

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

Rôle des estrogènes dans la scoliose idiopathique adolescente

par

Kareen Letellier

Programme de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de M.Sc.

en Biologie Moléculaire

Février 2008

© Kareen Letellier, 2008



Université de Montréal
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :

Rôle des estrogènes dans la scoliose idiopathique adolescente

présenté par :
Kareen Letellier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean Vacher, président-rapporteur
Dr Stefan Parent, membre du jury
Dr Alain Moreau, directeur de recherche
Dr Florina Moldovan, co-directeur

Résumé

La scoliose idiopathique est la forme la plus courante de scoliose, maladie se caractérisant par une déformation de la colonne vertébrale dans les trois plans de l'espace. Plusieurs facteurs étiologiques ont été mis en cause dont un défaut de signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes de patients atteints. La prévalence de la scoliose idiopathique adolescente chez les filles au moment de la puberté semble également montrer un rôle important des estrogènes dans le développement de cette maladie. Ainsi, ce projet avait pour but de déterminer le rôle des estrogènes dans la pathogenèse de la SIA, plus particulièrement de déterminer si l'interaction des estrogènes avec la mélatonine exacerbe le défaut de signalisation de la mélatonine présente dans les ostéoblastes humains de patients SIA. Les résultats de ce travail nous ont ainsi permis de démontrer qu'il semble exister une interaction entre les estrogènes et l'activité de la mélatonine dans les ostéoblastes humains provenant de patients SIA suggérant ainsi un rôle possible des estrogènes dans l'étiopathogenèse de la SIA. Plus particulièrement, nos travaux nous ont permis de distinguer du point de vue fonctionnel deux groupes de réponse au 17- β -estradiol dans les ostéoblastes humains de patients SIA.

Mots-clés : Estrogènes, Scoliose Idiopathique Adolescente, Mélatonine

Abstract

Idiopathic scoliosis is the most common form of scoliosis, a disease characterised by three dimensional deformity of the spine. The pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is attributed to different factors and especially to a melatonin signalling defect in osteoblasts of AIS patients. The prevalence of AIS in girls during pre-puberty and puberty growth seems to point to an important role of estrogens in the development of this disease. However, the reason this disease affects mostly girls as well as the role of estrogens in AIS is not clear, despite the fact that these hormones are known for their impact on bone and bone growth, including the spine. Thus, the goal of this study was to determine the role of estrogens in the pathogenesis of AIS, and especially to determine if the crosstalk between estrogens and melatonin could exacerbate the melatonin signalling defect occurring in human osteoblasts of AIS patients. The results of this study allowed us to demonstrate that a crosstalk between melatonin and estrogens may exist in human osteoblasts of AIS patients, which would suggest a possible role for estrogens in AIS pathogenesis. Moreover, our results led us to distinguish two functional groups of responsiveness to 17- β -estradiol in human osteoblasts.

Keywords : Estrogens, Adolescent Idiopathic Scoliosis, melatonin

Table des matières

Titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xv
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	4
2.1 La Scoliose Idiopathique Adolescente et son étiologie.....	5
2.1.1 Généralités.....	5
2.1.2 Les facteurs étiologiques de la SIA.....	6
2.1.2.1 Les facteurs génétiques.....	6
2.1.2.2 Les éléments structuraux du rachis.....	7
2.1.2.3 Les théories biomécaniques de l'évolution des scolioses.....	8
2.1.2.4 Les facteurs neurologiques et les facteurs musculaires.....	9
2.1.2.5 Les facteurs biochimiques.....	10
2.1.2.6 Les facteurs endocriniens.....	11
2.1.2.6.1 Les facteurs de croissance.....	11
2.1.2.6.2 La mélatonine.....	11
2.1.2.6.3 Les estrogènes.....	13
2.2 LA MÉLATONINE.....	14
2.2.1 Généralités.....	14
2.2.2 La signalisation cellulaire de la mélatonine.....	14
2.2.2.1 Action via ses récepteurs.....	15
2.2.2.1.1 Les récepteurs membranaires, MT1 et MT2.....	15
2.2.2.1.1 Le récepteur MT3.....	19

2.2.2.1.2	Les récepteurs nucléaires.....	19
2.2.2.1.3	Autres récepteurs.....	20
2.2.2.2	Action non-dépendante des récepteurs via la calmoduline.....	20
2.2.3	Régulation des récepteurs de la mélatonine.....	21
2.2.3.1	Les acides aminés impliqués dans l'activation et la signalisation des récepteurs de la mélatonine.....	21
2.2.3.2	Régulation négative des récepteurs à la mélatonine.....	22
2.2.3.3	Désensibilisation des récepteurs à la mélatonine.....	23
2.2.3.3.1	Désensibilisation homologue.....	23
2.2.3.3.2	Désensibilisation hétérologue.....	24
2.2.3.3.3	Internalisation des récepteurs.....	24
2.2.4	LA MÉLATONINE ET L'OS.....	25
2.3	LES ESTROGÈNES.....	26
2.3.1	Généralités.....	26
2.3.2	Signalisation cellulaire.....	27
2.3.2.1	Les récepteurs aux estrogènes.....	27
2.3.2.1.1	Les récepteurs ER α et ER β	27
2.3.2.1.2	Les récepteurs orphelins (estrogen receptor-related receptors).....	28
2.3.3	Les effets génomiques.....	29
2.3.3.1	Effets dépendants de la liaison à l'ADN.....	29
2.3.3.2	Effet des ER indépendante de la liaison du ligand.....	30
2.3.4	Effets non génomiques.....	31
2.3.5	Estrogènes et l'os.....	32
2.4	Interaction Estrogènes / Mélatonine.....	34
2.5	Hypothèse.....	36
2.6	Objectifs.....	36
CHAPITRE 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		38
3.1	Isolement des cellules.....	39
3.2	Culture cellulaire.....	44
3.3	Phosphatase alcaline.....	44
3.4	Extraction d'ARN.....	45

3.5	Analyse d'expression génique semi-quantitative de marqueurs de différenciation ostéoblastique par RT-PCR.....	45
3.6	Tests d'activité d'adenylate cyclase dans les ostéoblastes.....	46
3.7	Préparation des extraits membranaires et solubilisation des protéines membranaires.....	47
3.8	Purification des phosphoprotéines	47
3.9	Dosage des protéines.....	48
3.10	Immunoprécipitation	48
3.11	Immunodétection des protéines.....	49
3.12	Détection des récepteurs MT1, MT2 et des protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ par immunofluorescence.....	50
3.13	Analyses statistiques	50
CHAPITRE 4. RÉSULTATS		51
4.1	Expression des marqueurs de différenciation des ostéoblastes.....	52
4.2	Détermination de l'effet du 17- β -estradiol sur le défaut de la voie de signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes de patients SIA.....	54
4.2.1	Défaut de signalisation de la voie de signalisation de la mélatonine chez les patients atteints de SIA	54
4.2.2	Effet du 17- β -estradiol sur la réponse fonctionnelle de la mélatonine (reflétant le défaut de signalisation de la mélatonine) dans les ostéoblastes de patients SIA et contrôles.....	56
4.2.2.1	Effet du 17- β -estradiol en présence de mélatonine sur les ostéoblastes contrôles	56
4.2.2.1	Effet du 17- β -estradiol en présence de mélatonine sur les ostéoblastes des patients SIA du groupe 2 et 3.....	58
4.2.2.2	Effet du 17- β -estradiol en présence de mélatonine sur les ostéoblastes des patients SIA du groupe 1.....	61
4.3	Mise en évidence des protéines $G\alpha$ couplées aux récepteurs de la mélatonine chez les patients SIA du groupe 1	63
4.3.1	Couplage des protéines $G\alpha_i$ avec les récepteurs membranaires de la mélatonine, MT1 et MT2	63

4.3.2	Couplage des protéines $G\alpha_s$ avec les récepteurs membranaires de la mélatonine, MT1 et MT2	68
4.3.3	Colocalisation des protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$ avec les récepteurs membranaires de la mélatonine MT1 et MT2.....	72
4.4	Phosphorylation du récepteur de la mélatonine MT2	81
4.5	Etude des différents sites de phosphorylations des récepteurs de la mélatonine	84
CHAPITRE 5. DISCUSSION.....		89
5.1	Confirmation du défaut de signalisation de la mélatonine et clarification fonctionnelle des patients SIA.....	90
5.2	Effet du 17- β -estradiol sur la signalisation cellulaire de la mélatonine dans les ostéoblastes provenant de patients SIA	91
5.3	Couplage différentiel des récepteurs MT1 et MT2 aux protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ survient dans les ostéoblastes des patients SIA du groupe 1	94
5.4	Désensibilisation des récepteurs de la mélatonine	96
CHAPITRE 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES		100
CHAPITRE 7. RÉFÉRENCES		104
CHAPITRE 8 ANNEXES		138

Liste des tableaux

<u>CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE</u>	4
Tableau I: Les agonistes et les antagonistes des récepteurs aux estrogènes	28
Tableau II : Les coactivateurs des récepteurs aux estrogènes.....	29
Tableau III : Les corépresseurs des récepteurs aux estrogènes.....	30
<u>CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	38
Tableau IV: Données cliniques des patients provenant du groupe 1 selon la classification de <i>Moreau et al.</i> , 2004 (N/D : non disponible).	40
Tableau V : Données cliniques des patients provenant du groupe 2 selon la classification de <i>Moreau et al.</i> , 2004 (N/D : non disponible).	41
Tableau VI: Données cliniques des patients provenant du groupe 3 selon la classification de <i>Moreau et al.</i> , 2004 (N/D : non disponible).....	42
Tableau VII : Données cliniques des sujets contrôles (N/D : non disponible).	43
Tableau VIII : Amorces et conditions des PCR.....	46
<u>CHAPITRE 4 : RÉSULTATS</u>	51
Tableau IX : Résidus reconnus par différentes kinases dans la séquence du récepteur MT1.....	86
Tableau X : Résidus reconnus par différentes kinases dans la séquence du récepteur MT2.....	88
Tableau XI : Domaines protéique du récepteur MT2	88

Liste des figures

<u>CHAPITRE 2 : REVUE DE LA LITTÉRATURE</u>	4
Figure 1 : Schéma de la voie de signalisation de la mélatonine via les récepteurs MT1 et MT2	18
Figure 2 : Action des estrogènes sur le remodelage osseux.....	33
<u>CHAPITRE 4 : RÉSULTATS</u>	51
Figure 3 : Expression de différents marqueurs ostéoblastiques dans les cellules dérivées de patients scoliotiques et de cellules épithéliales de rein de Hamster (lignées HEK).....	53
Figure 4 : Effet de la mélatonine sur les taux d'AMPC dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles humains.....	55
Figure 5 : Effet du 17- β -estradiol sur les taux d'AMPC dans les ostéoblastes dérivés de sujets témoins (non scoliotiques).....	57
Figure 6 : Effet du 17- β -estradiol sur les taux d'AMPC dans les ostéoblastes de patients SIA humains provenant de patients du groupe 2.....	59
Figure 7 : Effet du 17- β -estradiol sur les taux d'AMPC dans les ostéoblastes de patients SIA humains provenant de patients du groupe 3.....	60
Figure 8 : Effet du 17- β -estradiol sur les taux d'AMPC dans les ostéoblastes de patients SIA humains provenant de patients groupe 1.....	62
Figure 9 : Mise en évidence du complexe constitué des protéines $G\alpha_i$ et du récepteur membranaire de la mélatonine MT1 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.....	65
Figure 10 : Mise en évidence du complexe constitué des protéines $G\alpha_i$ et du récepteur membranaire de la mélatonine MT2 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.....	66

Figure 11 : Détermination du couplage des protéines $G\alpha_i$ aux récepteurs membranaires de la mélatonine MT1 et MT2 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.....	67
Figure 12 : Mise en évidence du complexe constitué des protéines $G\alpha_s$ et du récepteur membranaire de la mélatonine MT1 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.....	69
Figure 13 : Mise en évidence du complexe constitué des protéines $G\alpha_s$ et du récepteur membranaire de la mélatonine MT2 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.....	70
Figure 14 : Détermination du couplage des protéines $G\alpha_s$ aux récepteurs membranaires de la mélatonine MT1 et MT2 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.....	71
Figure 15 : Détection du récepteur MT1 et de la protéine $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes humains de patients SIA du groupe 1.....	73
Figure 16 : Détection du récepteur MT1 et de la protéine $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes humains de patients SIA du groupe 1.....	74
Figure 17 : Détection du récepteur MT2 et de la protéine $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes humains de patients SIA du groupe 1.....	75
Figure 18 : Détection du récepteur MT2 et de la protéine $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes humains de patients SIA du groupe 1.....	76
Figure 19: Détection du récepteur MT1 et de la protéine $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes humains d'un sujet témoin.....	77
Figure 20 : Détection du récepteur MT1 et de la protéine $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes humains d'un sujet témoin.....	78
Figure 21 : Détection du récepteur MT2 et de la protéine $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes humains d'un sujet témoin.....	79
Figure 22 : Détection du récepteur MT2 et de la protéine $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes humains d'un sujet témoin.....	80
Figure 23 : Détection des récepteurs MT2 phosphorylés dans les ostéoblastes de patients SIA (groupe 1).....	82

Figure 24 : Détection des récepteurs MT2 phosphorylés au niveau de résidus tyrosine dans les ostéoblastes de patients SLA (groupe 1).	83
Figure 25 : Séquence du récepteur de la mélatonine MT1 (MEL1-A) de l'Homme et site de phosphorylations possibles au niveau de résidus tyrosine, sérine/thréonine.	85
Figure 26 : Séquence du récepteur de la mélatonine MT2 (MEL1-B) de l'Homme et site de phosphorylations possibles au niveau de résidus tyrosine, sérine/thréonine	87
<u>CHAPITRE 5 : DISCUSSION</u>	89
Figure 27 : Schéma de l'interaction de la voie rapide des estrogènes avec les voies de signalisation de la mélatonine.	93
Figure 28 : Mécanisme impliqué dans le changement du couplage des récepteurs β -adrénergique avec les protéines G et mécanisme possible impliqué dans la diminution du couplage des récepteurs de la mélatonine MT2 avec les protéines $G\alpha_s$ en présence de 17- β -estradiol.	98

Liste des abréviations

- AA-NAT : N-acetyltransférase
ADN : Acide déoxyribonucléique
ALP : Phosphatase alcaline
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
BSP : Salioprotéine osseuse
Ca²⁺ : ions calcium
CaM : Calmoduline
Cbat1/Runx2 : Facteurs de transcription
CREB : cAMP-Response Element Binding Protein
CSF-1 : Colony stimulating factor 1
DAG : Diacylglycérol
DAPI : 4',6' di-amidino-2-Phényl Indole
DBD : Domaine de liaison à l'ADN
ER : Récepteurs aux estrogènes
ERE : Élément de réponse aux estrogènes
ERK1/2 : Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2
ERR : Estrogen receptor-related receptors
FGF : Fibroblast growth factor
GH : Hormone de croissance
GHRH : Growth Hormone Releasing Hormone
Gi : Protéine G inhibitrice
GMPc : Guanosine Monophosphate
GRK : G-protein Receptor Kinases
Gs : Protéine G stimulatrice
HEK : cellules épithéliale de rein de Hamster
IL-1 : interleukine 1
IL-6 : Interleukine 6

IP3 : Inositol 3,4,5-triphosphate
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
LBD : Domaine de liaison du ligand
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPs : Microtubule binding proteins
MCF-7 : Cellules de cancer du sein
MEK1 : MAPK/ERK Kinase-1
MEK2 : MAPK/ERK Kinase-2
MT1/MT2 : Récepteur de la mélatonine MT1/Récepteurs de la mélatonine MT2
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NFκB : Facteur nucléaire Kappa B
NLS : Signal de localisation nucléaire
OPN : Ostéopontine
OCN : Ostéocalcine
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PMCA4b : Plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4b
PTH : Hormone parathyroïdienne
PvuII : Enzyme de restriction
RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand
RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
ROR : Retinoid Orphan Receptors
RORE : Élément de réponse aux hormones
RZR : Retinoid Z Receptors
SIA : Scoliose Idiopathique Adolescente
TGF-β : Transforming growth factor
TNF-α : Tumor necrosis factor alpha
XbaI : Enzyme de restriction

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires du Dr Alain Moreau et Dr Florina Moldovan. Je tiens à leur exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe. Je tiens sincèrement à les remercier pour leur disponibilité, leur nombreux conseils, leur engagement dans l'encadrement de ce travail ainsi que leur soutien tout au long de ma maîtrise.

Je tiens aussi à exprimer toute ma reconnaissance à tous les membres des laboratoires du Dr Alain Moreau et du Dr Florina pour leur disponibilité, leur gentillesse et l'ambiance chaleureuse qu'ils maintiennent au laboratoire. Je tiens à remercier tout particulièrement Marie-Claude Guyot, Mathilde Cancel, Karen Dahan et Dominique Leboeuf pour leur bonheur humeur et leur soutien tout au long de ma maîtrise et surtout lors de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens également à remercier « The centre for bone and peridontal research » pour m'avoir octroyé une bourse de formation des IRSC.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

La scoliose est une déformation de la colonne vertébrale dans les trois plans de l'espace (frontal, sagittal et coronal). La scoliose est une maladie qui constitue une préoccupation de santé publique importante puisqu'il s'agit du type de déformation osseuse présentant la plus grande prévalence (Kesley, 1982) chez les 10-18 ans, soit entre 2% et 3% de la population pédiatrique (Lonstein, 1989). La scoliose idiopathique de l'adolescent est la forme la plus commune de scoliose et survient principalement durant la période de croissance pré-pubertaire et pubertaire. Cette pathologie affecte une proportion significative de la population adolescente et en particulier les filles en période de croissance avec un ratio filles : garçons de 10 pour 1 lorsque l'angle de Cobb est supérieur à 30° (Goldbloom, 1994). La SIA engendre de multiples complications pour la santé des adolescents atteints telles que des douleurs, de l'ostéopénie précoce et pour les adolescents les plus atteints, des détresses respiratoires. Malheureusement les causes de la SIA ne sont pas encore bien définies et les seuls traitements actuels sont les corsets, afin d'essayer de stabiliser la déformation de la colonne vertébrale, et la chirurgie. Ainsi il est important de déterminer à la fois quels sont les facteurs étiologiques et aggravants de la SIA et de permettre de diagnostiquer plus précocement les adolescents à risque de progression.

De nombreux facteurs étiologiques ont été étudiés et mis en évidence tels que les facteurs génétiques, des anomalies au niveau des éléments structuraux du rachis, les facteurs neurologiques et musculaires, les facteurs biochimiques, les facteurs endocriniens (hormone de croissance, mélatonine et estrogènes). Récemment, une étude a montré que la mélatonine, hormone produite principalement par la glande pinéale, pourrait être à l'origine du développement de la SIA, en particulier via un défaut dans la voie de signalisation de cette hormone (Moreau *et al.*, 2004). Cette étude a permis d'établir une classification en trois groupes fonctionnels des patients atteints de scoliose idiopathique en fonction de leur réponse à la mélatonine. Des modifications post-transcriptionnelles affectant la fonction des protéines Gi couplées aux récepteurs membranaires de la mélatonine, MT1 et MT2, pourrait être à la source de ce défaut de signalisation (Moreau *et al.*, 2004). Cependant toutes ces études n'expliquent pas pourquoi la SIA se manifeste majoritairement à la puberté et qu'elle affecte en plus

grand nombre et en sévérité les jeunes filles. En effet, la plus grande incidence de la maladie chez les adolescentes vient actualiser le rôle des estrogènes dans l'étiopathogénèse de la SIA. La puberté est également une période qui coïncide avec un ensemble de manifestations biologiques impliquant la sécrétion des estrogènes. De plus, de nombreuses études ont mis en évidence l'impact des estrogènes sur l'os et la croissance osseuse. Cependant même si les estrogènes semblent être impliqués dans le développement de la SIA, aucune étude n'a permis de mettre en évidence leur rôle et le mécanisme par lequel ils agissent dans la pathogénèse de la SIA. Ainsi dans le contexte où nous voulons étudier l'interaction de la voie de signalisation de la mélatonine et des estrogènes, nous avons choisi les ostéoblastes comme modèle d'études car ils répondent à ces deux hormones.

Il est intéressant de souligner que la mélatonine et l'estradiol interfèrent lors de la signalisation cellulaire. Cette interaction a été particulièrement montrée dans les cellules du cancer du sein (cellules MCF7) (Del Rio *et al.*, 2004). De plus, la mélatonine est un inhibiteur spécifique de la transcription induite par le 17- β -estradiol (E2) au niveau de l'élément de réponse aux estrogènes (ERE). En outre, la sensibilité des cellules à la mélatonine est dépendante du rapport des récepteurs et de l'expression ectopique des récepteurs des estrogènes (Del Rio *et al.*, 2004).

Ainsi dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous avons émis l'hypothèse que les estrogènes participent au mécanisme pathogénique de la scoliose idiopathique adolescente en jouant sur les effets négatifs d'une signalisation aberrante de la mélatonine dans cette maladie.

CHAPITRE 2. REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 La Scoliose Idiopathique Adolescente et son étiologie

2.1.1 Généralités

La scoliose est une déformation tridimensionnelle affectant le rachis, le thorax et le bassin. Elle représente la déformation la plus fréquente en orthopédie au niveau pédiatrique. La majorité des scolioses (85 %) sont des scolioses dont les causes sont inconnues (idiopathique), les 15 % restant sont dues à des malformations congénitales, des maladies neuromusculaires ou associées à des pathologies osseuses. Selon le moment où elles surviennent, celles-ci seront dites infantile (0-3 ans), juvénile (3-10 ans) ou adolescente (10-20 ans). Cette pathologie est diagnostiquée par un examen clinique en position debout et assise. Le diagnostic fait intervenir la mesure de la gibbosité, la mesure de l'angle de Cobb (il permet de calculer l'angulation de la déformation du rachis) et la mesure du déséquilibre par rapport au pli inter-fessier. Plusieurs chercheurs ont présenté des perspectives divergentes dans l'espoir de définir plus clairement l'étiologie de la scoliose idiopathique adolescente. Ces recherches nombreuses et parfois contradictoires nous permettent de penser que l'origine de la SIA est probablement multifactorielle. Bien que la composante héréditaire paraisse certaine, beaucoup d'autres hypothèses ont été avancées mettant en cause des facteurs génétiques, les facteurs musculo-ligamentaires et neurologiques, les facteurs biochimiques et récemment les facteurs hormonaux et des dysfonctions dans la signalisation intracellulaire engendrée par ces hormones ont été étudiées. Par conséquent, plusieurs théories se confrontent sur l'étiologie et la pathogenèse de la scoliose idiopathique. De plus, certains de ces facteurs étiologiques proposés peuvent intervenir tant dans l'apparition que dans l'aggravation ce qui complique la compréhension de cette maladie. Néanmoins, des progrès considérables ont été réalisés dans les dernières années quant à la compréhension de la pathogénie de la SIA qui préoccupe depuis des siècles les cliniciens, les chercheurs et la population pédiatrique atteinte de cette maladie. Les hypothèses les plus acceptées de l'étiopathogénèse de la SIA font intervenir des anomalies de fonctionnement des centres du contrôle postural situés dans le cerveau, qui priveraient la colonne d'informations nécessaires à sa croissance régulière en hauteur (Dubousset *et al.*, 1983).

