectomy surgery after which scoliosis is produced in young chickens. *Spine* 2001;26:237-40.
8. Blank RD, Raggio CL, Giampietro PF et al. A genomic approach to scoliosis pathogenesis. *Lupus* 1999;8:356-60.
9. Brodner W, Krepler P, Nicolakis M et al. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis. *J.Bone Joint Surg.Br.* 2000;82:399-403.
10. Brydon L, Roka F, Petit L et al. Dual signaling of human Mella melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol.Endocrinol.* 1999;13:2025-38.

11. Byrd JA, III. Current theories on the etiology of idiopathic scoliosis. *Clin.Orthop.* 1988;114-9.
12. Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V et al. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* 2003;34:81-7.
13. Chen CA and Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* 2001;20:1643-52.
14. Cheng JC, Guo X, and Sher AH. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A longitudinal follow up study [see comments]. *Spine* 1999;24:1218-22.
15. Cheng JC, Tang SP, Guo X et al. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a histomorphometric study. *Spine* 2001;26:E19-E23.
16. Courtois I, Collet P, Mouilleseaux B et al. Bone mineral density at the femur and lumbar spine in a population of young women treated for scoliosis in adolescence. *Rev.Rhum.Engl.Ed* 1999;66:705-10.
17. Cowburn RF, O'Neill C, Ravid R et al. Preservation of Gi-protein inhibited adenylyl cyclase activity in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci.Lett.* 1992;141:16-20.
18. Ebihara S, Marks T, Hudson DJ et al. Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 1986;231:491-3.
19. Feldman RD. Insulin-mediated sensitization of adenylyl cyclase activation. *Br.J.Pharmacol.* 1993;110:1640-7.
20. Giampietro PF, Raggio CL, and Blank RD. Synteny-defined candidate genes for congenital and idiopathic scoliosis. *Am.J.Med.Genet.* 1999;83:164-77.
21. Hans D, Biot B, Schott AM et al. No diffuse osteoporosis in lumbar scoliosis but lower femoral bone density on the convexity. *Bone* 1996;18:15-7.
22. Jin X, von Gall C, Pieschl RL et al. Targeted disruption of the mouse Mel(1b) melatonin receptor. *Mol. Cell Biol.* 2003;105.
23. Justice CM, Miller NH, Marosy B et al. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* 2003;28:589-94.

24. Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T et al. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 1991;60:349-400.
25. Killian JT, Mayberry S, and Wilkinson L. Current concepts in adolescent idiopathic scoliosis. *Pediatr.Ann.* 1999;28:755-61.
26. Kokkola T and Laitinen JT. Melatonin receptor genes. *Ann.Med.* 1998;30:88-94.
27. Liu C, Weaver DR, Jin X et al. Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 1997;19:91-102.
28. Lowe TG, Edgar M, Margulies JY et al. Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J.Bone Joint Surg.Am.* 2000;82-A:1157-68.
29. Machida M. Cause of idiopathic scoliosis. *Spine* 1999;24:2576-83.
30. Machida M, Murai I, Miyashita Y et al. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats. *Spine* 1999;24:1985-9.
31. McCarrey JR, Abbott UK, Benson DR et al. Genetics of scoliosis in chickens. *J.Hered.* 1981;72:6-10.
32. Miller NH. Genetics of familial idiopathic scoliosis. *Clin.Orthop.* 2002;60-4.
33. Miller NH, Schwab DL, Sponseller PD et al. Characterization of idiopathic scoliosis in a clinically well-defined population. *Clin.Orthop.* 2001;349-57.
34. Muccielli ML, Martinez S, Pattyn A et al. Otlx2, an Otx-related homeobox gene expressed in the pituitary gland and in a restricted pattern in the forebrain. *Mol.Cell Neurosci.* 1996;8:258-71.
35. Nakade O, Koyama H, Arijii H et al. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J.Pineal Res.* 1999;27:106-10.
36. Petit L, Lacroix I, de Coppet P et al. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosine 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem.Pharmacol.* 1999;58:633-9.
37. Purkiss SB, Driscoll B, Cole WG et al. Idiopathic scoliosis in families of children with congenital scoliosis. *Clin.Orthop.* 2002;27-31.

38. Roka F, Brydon L, Waldhoer M et al. Tight association of the human Mel(1a)-melatonin receptor and G(i): precoupling and constitutive activity. *Mol.Pharmacol.* 1999;56:1014-24.
39. Roseboom PH, Namboodiri MA, Zimonjic DB et al. Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase. *Brain Res Mol.Brain Res* 1998;63:189-97.
40. Roth JA, Kim BG, Lin WL et al. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J.Biol.Chem.* 1999;274:22041-7.
41. Sadat-Ali M, al Habdan I, and al Othman A. Adolescent idiopathic scoliosis. Is low melatonin a cause? *Joint Bone Spine* 2000;67:62-4.
42. Tintut, Y., Parhami, F., Le, V., Karsenty, G., and Demer, L. L. Inhibition of Osteoblast-specific Transcription Factor Cbfa1 by the cAMP Pathway in Osteoblastic Cells. *J Biol Chem* 274(41), 28875-28879. 1999. Ref Type: Abstract
43. Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev.* 1998;78:687-721.
44. Veldhuizen AG, Wever DJ, and Webb PJ. The aetiology of idiopathic scoliosis: biomechanical and neuromuscular factors. *Eur.Spine J.* 2000;9:178-84.
45. Wang X, Jiang H, Raso J et al. Characterization of the scoliosis that develops after pinealectomy in the chicken and comparison with adolescent idiopathic scoliosis in humans. *Spine* 1997;22:2626-35.
46. Wang X, Moreau M, Raso VJ et al. Changes in serum melatonin levels in response to pinealectomy in the chicken and its correlation with development of scoliosis. *Spine* 1998;23:2377-81.
47. Weaver DR, Liu C, and Reppert SM. Nature's knockout: the Mel1b receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol.Endocrinol.* 1996;10:1478-87.
48. Wise CA, Barnes R, Gillum J et al. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2000;25:2372-80.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

4.1 Aspect fondamental

4.1.1 Récepteurs membranaires et couplage des protéines Gi

Il est bien connu que la mélatonine est une hormone régulant de nombreuses fonctions physiologiques dans de nombreux tissus différents. Bien que de récentes études aient suggéré la présence d'une signalisation de la mélatonine dans des lignées cellulaires ostéoblastiques (Nakade & coll., 1999; Roth & coll., 1999; Koyama & coll., 2002 et Suzuki & coll., 2002), les travaux effectués dans le cadre de ce mémoire sont les premiers permettant l'observation directe, par RT-PCR et immunohistochimie (IHC), d'éléments de la signalisation de la mélatonine, tel que les récepteurs MT1 et MT2 et leur couplage aux protéines Gi, dans les ostéoblastes et les ostéoclastes. La présence de ces éléments suggère fortement la présence d'une signalisation de la mélatonine similaire à celle retrouvée dans le tissu nerveux où elle fut largement étudiée pour son rôle de régulateur du cycle circadien (Dubocovich & coll., 1998).