Ces centres seraient sous la dépendance de la glande pinéale et récemment, Moreau et al. (Moreau *et al.*, 2004) ont démontré dans des cellules isolées de sujets scoliotiques, l'existence d'un défaut de signalisation de la mélatonine, hormone produite principalement par la glande pinéale. Le rôle de la mélatonine dans la scoliose a été d'ailleurs évoqué depuis de nombreuses années lorsque Dubousset et al. (Dubousset *et al.*, 2001) ont démontré que l'ablation de la glande pinéale entraîne cette maladie. Cependant la majorité des études à ce jour chez l'Homme n'ont pu mettre en évidence des changements significatifs dans les niveaux circulants de mélatonine (Brodner *et al.*, 2000; Sadat-Ali *et al.*, 2000). Dans ce sens, la mise en évidence d'un défaut de signalisation de la mélatonine vient actualiser le rôle de cette hormone dans la pathogénèse de la scoliose au niveau de son action et non au niveau de sa carence. De plus, ce défaut de signalisation permettrait d'expliquer également l'ensemble des anomalies associées à la SIA puisque les récepteurs à la mélatonine sont présents dans les tissus et systèmes atteints par cette condition.

2.1.2 Les facteurs étiologiques de la SIA

Dans le but de mieux comprendre l'étiologie de la SIA et d'expliquer les différents types de courbure de la colonne vertébrale observés chez les patients SIA, plusieurs hypothèses ont été avancées (Lowe *et al.*, 2000) (Burwell, 2003). Celles-ci sont résumées ici-bas de même que dans un récent article (Letellier *et al.*, 2007) (cf annexes).

2.1.2.1 Les facteurs génétiques

La SIA survient parfois avec une fréquence plus élevée dans certaines familles (Cowell *et al.*, 1972; Kesling *et al.*, 1997; Miller, 2002). Ainsi, plusieurs études ont essayé de trouver une composante génétique à la scoliose mais jusqu'à présent les résultats des travaux réalisés dans ce sens sont controversés et le mode de transmission reste un sujet de débat. Wynne-Davies (Wynne-Davies, 1968) a réalisé une étude sur 114 patients atteints de scoliose idiopathique dans le but d'établir l'incidence familiale de cette déformation et de comparer celle-ci avec l'incidence dans la population générale. Cette étude a montré que la composante génétique était importante dans le groupe composé d'adolescents scoliotiques. Cependant, le nombre de patients étudiés était trop faible pour tirer des conclusions quant au mode de transmission (transmission dominante et

transmission multi-génique). De plus, une étude réalisée sur des jumeaux a montré que la scoliose se développait avec une plus grande prédominance chez les jumeaux homozygotes (73 %) que chez les jumeaux hétérozygotes (36 %) (Carr, 1990) (Andersen *et al.*, 2007). Comme la prédominance féminine de la maladie est nette, certaines études proposent que la transmission soit liée au chromosome X (Cowell *et al.*, 1972), (Justice *et al.*, 2003) alors que d'autres favorisent une transmission autosomale (Salehi *et al.*, 2002). D'autres études ont également mis en évidence plusieurs loci de susceptibilité dans différents chromosomes. Il s'agit des régions sur les chromosomes 2, 6, 9,10, 16, 17, 18, 19 (Chan *et al.*, 2002b; Miller *et al.*, 2005; Salehi *et al.*, 2002; Wise *et al.*, 2000) (Alden *et al.*, 2006). Ainsi les résultats de ces études suggèrent plusieurs régions candidates potentielles, indiquant que l'hétérogénéité génétique et clinique pourrait être impliquée dans l'expression de cette maladie notamment dans la SIA dite familiale (représente 15% des cas). En résumé, la composante génétique est encore au cœur du débat et depuis plusieurs années, chercheurs et cliniciens tentent de développer des hypothèses concluantes pour clarifier l'étiopathogénèse de la SIA. Les études qui ont révélées que la SIA est présente avec une fréquence plus élevée dans certaines familles sont en faveur des facteurs génétiques (Cowell *et al.*, 1972; Kesling *et al.*, 1997). Malgré qu'il existe une forte composante héréditaire, la plupart des scolioses idiopathiques (85 %) apparaissent dans des familles n'ayant aucun antécédent familial de SIA, ce qui indique que des facteurs environnementaux pourraient également être impliqués.

2.1.2.2 Les éléments structuraux du rachis

Puisque la scoliose est une déformation de la colonne vertébrale, il est possible qu'un défaut dans l'une des composantes de cette structure puisse en être la cause. Ainsi, l'existence d'une scoliose dans des maladies affectant le tissu conjonctif (scolioses secondaires associées au syndrome de Marfan, l'hyperlaxité articulaires, d'Ehlers-Danlos, l'homocystinurie et l'ostéogenèse imparfaite) (Pyeritz *et al.*, 1979) suggère une responsabilité du collagène ou des protéoglycanes (les éléments principaux dans le support des structures de la colonne vertébrale) dans la genèse d'une scoliose (Akhtar *et al.*, 2005; Hadley-Miller *et al.*, 1994; Worthington *et al.*, 1991). Akhtar *et al.* (Akhtar *et al.*, 2005), dans une étude réalisée sur les disques intervertébraux de sujets normaux et de patients scoliotiques, ont observé le dérèglement de l'organisation lamellaire du

collagène et des fibres élastiques dans la scoliose. Worthington (Worthington *et al.*, 1991) a montré que le défaut primaire semble être relié à la synthèse du collagène et des protéoglycanes. Yu et al. (Yu *et al.*, 2005) ont montré que les disques intervertébraux d'adolescents normaux révèlent un réseau de fibres élastiques abondant et organisé alors qu'il est épars et dérégulé dans les disques scoliotiques et pourrait être ainsi impliqué dans la progression de la déformation de la colonne vertébrale (Duance *et al.*, 1998). Cependant, cette cause reste sujette à controverse. En effet, Oegema et al. (Oegema *et al.*, 1983) a montré avec une étude réalisée sur les disques intervertébraux que la scoliose idiopathique ne semble pas être le résultat d'une altération biochimique des protéoglycanes mais plutôt que la déformation du rachis pourrait amener à une altération de la composition des protéoglycanes en particulier dans le nucleus pulposis. Pedrini et al. (Pedrini *et al.*, 1973) ont pu observer une diminution de 25 % du taux de synthèse des glycosaminoglycanes et une augmentation de 25 % de la synthèse du collagène chez les sujets scoliotiques. D'autres chercheurs se sont attardés à étudier le système des fibres élastiques (2^{ème} composant majeur de la matrice extracellulaire) dont une étude réalisée sur 34 patients SIA qui a montré que 50% d'entre eux avaient une prédominance anormale de fibre musculaires de type I mettant ainsi en évidence le rôle des tissus élastique dans la SIA (Echenne *et al.*, 1988; Hadley-Miller *et al.*, 1994). Une étude réalisée par Miller et al. (Hadley-Miller *et al.*, 1994) sur 23 patients SIA et 5 individus contrôles sans SIA montre un défaut dans l'arrangement des fibres élastiques dans la majorité des patients scoliotiques (82 % des scoliotiques).

2.1.2.3 Les théories biomécaniques de l'évolution des scoliose

Les influences mécaniques sur la croissance de la colonne vertébrale semblent jouer un rôle important dans la progression de la courbe des scoliose car elles apparaissent principalement pendant la période rapide de croissance de l'adolescence. Plusieurs auteurs ont proposé que le développement de la scoliose serait basé sur la modification du profil sagittal (Cruickshank *et al.*, 1989; Deacon *et al.*, 1985; Dickson, 1992; Murray *et al.*, 1996; Roaf, 1966; Somerville, 1952; Willner *et al.*, 1983). D'après cette hypothèse, les patients avec une scoliose idiopathique développent des hypocyphoses progressives. Elles sont suivies d'une lordose de la colonne thoracique, causant le plissement de la colonne vertébrale sous le chargement physiologique appliqué à celle-ci.

Smith et al. ont décrit plus tard, une déformation dans le plan transverse et un phénomène de dérive osseuse vers la concavité de la courbe (Smith *et al.*, 1991). Plus récemment, Porter et al. ont proposé que la longueur de la moelle épinière était plus courte que la longueur antérieure du corps vertébral, ceci causant le pliement de la colonne vertébrale et finalement la déformation typique dans les trois plans de l'espace de la scoliose idiopathique (Porter, 2000). Cependant, la cause de cette théorie de croissance antérieure et postérieure de la colonne vertébrale n'a pas été déterminée. Cela pourrait être relié aux différences dans le taux de croissance endochondral et intramembranaire des éléments vertébraux.

Une fois la déformation scoliotique établie, la plupart conviennent que plusieurs composants de la progression de la courbe sont régulés par le principe de Hueter-Volkman (Hueter, 1862; volkmann, 1882). Ce principe établit que la croissance est retardée par une compression augmentée et qu'elle est accélérée quand les charges compressives sont réduites. Stokes et al. (Stokes *et al.*, 1998; Stokes *et al.*, 1996) ont proposé une théorie de modulation mécanique de la croissance vertébrale basée sur le principe de Hueter-Volkman, et ils croient qu'une fois que le chargement asymétrique se produit, un cercle vicieux se déclenche avec une déformation vertébrale progressive. Perdiolle et al. ont proposé qu'une petite courbure thoracique pourrait créer un chargement asymétrique causant une progression de la courbe une fois que la courbe atteint un certain niveau (Perdiolle *et al.*, 1993).

2.1.2.4 Les facteurs neurologiques et les facteurs musculaires

Le rôle de la musculature vertébrale dans la pathogenèse de la scoliose idiopathique a été le sujet de nombreuses études, en particulier dans la distribution des différents types de fibres associée à la déformation. Il a été montré que la scoliose peut être provoquée par des altérations au niveau du contrôle de la proprioception, un désordre neuromusculaire lié au neurotransmetteur impliqué dans l'état postural bipède (Ford *et al.*, 1988). Des différences ont été observées entre les muscles du côté concave et convexe de la courbure. En effet, plusieurs changements morphologiques et biochimiques dans les muscles de patients scoliotiques, telles qu'une différence de ratio des fibres de type 1 et de type 2 dans les muscles de la colonne vertébrale de même que

des anomalies indiquant une dénervation et une neuropathie, ont été documentés. Spencer (Spencer *et al.*, 1976a; Spencer *et al.*, 1976b) et Eccles ont été les premiers à décrire les fibres musculaires de type I et ceux de type II (Spencer *et al.*, 1976a; Spencer *et al.*, 1976b). Mannion *et al.* ont également mis en évidence, chez 14 patients, une diminution des fibres de type I dans les muscles paraspinaux du côté concave de la courbure contrairement au côté convexe où aucune différence n'a été observée (Mannion *et al.*, 1998).

2.1.2.5 Les facteurs biochimiques

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des facteurs biochimiques dans le développement de la scoliose et en particulier des études réalisées sur les plaquettes sanguines (Kindsfater *et al.*, 1994; Lowe *et al.*, 2002; Muhlrads *et al.*, 1982; Yarom *et al.*, 1982). En effet, plusieurs anomalies dans les plaquettes ont été observées chez les patients SIA tel qu'un taux intracellulaire élevé de calcium et de phosphore et une diminution de l'activité de plusieurs protéines intracellulaire (protéines contractiles, myosine adénosine triphosphate) (Yarom *et al.*, 1982). Une augmentation du taux de calmoduline serait associée à la SIA et à la progression de la courbure. De plus, la mélatonine serait un antagoniste de la calmoduline modulant ainsi le transport du calcium (Kindsfater *et al.*, 1994; Lowe *et al.*, 2002). Cependant ces facteurs biochimiques ne serait pas la cause de la SIA mais plutôt un bon indicateur de ce qui se produirait dans d'autres types cellulaires et tissus tel que les muscles. Les plaquettes et les muscles sont deux types cellulaires qui expriment l'actine et la myosine, des protéines contractiles. Ainsi, les défauts observés dans les plaquettes pourraient être retrouvés dans les muscles. Une étude réalisée par le Dr Enouf et le Dr Moreau (Bredoux *et al.*, 2006) a également mis en évidence un défaut dans la maturation des plaquettes en montrant une variation dans le niveau d'expression de différentes isoformes de Ca^{2+} -ATPase dans les plaquettes de 17 patients SIA. Ils ont ainsi montré une augmentation de l'expression de l'isoforme PMCA4b (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase) chez 70% des patients SIA comparativement à l'expression observée chez des sujets contrôles.

2.1.2.6 Les facteurs endocriniens

2.1.2.6.1 Les facteurs de croissance

La scoliose idiopathique adolescente survient principalement lors de la puberté et à un moment où la croissance s'accélère. Les facteurs de croissance ont ainsi été suspectés dans l'étiopathogénèse de la SIA. Nissinen et al. (Nissinen *et al.*, 1993) ont découvert que les enfants scoliotiques étaient plus grands que des enfants normaux. Cette différence peut être expliquée par une augmentation des niveaux d'hormones de croissance mais cette hypothèse est contredite par les travaux de Misol et al. (Misol *et al.*, 1971). Il est à mentionner que des cas de scoliose sont survenus suite au traitement par hormone de croissance (Docquier *et al.*, 2004) malgré qu'aucun lien direct avec le traitement substitutif par hormone de croissance n'ait pu être établi.

Différentes études ont également montré une interaction entre l'hormone de croissance et la mélatonine, une autre hormone semblant être impliquée dans le développement de la SIA. Deux études réalisées sur des hommes sains ont montré que l'administration orale de mélatonine conduisait à une augmentation du taux de l'hormone de croissance (GH) dans la plasma et augmentait également la réponse de l'hormone de croissance à la GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) (Meeking *et al.*, 1999; Valcavi *et al.*, 1987; Valcavi *et al.*, 1993). Une étude récente montre également que les enfants ayant une déficience en hormone de croissance ont des taux sanguins de mélatonine augmentés. Cependant, bien qu'une relation entre la mélatonine et l'hormone de croissance ait été mise en évidence par plusieurs études, le mécanisme impliquant l'interaction entre ces deux hormones est encore peu compris.

2.1.2.6.2 La mélatonine

La mélatonine, une hormone produite principalement par la glande pinéale au niveau du cerveau, régule plusieurs activités physiologiques notamment notre horloge biologique (cycle circadien), le système nerveux et immunitaire de même que le métabolisme osseux. La mélatonine peut également être produite par la rétine (Ivanova *et al.*, 2003), le tractus intestinal et les lymphocytes (Carrillo-Vico *et al.*, 2004) mais contrairement à celle produite par la glande pinéale et les lymphocytes, celle-ci n'est pas sécrétée dans la circulation générale et agit de manière locale au niveau des cellules rétinienne et de la

muqueuse intestinale (Green *et al.*, 2004). Le rôle de la mélatonine a été évoqué à plusieurs reprises suite à des expériences qui ont démontré que l'ablation de la glande pinéale entraînait le développement d'une scoliose chez le poulet et le rat (Machida *et al.*, 1993; Machida *et al.*, 1999). Le développement d'une scoliose chez des souris bipèdes et quadrupèdes de souches C57BL/6 (souris présentant un défaut dans la synthèse de la mélatonine) confirme également l'importance de la mélatonine dans cette pathologie (Machida *et al.*, 2006; Machida *et al.*, 1999). De plus, l'injection de doses quotidiennes de mélatonine prévient la survenue de la maladie chez ces rats bipèdes et les poulets pinéalectomisés. Cependant, la pinéalectomie réalisée chez de jeunes primates non humains n'a pas conduit au développement de scoliose et cela chez aucun des primates pinéalectomisés, malgré une carence complète en mélatonine (Cheung *et al.*, 2005). De plus, la pertinence biologique de la mélatonine dans la scoliose idiopathique est controversée puisque des études ont montré que les taux circulants de mélatonine n'étaient pas significativement différents des individus contrôles (Brodner *et al.*, 2000; Sadat-Ali *et al.*, 2000). Cependant, Moreau *et al.* (Moreau *et al.*, 2004) ont démontré dans des cellules provenant des patients scoliotiques, l'existence d'un défaut de signalisation de la mélatonine. Cette découverte est venue actualiser l'importance de cette hormone dans la pathogénie de la scoliose. Ces travaux ont permis de démontrer que le défaut de signalisation serait dû à une augmentation de la phosphorylation des protéines G inhibitrices (Gi) qui engendre leur inactivation. Ces études ont permis également de déterminer trois groupes de patients selon leur réponse à différentes concentrations de mélatonine (10^{-5} à 10^{-11} M).

L'inactivation des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 par des techniques de mutagenèse ont permis de mieux comprendre le rôle de ces récepteurs. En effet, la mutation du récepteur MT1 réalisée chez les souris (souris homozygotes pour la mutation) ne montre pas d'effet de ce récepteur sur la survie ni dans la fonction du rythme circadien. Cependant, l'inactivation du récepteur abolit l'effet inhibiteur de la mélatonine sur la décharge synaptique. De plus, les souris mutantes pour le récepteur de la mélatonine MT1 montrent une réponse partielle à la mélatonine mettant ainsi en évidence une redondance des récepteurs de la mélatonine (Liu *et al.*, 1997). La réponse partielle observée est abolie dans les souris double mutantes pour les récepteurs MT1 et

MT2 montrant le rôle du récepteur MT2 dans cette redondance (Jin *et al.*, 2003). De plus, une étude ciblée sur les variants alléliques du récepteur de la mélatonine MT1 a montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les polymorphismes présents chez les individus atteints de SIA et les individus normaux (Morcuende *et al.*, 2003).

2.1.2.6.3 *Les estrogènes*

La prédominance féminine de la SIA a amené des chercheurs à se questionner sur le rôle potentiel des estrogènes dans le développement de la SIA. En effet, la SIA est présente dans une proportion fille : garçon de 2 pour 1 avec des déformations inférieures à 10° et de 10 pour 1 avec des déformations supérieures à 30° d'angle de Cobb. De plus, l'incidence de la maladie est principalement observée au moment de la puberté qui est une période où les estrogènes jouent un rôle important. Une étude a récemment montré une relation entre l'âge à la ménarche, qui désigne l'âge où les jeunes filles ont pour la première fois leurs règles et la prévalence de la SIA (Grivas *et al.*, 2006) ce qui laisse penser que les estrogènes pourraient intervenir dans le développement de cette pathologie. En effet, une étude de Warren *et al.* sur les jeunes danseuses de ballets a montré que 15 danseuses sur 18 atteintes de scoliose avait eu une ménarche significativement retardé (14 ans et plus) comparativement aux danseuses sans scoliose. Cette étude suggère qu'une ménarche retardée correspondant à un hypoestrogénisme pourrait prédisposer les danseuses de ballets à la scoliose et aux fractures (Balasch, 2003; Warren *et al.*, 1986). Alors que d'autres études ont suggéré un effet des estrogènes et des agonistes des estrogènes (17- α -éthynylestradiol) sur le développement de scoliose. Le traitement du *Xenopus laevis blastulae* avec une dose pharmacologique de 17- β -estradiol (E2) 10^{-5} M a conduit au développement de scoliose (Iwamuro *et al.*, 2003). De même, le traitement du *Fundulus heteroclitus* avec un agoniste des estrogènes (17 α -éthynylestradiol (EE2)) conduit à une incidence significativement plus élevée des scoliose (Boudreau *et al.*, 2004). Cependant les mécanismes moléculaires par lesquels les estrogènes interviendraient dans l'initiation et/ou la progression de cette maladie ne sont pas clairement élucidés. Les récepteurs des estrogènes, en particulier le récepteur ER α , ont été visés par plusieurs études démontrant chez l'humain que le polymorphisme de ce récepteur peut être corrélé avec la progression de la SIA dans la

population japonaise et en particulier pour les déformations thoraciques droites (Inoue *et al.*, 2002). Néanmoins, une étude récente réalisée sur 540 patients chinois contredit ces résultats et montre qu'il n'y a pas d'association entre les polymorphismes PvuII et XbaI du gène du récepteur aux estrogènes ER α et la sévérité de la courbe (Tang *et al.*, 2006).

2.2 LA MÉLATONINE

2.2.1 Généralités

La mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est une neurohormone principalement synthétisée par la glande pinéale et est secrétée dans la circulation où elle agit au niveau des tissus cibles. La mélatonine est produite durant la nuit (Claustrat *et al.*, 2005) et sa synthèse est réalisée en plusieurs étapes : la première est la conversion du L-tryptophan, capté des vaisseaux cérébraux, en sérotonine. La sérotonine est ensuite métabolisée par l'arylalkylamine N-acetyltransférase (AA-NAT) en N-acétyl-5-hydroxytryptamine. L'étape finale de la voie de synthèse de la mélatonine est la conversion du N-acétyl-5-HT en mélatonine par la hydroxyindole-o-méthyltransferase. La mélatonine est une protéine lipophile qui est largement distribuée à travers le corps. Elle intervient dans la régulation du rythme circadien et saisonnier. Mais elle a également d'autres fonctions physiologiques et biochimiques. La mélatonine agit via quatre modes d'action principaux :

- sa liaison à des protéines intracellulaires (exemple: calmoduline) (Benitez-King *et al.*, 1991),
- des effets antioxydatifs (Reiter *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2003),
- sa liaison à des récepteurs membranaires (Macchi *et al.*, 2004),
- et sa liaison à des récepteurs nucléaires de la famille des récepteurs orphelins (Rafii-El-Idrissi *et al.*, 1998).