Nos expériences de co-immunoprécipitation nous ont permis d'observer un couplage différentiel des protéines Gi selon le type cellulaire, ostéoblaste versus ostéoclaste, et selon le récepteur membranaire, MT1 versus MT2. L'impact de ce couplage préférentiel sur la signalisation de la mélatonine est encore mal défini mais il laisse toutefois présager une stimulation d'effecteurs possiblement différents et donc des réponses différentes à la mélatonine. À titre d'exemple, la mélatonine stimule la différenciation des ostéoblastes par l'inhibition de l'accumulation d'AMPc, une molécule stimulant la dégradation de Cbfa1/Runx2 (Tintut & coll., 1999), alors qu'au niveau des ostéoclastes l'inhibition de l'AMPc semble agir différemment selon la signalisation impliquée. En effet, l'AMPc peut servir à activer PKA et dans le cas de la signalisation de la calcitonine, PKA est responsable de l'inhibition de l'ostéoclastogenèse (Kajiya et coll., 2003) alors que dans le cas de la signalisation de PTH, PKA est responsable de l'activation des ostéoclastes (Sugimoto et coll., 1993). On note cependant que, de façon générale, le simple ajout de mélatonine aux extraits membranaires des ostéoblastes et des ostéoclastes est suffisant pour causer la perte de la phosphorylation observée sur certaines protéines Gi (figure 2.3). On ne peut affirmer à

ce moment si cette perte est due à l'activation d'une phosphatase ou l'inhibition d'une kinase mais, puisque cette modification survient moins d'une heure après l'ajout de mélatonine aux extraits membranaires, il est plausible de croire que l'enzyme responsable de cette modification post-traductionnelle se situe à la membrane et que sa régulation par la mélatonine survient tôt dans la cascade de signalisation.

4.1.2 Régulation directe de l'activation des ostéoclastes par la mélatonine

Les observations effectuées chez les ostéoclastes suggèrent l'existence d'une signalisation de la mélatonine propre aux ostéoclastes et cette possibilité est un concept relativement nouveau puisque le modèle couramment accepté implique que ce sont les ostéoblastes qui sont responsables de la régulation des ostéoclastes par la synthèse de molécules tel que RANKL et l'ostéoprotégérine (section 1.1.2.2.1).

Néanmoins, l'hypothèse d'une signalisation de la mélatonine chez les ostéoclastes fut récemment mise de l'avant par Suzuki et coll. lors de tests effectués sur un modèle de co-culture ostéoblastes-ostéoclastes à base d'écaillés de poissons rouges et montrant une inhibition de l'activité des deux types de cellules en présence. Leurs conclusions furent d'évoquer la possibilité d'une signalisation de la mélatonine chez les ostéoblastes et les ostéoclastes et le rejet des résultats de Roth et de Nakade, ces derniers montrant une activation des ostéoblastes par la mélatonine, sous prétexte que leur modèle utilisait des ostéoblastes isolées, ce qui néglige l'impact des relations cellule-cellule que l'on retrouve *in vivo*. Ce même prétexte semble toutefois discréditer leur propre conclusion, soit la présence d'une signalisation directe de la mélatonine chez les ostéoclastes, puisque leur modèle de co-culture ne peut faire abstraction de la possibilité que les variations observées dans l'activités des ostéoclastes soient régies par des signaux émanant des ostéoblastes, eux-mêmes directement régulés par la mélatonine. Bref, il apparaît que les travaux de Suzuki et coll. soulèvent un point intéressant, soit la présence d'une signalisation directe de la mélatonine sur les ostéoclastes, mais que cette hypothèse est basée sur un raisonnement erroné.

Les ostéoclastes utilisés dans nos expériences furent dérivés de lymphocytes sanguins et différenciés *in vitro*, limitant ainsi l'intervention des ostéoblastes quoiqu'on

ne puisse exclure totalement la contribution d'autres types cellulaires dans ce système. L'ajout précoce de mélatonine aux cellules précurseurs des ostéoclastes empêche leur différenciation *in vitro*. Cependant, il a été observé que la mélatonine diminuait l'activité de résorption osseuse des ostéoclastes déjà matures et que l'ajout de luzindole bloquait partiellement cet effet de la mélatonine suggérant ainsi une signalisation passant par le récepteur membranaire MT2 (figure 2.5). Ces résultats présentant la mélatonine comme un inhibiteur de l'activation des ostéoclastes sont consistants avec les observations des études de Suzuki et de Koyama. En effet, malgré l'utilisation de modèles différents (*in vivo* pour Koyama, co-culture pour Suzuki, ostéoclastes isolés pour la présente étude), le phénotype général observé dans les trois cas est une inhibition de la fonction de résorption osseuse des ostéoclastes. Cependant, les explications données pour expliquer ce phénotype diffèrent quelque peu d'une équipe à l'autre.

4.1.2.1 Régulation du récepteur RANK

Nos observations semblent indiquer que la régulation négative des ostéoclastes par la mélatonine soit causée par une chute de l'expression du récepteur RANK suite au traitement à la mélatonine (figure 2.6). Le fait qu'un traitement à la mélatonine (10^{-7} M) de seulement 30 minutes soit suffisant pour inhiber l'expression de RANK évoque la possibilité d'une signalisation modulée par les récepteurs membranaires (MT1 et MT2) puisque les effets d'une signalisation passant par des récepteurs intracellulaires (MT3 ou ROR/RZR) nécessite un certain temps pour que la mélatonine puisse d'abord diffuser à l'intérieur de la cellule. Très peu d'informations sont connues au sujet de la régulation du récepteur RANK. Toutefois, de récentes études ont démontré que différentes molécules tel que le TGF β (Yan & coll., 2001), la $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine D₃ (Kido & coll., 2003) et l'interleukine-3 (Arai & coll., 1999) régulaient positivement le récepteur RANK chez les ostéoclastes. Les études de Kido et coll. ont également observé que le ligand lui-même, soit RANKL, avait un effet rétroactif positif sur l'expression du récepteur RANK lorsque les précurseurs ostéoclastiques sont déjà engagés sur la voie de l'ostéoclastogenèse. Malgré les observations précédentes, aucune étude n'a encore été réalisée afin de caractériser le

mécanisme transcriptionnel par lequel ces différentes molécules régulent l'expression de RANK.

Nos résultats montrant une régulation de l'expression de RANK chez les ostéoclastes traités à la mélatonine sont complémentaires à ceux obtenus par Koyama et coll. où il est démontré que l'augmentation de la masse osseuse observée chez les souris traitées à la mélatonine est principalement causée par une diminution de l'activité des ostéoclastes plutôt que par une activation de la synthèse osseuse par les ostéoblastes. Il a également été souligné que l'inhibition de la résorption osseuse par les ostéoclastes avait lieu suite à la surexpression de l'ostéoprotégérine, un récepteur leurre pour RANKL, et l'inhibition de l'expression du ligand RANKL par les ostéoblastes.

Il est donc vraisemblable de croire que la mélatonine inhibe l'activation des ostéoclastes en jouant sur les deux tableaux : d'une part, elle inhibe l'expression du récepteur RANK chez les ostéoclastes et, d'autre part, elle induit la production d'ostéoprotégérine et la sous-expression du ligand RANKL chez les ostéoblastes. Tous ces événements agissant de concert font de la mélatonine un puissant « frein » à la résorption osseuse. Toutefois, il demeure certain que les ostéoclastes sont majoritairement sous le contrôle des ostéoblastes, mais que dans le cas de la mélatonine, il semble que cette hormone puisse moduler directement l'activité des deux types cellulaires indépendamment.

4.2 Aspect clinique

Les avancées de la recherche sur la signalisation de la mélatonine au niveau de la physiologie osseuse semblent attribuer à cette hormone une importance capitale pour la saine régulation de ce tissu. Ainsi, il est envisageable et démontrable qu'une défaillance au niveau des voies de signalisation de la mélatonine exprimées dans le tissu osseux puisse entraîner une pathologie de ce tissu.

4.2.1 Scoliose idiopathique adolescente et mélatonine

Bien que la scoliose idiopathique adolescente soit la déformation rachidienne la plus fréquemment rencontrée par les orthopédistes, son étiologie demeure à ce jour

inconnue. Toutefois, il semble que cette maladie soit en fait un regroupement de causes hétérogènes et que différentes mutations dans divers gènes pourraient mener à la déformation scoliotique observée chez les patients SIA (section 1.3.1).

La communauté scientifique a commencé à s'interroger sur le rôle potentiel de la mélatonine dans la scoliose idiopathique suite aux observations effectuées sur des modèles animaux. En effet, il a été observé qu'une carence en mélatonine conduisait à une déformation du rachis similaire à celle observée chez les patients scoliotiques. Toutefois, l'implication de la mélatonine est remise en doute par certaines données cliniques montrant des niveaux normaux de mélatonine circulante chez les patients SIA (section 3.2.5.1). Ainsi, puisque la production de mélatonine ne semble pas faire défaut chez les patients SIA, il nous est paru logique de se questionner sur la qualité de la transmission de son signal au niveau cellulaire et principalement dans le tissu ciblé à la fois par cette pathologie et par la mélatonine, soit le tissu osseux.

4.2.1.1 Signalisation défaillante

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise ont permis de mettre en évidence, chez tous les patients atteints de SIA testés (41), un défaut de signalisation de la mélatonine. Ce défaut est observable non seulement chez les ostéoblastes mais également au niveau des chondrocytes et des myoblastes, suggérant ainsi une défaillance systémique de la signalisation de la mélatonine. Cette idée est supportée par des observations cliniques nous permettant d'associer de nombreux symptômes mineurs, en comparaison avec la déformation rachidienne, à des systèmes régulés par la mélatonine (figure 1.3). De plus, nos résultats ont permis d'identifier au moins trois types de réponses en présence de mélatonine (figure 3.2) suggérant l'existence de mutations présentant des effets distincts dans une même molécule ou des mutations dans des gènes distincts. Ceci est d'ailleurs corrélé par l'identification, par plusieurs groupes de recherches, de loci de susceptibilité à la SIA dans différents chromosomes humains (Axenovich & coll., 1999; Wise & coll., 2000; Chan & coll., 2002 et Justice & coll., 2003).

Les hypothèses permettant d'expliquer le mécanisme pathogénique entraînant la déformation du rachis ne sont encore qu'au stade de spéculations; d'ailleurs, la caractérisation de la torsion scoliotique comme symptôme principal ou comme conséquence d'un maux plus subtil reste à être faite. Toutefois, la défaillance de la signalisation de la mélatonine nous apparaît comme étant l'élément clé de cette pathologie et le point de départ d'une recherche plus approfondie de l'étiologie de la SIA. Bien que le présent mémoire n'ait pas la prétention d'identifier avec certitude l'une des mutations en cause dans la SIA, il oriente toutefois les recherches sur certains éléments de la signalisation de la mélatonine susceptible de jouer un rôle sur son étiologie.

4.2.1.1.1 Responsabilité des récepteurs MT1 et MT2

Les récepteurs sont les éléments les plus en amont d'une signalisation et une anomalie à ce niveau entraînerait une défaillance majeure de cette signalisation. Toutefois, il semble que les récepteurs MT1 et MT2 ne sont pas en cause dans la SIA puisque des études ont mis en évidence l'absence de mutation dans le récepteur MT1 chez les patients SIA (Morcuende & coll., 2003) et que des mutations naturelles et induites des récepteurs membranaires n'induisaient pas de déformation scoliotique chez le hamster (Weaver & coll., 1996 et Jin & coll., 2003). Il est à noter que la posture quadrupède du hamster atténue le stress biomécanique et pourrait ainsi contribuer à prévenir une déformation évidente du rachis. De plus, les études précédentes ne se sont point intéressées au phénotype osseux engendré par l'inactivation des récepteurs à la mélatonine et ne font mention d'aucune observation particulière à ce sujet; d'autant plus que le diagnostic d'une scoliose chez un animal au rachis aussi flexible que les rongeurs requiert une observation radiographique, ce phénotype a aisément pu passer inaperçu aux yeux de ces groupes de recherche. D'autre part, nos résultats ont montré que même en shuntant les récepteurs MT1 et MT2 avec le Gpp(NH)p, un analogue non-hydrolysable du GTP, la majorité des patients SIA exhibaient toujours une défaillance de la signalisation de la mélatonine (figure 3.4), permettant ainsi de conclure que les récepteurs n'étaient pas impliqués dans ce défaut de signalisation. Cette conclusion est également supportée par nos observations immunohistochimiques soulignant l'absence

de changement dans la localisation et la distribution des récepteurs MT1 et MT2 (figure 3.3), ce qui sous-entend une expression et une traduction normale.

Cependant, il a récemment été découvert que les récepteurs couplés aux protéines G, tel que les récepteurs MT1 et MT2, existent sous la forme de dimères (Ayoub & coll., 2002). Bien que le rôle physiologique de cette dimérisation sur la signalisation de la mélatonine soit encore très incertain, il est plausible d'envisager qu'une dimérisation aberrante des récepteurs pourrait entraîner un défaut dans la signalisation de la mélatonine; toutefois, il semble qu'aucune étude ne se soit attardée à cet aspect fonctionnel de ces récepteurs. Des études comparatives entre des cellules de patients SIA et celles d'individus contrôles, tel que la superposition de clichés IHC acquis par microscopie confocale ou de la co-immunoprécipitation des récepteurs, pourraient servir à démontrer l'état de dimérisation des récepteurs MT1 et MT2 en présence ou en absence de mélatonine et ainsi les mettre en cause ou les exclure définitivement de l'étiologie de la SIA.