2.2.2 La signalisation cellulaire de la mélatonine

La mélatonine peut activer ou inhiber des cascades de signal de transduction à travers différents récepteurs. La mélatonine se lie à des récepteurs membranaires (affinité de l'ordre du picomolaire) ainsi qu'à des récepteurs nucléaires (RZR/ROR) (affinité de l'ordre du nanomolaire).

2.2.2.1 Action via ses récepteurs

1.1.1.1.1 Les récepteurs membranaires, MT1 et MT2

La mélatonine agit via deux récepteurs membranaires : MT1 (Mel-1A ou MTNR1A) et MT2 (Mel-1B ou MTNR1B). Ces récepteurs sont constitués de sept segments transmembranaires et sont couplés aux protéines G ("Guanine nucleotide-binding proteins") (RCPG) (Masana *et al.*, 2001; Reppert, 1997). Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques possédant une activité GTPase et sont constituées des sous-unités alpha, bêta et gamma. Il existe au moins 20 sous-unités alpha dont les plus présentes sont les protéines G alpha i (inhibitrice), G alpha S (stimulatrice), G alpha q (active la voie de la phospholipase C (PLC)). Les protéines G agissent comme des « interrupteurs moléculaires » qui sont capables de déclencher une voie de signalisation en conduisant à la production de messagers secondaires. A l'état inactif, la sous-unité alpha lie le GDP. Lorsque le récepteur couplé aux protéines G est activé par la liaison de son ligand, la protéine G se lie au récepteur. Cette liaison au récepteur permet la libération du GDP par la protéine G qui le remplace par du GTP. La sous-unité Galpha se dissocie ensuite des sous-unités gamma et beta. Les sous-unités alpha et gamma/beta peuvent ainsi déclencher différentes voies de signalisation en activant des messagers secondaires différents et des canaux ioniques (G γ / β). L'hydrolyse du GTP par la sous-unité G alpha permet à nouveau sa liaison aux sous-unités beta/gamma et peut ainsi commencer un nouveau cycle.

Des études réalisées sur des rongeurs ont montré que les récepteurs membranaires de la mélatonine, MT1 et MT2, sont présents dans des tissus variés. Chez l'humain, ces récepteurs sont également présents dans de nombreux organes : le cerveau, la rétine, le système cardiovasculaire, le foie, la vésicule biliaire, les intestins, les reins, les cellules immunitaires, les adipocytes, la prostate, les cellules épithéliales du sein, les ovaires et la peau. Les voies de transduction des récepteurs de la mélatonine couplés aux protéines G à travers la membrane plasmique font intervenir plusieurs messagers secondaires : l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), le diacylglycérol (DAG), l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3), le guanosine monophosphate (GMPc) et le calcium. Ces messagers secondaires, vont véhiculer l'information liée à la fixation du ligand jusqu'à des effecteurs intracellulaires terminaux responsables, plus ou moins directement, de la

fonction de la mélatonine. Les interactions du récepteur MT1 avec plusieurs protéines G ont été démontrées : G_i , G_o , G_q , G_z , G_{12} , G_{13} , G_{14} , G_{16} (Barrett *et al.*, 2003; Brydon *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2002a; Ho *et al.*, 2001; New *et al.*, 2003). Cependant c'est majoritairement la forme inhibitrice qui est impliquée dans la transduction du signal de la mélatonine et une étude a montré qu'un défaut existe à ce niveau dans la SIA (Moreau *et al.*, 2004).

La voie de signalisation activée par la mélatonine semble être régulée et tissu spécifique. La liaison de la mélatonine à son récepteur membranaire amène à la liaison de la protéine G ainsi qu'au changement de conformation de la sous unité alpha intracellulaire spécifique. La mélatonine à travers l'activation de la protéine $G\alpha$ inhibitrice, conduit à une inhibition de la stimulation de la production de l'AMPc induite par la Forskoline (Niles *et al.*, 1990; Niles *et al.*, 1991; Witt-Enderby *et al.*, 1996). La diminution du taux d'AMPc intracellulaire conduit à une inhibition de l'activation de la PKA et donc à une inhibition de la phosphorylation de CREB (cAMP-Responsive Element Binding Protein)(Masana *et al.*, 2001; McNulty *et al.*, 1994; Witt-Enderby *et al.*, 1998). En plus de la cascade dépendante de l'AMPc, le récepteur MT1 peut activer un signal de transduction dépendant de la PLC directement ou indirectement via les sous unités β et γ des protéines G et activer ainsi la voie de la PKC par la formation de DAG (Brydon *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2002a; Godson *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 2002; Roka *et al.*, 1999). Dans un autre temps, l'activation de MT1 augmente la phosphorylation de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ou MEK1 (MAPK/ERK Kinase-1), MEK2 (MAPK/ERK Kinase-2) et ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2)(Hazlerigg *et al.*, 1996).

Ces récepteurs peuvent aussi moduler la formation de l'acide arachidonique (Godson *et al.*, 1997) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase)(Chan *et al.*, 2002a; Witt-Enderby *et al.*, 2003). De plus, plusieurs mécanismes de réponse à la mélatonine sont médiés par la régulation des canaux ioniques (figure 1).

Les niveaux d'AMPc et de GMPc (Petit *et al.*, 1999) sont également modulés à travers l'activation de MT2. De façon similaire à MT1, l'activation de MT2 par la mélatonine inhibe la formation d'AMPc (Brydon *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000; MacKenzie *et al.*, 2002) et MT2 est également couplé à une stimulation de l'hydrolyse de

l'inositolphosphate (IP) en diacylglycérol (DAG) et en inositol 3,4,5 triphosphate (IP3) qui jouent un rôle de second messagers (Ho *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 2002). Néanmoins, contrairement à MT1, la localisation de MT2 est plus limitée (le cervelet, le SNC, la rétine, les reins, les ovaires, les os, les vaisseaux cardiaques et dans des lignées cellulaires cancéreuses) (von Gall *et al.*, 2002).

La sensibilité de la réponse des récepteurs de la mélatonine à son ligand reflète des changements dans la densité des récepteurs à la mélatonine qui se produisent pendant le cycle 24h jour/nuit. Les mécanismes qui engendrent une réponse différente à la mélatonine selon le tissu ne sont pas encore bien compris, mais les données commencent à montrer que les événements transcriptionnels et le découplage des protéines G pourraient être impliqués.

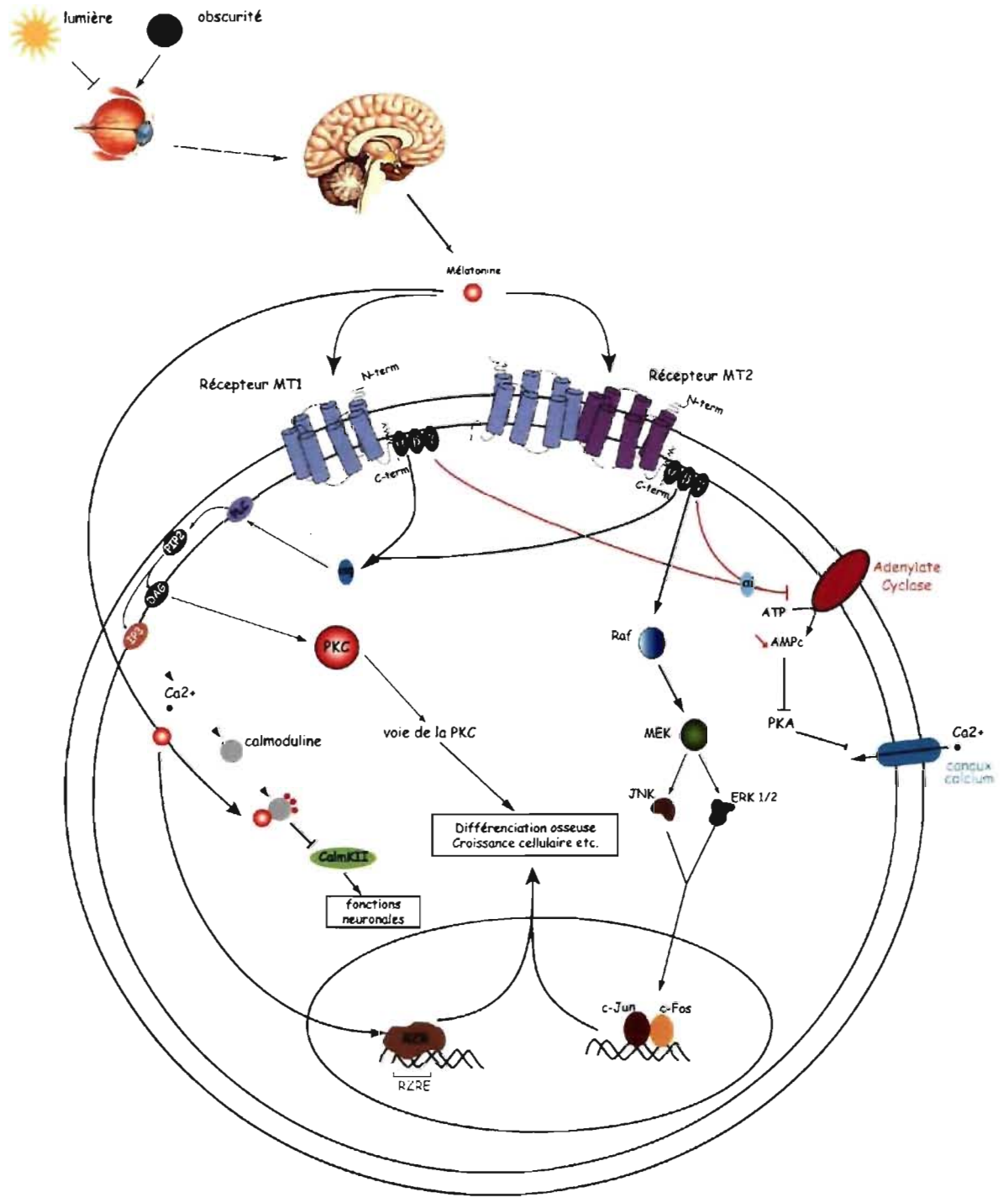


Figure 1 : Schéma de la voie de signalisation de la mélatonine via les récepteurs MT1 et MT2 (adapté de ambion.com)

2.2.2.1.1 *Le récepteur MT3*

Un troisième récepteur à la mélatonine MT3 a été cloné chez le Hamster (Nosjean *et al.*, 2000). Il a été montré que cette protéine avait 95% d'homologie avec la quinone réductase 2 humaine, une enzyme impliquée dans la détoxification (Nosjean *et al.*, 2000). Ce récepteur cytosolique possède une plus faible affinité pour la mélatonine que les récepteurs membranaires MT1 et MT2 (de l'ordre du nanomolaire)(Nosjean *et al.*, 2001). Ce récepteur est également exprimé de façon ubiquitaire (le foie, les reins, le cerveau, les tissus adipeux, les muscles squelettiques, les poumons, les intestins, les testicules)(Nosjean *et al.*, 2001). Récemment, des études ont montré que le récepteur MT3 pourrait être impliqué dans la régulation de la pression intraoculaire chez le lapin (Pintor *et al.*, 2001) et dans la réponse inflammatoire (Lotufo *et al.*, 2001). Le récepteur MT3 n'est pas un récepteur au même titre que les récepteurs membranaires de la mélatonine MT1 et MT2 mais plutôt un récepteur pharmacologique puisqu'il reconnaît de nombreux ligands mais avec une affinité moindre.

2.2.2.1.2 *Les récepteurs nucléaires*

La mélatonine se lie également à des récepteurs nucléaires RZR/ROR qui sont des récepteurs de la famille des récepteurs nucléaires orphelins (Becker-Andre *et al.*, 1994) (Rafii-El-Idrissi *et al.*, 1998). Contrairement à la majorité des hormones la mélatonine est une petite molécule chimique qui peut rentrer librement dans la cellule où elle peut se lier au récepteur cytosolique MT3 ou se rendre au noyau et se lier au récepteur RZR/ROR. La constante de liaison de la mélatonine à ces récepteurs est de l'ordre du nanomolaire, ce qui est similaire à la concentration physiologique de la mélatonine. Des études de transfection utilisant une construction RORE-gène rapporteur ont montré que l'activité transcriptionnelle de ses récepteurs était augmentée en présence de mélatonine et de ces analogues (Missbach *et al.*, 1996; Schrader *et al.*, 1996). Ces récepteurs nucléaires contiennent cinq domaines : un domaine A/B (N-terminal) qui possède une séquence AF-1, un domaine C de liaison à l'ADN, un domaine D variable charnière, un domaine E de liaison au ligand (contenant AF2) et un domaine optionnel court nommé F. Ces récepteurs se lient à l'ADN sous forme de monomères et reconnaissent les éléments de réponse RORE (éléments de réponse aux hormones)(Giguere *et al.*, 1995;

Greiner *et al.*, 1996; Schrader *et al.*, 1996). Le récepteur RZR ainsi que ROR α sont exprimés dans de nombreux organes alors que les récepteurs RZR β et RZR γ sont plus restreints (Smirnov, 2001) (Wiesenberg *et al.*, 1995). ROR γ est le plus exprimé dans les muscles squelettiques (Hirose *et al.*, 1994). Ces récepteurs nucléaires sont ainsi impliqués dans de nombreuses actions physiologiques. Ils sont en particulier impliqués dans les réactions du système immunitaire (He *et al.*, 1998), dans la différenciation du système nerveux central (Matysiak-Scholze *et al.*, 1997) et possiblement dans la modulation du métabolisme lipidique (Mamontova *et al.*, 1998).

2.2.2.1.3 *Autres récepteurs*

Il existe également chez les mammifères, un récepteur qui possède 45% d'homologie avec la séquence d'acides aminés des récepteurs de la mélatonine, le récepteur GPR50. Il est cependant incapable de lier la mélatonine et son ligand est encore inconnu. Néanmoins, une étude a montré que le récepteur GPR50 était capable d'inhiber la fonction du récepteur MT1 en l'hétérodimérisant avec ce dernier (Levoye *et al.*, 2006). En effet, le récepteur GPR50 abolit la liaison de l'agoniste ainsi que le couplage des protéines G au récepteur MT1 de l'hétérodimère. Cependant, le récepteur GPR50 hétérodimérisant avec le récepteur MT2 ne modifie pas la fonction de ce dernier.

2.2.2.2 **Action non-dépendante des récepteurs via la calmoduline**

La mélatonine a également la capacité d'agir indépendamment de ses récepteurs. Cette capacité est attribuée à son petit poids moléculaire et à sa nature hautement lipophile et/ou dû à un mécanisme actif d'absorption. La mélatonine une fois dans le cytoplasme se lie à la calmoduline (CaM) avec une grande affinité. La calmoduline est codée par trois gènes distincts transcrit en huit ARNm constitués de différents signaux de polyadénylation mais sont cependant traduits en une seule protéine identique de 148 acides aminés. La calmoduline est une protéine ubiquitaire liant le Ca²⁺ et qui relaie le signal du Ca²⁺ à différentes protéines cibles (Cheung, 1980). Le complexe Ca²⁺-CaM agit directement par interaction avec des enzymes cibles clés (adénylates cyclases, phosphodiésterases, microtubule binding proteins (MAPs) et tubuline 4) (Lee *et al.*, 1984; Salter *et al.*, 1981; Sharma *et al.*, 1986) et indirectement via des protéines kinases spécifiques (Klee, 1991). La liaison du Ca²⁺ à la calmoduline expose des régions

hydrophobes permettant ainsi la liaison des protéines cibles. Initialement, il a été suspecté que la calmoduline pouvait être impliquée dans la transduction du signal intracellulaire de la mélatonine car les changements dans l'activité de la calmoduline étaient comparables aux effets de l'hormone sur la structure du cytosquelette (Benitez-King *et al.*, 1990). D'autres expériences ont suggéré une interaction physiologique entre la CaM et la mélatonine (Benitez-King *et al.*, 1991). De plus, des expériences de séparation électrophorétique après incubation de la CaM avec de la mélatonine tritiée (Mélatonine- H^3) ont montré que la mélatonine migre avec la calmoduline seulement en présence de Ca^{2+} . Ainsi ces expériences ont montré que la calmoduline possède une haute affinité pour la mélatonine mais cette interaction est dépendante de la présence de Ca^{2+} (Benitez-King *et al.*, 1991). Enfin, plusieurs études ont montré que la mélatonine joue un rôle d'antagoniste de la liaison des ions calcium (Ca^{2+}) à la calmoduline (Benitez-King *et al.*, 1993a; Benitez-King *et al.*, 1993b) et qu'elle est également capable d'inhiber de manière dose dépendante l'activation de l'enzyme Ca^{2+} -CaM-dépendant phosphodiesterase par la calmoduline. Les modèles animaux ont permis de montrer que l'expression altérée de la calmoduline peut amener au développement de pathologies telles qu'une hypertrophie cardiaque (surexpression de la calmoduline) (Obata *et al.*, 2005), maladie de Graves (hypertyroïdie) (Inaba *et al.*, 1984).

2.2.3 Régulation des récepteurs de la mélatonine

2.2.3.1 Les acides aminés impliqués dans l'activation et la signalisation des récepteurs de la mélatonine

La capacité de la mélatonine à lier, activer et moduler ses propres récepteurs dépend de l'interaction de la mélatonine avec des acides aminés ou des domaines spécifiques de ses récepteurs. L'analyse de liaison de la mélatonine à ses récepteurs et les changements résultants qui induisent leur activation ont été facilités par des modèles récents de récepteurs de la mélatonine qui sont basés sur les cristallographies de la rhodopsine (Navajas *et al.*, 1996). A partir de ce modèle, Navajas *et al.* ont proposé un site hypothétique de liaison de la mélatonine, dans lequel un résidu valine et un résidu histidine sont responsables de la reconnaissance du groupe 5-methoxy de la mélatonine et un résidu sérine et alanine qui sont nécessaires à la liaison du groupe fonctionnel N-acétyl (Navajas *et al.*, 1996). Plusieurs études de mutagenèse sur des résidus des

récepteurs de la mélatonine, MT1 et MT2, ont été réalisées et ont montré leur importance dans la liaison du ligand et dans la fonction de ces récepteurs. Des études de mutagenèse du récepteur MT1, on montré que la valine 208 (V208) conduit à une diminution de 2 à 5 fois de la liaison de la 2-[¹²⁵I]-iodomélatonine comparativement au récepteur natif (Conway *et al.*, 1997). Cette mutation n'affecte cependant pas la fonctionnalité du récepteur dans les cellules transfectées HEK. Ce mutant n'affecterait que la liaison du ligand et suggèrent ainsi que la valine 208 participerait à la poche de liaison du récepteur. Les études de mutagenèse sur le résidu histidine 211 ont montré que ce résidu serait aussi impliqué dans la liaison du ligand puisque le changement de l'histidine en phenylalanine (H211F) ou en leucine (H211L) conduit à une diminution de la liaison du ligand de 6 à 7 fois comparativement au récepteur natif. De plus, l'analyse de H211F et H211L révèle que ces mutants ne sont pas capables d'inhiber la production d'AMPc (Conway *et al.*, 1997). Ceci révèle que l'histidine 211 est impliquée dans la liaison du ligand mais également dans l'activation du récepteur. L'analyse des mutations S110A et S114A dans le récepteur humain MT1 indique que ces mutations réduisent la liaison de la 2-[¹²⁵I]-iodomélatonine pour le récepteur de 8 à 9 fois. Ces mutations résultent aussi en une diminution de l'affinité du récepteur pour ses agonistes et ses agonistes partiels mais n'a cependant pas d'effet sur la liaison de l'antagoniste luzindole (Conway *et al.*, 1997). Enfin, il a été montré que les résidus cystéine joueraient un rôle important en modulant la liaison de haute affinité des agonistes au récepteur MT2, les mutations C113 ou C190 en alanine conduisent à une perte de la liaison de la 2-[¹²⁵I]-iodomélatonine au récepteur MT2 (Mseeh *et al.*, 2002). Le pont disulfure serait important dans la conformation du site de liaison de la mélatonine dans le récepteur MT2. Une mutation de G266 en une thréonine génère un mutant MT1 qui lie faiblement la 2-[¹²⁵I]-iodomélatonine comparativement au récepteur natif (Gubitze *et al.*, 2000). Des études ont également montré l'importance du segment transmembranaire 6 (TM6) du récepteur MT1 par la production de chimère (Gubitze *et al.*, 2000) ainsi que le segment transmembranaire 4 (TM4) (Conway *et al.*, 2000).

2.2.3.2 Régulation négative des récepteurs à la mélatonine

La régulation négative est un processus qui vise à diminuer le nombre de récepteurs à la membrane cellulaire après une exposition prolongée ou répétée à la mélatonine ou à un

autre agoniste. Ce mécanisme de diminution des récepteurs est différent de celui observé dans la désensibilisation des récepteurs par phosphorylation. Cette diminution passe par un mécanisme de dégradation qui est observé au niveau protéique et de l'ARNm. De plus, ces mécanismes sont agoniste-dépendant (Kallal *et al.*, 1998). Les récepteurs sont tout d'abord internalisés dans des vésicules et sont ensuite pour la majorité recyclés à la membrane. Ils peuvent ainsi être à nouveau activés par la liaison de l'agoniste. Cependant une petite minorité des récepteurs internalisés sont envoyés vers les lysosomes pour y être dégradés (von Zastrow *et al.*, 1992).

2.2.3.3 Désensibilisation des récepteurs à la mélatonine

Bien que la désensibilisation des récepteurs de la mélatonine ait été peu étudiée, il est fort probable que ce mécanisme soit similaire à celui utilisé par d'autres récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Gerdin *et al.*, 2004; Hazlerigg *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 2000; MacKenzie *et al.*, 2002).

La désensibilisation est un mécanisme qui permet d'inactiver les récepteurs couplés aux protéines G par phosphorylation. La phosphorylation de ces récepteurs peut être effectuée par différentes kinases telles que les Sérine/thréonine kinase GRK (G-protein Receptor Kinases), la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) etc. (Hosey *et al.*, 1995; Krupnick *et al.*, 1998). Il existe deux mécanismes de désensibilisation : la désensibilisation homologue (c'est-à-dire par la mélatonine elle-même) et la désensibilisation hétérologue (c'est-à-dire par d'autres stimuli telle que la photopériode ou l'estradiol).