4.2.1.1.2 Régulation post-traductionnelle des protéines Gi

La mutation d'une molécule modulant une cascade de signalisation peut avoir des répercussions sur celle-ci. En effet, la défaillance d'un enzyme responsable de la régulation post-traductionnelle d'un des éléments de la signalisation de la mélatonine pourrait entraîner une défaillance de cette dernière.

Dans cette optique, les travaux réalisés dans le cadre de la présente étude nous ont permis d'observer que des formes phosphorylées de protéines Gi étaient préférentiellement couplées aux récepteurs MT2 chez les patients scoliotiques par rapport aux individus contrôles (figures 3.5 et 3.6). Il est connu que la phosphorylation en N-terminal des protéines Gi empêche la formation du trimère fonctionnel $G\alpha\beta\gamma$ et donc bloque la transmission du signal (Chen & coll., 2001). Il apparaît ainsi que, chez les trois patients SIA testés, l'activation constitutive d'une kinase ou encore l'inhibition d'une phosphatase ciblant les protéines Gi pourrait avoir comme conséquence une hyperphosphorylation de ces dernières et ainsi interférer avec la signalisation de la mélatonine contribuant de ce fait au développement de la scoliose chez ces patients.

4.2.2 Ostéopénie et ostéoporose

En plus de l'évidente déformation du rachis des patients scoliotiques, des observations cliniques ont montré que, tôt à l'âge adulte, il arrivait souvent que ces patients souffrent également d'ostéoporose (Cheng & coll., 1999). On peut facilement faire le rapprochement entre l'ostéoporose et la mélatonine par l'observation des souris C57BL/6 qui sont déficientes en synthèse de mélatonine et qui exhibent une faible densité osseuse (von Gall & coll., 2000). Il est donc légitime de croire que la faible densité osseuse des patients SIA soit également provoquée par une défaillance de la signalisation de la mélatonine. Cette hypothèse semble d'autant plus plausible que la littérature a déjà souligné ce lien entre l'ostéoporose et la mélatonine (Sandyk & coll., 1992 et Ostrowska & coll., 2001).

Dans un même ordre d'idée, le déclin naturel de la synthèse de la mélatonine lors du vieillissement (Sack & coll., 1986) pourrait grandement contribuer à l'augmentation de l'incidence d'ostéoporose observée dans ce groupe de population. À la lumière des connaissances scientifiques et des nouvelles données apportées par les présents travaux, il est aisé de croire que l'ostéoporose gériatrique pourrait être en partie provoquée par une hausse de l'activité ostéoclastique elle-même causée par une carence en mélatonine, cette hormone servant de « frein » à la fonction ostéoclastique (section 4.1.2).

La mélatonine pourrait également prévenir d'autres types d'ostéoporose que celle reliée à la SIA ou l'ostéoporose gériatrique. Par exemple, le traitement aux glucocorticoïdes, largement utilisé dans le traitement de plusieurs maladies graves comme la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), comporte des effets secondaires dont le plus pernicieux est probablement la perte de densité osseuse; une perte parfois suffisamment importante pour entraîner une telle augmentation du risque de fracture que les parents des jeunes préfèrent faire cesser le traitement aux glucocorticoïdes. À ce point, on peut imaginer un traitement par lequel ces patients DMD pourraient entreprendre une double thérapie : des glucocorticoïdes agissant contre la maladie et de la mélatonine, ou un dérivé, pour minimiser la perte de masse osseuse associée à la prise

du médicament principal. Bien sûr, il ne s'agit là encore que de spéculations thérapeutiques, mais elles jettent toutefois un regard positif sur les avenues possibles de la caractérisation exhaustive des voies de signalisation de la mélatonine dans le tissu osseux.

4.2.3 Mélatonine et estrogène

Tout comme la mélatonine, les estrogènes ont un effet sur le métabolisme osseux et leurs signalisations respectives interfèrent mutuellement l'une avec l'autre (section 1.3.1). De ce fait, on peut envisager que les estrogènes jouent également un rôle dans l'étiologie de la SIA en atténuant davantage les effets d'une signalisation de la mélatonine déjà défaillante. En effet, on peut se poser des questions sur l'implication des estrogènes dans la SIA suite aux observations cliniques indiquant une incidence quatre fois plus élevée chez les filles que chez les garçons (Shohat & coll., 1988). De plus, on note que les SIA se développent généralement au début de l'adolescence, moment où la production d'estrogène devient plus importante chez les jeunes filles. Ainsi, on peut imaginer que si une même défaillance de la signalisation de la mélatonine affecte deux adolescents de sexe opposé, l'effet antagoniste des estrogènes va atténuer davantage la signalisation de la mélatonine chez la jeune fille et aura pour conséquence d'aggraver le défaut de signalisation et mener à une scoliose idiopathique sévère. On peut croire que les estrogènes atténuent la signalisation de la mélatonine d'une part parce que cette hormone active PKC δ , une kinase impliquée dans la phosphorylation des protéines G et donc de leur inactivation (Qiu & coll., 2003), et d'autre part parce que les estrogènes régulent négativement l'expression de ces mêmes protéines G (Papaioannou & coll., 1999). Ainsi, non seulement les estrogènes font-ils diminuer le nombre de protéines G disponibles pour les récepteurs à mélatonine, mais ces mêmes protéines G sont davantage inactivées par phosphorylation.

Dans un même ordre d'idée, l'interrelation de la mélatonine avec les estrogènes peut également avoir un rôle à jouer dans le phénotype ostéoporotique. Il a été constaté que les rates ovariectomisées subissaient une perte de densité osseuse mais que le traitement à l'estradiol permettait de prévenir cette perte (Sims & coll., 1996). Ce modèle est analogue au phénomène où les femmes ménopausées voient leur risque

d'ostéoporose augmenter alors que leur production d'estrogène diminue drastiquement (Cohen-Solal & coll., 1993). Certaines évidences semblent indiquer que la perte de densité osseuse résultant d'une carence en estrogène serait causée directement (Okabe & coll., 2000) et indirectement (Cohen-Solal & coll., 1993 et Horowitz, 1993) par une activation des ostéoclastes. Ainsi, puisque l'ostéoporose est une condition fréquente chez les femmes âgées, il est facile de croire que la double carence, mélatonine et estrogène, pourrait agir de concert afin d'exacerber le phénotype ostéoporotique par l'activation de la résorption osseuse ; d'une part, la perte des estrogènes stimule la formation des ostéoclastes et d'autre part, la baisse de production de la mélatonine provoque le retrait du « frein » naturel de l'activation ostéoclastique.

Toutefois, un paradoxe difficile à expliquer ressort de ces constatations. En effet, bien que des expérimentations *in vivo* démontrent qu'une carence en mélatonine (von Gall & coll., 2000) ou en estrogène (Sims & coll., 1996) conduit à un même phénotype de faible densité osseuse, les études effectuées au niveau moléculaire indiquent que la mélatonine et les estrogènes ont un effet antagoniste mutuel sur leur signalisation. Il apparaît donc que malgré le fait que ces deux signalisations s'inhibent l'une et l'autre, leur effet sur le métabolisme osseux est le même.

4.3 Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce projet dévoilent des faits intéressants et nouveaux tant qu'à la régulation directe des ostéoclastes par la mélatonine et à l'implication possible d'une signalisation défaillante de cette hormone chez les patients SIA. Toutefois, ces nouvelles connaissances suscitent de toutes nouvelles questions autant sur la plan fondamentale que clinique ce qui permet l'ouverture du projet sur différentes avenues.

Puisque très peu de choses sont connues sur la régulation transcriptionnelle de RANK, il pourrait s'avérer intéressant, dans le cadre d'un nouveau projet, de chercher à caractériser la cascade moléculaire initiée par la mélatonine et résultant en une inhibition de l'expression de RANK dans les cellules ostéoclastiques. La caractérisation de la région régulatrice de RANK devrait permettre l'identification de facteurs de

transcription et de sites de liaison sur ce promoteur. La confirmation d'une influence de la mélatonine sur l'expression de RANK dans d'autres types cellulaires où RANK est exprimé, tel que les lymphocytes, permettrait une plus grande latitude lors du choix d'un modèle cellulaire pour l'étude de cette signalisation. En effet, les ostéoclastes sont des cellules qui ne se multiplient pas ce qui rend leur utilisation limitée.

Une des suites logiques de ce projet est l'identification du facteur qui est responsable de la phosphorylation accrue des protéines G chez les patients SIA. Il est concevable qu'un gain de fonction d'une kinase ou la perte de fonction d'une phosphatase puisse être impliqué dans ce processus. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques pour différentes kinases et phosphatases permettrait de déterminer, lors des mêmes tests de co-immunoprécipitation, la nature de l'enzyme défaillante chez les patients SIA observés. L'étape suivante serait de séquencer le gène codant pour l'enzyme en question afin de caractériser la mutation qui l'afflige et les conséquences fonctionnelles qui en découlent.

Un autre aspect qu'il serait pertinent d'investiguer est l'influence des estrogènes sur la signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes et les ostéoclastes. En effet, le fait que davantage de femmes soient affligées par la SIA et l'ostéoporose, deux maladies semblant impliquer la mélatonine, suggère un rôle prépondérant des estrogènes dans ces pathologies osseuses (section 4.2.3). Encore une fois, en reprenant les expériences de co-immunoprécipitation, l'ajout d'estradiol permettrait de voir comment l'intervention des estrogènes dans la signalisation de la mélatonine affecte la phosphorylation des protéines G ou l'abondance de ces dernières.

Toutefois, l'ultime défi demeurera de déterminer comment l'expression aberrante des gènes ciblés par la mélatonine peut conduire à la déformation du rachis telle qu'observée chez les patients atteints de scoliose idiopathique adolescente.

Ainsi, nous croyons qu'une meilleure caractérisation des voies de signalisation de la mélatonine et la détermination de son interrelation avec les estrogènes dans le tissu osseux permettraient d'ouvrir la voie à la recherche de procédés pharmacologiques

permettant une régulation efficace de ce tissu, un tissu beaucoup moins inerte ou fossilisé qu'il fut jadis considéré.

Bibliographie

- Ahl T, Albertsson-Wilklund K et Kalen R. Growth hormone profiles in pubertal girls with idiopathic scoliosis. *Spine* 1988; 13: 139-142.
- Axenovich TI, Zaidman AM, Zorkoltseva IV et coll. Segregation analysis of idiopathic scoliosis: demonstration of a major gene effect. *Am.J.Med.Genet* 1999; 86: 389-394.
- Ayoub MA, Couturier C, Lucas-Meunier E, Angers S, Fossier P, Bouvier M et Jockers R. Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 2002; 277(24): 21522-21528.
- Bagnall K, Raso VJ, Moreau M, Mahood J, Wang X et Zhao J. The effects of melatonin therapy on the development of scoliosis after pinealectomy in the chicken. *J Bone Joint Surg Am* 1999; 81(2): 191-199.
- Beard HK, Roberts S et O'Brien JP. Immunofluorescent staining for collagen and proteoglycan in normal and scoliotic intervertebral discs. *J Joint Bone Surg Br* 1981; 63: 529-534.
- Beguiristain JL, De Salis J, Oriafio A et Canadell J. Experimental scoliosis by epiphysiodesis in pigs. *Int Orthop* 1980; 3(4): 317-321.
- Bouvier M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(4): 274-286.
- 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.
- Buric M et Momcilovic B. Growth pattern and skeletal age in school girls with idiopathic scoliosis. *Clin Orthop* 1982; 170: 238-242.

- 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.
- Chen CA et Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* 2001; 20: 1643-1652.
- Cheng JC, Guo X et Sher AH. Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A longitudinal follow up study. *Spine* 1999; 24: 1218-1222.
- Cheng JC, Tang SP, Guo X et coll. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a histomorphometric study. *Spine* 2001; 26: E19-E23.
- 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.
- 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.
- Cohen-Solal ME, Graulet AM, Denne MA, Gueris J, Baylink D et de Vernejoul MC. Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: involvement of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(6): 1648-1653.
- 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.
- Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S et Sauri DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mella 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.
- Ducy P, Zhang E, Geoffroy V, Ridall A et Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-754.
- Erickson EF, Colvard DS, Berg NG, Graham ML, Mann KG, Spelberg TC et Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; 241: 84-86.
- Franzoso G, Carlson L, Xing L et coll. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Gene Dev* 1997; 11: 3482-3496.
- Geary GG, Krause DN et Duckles SP. Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *Am J Physiol* 1997; 273(3 Pt 2): H1530-H1536.
- Geissele AE, Kransdorf MJ, Geyer CA, Jelinek JS et Van Dam BE. Magnetic resonance of the brain stem in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1991; 16: 761-763.
- Gerber HP, Vu T, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z et Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Gen* 1999; 106: 97-106.
- Ghosh P, Bushell GR, Taylor TK, Pearce RH et Grimmer BJ. Distribution of glycoaminoglycan across the normal and scoliotic disc. *Spine* 1980; 5: 310-317.
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM et Otulakowski G. Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* 1994; 8(5): 538-553.
- Godson C et Reppert SM. The Mella melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1997; 138(1): 397-404.
- Hazlerigg DG, Thompson M, Hastings MH et Morgan PJ. Regulation of mitogen-activated protein kinase in the pars tuberalis of the ovine pituitary: interactions

between melatonin, insulin-like growth factor-1, and forskolin. *Endocrinology* 1996; 137(1): 210-218.