2.2.3.3.1 Désensibilisation homologue

Les intervenants de la désensibilisation homologue sont les kinases couplées aux protéines G (GRK) et la β -arrestine. La désensibilisation homologue est dépendante de la liaison du ligand au récepteur et de son activation. La famille des GRK comprends six membres dont certains d'entre eux, semblent avoir une spécificité pour certains récepteurs. Les GRK vont phosphoryler les résidus sérine et thréonine des récepteurs couplés aux protéines G au niveau de la queue C-terminale. Les GRK sont des protéines cytoplasmiques qui sont transloquées à la membrane sous le contrôle de différents mécanismes (farnésylation, liaison aux phospholipides, palmitoylation etc.). Elles

peuvent être régulées par des protéines telles que la calmoduline (Pronin *et al.*, 1997), la recoverine (Chen *et al.*, 1995) et la PKC. Cependant les GRK ne sont pas suffisantes pour l'inactivation totale des RCPG où la désensibilisation homologue nécessite également la présence d'une autre protéine, la β -arrestine. La β -arrestine possède plusieurs domaines qui interviennent dans la reconnaissance des récepteurs activés et phosphorylés : domaines de reconnaissance des résidus phosphorylés (domaine P), reconnaissance de la forme activée du récepteur (domaine A). La liaison de ces deux domaines aux récepteurs activés induit un changement de conformation qui permet d'exposer un troisième domaine de la β -arrestine, le domaine S (domaine de liaison au récepteur) augmentant ainsi l'affinité de liaison des β -arrestines aux récepteurs. Les récepteurs ainsi liés à la β -arrestine ne peuvent plus se coupler aux protéines G et induire leur voie de signalisation au niveau cellulaire.

2.2.3.3.2 Désensibilisation hétérologue

La désensibilisation hétérologue fait intervenir des protéines kinases qui sont activés par d'autres récepteurs présents à la membrane cellulaire. Ces kinases sont ainsi activées grâce aux seconds messagers produits après activation de ces autres récepteurs. Les kinases impliquées dans ce mécanisme sont la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC). La phosphorylation des récepteurs par ces kinases conduit à une diminution du couplage des RCPG aux protéines G conduisant ainsi à une inactivation des récepteurs.

2.2.3.3.3 Internalisation des récepteurs

Les récepteurs soumis à la désensibilisation homologue et hétérologue sont ensuite internalisés dans des vésicules de clathrine et se retrouve ainsi dans des endosomes précoces. Ces endosomes seront retrouvés à la périphérie cellulaire où ils seront redirigés à la membrane en passant par le réticulum endoplasmique ou redirigés vers les compartiments tardifs de l'endocytose. Les endosomes tardifs fusionnent ensuite avec les lysosomes (Mullock *et al.*, 1998). Les récepteurs sont ensuite dégradés par les enzymes présentes dans les lysosomes.

2.2.4 LA MÉLATONINE ET L'OS

De nombreuses études ont montré le lien entre la mélatonine et le métabolisme osseux. La mélatonine et ses récepteurs semblent impliqués dans la prolifération, l'induction de la différenciation des ostéoblastes et dans la formation de l'os (Roth *et al.*, 1999). Une des études qui appuie cette implication de la mélatonine montre que cette hormone stimule la synthèse de collagène de type I, protéine intervenant dans la formation de l'os et qui constitue la trame de la matrice osseuse, dans les lignées cellulaires d'ostéoblastes cultivées *in vitro* (Nakade *et al.*, 1999). La différenciation des ostéoblastes est générée à partir de cellules ostéoprogénitrices qui se différencient en ostéoblastes après arrêt de leur prolifération. Les ostéoblastes sont des cellules osseuses chargées de la synthèse et de la minéralisation de la matrice osseuse. Leur rôle est également de contrôler la dégradation de la matrice osseuse grâce à la production de collagénase. La différenciation des ostéoblastes ainsi que le contrôle de leur prolifération et leur apoptose est contrôlé par des facteurs de transcription (Cbaf1/Runx2) (Yamaguchi *et al.*, 2000), par des interactions cellulaires (Hay *et al.*, 2000), par des hormones telles que l'hormone parathyroïdienne (PTH) (Strewler, 2001) ou des facteurs de croissance (TGF- β , FGF). Différents marqueurs sont exprimés lors de la différenciation des cellules précurseurs en ostéoblastes tels que la phosphatase alcaline (Huang *et al.*), suivi plus tard dans la différenciation du collagène de type I, de l'ostéopontine et au niveau de l'ostéoblaste différencié : la sialoprotéine osseuse (BSP) et l'ostéocalcine (Oldberg *et al.*, 1988; Radio *et al.*, 2006). Des études réalisées sur le lien entre la mélatonine et la formation de l'os ont montré que les effets de cette hormone sur les cellules osseuses semblent passer par ses récepteurs membranaires, en particulier le récepteur MT2 (Roth *et al.*, 1999). En effet, un traitement des ostéoblastes MC3T3 par le luzindole (antagoniste de la mélatonine) et la toxine pertussique (inactive les protéines Gi) diminue l'expression de BSP (salioprotéine osseuse) et ALP (phosphatase alcaline) induite par la mélatonine. De plus, le promoteur de la BSP contient un élément de réponse des récepteurs nucléaires de la mélatonine (RZR)(Schrader *et al.*, 1996). La mélatonine pourrait ainsi jouer un rôle important dans la croissance osseuse.

De plus, la voie de signalisation de la mélatonine induit par les récepteurs membranaires influence le taux d'AMPc intracellulaire et pourrait ainsi agir sur l'expression des

récepteurs nucléaires RZR/ROR qui est régulée elle-même par le taux d'AMPc (Baler *et al.*, 1996).

Deux études réalisées sur des souris C57BL/6j naturellement déficientes en mélatonine ont montré l'importance de la mélatonine sur l'os et particulièrement dans le développement de la scoliose. La souche de souris C57BL/6J possède une mutation au niveau du gène AANAT (enzyme nécessaire à la synthèse de mélatonine) encodant ainsi pour une protéine tronquée. La mutation altère l'épissage de l'ARN et conduit ainsi à une protéine tronquée puisqu'il contient un codon stop (Roseboom *et al.*, 1998). Au niveau fonctionnel, une diminution de la densité minérale osseuse a été observée (Akhter *et al.*, 2004; Raum *et al.*, 2007). En effet, ces souris lorsqu'elles sont placées en mode bipède suite à l'amputation des membres supérieurs développent des scoliose et l'injection de mélatonine prévient ce développement (Machida *et al.*, 2006; Oyama *et al.*, 2006). Deux études comparant le métabolisme osseux chez les souris C57BL/6j, déficiente en mélatonine, et chez les souris C3H, présentant une surproduction de mélatonine, ont montré que la masse osseuse ainsi que la densité osseuse étaient diminuées chez ces premières comparativement à celles observées chez les souris C3H (Chen *et al.*, 1999a; von Gall *et al.*, 2000).

2.3 LES ESTROGÈNES

2.3.1 Généralités

Les estrogènes sont des hormones stéroïdiennes synthétisées principalement dans les ovaires mais également dans les testicules, le tissu adipeux, l'hypothalamus et le cerveau. La distribution des estrogènes à travers le corps se fait à travers le sang dans lequel ces hormones sont liées à la globuline et à l'albumine. Les estrogènes pénètrent également dans les cellules dues à leur caractère lipophile et se lient à des récepteurs intracellulaires. Différents estrogènes sont produits, les trois principaux sont l'estradiol, l'estriol et l'estrone. Ce sont des dérivés du noyau estrane qui comporte un cycle aromatique. La synthèse des estrogènes se fait à partir de précurseurs, les androgènes qui, chez la femme, sont sécrétés par la glande surrénale et les ovaires. Les estrogènes sont des dérivés du cholestérol et de la prégnénolone qui sont transformés en androstènedione et testostérone. La principale enzyme impliquée dans la synthèse de

l'estradiol et de l'estrone à partir de ces précurseurs est l'aromatase. Cette enzyme est constituée d'une cytochrome P-450 et d'une cytochrome réductase utilisant le NADPH comme réducteur (Simpson *et al.*, 2000). La synthèse d'estrogènes est variable au cours du cycle menstruel et durant la vie. Elle est augmentée au moment de la puberté et est fortement diminuée à la ménopause. Les estrogènes ont des effets variés, ils interviennent dans le développement des caractères sexuels primaires et secondaires (utérus, trompes, vagin, glandes mammaires et seins). Lors de la puberté, les estrogènes accélèrent la croissance, ayant ainsi un effet sur la croissance squelettique.

2.3.2 Signalisation cellulaire

2.3.2.1 Les récepteurs aux estrogènes

2.3.2.1.1 Les récepteurs $ER\alpha$ et $ER\beta$

Les estrogènes agissent via des récepteurs nucléaires, $ER\alpha$ et $ER\beta$ (Green *et al.*, 1986a)(Green *et al.*, 1986b; Greene *et al.*, 1986). Ce sont des récepteurs nucléaires à cinq domaines (A/B, C, D, E et F) appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes/thyroidiennes. Le domaine A, au niveau de la région N-terminale, représente le domaine d'interaction protéine-protéine et possède des fonctions de transactivation. En effet, il participe, par le recrutement de coactivateur transcriptionnel, à l'activation et à l'expression des gènes cibles des estrogènes. Ce domaine possède une fonction d'activation de la transcription ou AF-1 en plus de sites de phosphorylations fonctionnels. Le domaine C possède deux sous domaines, l'un qui intervient dans la liaison à l'ADN au niveau du ERE (Estrogen Response Element) et l'autre dans la dimérisation des récepteurs (DBD). Le domaine DBD possède une structure en doigts de zinc importante pour la dimérisation des récepteurs ainsi que dans la liaison des récepteurs à une séquence spécifique de l'ADN. Ce domaine est relativement bien conservé entre $ER\alpha$ et $ER\beta$ (Enmark *et al.*, 1997; Pace *et al.*, 1997). Le domaine D contient la région charnière et la séquence NLS (signal de localisation au noyau) permettant la translocation du récepteur au noyau. Les domaines E/F, placés en région C-terminale, constitue le domaine de fixation du ligand (LBD) et le domaine d'activation fonctionnelle AF-2. En absence d'estrogènes, les corépresseurs transcriptionnels sont liés au LBD ce qui maintient le récepteur dans un état

transcriptionnellement inactif. Plusieurs isoformes d'ER α et ER β ont été mis en évidence dans la littérature.

La réponse des récepteurs aux estrogènes aux antiestrogènes synthétiques (Génistéine, DES, tamoxifène, raloxifène, ICI 164,384) est différente selon le récepteur (tableau 1). Les différences dans la région N-terminale des deux récepteurs pourraient expliquer la réponse différente des deux récepteurs à leurs différents ligands (en particulier leur différence au niveau du domaine AF-1).

Tableau I: Les agonistes et les antagonistes des récepteurs aux estrogènes

Agoniste	Antagoniste
Benzestrol	cyclofenil
β -Zearalenol	Furan (antagoniste)
Dichlorodiphényltrichloro-ethane (DDT)	ICI 164,384
Diéthylstilbestrol (DES)	ICI 182,780
Furan (Agoniste)	Raloxifène
Hexestrol	Tamoxifène
Phytoestrogènes (Daidzéine, Génistéine)	4-hydroxytamoxifène (TOT)
Propyl pyrazole triol (PPT)	
Tétrahydrochrysène (THC)	

2.3.2.1.2 Les récepteurs orphelins (estrogen receptor-related receptors)

D'autres récepteurs nucléaires possédant une forte homologie avec les récepteurs nucléaires des stéroïdes ont été découverts. Ces récepteurs, les « estrogen related receptors » alpha, beta et gamma (ERR α , ERR β , ERR γ), constituent un sous groupe de récepteurs orphelins. Ils ont en particulier une homologie au niveau des domaines DBD et LBD mais ils ne lient pas les estrogènes ou les composés estrogéniques. L'action des estrogènes passent par deux effets cellulaires : des effets génomiques (ERE) et des effets non génomiques (signalisation rapide).

2.3.3 Les effets génomiques

2.3.3.1 Effets dépendants de la liaison à l'ADN

Les estrogènes, suite à leur liaison aux récepteurs vont conduire à un changement de conformation de leurs récepteurs qui permettra la dimérisation de ceux-ci. Les récepteurs dimérisés se lient à l'ADN au niveau du ERE (Estrogen Response Elements). Cette liaison est suivie d'un recrutement de coactivateurs et de facteurs de transcription conduisant ainsi à la formation d'un complexe de pré-initiation. Les récepteurs des estrogènes peuvent interagir avec les mêmes facteurs de transcription tels que fos et jun au niveau du site AP-1 pour permettre l'activation et l'expression de certains gènes (Paech *et al.*, 1997). À cause de leur homologie dans leur domaine AF-2, il a été anticipé que les deux sous-types de récepteurs aux estrogènes auraient un comportement similaire dans le recrutement des co-activateurs. Cependant, certaines différences dans le recrutement de ces coactivateurs ont été reportées et montrent ainsi que ER α et ER β peuvent avoir des effets opposés en présence d'estrogènes (Paech *et al.*, 1997).

Tableau II : Les coactivateurs des récepteurs aux estrogènes.

Facteurs	Références
SRC-1 (p160-1, N-CoA1)	(Wang <i>et al.</i> , 2007)
SRC-2 (TIF-2, GRIP-1, N-CoA2)	(Norris <i>et al.</i> , 1998)
SRC3 (ACTR, AIB, P/CIP, PRIP, RAC3, RAP250, TRAM1, TRBP)	(Labhart <i>et al.</i> , 2005)
CBP/p300	(Zhou <i>et al.</i> , 1998)
TRAP/DRIP	(Zhang <i>et al.</i> , 2005)
SRA (steroid receptor RNA activator)	(Coleman <i>et al.</i> , 2004)
Brg1/Brm	(Acevedo <i>et al.</i> , 2004)
Histone methyl transferase (CARM1)	(Chen <i>et al.</i> , 1999b)
PRMT2	(Qi <i>et al.</i> , 2002)
Ubiquitine ligase (E6-AP)	(Li <i>et al.</i> , 2006)
Ciz1	(den Hollander <i>et al.</i> , 2006)

Tableau III : Les corépresseurs des récepteurs aux estrogènes.

Facteurs	Références
MAP2	(Cui <i>et al.</i> , 2006)
TFII-I	(Ogura <i>et al.</i> , 2006)
RIP-140	(Augereau <i>et al.</i> , 2006)
SHP	(Johansson <i>et al.</i> , 1999)
DAX-1	(Zhang <i>et al.</i> , 2000)
NCoR	(Chien <i>et al.</i> , 1999)
SMRT	(Nagy <i>et al.</i> , 1997)
LcoR	(Fernandes <i>et al.</i> , 2003)
SAP30	(Laherty <i>et al.</i> , 1998)

2.3.3.2 Effet des ER indépendante de la liaison du ligand

Plusieurs études ont semblé mettre en évidence que l'activation des récepteurs stéroïdiens ne nécessite pas forcément la liaison du ligand au récepteur. Le mécanisme par lequel les récepteurs peuvent être activés sans la liaison du ligand implique la phosphorylation des récepteurs (Weigel, 1996). Les récepteurs sont phosphorylés par plusieurs protéines kinases telles que la protéine kinase A (PKA) (Aronica *et al.*, 1993) et la protéine kinase C (PKC) (Lahooti *et al.*, 1998). La phosphorylation des récepteurs agit sur la fonction des récepteurs aux estrogènes aussi bien de manière positive que négative. Elle peut augmenter l'affinité de liaison du ligand au récepteur (Likhite *et al.*, 2006) ou diminuer la stabilité du récepteur (Cheng *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2006). La phosphorylation joue également un rôle important dans la liaison du récepteur ER α à l'ADN, en augmentant (Castano *et al.*, 1997; Likhite *et al.*, 2006; Tzeng *et al.*, 1996) ou diminuant son affinité de liaison pour l'ADN (Chen *et al.*, 1999c). Elle est également importante dans d'autres parties de leur activité transcriptionnelle telle que leur interaction avec leurs cofacteurs (Bunone *et al.*, 1996; Likhite *et al.*, 2006; Masuhiro *et al.*, 2005) ou dans leur localisation subcellulaire (Lee *et al.*, 2002). De plus, la dimérisation des récepteurs semble être sous l'influence de la phosphorylation d'une sérine (Ser-236) dans la région LBD (Chen *et al.*, 1999c). Il est également possible que les récepteurs aux estrogènes modulent l'expression des gènes sans une liaison directe à l'ADN comme par exemple dans le cas de la liaison de ER α à

une sous unité de NF κ B qui prévient son interaction avec le promoteur de l'interleukine 6 (IL-6) (Galien *et al.*, 1997).

2.3.4 Effets non génomiques

En plus d'intervenir dans la transcription de certains gènes par l'intermédiaire de l'activation de ses récepteurs nucléaires, les estrogènes sont également capable de moduler un certains nombre de messagers secondaires tels que le Ca²⁺ intracellulaire (Improta-Brears *et al.*, 1999), la production d'AMPc (Aronica *et al.*, 1994), la génération de phosphate inositol (Le Mellay *et al.*, 1997), et l'activation de « mitogen-activated protein kinases » (MAPK), Erk1 et Erk2 (Endoh *et al.*, 1997; Watters *et al.*, 1997). Il est particulièrement intéressant de noter que l'existence d'une signalisation rapide initiée par les estrogènes a été démontrée dans des lignées d'ostéoblastes (ROS 17/2.8). Cette étude a montré que l'exposition des ostéoblastes aux estrogènes conduisait à une activation rapide des MAPK (5 minutes) (Endoh *et al.*, 1997). Des études utilisant des antagonistes des récepteurs des estrogènes (ICI 182,780 ; ICI 164,384) ont montré également que ER α et ER β pourrait faciliter cette signalisation rapide et l'activation des Erk (Improta-Brears *et al.*, 1999; Migliaccio *et al.*, 1996). Cependant le mécanisme par lequel les estrogènes agissent est encore peu connu, mais dû à la rapidité de son action, ce mécanisme interviendrait sûrement au niveau de la membrane plasmique. Un gène codant pour un récepteur de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, qui semble être impliqué dans la réponse rapide aux estrogènes, a été cloné. Son expression a été associée à l'expression des récepteurs aux estrogènes dans les cellules de cancer du sein (Carmeci *et al.*, 1997). Cette étude a également montré que les cellules n'exprimant pas les récepteurs des estrogènes sont également capables d'activer les kinases Erk en présence de 17- β -estradiol, probablement via les sous-unités γ et β des protéines G couplées au récepteur GPR30 (Carmeci *et al.*, 1997). Le récepteur GPR30 est un récepteur présent au niveau de la membrane plasmique qui conduit, suite à la liaison spécifique des estrogènes, à une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire (Filardo *et al.*, 2007). Il serait ainsi couplé à une protéine G α_s (Thomas *et al.*, 2005). Une étude a montré que les estrogènes réduisent les niveaux de protéines G $_z$, G $_{i1}$ et G $_{i3}$ dans l'hypothalamus (Raap *et al.*, 2000). De plus, le 17- β -estradiol diminue l'expression des

protéines $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes comparativement aux niveaux d'expression observés dans les contrôles (Papaioannou *et al.*, 1999).

2.3.5 Estrogènes et l'os

Les récepteurs des estrogènes sont présents au niveau des cellules osseuses, en particulier dans les ostéoblastes et les chondrocytes mais leur présence dans les ostéoclastes matures demeure controversée. Le taux d'ARNm d'ER α est 10 fois plus important que celui d'ER β dans l'os trabéculaire cependant le niveau d'expression de ces deux récepteurs reste pourtant faible par rapport à celui observé dans les organes reproducteurs. En plus de la présence des récepteurs des estrogènes dans les cellules osseuses, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication des estrogènes dans le métabolisme osseux. Une forte corrélation négative entre l'estradiol et les marqueurs du remodelage osseux (ALP, pro-collagène de type I, ostéocalcine) a été démontrée chez les filles durant la puberté (Blumsohn *et al.*, 1994; Cadogan *et al.*, 1998; Weaver *et al.*, 1997). De plus, la perte d'estrogènes conduit à la formation d'ostéoporose (Lindsay *et al.*, 1976; Raisz, 1988) montrant ainsi que les estrogènes sont essentiels pour le maintien de la masse osseuse chez les femmes (Migliaccio *et al.*, 1995). La présence des marqueurs du remodelage osseux est élevée durant l'enfance et augmente de façon plus importante encore pendant la puberté. Le rôle potentiel des estrogènes dans la SIA est également soutenu par l'ostéopénie observée chez les filles atteintes de scoliose idiopathique adolescente (Cheng *et al.*, 1999) chez environ 30% des patients, dans la population chinoise.

L'effet des estrogènes sur le remodelage osseux est de diminuer la fréquence d'activation et le nombre d'ostéoclastes et d'ostéoblastes. Cependant, l'effet des estrogènes sur les ostéoclastes est probablement indirect et serait le résultat d'une régulation de leur différenciation et de l'activité par des protéines produites par les ostéoblastes telles que RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand) et CSF-1 (colony stimulating factor 1) (Riggs *et al.*, 2002) (Eastell, 2005) (figure 2). Enfin, l'E $_2$ (17- β -estradiol) stimule aussi la synthèse et la sécrétion de l'ostéoprotégrine (OPG), une protéine qui a un rôle dans l'inhibition de la fonction des ostéoclastes. Sur les ostéoblastes, les estrogènes exerceraient un effet anabolique (Tobias *et al.*, 1999).

Les estrogènes ont également une action sur la plaque de croissance en agissant sur l'apoptose des chondrocytes (Weise *et al.*, 2001) et la présence des récepteurs des estrogènes, ER α et ER β , dans les ostéoblastes et dans les chondrocytes suggère une action directe des estrogènes sur la croissance et la formation de l'os (Kusec *et al.*, 1998; Nilsson *et al.*, 1999). L'inactivation génique des récepteurs aux estrogènes réalisés sur des souris semblent montrer que les effets sur le remodelage osseux sont médiés par ER α tout comme les effets sur la plaque de croissance mais les effets sur le périoste semblent être médié par ER β (Riggs *et al.*, 2002).