Hilibrand AS, Blakemore LC, Loder RT, Greenfield ML, Farley FA, Hensinger RN et Hariharan M. The role of melatonin in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996; 21(10): 1140-1146.

Ho MK, Yung LY, Chan JS, Chan JH, Wong CS et Wong YH. Galpha(14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *Br J Pharmacol* 2001; 132(7): 1431-1440.

Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 1993; 260(5108): 626-627.

Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR et Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 1996; 2(10): 1132-1136.

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.

Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency: a 1998 update. *Bone* 1998; 23: 75-81.

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.

Kajiya H, Okamoto F, Fukushima H et Okabe K. Calcitonin inhibits proton extrusion in resorbing rat osteoclasts via protein kinase A. *Pflugers Arch* 2003; 445(6): 651-658.

Kazuhisa N, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR et de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002; 108: 17-29.

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.

- Krupnick JG et Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 289-319.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J et Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 165-176.
- Lanske B, Karaplis AC, Lee K et coll. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 1996; 273: 663-666.
- Lefebvre V et de Crombrughe B. Toward understanding SOX9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biol* 1998; 16: 529-540.
- Lerner AB, Case JD et Takahashi Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.
- Liebergall M, Floman Y et Eldor A. Functional, biochemical, and structural anomalies in platelets of patients with idiopathic scoliosis. *J Spinal Disord* 1989; 2: 126-130.
- Lonstein JE. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet* 1994; 344(8934): 1407-1412.
- 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.
- 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, 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.
- Manolagas SC et Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 332: 305-311.

- Masson-Pevet M, Gauer F, Schuster C et Guerrero HY. Photic regulation of mt(1) melatonin receptors and 2-iodomelatonin binding in the rat and Siberian hamster. *Biol Signals Recept* 2000; 9(3-4): 188-196.
- Meyer S, More R et Yarom R. Platelet pathology in minimal curve idiopathic scoliosis: an attempt to predict curve progression. *J Orthop Res* 1987; 5: 330-336.
- Meyer T, Kneissel M, Mariani J et Fournier B. In vitro and in vivo evidence for orphan nuclear receptor RORalpha function in bone metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(16): 9197-9202.
- 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.
- Mollis TM, Walters MR et Hill SM. Modulation of estrogen receptor mRNA by melatonin in MCF7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 1681-1690.
- 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.
- Moreau A, Wang DS, Forget S, Azeddine B, Angeloni D, Fraschini F, Labelle H, Poitras B, Rivard CH et Grimard G. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* (sous presse).
- Morris AJ et Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 1999; 79(4): 1373-1430.
- 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.
- Niles LP et Hashemi F. Picomolar-affinity binding and inhibition of adenylate cyclase activity by melatonin in Syrian hamster hypothalamus. *Cell Mol Neurobiol* 1990; 10(4): 553-558.

- Noble BS, Stevens H, Mosley JR, Pitsillides AA, Reeve J et Lanyon LE. Bone loading changes the number and distribution of apoptotic osteocytes in cortical bone. *JBMR* 1997; 12(Suppl 1): S111.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangre 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.
- Okabe K, Okamoto F, Kajiya H, Takada K et Soeda H. Estrogen directly acts on osteoclasts via inhibition of inward rectifier K⁺ channels. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 361(6): 610-620.
- 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.
- Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B, Swietochowska E et Gorski J. Assessment of the relationship between circadian variations of salivary melatonin levels and type I collagen metabolism in postmenopausal obese women. *Neuroendocrinol Lett* 2001; 22(2): 121-127.
- Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Swietochowska E, Marek B, Kajdaniuk D et Gorski J. Assessment of the relationship between dynamic pattern of nighttime levels of melatonin and chosen biochemical markers of bone metabolism in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *Neuroendocrinol Lett* 2001; 22(2): 129-136.
- Oursler M, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL et Spelberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6613-6617.
- Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *JBMR* 1996; 11: 1043-1051.
- 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.
- 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.

- Pöggeler B, Balzer I, Hardeland R et coll. Pineal hormone mélatonine oscillates also dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Naturwissenschaften* 1991; 78: 268-269.
- Quarles LD et Siddhanti SR. Guanine nucleotide binding-protein coupled signaling pathway regulation of osteoblast-mediated bone formation. *J Bone Miner Res* 1996; 11(10): 1375-1383.
- 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.
- Ram PT, Dai J, Yuan L, Dong C, Kiefer TL, Lai L et Hill SM. Involvement of the mtl melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Let* 2002; 179(2): 141-150.
- Rato AG, Pedrero JG, Martinez MA, Del Rio B, Lazo PS et Ramos S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *FASEB J* 1999; 13: 857-868.
- 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, Manchester LC et Qi W. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem Biophys* 2001; 34: 237-256.
- Riseborough E et Wynne-Davies R. A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts. *J Bone Joint Surg Am* 1973; 55: 974-983.
- Robin GC et Stein H. Experimental scoliosis in primates. Failure of a technique. *J Bone Joint Surg Br* 1975; 57(2): 142-145.
- Roth JA, Kim BG, Lin WL et Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999; 274(31): 22041-22047.

- Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM et Singer CM. Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res* 1986; 3(4): 379-388.
- Sahlstrand T, Ortengren R et Nachemson A. Postural equilibrium in adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Orthop Scand*. 1978; 49(4): 354-365.
- Sandyk R, Anastasiadis PG, Anninos PA et Tsagas N. Is postmenopausal osteoporosis related to pineal gland functions? *Int J Neurosci* 1992; 62(3-4): 215-225.
- Santini F, Gaidarov I et Keen JH. G protein-coupled receptor/arrestin3 modulation of the endocytic machinery. *J Cell Biol* 2002; 156(4): 665-676.
- Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R et Maas R. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000; 24(4): 391-395.
- Schuster C, Gauer F, Guerrero H, Lakhdar-Ghazal N, Pevet P et Masson-Pevet M. Photic regulation of mt1 melatonin receptors in the Siberian hamster pars tuberalis and suprachiasmatic nuclei: involvement of the circadian clock and intergeniculate leaflet. *J Neuroendocrinol* 2000; 12(3): 207-216.
- Schuster C, Gauer F, Malan A, Recio J, Pevet P et Masson-Pevet M. The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt(1) melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinology* 2001; 74(1): 55-68.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ et coll. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.
- Sims NA, Morris HA, Moore RJ et Durbridge TC. Estradiol treatment transiently increases trabecular bone volume in ovariectomized rats. *Bone* 1996; 19(5): 455-461.
- 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.

- Slager UT, Hsu JD et Swank SM. Pathology and morphometry of the paraspinous muscles in nonidiopathic scoliosis. *J pediatr Orthop* 1987; 7: 301-304.
- 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.
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M et coll. Gene expression of the key enzymes of mélatonine synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 2001; 30: 243-247.
- Sugimoto T, Kanatani M, Kaji H, Yamaguchi T, Fukase M et Chihara K. Second messenger signaling of PTH- and PTHRP-stimulated osteoclast-like cell formation from hemopoietic blast cells. *Am J Physiol* 1993; 265(3 Pt 1): E367-373.
- Suzuki N et Hattori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. *J Pineal Res* 2002; 33(4): 253-258.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289: 1504-1508.
- Thomas S et Dave PK. Experimental scoliosis in monkeys. *Acta Orthop Scand* 1985; 56(1): 43-46.
- 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.
- Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J et Noble BS. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *JBMR* 1998; 13(8): 1243-1250.
- Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW et Noble BS. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(9): 3128-3135.
- Udén A, Nilsson IM et Willner S. Collagen-induced platelet aggregation and bleeding time in adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Orthop Scand* 1980; 51(5): 773-777.
- 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.
- 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.
- Weinstein RS et Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med* 2000; 108(2): 153-164.
- Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R et Broadus AE. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 10240-10245.
- Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M et Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23(3): 327-333.
- Wise CA, Barnes R, Gillum J et coll. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2000; 25: 2372-2380.
- 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.
- Witt-Enderby PA, Jarzynka MJ et Melan MA. Microtubules modulate melatonin receptor function. *Neurosci abstracts* 2001; 27: 142.
- Zaleske DJ, Ehrlich MG et Hall JE. Association of glycoaminoglycan depletion and degradative enzyme activity in scoliosis. *Clin Orthop* 1980; 148: 177-181.
- Zetterberg C, Aniansson A et Grimby G. Morphology of the paravertebral muscles in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1983; 8: 457-462.

*curriculum vitae***IDENTIFICATION**Nom : **Forget**Prénom : **Steve**

Adresse :

Téléphone :

Ste-Justine (514) 345-4931 #6781

FORMATION ACADÉMIQUE

2001-2004 :	Maîtrise en Biologie Moléculaire	Université de Montréal
1997-2000:	Bac spécialisé en microbiologie (Moyenne cumulative : 3,1)	Université de Montréal
hiver 1997:	Mineur Arts et Sciences	Université de Montréal
1994-1996:	D.E.C en sciences de la santé	Collège de Bois-de-Boulogne

EXPÉRIENCES DE TRAVAIL EN MILIEU SCIENTIFIQUE

2001-2004 :	Maîtrise en Biologie Moléculaire	Labo Dr Alain Moreau (Hôpital Ste-Justine, CRHSJ)
Été 2000	Stage en mycologie	Labo Dr Pierre Belhumeur (Université de Montréal)

COMPÉTENCES

Techniques :

- Culture cellulaire
- Design d'amorces
- Differential display PCR (ddPCR)
- Purification de membranes
- RT-PCR
- Transfection
- Western blot

Logiciels :

- Access (notions de base)
- Excel
- Photoshop
- PowerPoint
- Word

EXPÉRIENCES CONNEXES

2001-2004 (Labo Dr Alain Moreau)

- Responsabilités techniques
- Responsable de l'approvisionnement du matériel de laboratoire
- Conception d'un système de gestion des stocks l'azote liquide
- Vice-président de l'association de étudiants gradués du Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine (2003)

PRIX & NOMINATION

- ❖ Nomination pour le prix Hans Selye, CRCQ 2003
- ❖ 1^{er} prix aux affiches des étudiants gradués de niveau Maîtrise, CRHSJ 2003
- ❖ 2^{ième} prix en Recherche Fondamentale, SSQ 2001
- ❖ 2^{ième} prix en Recherche Fondamentale, POES 2001

PRÉSENTATIONS AVEC ABSTRACTS

Oraux :

1. **Forget S, Azeddine B, Wang DS et Moreau A.** Caractérisation de la signalisation intracellulaire de la mélatonine dans les cellules osseuses. IVe Congrès des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de Médecine du CHUM et des Centres Hospitaliers de l'Université de Montréal (COPSE), 22 janvier 2003, Palais des Congrès de Montréal, Montréal.

(S. Forget)

2. **Forget S, Wang DS, Letellier K et Moreau A.** Études des voies de signalisation de la mélatonine chez l'ostéoblaste et de son implication dans la scoliose idiopathique chez l'adolescent. XVIIe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués, Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 7 juin 2002, Montréal.
3. **Forget S, Wang DS, Letellier K, Joncas J, Labelle H, Poitras B, Rivard C-H, Grimard G et Moreau A.** Analyse fonctionnelle des voies de signalisation de la mélatonine chez les patients atteints de scoliose idiopathique. Journée de la recherche du Programme d'orthopédie Édouard-Samson (POES), 10 Mai 2002, Hôpital Maisonneuve-Rosemont/Université de Montréal, Montréal.
4. **Forget S, Wang DS, Labelle H et Moreau A.** Études des voies de signalisation de la mélatonine chez l'ostéoblaste et de son implication possible dans la scoliose idiopathique. IIIe Congrès des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de Médecine du CHUM et des Centres Hospitaliers de l'Université de Montréal (COPSE), 26 janvier 2002, Université de Montréal, Montréal.
5. **Forget S, Wang DS, Labelle H et Moreau A.** Étude des voies de signalisation de la mélatonine chez l'ostéoblaste et de son implication dans la scoliose idiopathique chez l'adolescent. 31^{ième} Congrès annuel de la Société de la Scoliose du Québec (SSQ), 14-15 septembre 2001, Fairmont Tremblant, Mont-Tremblant. (2^{ième} prix en Recherche Fondamentale)
6. **Forget S, Wang DS, Labelle H et Moreau A.** Étude des voies de signalisation de la mélatonine chez l'ostéoblaste et de son implication dans la scoliose idiopathique chez l'adolescent. Journée de la recherche du Programme d'orthopédie Édouard-Samson (POES), 11 mai 2001, Hôpital Maisonneuve-Rosemont/Université de Montréal, Montréal. (2^{ième} prix en recherche fondamentale)

Affiches :

1. **Forget S, Azeddine B, Wang DS et Moreau A.** Dualité fonctionnelle de la mélatonine dans le métabolisme osseux. 45^{ième} Congrès Annuel du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), 25-27 septembre 2003, Orford. (en nomination pour le prix Hans Selye)
2. **Forget S, Azeddine B, Wang DS et Moreau A.** Dualité fonctionnelle de la mélatonine dans le métabolisme osseux. XVIIIe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 6 juin 2003, Montréal. (1er prix étudiants gradués de niveau maîtrise)
3. **Forget S, Azeddine B, Wang DS et Moreau A.** Dualité fonctionnelle de la mélatonine dans le métabolisme osseux. IXe Journée scientifique du programmes de biologie moléculaire, Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal, 25 avril 2003, IRCM, Montréal.
4. **Forget S, Wang DS, Letellier K, Joncas J, Labelle H, Poitras B, Rivard C-H, Grimard G et Moreau A.** Analyse fonctionnelle des voies de signalisation de la

mélatonine chez les patients atteints de scoliose idiopathique. 44^{ième} Congrès Annuel du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), 19-21 septembre 2002, Manoir Ste-Sauveur, St-Sauveur.