D'autres études récentes en faveur de l'implication des estrogènes dans le remodelage osseux suggèrent que les estrogènes régulent la production de cytokines, particulièrement celles responsables du remodelage osseux : IL-1 (interleukin-1), tumor necrosis factor (TNF- α) et IL-6 (interleukin-6) dont la synthèse est diminuée dans les ostéoblastes par la présence de 17- β -estradiol (Horowitz, 1993).

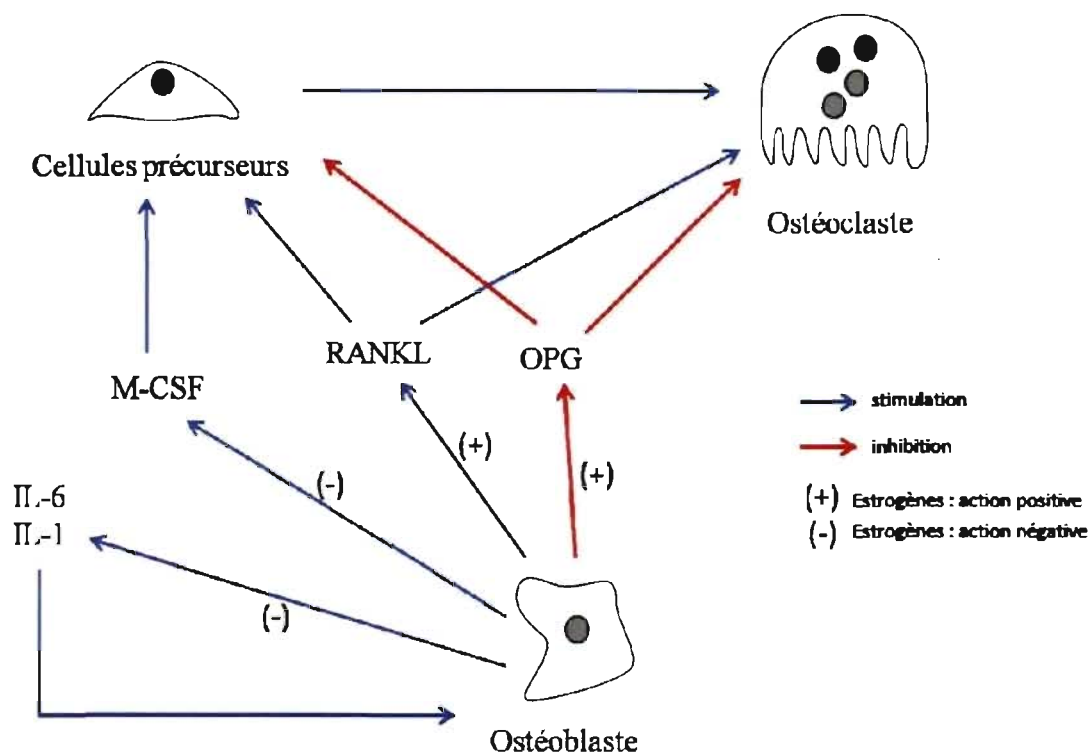


Figure 2 : Action des estrogènes sur le remodelage osseux (adapté de Medscape.com).

2.4 Interaction Estrogènes / Mélatonine

La mélatonine a été longtemps suspectée de jouer un rôle dans le contrôle de la reproduction saisonnière chez les animaux (Reiter, 1980). Ainsi plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'interaction entre la mélatonine et les estrogènes donnant ainsi lieu à de nombreuses évidences que ces hormones peuvent interagir dans leur voie de signalisation cellulaire. Cette interaction a surtout été étudiée dans les cellules cancéreuses de sein puisque la mélatonine semble avoir un rôle oncostatique, en particulier dans ce type de cancer, où elle prévient le développement et la croissance de tumeurs chez le rongeur (Cos *et al.*, 2000a; Cos *et al.*, 2000b). Le traitement des cellules MCF-7 à la mélatonine diminue le taux d'ARNm codant pour les récepteurs des estrogènes (Molis *et al.*, 1994). La mélatonine aurait ainsi des effets antiestrogéniques dans les cellules de cancer du sein (MCF-7) (Cos *et al.*, 1998; Cos *et al.*, 2000a). En effet, l'inhibition de la prolifération et de l'invasion des cellules MCF-7 induite par la présence d'estrogènes a été observée lorsque les cellules sont traitées à des concentrations physiologiques de mélatonine (Cos *et al.*, 1998; Cos *et al.*, 2000a). De plus, la mélatonine augmente la sensibilité de ces cellules aux antagonistes des estrogènes (Wilson *et al.*, 1992). En outre, la mélatonine inhibe également l'expression de protéines régulées par les estrogènes (Mediavilla *et al.*, 1997; Molis *et al.*, 1995). La sensibilité des cellules MCF-7 à la mélatonine et le mécanisme impliqué dans cette sensibilité semble être dépendante du ratio de ER α /ER β puisqu'elle est supprimée lors de la surexpression d'ER β (Del Rio *et al.*, 2004).

Les différentes actions de la mélatonine sur les estrogènes et leur voie de signalisation semblent être médiées par le récepteur membranaire de la mélatonine MT1 puisque la surexpression de ce récepteur dans les cellules MCF-7 augmente l'activité suppresseur de tumeurs de la mélatonine (Jones *et al.*, 2000; Ram *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2002). La mélatonine n'agit toutefois pas dans la liaison des estrogènes à leur récepteurs, ni par une liaison direct à ER α et ER β mais elle agit plutôt sur leur niveau d'expression et sur la liaison du complexe E₂-ER à l'ADN au niveau du ERE (Rato *et al.*, 1999).

La mélatonine et les estrogènes modulent certains messagers secondaires de façon opposée comme le taux d'AMPc intracellulaire. En effet, les estrogènes sont capables, par un mécanisme non-génomique, d'activer les adénylates cyclases et d'augmenter ainsi le taux d'AMPc intracellulaire (Aronica *et al.*, 1994) contrairement à la mélatonine qui par l'intermédiaire du couplage de ces récepteurs aux protéines G inhibitrices conduit à une diminution du taux d'AMPc intracellulaire (Godson *et al.*, 1997). Ainsi il a été démontré que la mélatonine diminuait les taux d'AMPc induit par la forskoline et les estrogènes dans les cellules MCF-7 en plus d'inhiber la transcription du gène ER α (Kiefer *et al.*, 2002).

La mélatonine interagit également avec la voie de signalisation des estrogènes au niveau d'une protéine, la calmoduline. La liaison du complexe estrogènes-récepteurs à l'ADN est facilitée par la liaison de la calmoduline à ce complexe (Bouhoute *et al.*, 1995; Castoria *et al.*, 1988). La liaison de la calmoduline aux récepteurs des estrogènes n'a été observé que dans le cas du récepteur ER α (Del Rio *et al.*, 2004; García Pedrero *et al.*, 2002). Le mécanisme par lequel la calmoduline facilite la liaison du complexe E2-ER fait intervenir la phosphorylation du récepteur (Bouhoute *et al.*, 1995; García Pedrero *et al.*, 2002). Il est intéressant de souligner que la mélatonine interagit également avec la calmoduline (Benitez-King *et al.*, 1993a) et inhibe l'activité de l'enzyme : « Ca²⁺/calmodulin dependant Kinase II » (Benitez-King *et al.*, 1996; Dai *et al.*, 2002).

De plus, l'interaction de la mélatonine avec la calmoduline semble être un point important de l'effet antiprolifératif de la mélatonine dans les cellules cancéreuses puisque l'expression d'un mutant de ER α , incapable de lier la calmoduline, aboutit à la suppression de cet effet sur les cellules MCF-7 (Del Rio *et al.*, 2004).

Les estrogènes peuvent également agir sur la voie de signalisation de la mélatonine, une étude a montré que le 17- β -estradiol affecte les récepteurs membranaires de la mélatonine MT1 et MT2 en atténuant la réponse de la mélatonine à travers l'activation de MT1 et en augmentant la densité des récepteurs MT2 (Masana *et al.*, 2005).

2.5 Hypothèse

L'étiologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent (Matysiak-Scholze *et al.*), la forme la plus commune de scoliose, n'est pas claire bien que la SIA soit une maladie affectant un nombre important de jeunes adolescents (0.2-6% de la population). Il est de plus en plus concevable qu'aux facteurs biomécaniques et biochimiques s'ajoutent de nouveaux concepts basés sur des dysfonctionnements des facteurs de signalisation hormonale impliquant le système neuroendocrinien. L'équipe du Dr Alain Moreau a mis en évidence un dysfonctionnement dans la signalisation cellulaire de la mélatonine dans les ostéoblastes chez les patients atteints de scoliose idiopathique (Moreau et al. 2004). **Cependant ces concepts n'expliquent pas pourquoi la SIA se manifeste majoritairement à la puberté et qu'elle affecte en plus grand nombre et en sévérité les jeunes filles.** La puberté est une période qui coïncide avec un ensemble de manifestations biologiques impliquant la sécrétion des estrogènes et elle est donc non seulement cruciale pour l'initiation de la scoliose mais aussi décisive dans la progression de la maladie. Cependant, plusieurs études ont montré que les estrogènes interviennent dans la voie de signalisation de la mélatonine en exerçant un antagonisme avec la mélatonine. Ainsi, ce projet a pour but de déterminer l'effet des estrogènes sur la signalisation de la mélatonine dans un contexte où l'incidence de la SIA survient à la puberté moment où la production d'estrogènes augmente. Sachant que les estrogènes (dont les principaux sont l'estrone (E_1), estriol (E_3) et le 17- β -estradiol (E_2)) jouent un rôle actif dans le déclenchement de la puberté, **nous avons émis l'hypothèse que les estrogènes participent au mécanisme pathogénique de la scoliose idiopathique en amplifiant les effets négatifs d'une signalisation aberrante de la mélatonine dans cette maladie.**

2.6 Objectifs

L'objectif de ce projet a été de vérifier si les estrogènes interfèrent avec la signalisation cellulaire de la mélatonine et d'identifier par quels mécanismes l'estradiol exerce des effets sur la signalisation de la mélatonine chez les patients SIA.

Les objectifs spécifiques ont donc été les suivants :

- 1- Analyse des effets des estrogènes sur l'activité adénylate cyclase en réponse à la mélatonine en présence ou en absence de l'estradiol (E_2) dans des cellules contrôles et des cellules de patients scoliotiques
- 2- Analyse de l'effet des estrogènes sur le couplage des récepteurs à la mélatonine aux protéines G
- 3- Analyse de l'effet des estrogènes sur la localisation cellulaire des récepteurs de la mélatonine et leur colocalisation avec les protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$.

CHAPITRE 3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Isolement des cellules

Les ostéoblastes de patients SIA ont été isolés de spécimens osseux obtenus durant la chirurgie de la colonne vertébrale. Les fragments osseux proviennent des vertèbres de 40 patients SIA (allant de T3 à L4) et des fragments osseux provenant de différents sites anatomiques (tibia, fémur, cheville, vertèbres) de 10 sujets témoins ont été également utilisés. Ces ostéoblastes ont été obtenus lors de chirurgies réalisées suite à un traumatisme chez des sujets d'âge et de sexe appariés. Les tissus ont été obtenus avec le consentement éclairés des patients et l'approbation par le Comité d'Éthique Institutionnel de l'Hôpital Sainte-Justine et de l'Hôpital pour Enfants de Montréal, de l'Hôpital Shriners et l'université McGill, Montréal. Toutes les variables cliniques indiquées ont été obtenues au moment de la chirurgie. Les caractéristiques cliniques des sujets témoins et SIA examinés sont indiqués dans les tableaux IV, V et VI. Les variables cliniques indiquées dans ces tableaux sont l'âge à la chirurgie, l'angle de Cobb à la première visite, l'angle de Cobb pré-opératoire, le risser à la première visite, le risser pré-opératoire (risser au moment de la chirurgie) et l'âge à la ménarche. Le Risser est un indice de maturité osseuse. Il permet de déterminer le noyau d'ossification secondaire des crêtes iliaques. Il est différencié en 5 stades (0-5), le stade 5 correspondant à l'arrêt de la croissance. Nous avons sélectionnés des filles SIA avec un âge moyen au moment de la chirurgie de 14 ans et 8 mois et qui ne sont pas sous prescription d'anovulant.

Les tissus moux présents sur les fragments osseux ont été éliminés après un traitement à la collagénase. Les fragments ont ensuite été coupés en plus petits fragments et ont été placés dans des pétris de 78,5 cm² (Corning, Life Sciences, Lowell, Massachusetts) dans du milieu α -MEM (dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, Burlington, Ontario) contenant 10% SVF (sérum de veau foetal, Gibco BRL, Burlington, Ontario) et 1% Penicilline-Streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), à 37°C et 5% de CO₂. Une période de 30 jours a été nécessaire à l'émergence des ostéoblastes des fragments osseux. Les cellules ont été maintenues dans ces conditions jusqu'à confluence. Elles ont ensuite été passées en présence de trypsine (trypsine 0,25 %, Gibco, Burlington, Ontario) afin de les congeler.

Tableau IV: Données cliniques des patients provenant du groupe 1 selon la classification de Moreau et al., 2004 (N/D : non disponible).

#	Courbure	Âge à la chirurgie	Angle de Cobb		maturation osseuse		Âge à la ménarche
			Cobb 1ère visite	Cobb pre-opératoire	Risser 1ère visite (âge)	Risser pre-opératoire (âge)	
1	tdlg	14,8	39	41-50	0 (12,8)	3 (14,8)	13,08
2	tdlg	14,3	57-53	67-55	0 (14)	1 (14,3)	N/D
3	tdlg	16,6	38-25	51-30	3 (14,75)	3-4 (16)	13,8
4	tdlg	12,8	44-38	53-55	2 (11,25)	3 (12,8)	11,17
5	tdlg	16,6	60-66	65-95	N/D	N/D	N/D
6	tdlg	15	29-27	29-37-35	1 (14,42)	3 (15)	N/D
7	tdlg	14,61	35-37	41-48	N/D	N/D	N/D
8	tdlg	15,3	72-59	72-59	0	0 (15,3)	N/D
9	tdlg	18	40-52	45-57	N/D	N/D	16,9
10	tlg	16,16	33	28	2 (13,8)	3 (16,2)	11,9
11	tld	12,6	41	63	0 (10,08)	1 (12,6)	12,5
12	tld	14,6	33	38	N/D	N/D	N/D
13	td	14,8	66	58	2+ (13,17)	3 (14,17)	13
14	td	14,75	29	32	- (13,75)	0 (14,75)	16
15	td	14,25	88	88	- (13,9)	- (14,25)	N/D
16	td	16,18	58	58	N/D	N/D	N/D
17	td	14,9	48	54	-	4 (14,5)	11,5
18	td	14,81	61	67	N/D	N/D	N/D
19	tdg	13,25	58-49	58-49	N/D	N/D	13,8
20	tlg	15,21	21	56	N/D	N/D	N/D

tdlg = thoracique droite lombaire gauche (double scoliose), tlg = thoracolombaire gauche, tld = thoracolombaire droit, td = thoracique droite, tdg = thoracique droite gauche. Tous les patients sont des filles et la moyenne d'âge à la chirurgie est de $14,96 \pm 1,3$ et la moyenne d'âge à la ménarche est de $13,36 \pm 1,97$.

Tableau V : Données cliniques des patients provenant du groupe 2 selon la classification de *Moreau et al.*, 2004 (N/D : non disponible).

#	Courbure	âge à la chirurgie	Angle de Cobb		maturation osseuse		Âge à la ménarche
			Cobb 1ère visite	Cobb pré-opératoire	Risser 1ère visite	Risser pré-opératoire	
1	td	13,02	54-61	48	0 (12)	0 (13,02)	13,68
2	td	16,44	32	49	2 (14,42)	4 (16,44)	14,44
3	td	13,11	35	51	0	N/D	N/D
4	tdlg	15,52	42-20	55-42		N/D	N/D
5	td	13,78	39	61	0 (9,5)	N/D	N/D
6	tld	15,3	64-61	64-61	4 (14,92)	4 (15,3)	11,5
7	tdlg	13,41	28-31	60-48	N/D	N/D	N/D
8	td	14,04	40	50	N/D	N/D	N/D
9	tdlg	18,93	36-30	29-35	N/D	N/D	N/D
10	tdlg	14,41	61-54	57-65	N/D	N/D	N/D

tdlg = thoracique droite lombaire gauche (double scoliose), tlg = thoracolombaire gauche, tld = thoracolombaire droit, td = thoracique droite, tdg = thoracique droite gauche. Tous les patients sont des filles et la moyenne d'âge à la chirurgie est de $14,8 \pm 1,83$ et la moyenne d'âge à la ménarche est de $13,2 \pm 1,53$.

Tableau VI : Données cliniques des patients provenant du groupe 3 selon la classification de *Moreau et al.*, 2004 (N/D : non disponible).

#	Courbure	Âge à la chirurgie	Angle de Cobb		maturation osseuse		Âge à la ménarche
			Cobb 1ère visite	Cobb pré-opératoire	Risser 1ère visite	Risser pré-opératoire	
1	td	17,78	79	84	(16,25)	5 (17,78)	N/D
2	tdlg	15,61	21-24	57-50	0 (12,42)	5 (15,61)	14,58
3	tdlg	15,69	63-45-33	63-45-33	3 (14,83)	3 (15,69)	14,42
4	td	13,73	54	54	2 (13,5)	3 (13,73)	N/D
5	td	13,07	40	36	N/D	N/D	N/D
6	td	14,46	78	78	1 (14,25)	1 (14,46)	N/D
7	tlg	12,01	67	67	0 (11,83)	0 (12,01)	N/D
8	td	13,74	61	61	(13,42)	4 (13,74)	11,83
9	td	11,07	70	100	0 (10,42)	0 (11,07)	10,58
10	tdlg	14,22	48-45	64-42	1 (12,5)	2 (14,22)	14,75

tdlg = thoracique droite lombaire gauche (double scoliose), tlg = thoracolombaire gauche, tld = thoracolombaire droit, td = thoracique droite, tdg = thoracique droite gauche. Tous les patients sont des filles et la moyenne d'âge à la chirurgie est de $14,14 \pm 1,92$ et la moyenne d'âge à la ménarche est de $13,23 \pm 1,9$.

Tableau VII : Données cliniques des sujets contrôles (N/D : non disponible).

#	sexe	âge	diagnostic	site anatomique
1	F	14,23	fracture malléole interne gauche	cheville
2	F	18,74	luxation hanche gauche	tibia
3	F	15,5	séquelle pied bot	tibia et péroné
4	F	11,07	malunion tibia distal	cheville
5	F	15,07	ostéochondrite disséquante genou droit	fémur distal
6	F	15,71	polytrauma	fémur
7	M	16,65	polytrauma	fémur
8	M	14,1	ILMI	fémur
9	F	18,09	Hernie discale	vertèbre
10	F	16,45	spondylo	vertèbre

F = féminin, M = masculin

3.2 Culture cellulaire

Les tissus ont été incubés dans le milieu de culture α -MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, Burlington, Ontario) et supplémenté avec 10% (v/v) de SVF (sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Burlington, Ontario), 1% de Pénicilline (Gibco BRL, Burlington, Ontario) et 100 μ g/ml de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario) à 37°C dans une atmosphère de 5% CO₂/ 95% air et dans les boîtes de culture 78,5 cm² (Moreau *et al.*, 2004). Les ostéoblastes ont toujours été utilisés pour les expériences à des passages maximum de P₃ et P₄.

3.3 Phosphatase alcaline

Les cellules ont étéensemencées dans des labteks (lame à 8 chambres) à une densité de 15 000 cellules/cm². Les cellules ont été incubées dans le milieu de culture α -MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, Burlington, Ontario) et supplémenté avec 10% (v/v) de SVF (sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), 1 % de Pénicilline et de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) à 37°C dans une atmosphère de 5% CO₂/ 95% air pendant 4 jours. Les cellules ont ensuite été fixées avec 3,7 % de formaldéhyde (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario) dans du PBS (0,137 M NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2,68 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄) pendant 5 minutes puis rincées 3 fois rapidement avec du PBS. Les cellules ont été incubées pendant 1h à température ambiante avec une solution de coloration (0,5 mM de naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), 1 mM de fast red TR (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario), 62,5 μ l d'éthylène glycol monoéthyléther, 6 ml TBS (Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M à pH 9.5) puis les cellules ont été rincées 3 fois avec du PBS. Des photographies ont ensuite été réalisées au microscope, la coloration rouge représentant ainsi la présence de la phosphatase alcaline.

3.4 Extraction d'ARN

Les cellules à confluence dans des pétris de 78,5 cm², ont été privées de sérum avec du milieu α -MEM et 1% Penicilline-Streptomycine pendant 24h. Elles ont ensuite été récoltées mécaniquement (grattage) en présence du Trizol (Invitrogen, Burlington, Ontario) (1 ml pour 10⁷ cellules) et placées dans des tubes eppendorfs où 200 μ l de chloroforme a été ajouté par ml de Trizol. Les tubes ont ensuite été agités vigoureusement pendant 45 secondes. Les tubes ont été placés à température ambiante pendant 3 minutes. Ils ont ensuite été centrifugés à 4°C pendant 15 minutes. La phase aqueuse a été récupérée et l'ARN a été précipité avec 500 μ l d'isopropanol/ml de Trizol. Les échantillons ont été placés 10 minutes à température ambiante et ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 12 000 g à 4°C. Le culot a été lavé avec 500 μ l d'éthanol froid, suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 7500g à 4°C. L'ARN a été resuspendu dans de l'eau stérile. Le dosage de l'ARN a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (spectrophotomètre, UV-1601PC, Mandel, Guelph, Ontario) dans une solution de TE (Tris HCl 20 nM, EDTA 2 nM pH 7,5). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % (Gibco BRL, Burlington, Ontario) dans du tampon MOPS (Roche, Mississauga, Ontario).

3.5 Analyse d'expression génique semi-quantitative de marqueurs de différenciation ostéoblastique par RT-PCR

Les RT-PCR ont été réalisés à partir d'ARN totaux d'ostéoblastes de patients SIA et de patients contrôles. Les réactions de RT-PCR ont été effectuées à partir d'un mix comprenant 10 mM Tris pH 8,3, 50 mM KCl, 1,2 mM dNTP, 6 mM de MgCl₂, 3 μ M d'Hexamère, 3 mM de DTT. A ce mix a été ajouté 20 U RNase Out (Invitrogen, Burlington, Ontario) et 60 U Reverse Transcriptase (Invitrogen, Burlington, Ontario) par échantillon. La réaction de RT-PCR a été réalisée à partir d'un μ g d'ARN. Les échantillons ont été incubés 10 minutes à température ambiante, puis 15 minutes à 42°C, et enfin 5 minutes à 99°C. Les réactions de PCR ont été effectuées à partir de l'ADNc

obtenus de la réaction de RT. Pour chaque PCR, 2 µl de RT ont été utilisés et placé dans un mix constitué de 6 mM de MgCl₂, 10 mM Tris pH 8,3, 50 mM KCl, Taq 2,5 U par échantillons (Invitrogen, Burlington, Ontario). A chaque échantillon, a été ajouté 260 nM d'amorces sens et anti-sens (tableau VIII). Toutes les réactions PCR ont été soumis à un cycle de dénaturation de 1 minute à 95°C, suivi d'une hybridation à une température variable selon les amorces (tableau VIII) et d'une extension de 1 minute à 72 °C.

Tableau VIII : Amorces et conditions des PCR

Amorces	Sens	Taille du fragment	Nbre de cycle	T°C hybridation
Phosphatase alcaline : Sens	5' ACACCTGGAAGAGCTTCAAACCGA 3'	401	30	60°C
Phosphatase alcaline : Anti-sens	5' TCCACCAAATGTGAAGACGTGGGA 3'			
Collagène Type I : Sens	5' TGACCTCAAGATGTGCCACT 3'	197	35	52,8°C
Collagène Type I : Anti-sens	5' ACCAGACATGCCTCTTGTC 3'			
Ostéopontine : Sens	5' CAGCCATGAATTCACAGCC 3'	307	35	52,8°C
Ostéopontine : Anti-sens	5' GGGAGITTCCATGAAGCCAC 3'			
Ostéocalcine : Sens	5' ACACCTCCTCGCCTATTG 3'	249	30	55°C
Ostéocalcine : Anti-sens	5' GATGTGGTCAGCCAACTC 3'			
GAPDH : Sens	5'- ACCACAGTCCATGCCATCA -3'	452	30	60°C
GAPDH : Anti-sens	5' - TCCACCACCCTGTTGCTGT -3'			

3.6 Tests d'activité d'adénylate cyclase dans les ostéoblastes

La fonctionnalité de la voie de signalisation de la mélatonine a été évaluée par la détermination de l'habilité des protéines Gi à inhiber l'activité des adénylates cyclases stimulées par la Forskoline dans les ostéoblastes. Les ostéoblastes de patients SIA et des sujets contrôles ont été ensemencés en quadruplicata dans les plaques de 24 puits (1x10⁵ cellules/puits). Les cellules ont été privées de sérum avec du milieu α-MEM (1% penicilline – streptomycine) pendant 16 h et ont ensuite été incubées avec la Forskoline (10⁻⁵M, Sigma) pour stimuler la formation de l'AMPc. Les courbes d'inhibition de la production d'AMPc ont été générées en présence de forskoline par l'addition de la mélatonine dans les échantillons à des concentrations allant de 10⁻¹¹M à 10⁻⁵M seul ou en présence de 17-β-estradiol (10⁻¹⁰ M, Sigma) dans un volume final de 1 ml de milieu α-MEM contenant 2,5% de SVF et 1% de pénicilline/streptomycine. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, les cellules ont été lysées et les lysats ont été portés à ébullition puis centrifugés à 13 000 rpm, à 4°C pendant 3 minutes. Le taux d'AMPc a été déterminé dans un aliquot de 200 µl de supernageant grâce à un kit de

radioimmunologique (Amersham-Pharmacia Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Tous les tests ont été réalisés en duplicata.

3.7 Préparation des extraits membranaires et solubilisation des protéines membranaires

Les cellules ont été mises en culture jusqu'à confluence dans une boîte de culture de 78,5 cm², rincées 2 fois dans du PBS froid, et grattées dans 200 µl de tampon froid : 5 mM Tris (pH 7.4), 2 mM EDTA, et un mélange de protéase (1 µg/ml pepstatine, 1 µg/ml aprotinine, 1 µg/ml leupeptine, 1mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), 1 % métabisulfite de sodium). Les cellules ont été homogénéisées avec un polytron (PT1300D, KINEMATICA AG) pendant 5 secondes à 29 000 rpm. Les lysats ont été centrifugés à 450 g pendant 5 minutes à 4°C et le surnageant a été ajouté doucement sur le dessus d'une solution de 9 ml de sucrose 35 % dans des tubes d'ultracentrifugation (Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA, USA). Les fractions de membrane plasmique ont été sédimentées par ultracentrifugation à 150,000 g pendant 90 minutes à 4°C et le culot comprenant les membranes a été resuspendu dans 1 ml de tampon froid : Tris 50 mM (pH 7.4), MgCl₂ 5 mM, EDTA 2 mM, et un mélange d'inhibiteur (pepstatine 1 µg/ml, aprotinine 1 µg/ml, leupeptine 1 µg/ml, PMSF 1mM (phenylmethylsulfonylfluoride), 1 % métabisulfite de sodium), incubés avec ou sans mélatonine (10⁻⁹ M) et avec ou sans 17-β-estradiol (10⁻¹⁰ M) pendant 30 minutes à 4°C. Les membranes ont ensuite été centrifugées à 13,000 g pendant 20 min à 4°C. Les culots ont été lavés avec un tampon froid : Tris 75 mM (pH 7.4), MgCl₂ 12 mM, EDTA 2 mM et un mélange d'inhibiteurs de protéases et ensuite resuspendu dans le même tampon contenant 1% de Triton X-100 et mis sous agitation toute la nuit à 4°C. Les protéines membranaires non solubilisées ont été enlevées par centrifugation à 13,000 x g pendant 30 min à 4°C.

3.8 Purification des phosphoprotéines

Les ostéoblastes ont été mises en culture jusqu'à confluence dans une boîte de culture de 78,5 cm². Les cellules ont été soumis à l'action de la trypsine et ont été resuspendues

dans un tampon de lyse contenant du CHAPS (0,25 %) (Qiagen, Mississauga, Ontario) et des inhibiteurs de protéases (Qiagen, Mississauga, Ontario). Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 4°C et les échantillons ont été vortexés brièvement à toutes les 10 minutes à trois reprises. Après 30 minutes d'incubation, les cellules ont été centrifugées à 10 000 g et à 4°C pendant 30 minutes. Les protéines ont été quantifiées puis les échantillons contenant 2,5 mg de protéines ont été déposés sur des colonnes de purification. Les colonnes ont ensuite été lavées avec du tampon de lyse comme décrit précédemment. 500 µl de solution d'éluion ont été déposés dans les colonnes et les fractions d'éluion ont été récupérées. Cette dernière étape a été répétée 11 fois. Les concentrations en protéines de chaque fractions d'éluion ont été déterminées.

3.9 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Bradford (BioRad, Mississauga, ON, Canada). Une courbe étalon a été réalisée avec des concentrations croissantes de BSA (albumine sérique de boeuf). Les échantillons ont été incubés 15 minutes en présence de réactif de Bradford et la lecture de l'absorbance à 595 nm a été réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (ASYS Hitech EXPERT96 Biochrom, Autriche).

3.10 Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation a été réalisée à partir de 100 µg de protéines membranaires. Les protéines membranaires ont été incubées avec les anticorps spécifiques anti-MT2 ou MT1 dirigés contre les protéines humaines (chèvre polyclonal, Santa Cruz, CA, USA). Une dilution finale de 1:80 a été utilisée ce qui correspond à 2,5 µg/ml. Les extraits ont été incubés toute la nuit à 4°C sous une agitation lente. Par la suite, 30 µl d'une solution de protéine A-agarose (50% (vol/vol)) ont été ajoutés aux échantillons et ceux-ci ont été placés sous agitation lente pendant 6h à 4°C. Après une centrifugation d'une minute à 5000 g, les surnageants ont été enlevés et les billes d'agarose ont été lavées 5 fois avec 1 ml de tampon froid : Tris 75 mM (pH 7.4), MgCl₂ 12 mM, EDTA 2 mM, (pepstatine 1 µg/ml, aprotinine 1 µg/ml, leupeptine 1 µg/ml, PMSF 1mM (phenylmethylsulfonylfluoride), 1 % métabisulfite de sodium), et 0,05% de Triton X-

100. Les billes ont été ensuite resuspendues dans un tampon contenant 70 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 4 mM d'urée, 40 mM de Dithiothreitol (DTT) 10 % glycérol, et 0,05 % de bleu de bromophénol pH 6,8.

3.11 Immunodétection des protéines

La détection des protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ à partir des échantillons d'extraits membranaires immunoprécipités a ensuite été effectuée par immunobuvardage de type Western blot avec des anticorps anti- $G\alpha_s$ (BD Biosciences, Mississauga, Ontario) et anti- $G\alpha_i$ (Santa Cruz Biotechnology). Les échantillons issus de l'immunoprécipitation ont été bouillis pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines. Les protéines ont ensuite été séparées dans un gel de 10 % (w/v) de polyacrylamide SDS-PAGE et transférées ensuite sur une membrane de nitrocellulose (Hybond C extra, Amersham Biosciences). Les membranes ont été bloquées toute la nuit dans une solution de T-TBS (20 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 0,1 % Tween-20) et de lait (5 %). Les membranes ont par la suite été rincées et incubées pendant 1 heure à température ambiante avec les anticorps anti- $G\alpha_s$ (250 $\mu\text{g/ml}$, BD Biosciences), anti- $G\alpha_i$ (Santa-Cruz Biotechnology), anti-MT1 (0,2 $\mu\text{g/ml}$, chèvre polyclonal, Santa Cruz, CA, USA), anti-MT2 (0,2 $\mu\text{g/ml}$, chèvre polyclonal, Santa Cruz, CA, USA) et anti- α -tubuline (sigma-aldrich, Oakville, Ontario). Après incubation avec l'anticorps primaire, les membranes ont été soigneusement lavées et réincubées pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire. L'anticorps anti-souris IgG conjugué à la peroxydase (dilution 1 dans 40 000, chèvre anti-souris IgG Horseradish Peroxidase) et l'anticorps anti-lapin IgG conjugué à la peroxydase (dilution 1 dans 40 000, anti-lapin IgG Horseradish Peroxidase) ont été utilisés respectivement pour la détection des protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$. Après les lavages, la détection a été réalisée en utilisant le « Super Signal Western Blotting chemiluminescence system » (SuperSignal, Pierce). La densité des bandes obtenues lors des immunobuvardages de type Western a été quantifiée à l'aide du logiciel Fluorchem 8800 (Alpha Innotech Corporation).

3.12 Détection des récepteurs MT1, MT2 et des protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ par immunofluorescence

Les ostéoblastes ont été cultivés en monocouche sur des lames de verre (Labtek) (Nalgene Nunc International, Naperville, IL) et traités avec ou sans mélatonine 10^{-9} M (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada), et en présence 17- β -estradiol 10^{-10} M, (Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) à 37° C pour une période de 30 minutes dans du milieu de culture α -MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) supplémenté avec 2.5 % (v/v) SVF (Sérum de veau fœtal, Gibco). Les cellules ont été fixées dans une solution 50 % d'éthanol et 50% acétone pendant 10 minutes. Les cellules fixées ont été incubées avec l'anticorps anti- $G\alpha_s$ (BD Biosciences purifié de souris, monoclonal, 250 ng/ml, dilution 1/1000), anti- $G\alpha_i$ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, lapin polyclonal, 200 ng/ml, dilution 1/1000), anti MT1 and anti MT2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, chèvre polyclonal, 200 ng /ml) toute la nuit à 4 °C. Les cellules ont été lavées et incubées avec l'anticorps secondaire (dilution 1/600) pendant 1h à température ambiante. Les lames contenant les cellules ont été lavées, montées avec des lamelles et à l'aide du réactif ProLong® Gold antifade avec DAPI (Molecular Probes, Eugene, OR) et analysées en utilisant un microscope Leica DMR (Retiga Qimaging Camera). Un marquage positif a été révélé par les sondes Alexa fluor 488 pour le marquage vert (FITC) (anti-souris et anti-lapin), Alexa fluor 594 pour le marquage rouge (anti-chèvre) et le DAPI pour le marquage nucléaire bleu.

3.13 Analyses statistiques

Afin de déterminer si les différences observées dans les tests d'AMPC et les immunoprécipitations suivies d'immunobuvardages de type Western (stimulation avec ou sans mélatonine et avec ou sans estradiol) sont significatives, nous avons réalisés des analyses statistiques avec un test paramétrique (test t de student) en utilisant le logiciel STATISTICA. Les différences ont été considérées significatives lorsque le $p \leq 0,05$.

CHAPITRE 4. RÉSULTATS

4.1 Expression des marqueurs de différenciation des ostéoblastes

Les ostéoblastes dérivés des biopsies de patients ont été caractérisés phénotypiquement tout d'abord en vérifiant l'expression des marqueurs ostéoblastiques. En effet, le tissu osseux est constitué d'une matrice extracellulaire constituée de fibres de collagène de type I et de glycoprotéines telles que l'ostéopontine (OPN), la BSP (bone sialoprotein) et des protéoglycanes. Parmi ces marqueurs, l'ostéoblaste différencié exprime le collagène de type I, l'ostéopontine, la phosphatase alcaline, la BSP et l'ostéocalcine. Ces protéines sont exprimées tout au long de la différenciation de l'ostéoblaste. L'ostéocalcine est un marqueur d'ostéoblastes matures. Nous avons ainsi réalisés des tests colorimétriques et des analyses d'expression par RT-PCR afin de détecter les marqueurs de différenciation des ostéoblastes pour nous assurer que les cellules dérivées des fragments osseux obtenus durant la chirurgie des patients SIA tous sévèrement atteints et des sujets témoins opérés suite à un traumatisme sont bien des ostéoblastes. La figure 3 montre que les cellules de patients SIA et les cellules de sujets sains utilisés réagissent de façon positive au test colorimétrique de « fast red » permettant de détecter la phosphatase alcaline (figure 3A). Comme attendu, les cellules HEK, des cellules humaines embryonnaires de rein, utilisées comme contrôle négatif, n'ont pas été coloré en rouge montrant l'absence de phosphatase alcaline (Figure 3A).

Des RT-PCR à partir d'ARNm extraits des ostéoblastes de patients SIA et des sujets contrôles ont été réalisées afin de détecter les marqueurs de différenciation des ostéoblastes tels que la phosphatase alcaline, le collagène de type-I, l'ostéopontine et l'ostéocalcine (figure 3B). Les transcrits (ARNm) des gènes codant pour ces quatre protéines ont été détectés chez les patients SIA ainsi que chez les contrôles utilisés. Ils n'ont cependant pas été détecté, comme attendu, dans les cellules HEK (contrôle négatif) à l'exception du transcrit du gène codant pour l'ostéopontine. Une réaction de RT-PCR a été réalisée avec chaque échantillon en utilisant les amorces permettant de détecter la GAPDH afin de s'assurer que la quantité d'ARNm utilisé pour réaliser les RT-PCR pour chaque échantillon était identique.

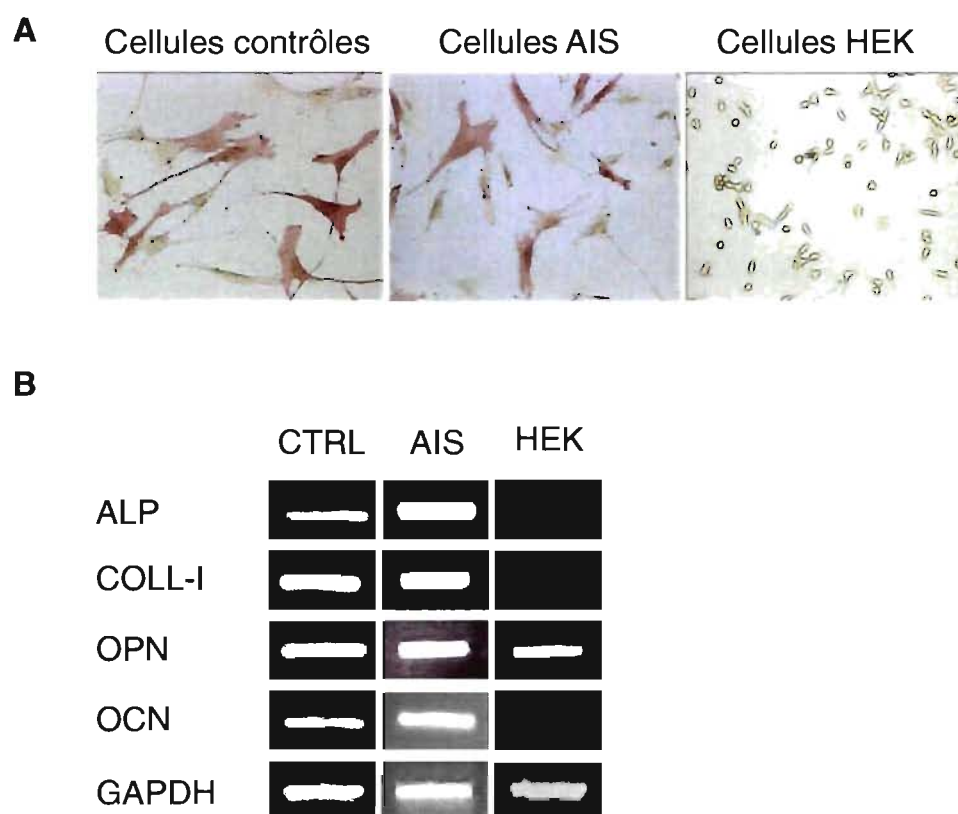


Figure 3 : Expression de différents marqueurs ostéoblastiques dans les cellules dérivées de patients scoliotiques et de cellules humaines embryonnaire de rein (lignées HEK).

Ces cellules ont été cultivées dans des pétris jusqu'à confluence. Panneau A : la phosphatase alcaline (marqueur ostéoblastique) a été détectée par méthode colorimétrique à l'aide du colorant « fast red ». Le panneau A représente la coloration réalisée sur les cellules dérivées de fragments osseux provenant de patients contrôles, scoliotiques et de cellules HEK représentant le contrôle négatif. Le panneau B représente les RT-PCR réalisées à partir d'ARN extraits d'ostéoblastes provenant de patients contrôles, de patients SIA et cellules HEK. Cette figure montre l'expression de l'ARNm de divers marqueurs de différenciation ostéoblastique : la phosphatase alcaline, le COL-1 (collagène de type-1), l'OCN (ostéocalcine) et l'OPN (ostéopontine). Les amorces et les conditions de PCR sont données dans la section Matériel et Méthodes (VIII).

4.2 Détermination de l'effet du 17- β -estradiol sur le défaut de la voie de signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes de patients SIA

4.2.1 Défaut de signalisation de la voie de signalisation de la mélatonine chez les patients atteints de SIA

Des études précédentes réalisées dans le laboratoire du Dr Alain Moreau ont mis en évidence un défaut de signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes de patients SIA (Moreau *et al.*, 2004). Les variations dans les réponses des ostéoblastes à la mélatonine ont permis de classer les patients en trois groupes fonctionnels. Les mêmes tests ont été réalisés sur les ostéoblastes de patients SIA afin de déterminer les groupes auxquels ils appartiennent et ainsi que sur des sujets témoins (trauma). Les ostéoblastes ont été soumis à des concentrations croissantes de mélatonine (10^{-11} M à 10^{-5} M) et le taux d'AMPC a été mesuré suite à la stimulation des adénylates cyclases par la forskoline (10^{-5} M) afin d'observer l'inhibition de cette activité par la mélatonine (figure 4). Les ostéoblastes dérivés de sujets témoins (non-scoliotique) montrent une courbe d'inhibition de la production d'AMPC intracellulaire en présence de concentrations croissantes de mélatonine. Cependant, les ostéoblastes provenant de patients SIA ne montrent pas cette courbe d'inhibition. Ainsi trois groupes ont été observés, le premier groupe correspond aux ostéoblastes qui ont une augmentation de la production d'AMPC en présence de mélatonine comparé à la production d'AMPC induite par la forskoline. Le groupe 2 correspond aux ostéoblastes qui ne montrent aucune inhibition ou stimulation en réponse à la mélatonine. Et enfin le groupe 3 montre une courbe d'inhibition partielle suite à la stimulation avec des concentrations croissantes de mélatonine. Cependant, cette inhibition est plus faible que celle observée dans les ostéoblastes de sujets témoins. Les variations du niveau d'AMPC en présence de mélatonine est significative comparativement aux contrôles pour le groupe 1, ainsi que pour le groupe 2. Cette variation est significative pour les concentrations de mélatonine de 10^{-9} et 10^{-5} M pour les patients du groupe 3. Cette classification en trois groupes, selon les types de réponse à la mélatonine a été précédemment publiés (Moreau et al. 2004)(Azzedine et al. 2007).

Ces expériences confirment à nouveau l'existence de ces trois groupes de patients quant à leur réponse suite à la stimulation avec des concentrations croissantes de mélatonine.