5. **Forget S**, Wang DS, Letellier K et. Moreau A. Études des voies de signalisation de la mélatonine chez l'ostéoblaste et de son implication possible dans la scoliose idiopathique. VIIIe Journée scientifique du programme de biologie moléculaire, Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal, 10 mai 2002, CRCHUM-Hôpital Notre-Dame, Montréal.
6. **Forget S**, Wang DS, Labelle H et Moreau A. Étude des voies de signalisation de la mélatonine chez l'ostéoblaste et de son implication dans la scoliose idiopathique chez l'adolescent. XVIe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, juin 2001, Montréal.
7. **Forget S**, Wang DS, Labelle H et Moreau A. Étude des voies de signalisation de la mélatonine chez l'ostéoblaste et de son implication dans la scoliose idiopathique chez l'adolescent. VIIe Journée scientifique du programme de biologie moléculaire, Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal, mai 2001, Université de Montréal, Montréal.

Publications

Article :

- Moreau A, Wang DS, **Forget S**, Azeddine B, Labelle H, Poitras B, Rivard C.-H et Grimard G. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. Spine, sous-presse.

Chapitre de livre :

- Moreau A, Wang DS, **Forget S**, Duey C et Dusart J. GC-rich Templates Amplification by Inverse PCR: DNA Polymerase and Solvent Effects. Dans: Methods in Molecular Biology 2002 Vol67: PCR Cloning Protocols: from Molecular Cloning to Genetic Engineering 2^{ième} édition chapitre 8. Édité par: B-Y. Chen & H.W. Janes.

Abstracts (comme coauteur) :

1. Moreau A, Wang DS, **Forget S**, Joncas J, Labelle H, Poitras B et Rivard C.-H. Analysis of melatonin signal transduction pathways in Idiopathic Scoliosis. 31st Annual Meeting Quebec Scoliosis Society, 14-15 septembre, 2001, Fairmont

- Tremblant, Mont-Tremblant. (1er prix Roger-Simoneau, Recherche Fondamentale)
2. Moreau A, Wang DS, **Forget S**, Letellier K, Joncas J, Labelle H, Poitras B, Rivard C-H et Grimard G. Analyse des voies de signalisation de la mélatonine dans la scoliose idiopathique. Ve Congrès interdisciplinaire en orthopédie pédiatrique Parrainé par l'Hôpital Shriners pour enfants en collaboration avec l'Hôpital Sainte-Justine, 12 avril 2002, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, (conférencier invité).
 3. Moreau A, Wang DS, **Forget S**, Letellier K, Joncas J, Labelle H, Poitras B, Rivard C-H et Grimard G. Analysis of melatonin transduction pathway in adolescent idiopathic scoliosis. 37th Annual Meeting, Scoliosis Research Society, September 18-21, 2002, Seattle, USA.
 4. Azeddine B, Wang DS, **Forget S**, Joncas J, Lacroix G, Poitras, B, Labelle H, Rivard C-H, Grimard G et Moreau A. Variables cliniques et dysfonctionnement de la signalisation intracellulaire de la mélatonine dans la scoliose idiopathique. 31ième Congrès Annuel de la Société de la Scoliose du Québec, 25-26 septembre 2002, Manoir Rouville-Campbell, Mont-St-Hilaire.
 5. Azeddine B, Wang DS, **Forget S** et Moreau A. Étude du dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine dans la scoliose idiopathique. IVe Congrès des stagiaires de recherche en santé de la Faculté de Médecine du CHUM et des Centres Hospitaliers de l'Université de Montréal, 22 janvier 2003, Palais des Congrès de Montréal, Montréal.
 6. Azeddine B, Wang DS, **Forget S**, Joncas J, Lacroix G, Poitras B, Labelle H, Rivard C-H, Grimard G et Moreau A. Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine dans la scoliose idiopathique. IXe Journée scientifique du programme de biologie moléculaire, Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal, 25 avril 2003, IRCM, Montréal.
 7. Azeddine B, **Forget S**, Wang DS et Moreau A. Study of molecular mechanism involved in melatonin signaling dysfunction in idiopathic scoliosis. Journée de la recherche du Programme d'orthopédie Édouard-Samson (POES), 9 mai 2003, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de Montréal. (1er prix en recherche fondamentale).
 8. Azeddine B, **Forget S**, Wang DS et Moreau A. Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine dans la scoliose idiopathique. XVIIIe Congrès annuel de la recherche des étudiants gradués et post-gradués du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, 6 juin 2003, Montréal.
 9. Moreau A, Azeddine D, **Forget S** et Wang DS. Étude de l'étiopathogénèse de la scoliose idiopathique: Nouvelles Perspectives Moléculaires et Thérapeutiques. 45ième Congrès Annuel du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), 25-27 septembre 2003, Orford.
 10. Boulanger H, Wang DS, **Forget S**, Azeddine B, Aubin C-É, Thouin J-F, Mathieu P-A et Moreau A. Étude fonctionnelle des mécanismes initiateurs de la

scoliose pendant la croissance vertébrale. 45ième Congrès Annuel du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), 25-27 septembre 2003, Orford.

11. Azeddine B, **Forget S**, Wang DS et Moreau A Mécanismes moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine dans la scoliose idiopathique. 45ième Congrès Annuel du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), 25-27 septembre 2003, Orford.
12. Azeddine B, **Forget S**, Wang DS, Labelle H, Poitras B, Rivard C-H, Grimard G et Moreau A. Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine dans la scoliose idiopathique. 33ième Réunion Annuelle de la Société de la Scoliose du Québec (SSQ), 24-25 octobre 2003, Auberge Saint-Antoine, Québec.
13. Moreau A, Wang DS, **Forget S**, Azeddine B, Boyer S, Tremblay M, Bernard M, Thouin J-F, Chrzanowski V, Boulanger H, Joncas J, Lacroix G, Poitras, B, Labelle H, Rivard C-H, Grimard G, Aubin C-É et Mathieu PA. Nouvelles approches pharmacologiques dans le traitement de la scoliose idiopathique: réalité ou utopie? 33ième Réunion Annuelle de la Société de la Scoliose du Québec, 24-25 octobre 2003, Auberge Saint-Antoine, Québec.

ACTIVITÉS

- Arts martiaux
- Conditionnement physique
- Golf
- Plongeon

RÉFÉRENCES DISPONIBLES SUR DEMANDES



(Rev. décembre 2003)