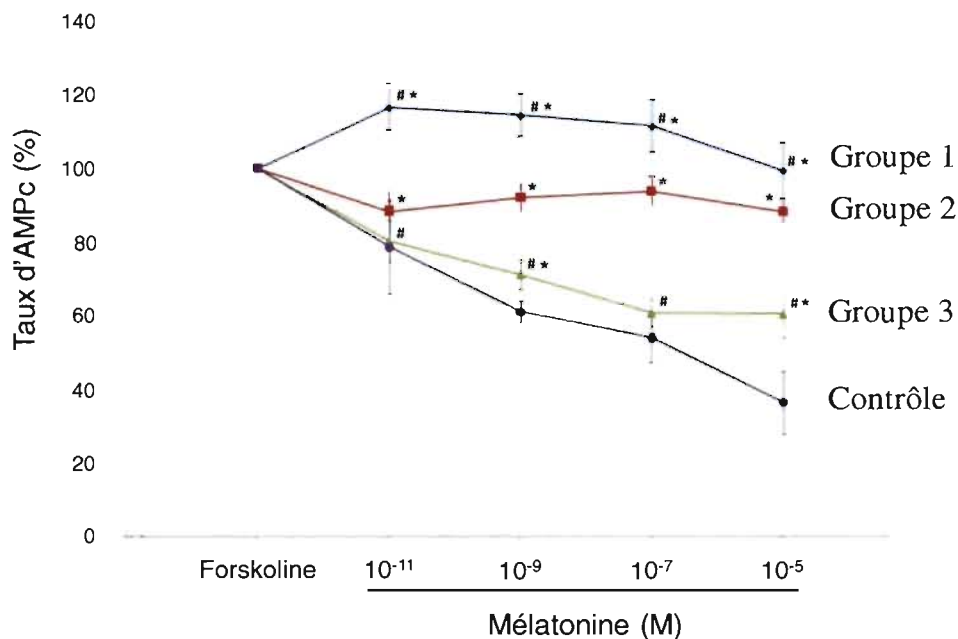


Figure 4 : Effet de la mélatonine sur les taux d'AMPc dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles humains. Les cellules provenant de fragments osseux de patients AIS et de patients opérés pour un traumatisme ont été cultivées dans des pétris jusqu'à confluence. Les cellules ont été stimulées à la forskoline (10^{-5} M) et à des concentrations croissantes en mélatonine (10^{-11} à 10^{-9} M) pendant 30 minutes. Ce graphique représente le dosage de l'AMPc intracellulaire réalisé à partir d'un kit radioimmunologique (n=40). La courbe bleu représente les taux d'AMPc des patients du groupe 1 (n=20), la courbe rouge celles des patients du groupe 2 (n=10), la courbe verte celle des patients du groupe 3 (n=10) et enfin la courbe mauve celle des sujets témoins (n=10). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, * représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc : patients SIA vs contrôles (test t-student ; $p < 0,002$); # représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc : forskoline vs mélatonine (test t-student ; $p < 0,002$).

4.2.2 Effet du 17- β -estradiol sur la réponse fonctionnelle de la mélatonine (reflétant le défaut de signalisation de la mélatonine) dans les ostéoblastes de patients SIA et contrôles

4.2.2.1 Effet du 17- β -estradiol en présence de mélatonine sur les ostéoblastes contrôles

Le dosage de l'AMPc intracellulaire a été réalisé sur des ostéoblastes témoins (patients trauma) afin de déterminer le rôle du 17- β -estradiol dans le taux d'AMPc intracellulaire en présence de mélatonine (figure 5). Suite à la stimulation préalable des ostéoblastes par la forskoline (10^{-5} M), ceux-ci produisent de l'AMPc et l'exposition des cellules à des concentrations croissantes de mélatonine génère une courbe d'inhibition de l'activité adénylate cyclase se traduisant par une inhibition de 60 % de la production d'AMPc à une concentration pharmacologique de mélatonine (10^{-5} M). Une courbe d'inhibition est également observée lorsque les ostéoblastes sont traités avec la mélatonine à une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M). En présence de concentration de mélatonine égales ou supérieures à 10^{-9} M, le 17- β -estradiol augmentent légèrement le taux d'AMPc intracellulaire comparativement à celui observé en présence de mélatonine seule. Cependant cette augmentation d'AMPc intracellulaire en présence d'E₂ n'est pas significative.

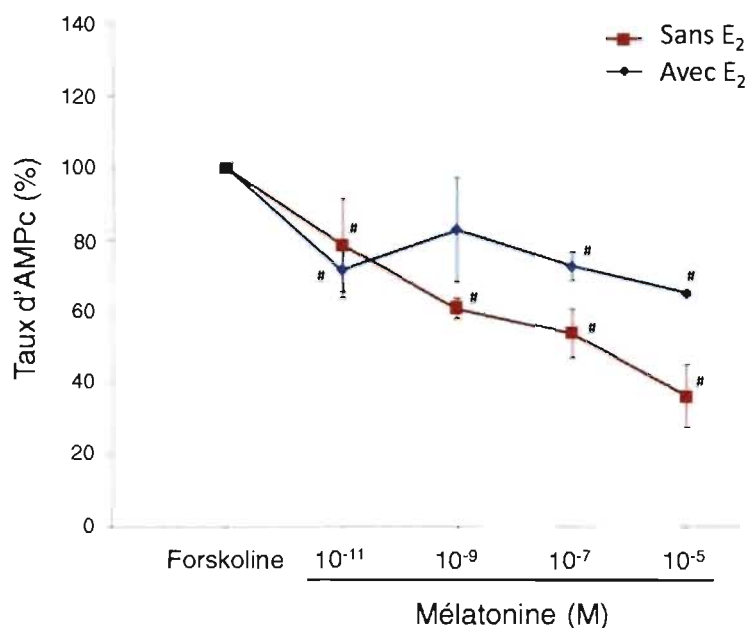


Figure 5 : Effet du 17-β-estradiol sur les taux d'AMPc dans les ostéoblastes dérivés de sujets témoins (non scoliotiques).

Ce graphique représente le dosage de l'AMPc intracellulaire réalisé à partir d'un kit radioimmunologique (n=10). La courbe rouge (■) correspondant aux taux d'AMPc dosés dans les ostéoblastes en présence de mélatonine seule et la courbe bleue (◆) correspond aux taux d'AMPc dosés en présence de mélatonine et de 17-β-estradiol (E₂) (10⁻¹⁰ M). Les données sont exprimées en moyenne ± SEM, * représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc : mélatonine vs mélatonine + E₂ (17-β-estradiol) (test t-student (p<0,002) ; # représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc : forskoline vs stimulations (mélatonine et mélatonine + E₂) (test t-student p<0,002).

4.2.2.1 Effet du 17- β -estradiol en présence de mélatonine sur les ostéoblastes des patients SIA du groupe 2 et 3

Le dosage de l'AMPc intracellulaire a été réalisé sur des ostéoblastes de patients provenant du groupe 2 et 3 selon la classification de Moreau et al. (Moreau et al. 2004) afin de déterminer le rôle du 17- β -estradiol dans le taux d'AMPc intracellulaire en présence de mélatonine chez les patients atteints de scoliose idiopathique (figure 6 et 7). Chez les ostéoblastes provenant du groupe 2, nous n'observons pas ou très peu d'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase en présence de mélatonine seule (figure 6). L'inhibition n'est également pas observé lorsque les cellules sont stimulées avec des concentrations croissantes de mélatonine et une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M) excepté pour les ostéoblastes traités avec du 17- β -estradiol et une concentration de 10^{-5} M de mélatonine. Nous n'observons pas de différence significative dans le taux d'AMPc intracellulaire entre les ostéoblastes traités avec de la mélatonine seule ou avec de la mélatonine et du 17- β -estradiol.

Chez les ostéoblastes provenant du groupe 3 selon la classification de Moreau et al. (Moreau et al. 2004)(Azzedine et al. 2007), nous observons une inhibition de la production de l'AMPc par les adénylates cyclases en présence de mélatonine seule (figure 7). Elle est cependant moins importante que celle observée chez les ostéoblastes contrôles mais est significative par rapport aux taux obtenus en présence de forskoline seule. L'inhibition obtenue est de 40 % ce qui est plus faible que l'inhibition de 60 % démontré chez les ostéoblastes contrôles. Lorsque les cellules sont stimulées simultanément avec de la mélatonine et du 17- β -estradiol, nous ne constatons pas de diminution du taux d'AMPc intracellulaire. Le taux d'AMPc varie entre 100 et 110 % lorsque les cellules sont stimulées à la mélatonine et au 17- β -estradiol comparativement aux taux observés en présence de forskoline (100%). La différence remarquée entre les taux d'AMPc en présence de mélatonine seule et en présence de mélatonine et de 17- β -estradiol est significative pour les concentrations en mélatonine de 10^{-9} M et 10^{-7} M.

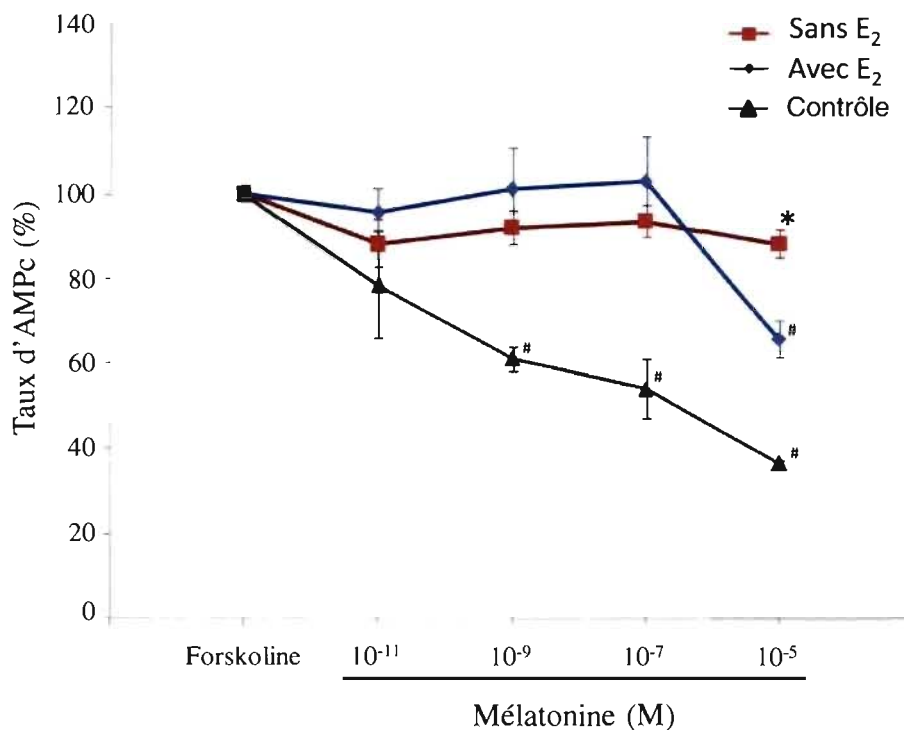


Figure 6 : Effet du 17- β -estradiol sur les taux d'AMPc dans les ostéoblastes de patients SIA humains provenant de patients du groupe 2.

Ce graphique représente le dosage de l'AMPc intracellulaire réalisé à partir d'un kit de radioimmunologique (n=10). La courbe rouge (■) correspondant aux taux d'AMPc dosés dans les ostéoblastes en présence de mélatonine seule, la courbe bleu (◆) correspond aux taux d'AMPc dosés en présence de mélatonine et de 17- β -estradiol (E₂) (10⁻¹⁰ M) et la courbe noire (▲) correspond aux taux d'AMPc des sujets témoins en présence de mélatonine seule. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, * représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc : mélatonine vs mélatonine + E₂ (test t-student, p<0,002) ; # représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc forskoline vs stimulations (mélatonine et mélatonine + E₂) (test t-student ; p<0002).

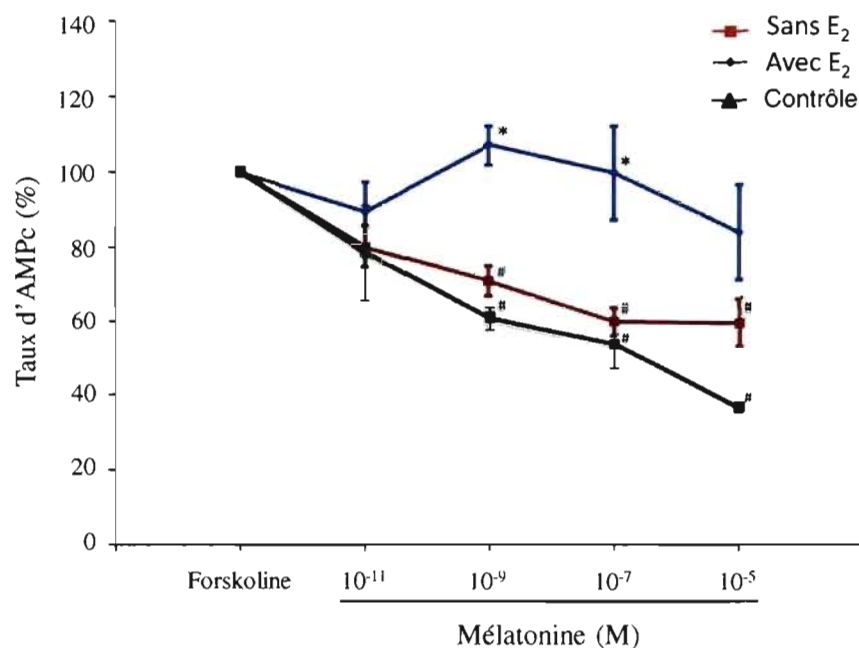


Figure 7 : Effet du 17- β -estradiol sur les taux d'AMPc dans les ostéoblastes de patients SIA humains provenant de patients du groupe 3.

Ce graphique représente le dosage de l'AMPc intracellulaire réalisé à partir d'un kit radioimmunologique (n=10). La courbe rouge (■) correspondant aux taux d'AMPc dosés dans les ostéoblastes en présence de mélatonine seule, la courbe bleu (◆) correspond aux taux d'AMPc dosés en présence de mélatonine et de 17- β -estradiol (E₂) (10⁻¹⁰ M) et la courbe noire (▲) correspond aux taux d'AMPc des sujets témoins en présence de mélatonine seule. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, * représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc : mélatonine vs mélatonine + E₂ (test t -student, p<0,002) ; # représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc forskoline vs stimulations (mélatonine et mélatonine + E₂) (test t-student ; p<0002).

4.2.2.2 Effet du 17- β -estradiol en présence de mélatonine sur les ostéoblastes des patients SIA du groupe 1

Les ostéoblastes de patients SIA provenant du groupe 1 selon la classification de Moreau et al. (Moreau et al. 2004)(Azzedine et al. 2007) ont été soumis à des concentrations croissantes de mélatonine (10^{-11} M à 10^{-5} M) en présence et ou en absence de 17- β -estradiol (figure 8). En présence de mélatonine seule, le taux d'AMPc intracellulaire est augmenté comparativement aux ostéoblastes contrôles et aux ostéoblastes des groupes 2 et 3 (figure 4). L'augmentation du taux d'AMPc par rapport aux taux d'AMPc dosé en présence de forskoline seule est significative pour les concentrations en mélatonine de 10^{-11} M et 10^{-9} M.

En présence de 17- β -estradiol et de mélatonine, nous observons une courbe d'inhibition de la production d'AMPc. Cette inhibition par rapport aux taux obtenus en présence de forskoline seul (10^{-5} M) est significative pour toutes les concentrations de mélatonine. Lorsque les ostéoblastes sont stimulés simultanément avec du 17- β -estradiol et de la mélatonine, le taux d'AMPc intracellulaire est diminué d'environ 40% comparativement à celui observé en présence de mélatonine seule (figure 8). Cette différence observée en présence de 17- β -estradiol est significative pour les concentrations de mélatonine allant de 10^{-11} M à 10^{-5} M. Ainsi la courbe d'inhibition observée en présence de 17- β -estradiol se rapproche de celle obtenu chez les sujets témoins sans toutefois rejoindre les niveaux d'AMPc intracellulaire obtenus dans les ostéoblastes de ces derniers.

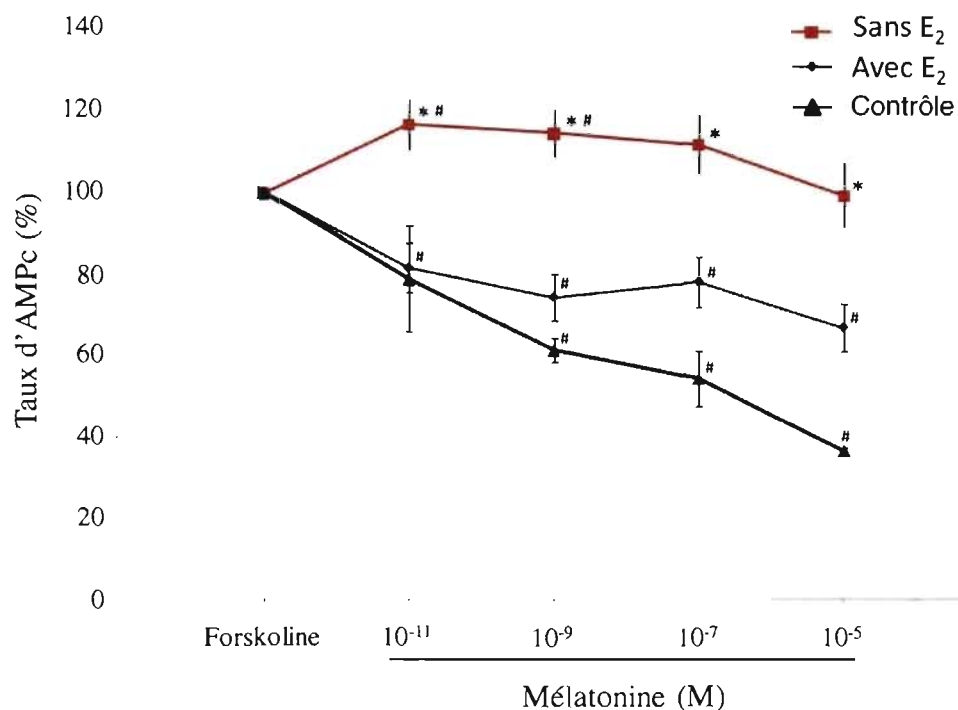


Figure 8 : Effet du 17- β -estradiol sur les taux d'AMPc dans les ostéoblastes de patients SIA humains provenant de patients groupe 1.

Ce graphique représente le dosage de l'AMPc intracellulaire réalisé à partir d'un kit radioimmunologique (n=10). La courbe rouge (-■-) correspondant aux taux d'AMPc dosés dans les ostéoblastes en présence de mélatonine seule, la courbe bleu (-◆-) correspond aux taux d'AMPc dosés en présence de mélatonine et de 17- β -estradiol (E₂) (10⁻¹⁰ M) et la courbe noire (-▲-) correspond aux taux d'AMPc des sujets témoins en présence de mélatonine seule. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, * représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc : mélatonine vs mélatonine + E₂ (test t -student, p<0,002) ; # représente les statistiques effectuées sur les taux d'AMPc forskoline vs stimulations (mélatonine et mélatonine + E₂) (test t-student ; p<0002).

4.3 Mise en évidence des protéines $G\alpha$ couplées aux récepteurs de la mélatonine chez les patients SIA du groupe 1

4.3.1 Couplage des protéines $G\alpha_i$ avec les récepteurs membranaires de la mélatonine, MT1 et MT2

Suite à la diminution des taux d'AMPC intracellulaire en présence de 17- β -estradiol dans les ostéoblastes provenant de patients SIA du groupe 1 selon la classification de Moreau et al. (2004), nous nous sommes particulièrement intéressés à ce groupe fonctionnel. Nous avons voulu déterminer si le couplage des récepteurs de la mélatonine aux protéines G était modifié et pourrait expliquer les variations d'AMPC observés. Dans ce but, des immunoprécipitations ont été réalisées avec des anticorps spécifique anti-MT1 et les protéines G couplés aux récepteurs ont été révélées par immunobuvardages de type western. La littérature ayant bien établi le couplage préférentiel des récepteurs de la mélatonine aux protéines G inhibitrices nous avons tout d'abord observés le couplage avec la sous-unité alpha i. Ces immunoprécipitations ont permis de confirmer l'interaction entre les récepteurs de la mélatonine MT1 et les protéines $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes provenant des patients AIS du groupe 1 (figure 9). Cette interaction est également présente dans les ostéoblastes provenant de fragments osseux obtenus lors de la chirurgie pour traumatisme (sujets témoins). De même, l'interaction entre le récepteur de la mélatonine MT2 et les protéines $G\alpha_i$ a été observée dans les ostéoblastes provenant de patients du groupe 1 (figure 10). L'interaction des récepteurs MT1 et MT2 avec les protéines $G\alpha_i$ a été constaté pour chacune des stimulations (mélatonine seule, 10^{-9} M ; E_2 seule, 10^{-10} M ; mélatonine, 10^{-9} M + E_2 , 10^{-10} M). Les anticorps anti- $G\alpha_i$ utilisés reconnaissent les protéines $G\alpha_{i1}$ et $G\alpha_{i3}$. La quantification de l'intensité des bandes obtenues lors des immunobuvardages de type western réalisés à partir des immunoprécipitations avec les anticorps anti-MT1 et anti-MT2 a été effectuée (figure 11). Dans les immunoprécipitations réalisées en utilisant l'anticorps anti-MT1, nous n'avons pas observé de variation significative dans l'intensité des bandes lorsque les

ostéoblastes ont été stimulés avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M) en présence ou en absence de concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) (figure 11A). Aucune variation n'a été également observée dans les immunoprécipitations réalisées avec l'anticorps anti-MT2 (figure 11B). Il est à noter que deux bandes distinctives ont été observées dans les immunobuvardages utilisant l'anticorps spécifique anti-G α_i : une bande à 45 kDa et une bande à 60 kDa.

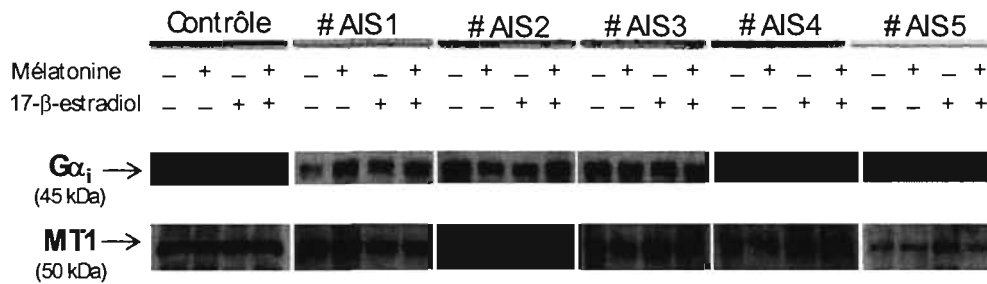


Figure 9 : Mise en évidence du complexe constitué des protéines G α_i et du récepteur membranaire de la mélatonine MT1 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA et de sujets contrôles (trauma) ont été stimulées à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 16 heures. Les immunoprécipitations ont été réalisées avec des anticorps anti-MT1 et anti-MT2 spécifiques à partir des fractions membranaires provenant d'ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles (n=5). Afin de nous assurer que la quantité des récepteurs de la mélatonine MT1 immunoprécipités a été similaire, nous avons également détectés le récepteur MT1 (contrôles d'immunoprécipitation). Les immunobuvardages de type western réalisés ensuite, ont été révélés avec des anticorps spécifiques anti-G α_i et anti-MT1. La bande à 45 kDa correspond à la protéine G α_i et la bande à 50 kDa correspond à la protéine MT1.

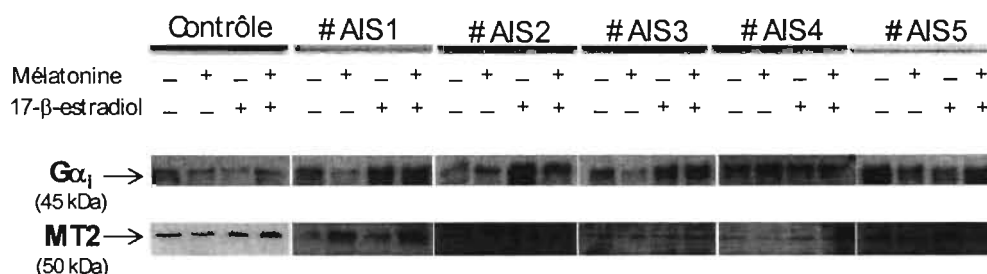


Figure 10 : Mise en évidence du complexe constitué des protéines G α_i et du récepteur membranaire de la mélatonine MT2 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA et de patients opérés pour un traumatisme ont été stimulées à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 16 heures. Les immunoprécipitations ont été réalisées avec des anticorps anti-MT1 et anti-MT2 spécifiques à partir des fractions membranaires provenant d'ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles (n=5). Afin de nous assurer que la quantité des récepteurs de la mélatonine MT2 immunoprécipités a été similaire, nous avons également détectés le récepteur MT2 (contrôles d'immunoprécipitation). Les immunobuvardages de type western réalisés ensuite ont été révélés avec des anticorps spécifiques anti- G α_i et anti-MT2. La bande à 45 kDa correspond à la protéine G α_i et la bande à 50 kDa représente la protéine MT2.

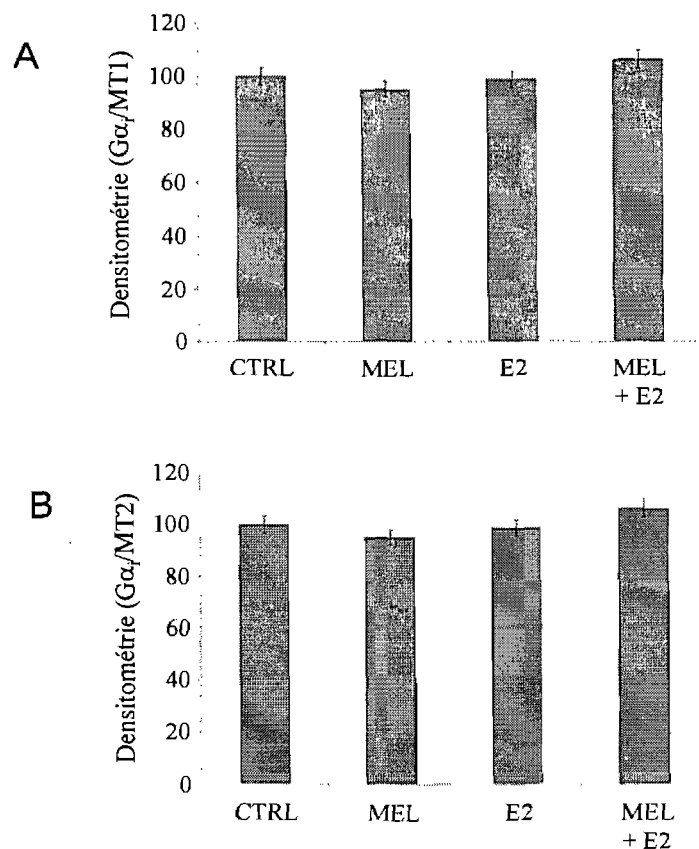


Figure 11 : Détermination du couplage des protéines $G\alpha_i$ aux récepteurs membranaires de la mélatonine MT1 et MT2 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1. Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA ont été stimulées à des concentrations physiologiques de mélatonine (MEL) (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (E2) (10^{-10} M) pendant 16 heures. Les cellules sans stimulation servent de contrôle (CTRL). Les immunoprécipitations ont été réalisées avec des anticorps anti-MT1 et anti-MT2 spécifiques à partir des fractions membranaires provenant d'ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles à partir de 100 μ g de protéines (n=5). Afin de nous assurer que la quantité des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 immunoprécipités a été similaire, nous avons également détecté le récepteur MT2 (contrôles d'immunoprécipitation). Les immunobuvardages de type Western réalisés ensuite ont été révélés avec des anticorps spécifiques anti- $G\alpha_i$, anti-MT1 et anti-MT2. Ce graphique représente la quantification de la densité des bandes observées à 45 kDa correspondant à la protéine $G\alpha_i$ rapportée à la densité des bandes à 50 kDa correspondant aux récepteurs de la mélatonine (MT1/MT2).

4.3.2 Couplage des protéines $G\alpha_s$ avec les récepteurs membranaires de la mélatonine, MT1 et MT2

Suite à l'absence de variations dans le couplage des récepteurs MT1 et MT2 avec les protéines G inhibitrices nous avons étudiés le couplage de ces récepteurs avec les protéines G stimulatrices. Des immunoprécipitations réalisées avec des anticorps spécifique anti-MT1 et anti-MT2 ont ainsi permis de mettre en évidence une interaction entre les récepteurs de la mélatonine, MT1 et MT2, et les protéines $G\alpha_s$ chez les patients AIS du groupe 1 (figure 12-14). Nous pouvons observés deux bandes sur les immunobuvardages de type western réalisés avec les anticorps spécifiques anti- $G\alpha_s$, une bande à 45 kDa et une autre à environ 60 kDa (figure 12 et 13). Nous pouvons également observés la présence de la bande à 60 kDa dans les immunoprécipitations réalisées avec l'anticorps anti-MT2 (figure 13). De plus dans ces immunoprécipitations nous avons observés une diminution de l'intensité des bandes lorsque les ostéoblastes ont été stimulés avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M) en présence ou en absence de concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M). Cette diminution n'est pas observée dans les immunoprécipitations réalisées avec l'anticorps anti-MT1 (figure 12).

La densitométrie des bandes réalisée à partir des immunobuvardages effectués avec les anticorps anti- $G\alpha_s$ confirment l'absence de différence dans l'interaction du récepteur MT1 et des protéines $G\alpha_s$ (figure 14). Cependant lorsque les immunoprécipitations sont réalisées avec les anticorps anti-MT2, nous observons une diminution significative de 40 % du couplage entre le récepteur MT2 et les protéines $G\alpha_s$ en présence de 17- β -estradiol. Une diminution de l'interaction entre ces deux protéines est également observée en présence de mélatonine seule mais cette différence n'est pas significative.

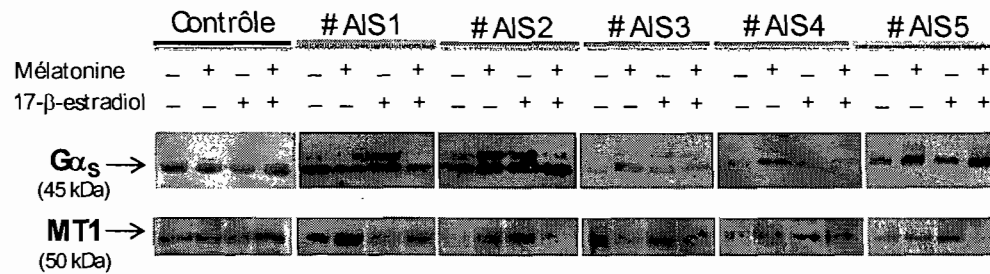


Figure 12 : Mise en évidence du complexe constitué des protéines G α_s et du récepteur membranaire de la mélatonine MT1 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA du groupe 1 ont été stimulées à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 16 heures. Les immunoprécipitations ont été réalisées avec des anticorps anti-MT1 et anti-MT2 spécifiques à partir des fractions membranaires provenant d'ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles (n=5). Afin de nous assurer que la quantité des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 immunoprécipités a été similaire, nous avons également détectés le récepteur MT2 (contrôles d'immunoprécipitation). Les immunobuvardages de type Western réalisés ensuite ont été révélés avec des anticorps spécifiques anti-G α_s et anti-MT1. La bande à 45 kDa correspond à la protéine G α_s et la bande à 50 kDa représente la protéine MT1.

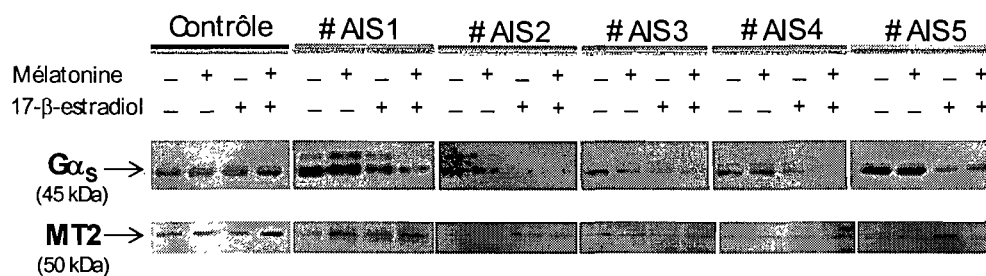


Figure 13 : Mise en évidence du complexe constitué des protéines G α_s et du récepteur membranaire de la mélatonine MT2 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA ont été stimulées à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 16 heures. Les immunoprécipitations ont été réalisées avec des anticorps anti-MT1 et anti-MT2 spécifiques à partir des fractions membranaires provenant d'ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles (n=5). Afin de nous assurer que la quantité des récepteurs de la mélatonine MT2 immunoprécipités a été similaire, nous avons également détecté le récepteur MT2 (contrôles d'immunoprécipitation). Les immunobuvardages de type Western réalisés ensuite ont été révélés avec des anticorps spécifiques anti-G α_s et anti-MT2. La bande à 45 kDa correspond à la protéine G α_s et la bande à 50 kDa représente la protéine MT2.

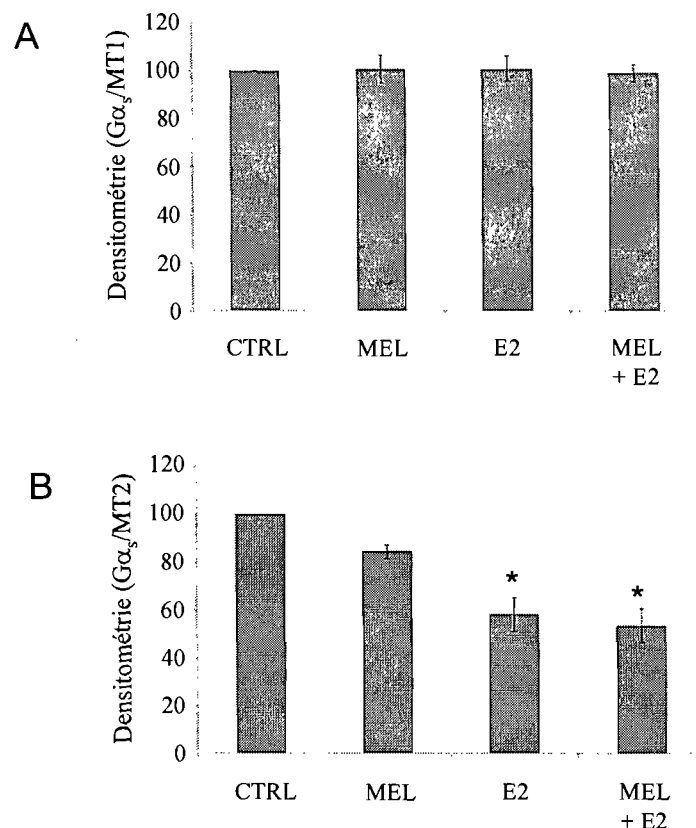


Figure 14 : Détermination du couplage des protéines Gα_s aux récepteurs membranaires de la mélatonine MT1 et MT2 dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1. Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA ont été stimulées à des concentrations physiologiques de mélatonine (MEL) (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17-β-estradiol (E2) (10^{-10} M) pendant 16 heures. Les cellules sans stimulation servent de contrôle (CTRL). Les immunoprécipitations ont été réalisées avec des anticorps anti-MT1 et anti-MT2 spécifiques à partir des fractions membranaires provenant d'ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles à partir de 100 μg de protéines (n=5). Afin de nous assurer que la quantité des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 immunoprécipités a été similaire, nous avons également détecté le récepteur MT2 (contrôles d'immunoprécipitation). Les immunobuvardages de type western réalisés ensuite ont été révélés avec des anticorps spécifiques anti-Gα_s, anti-MT1 et anti-MT2. Ce graphique représente la quantification de la densité des bandes observées à 45 kDa correspondant à la protéine Gα_s rapportée à la densité des bandes à 50 kDa correspondant aux récepteurs de la mélatonine (MT1/MT2).

4.3.3 Colocalisation des protéines $G\alpha_s$ et $G\alpha_i$ avec les récepteurs membranaires de la mélatonine MT1 et MT2

Des expériences d'immunofluorescences ont été réalisées afin de déterminer si les récepteurs membranaires de la mélatonine et les protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ colocalisent dans les ostéoblastes. Ces expériences ont été réalisées avec des cellules de patients du groupe 1 (figure 15-18). Les expériences d'immunofluorescence montrent une colocalisation des récepteurs MT1 avec les protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ au niveau du cytoplasme et de la membrane plasmique dans les ostéoblastes de patients SIA du groupe 1 (figure 15 et 16). De même, les récepteurs MT2 colocalisent avec les protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ dans les mêmes compartiments cellulaires. Cependant, le récepteur MT2 contrairement au récepteur MT1 colocalise avec les protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ au niveau de la membrane nucléaire en présence de 17- β -estradiol (figure 15, 17 et 18).

Nous avons également mis en évidence un marquage moins important lorsque les expériences d'immunofluorescence ont été réalisés avec des anticorps anti-MT1 ce qui semblerait supposer que les récepteurs MT1 sont moins présent que les récepteurs MT2 dans les ostéoblastes humains. Cependant, aucune variation dans les taux des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 en fonction des différentes stimulations (mélatonine seule, 17- β -estradiol seul ou mélatonine et 17- β -estradiol) n'a pu être observé au niveau des ostéoblastes des patients SIA. Les immunofluorescences ont également été réalisées sur des sujets témoins mais aucune différence notable n'a pu être observée (figure 19 - 22).

Ainsi, les expériences d'immunofluorescence n'ont pu mettre en évidence une variation dans la localisation et la distribution de ces récepteurs dans les différentes conditions utilisées. Cependant, nous avons pu observer que le récepteur MT2 semble être plus présent au niveau péri-nucléaire que le récepteur MT1 en présence de 17- β -estradiol dans les ostéoblastes de patients du groupe 1.

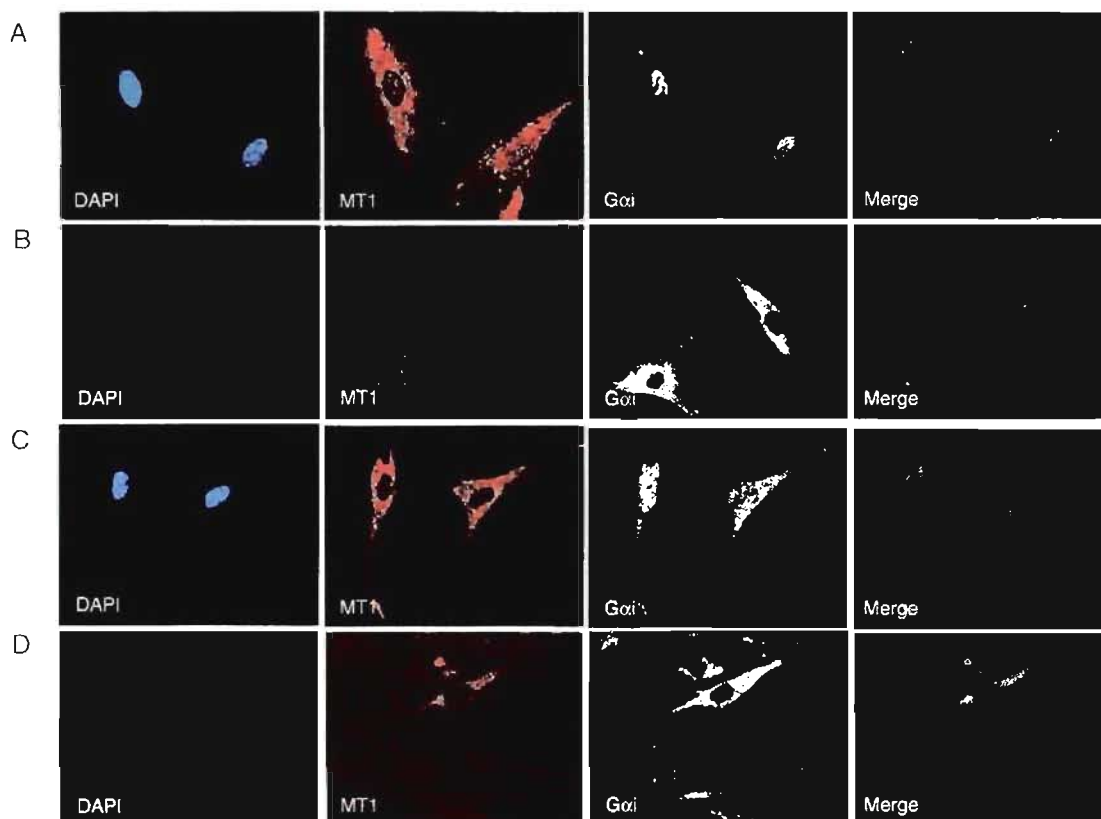


Figure 15 : Détection du récepteur MT1 et de la protéine $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes humains de patients SIA du groupe 1.

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA du groupe 1 ont été cultivées sur des lames de verre (labtek) (15 000 cellules/puits) et stimulées ensuite à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 30 minutes. Les ostéoblastes ont été incubés avec les anticorps spécifiques anti-MT1 et anti- $G\alpha_i$. La détection des anticorps primaires a été réalisée à partir d'anticorps couplés au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) ou à la rhodamine. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de DAPI. La ligne A correspond aux ostéoblastes non traités, la ligne B aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M), la ligne C aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M), la ligne D aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M).

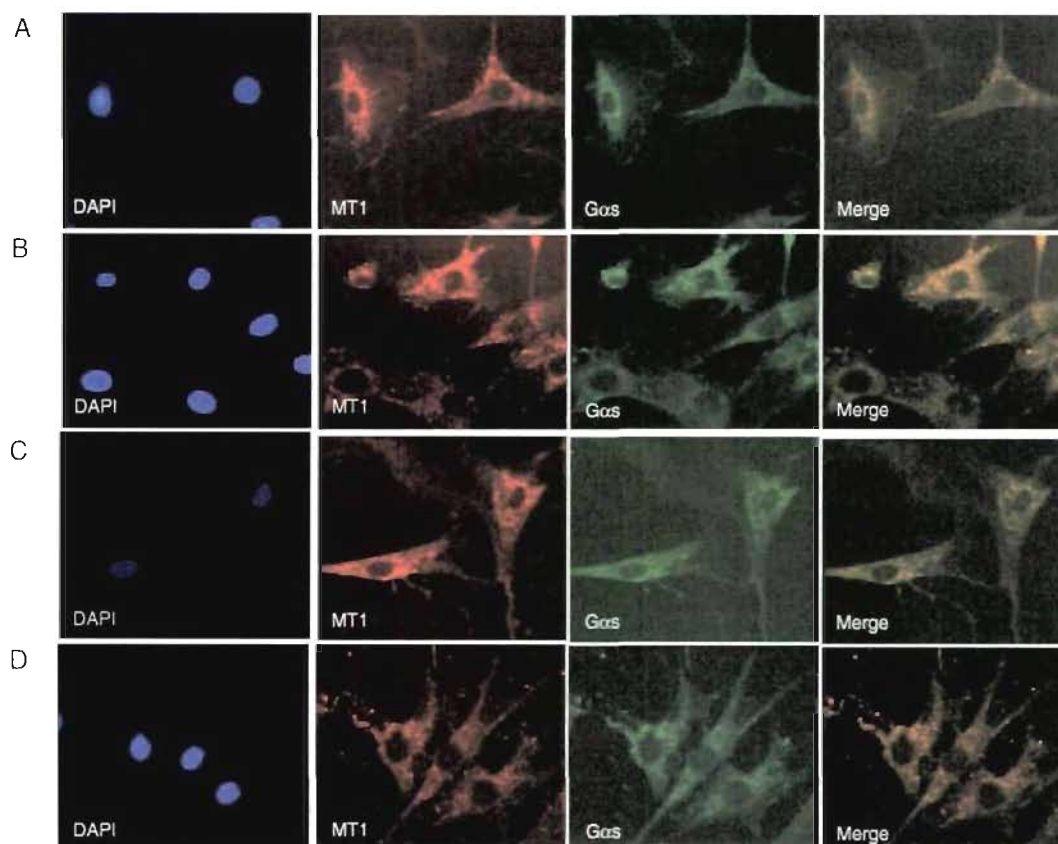


Figure 16 : Détection du récepteur MT1 et de la protéine $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes humains de patients SIA du groupe 1.

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA du groupe 1 ont été cultivées sur des lames de verre (labtek) (15 000 cellules/puits) et stimulées ensuite à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 30 minutes. Les ostéoblastes ont été incubés avec les anticorps spécifiques anti-MT1 et anti- $G\alpha_s$. La détection des anticorps primaire a été réalisée à partir d'anticorps couplés au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) ou à la rhodamine. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de DAPI. La ligne A correspond aux ostéoblastes non traités, la ligne B aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M), la ligne C aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M), la ligne D aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M).

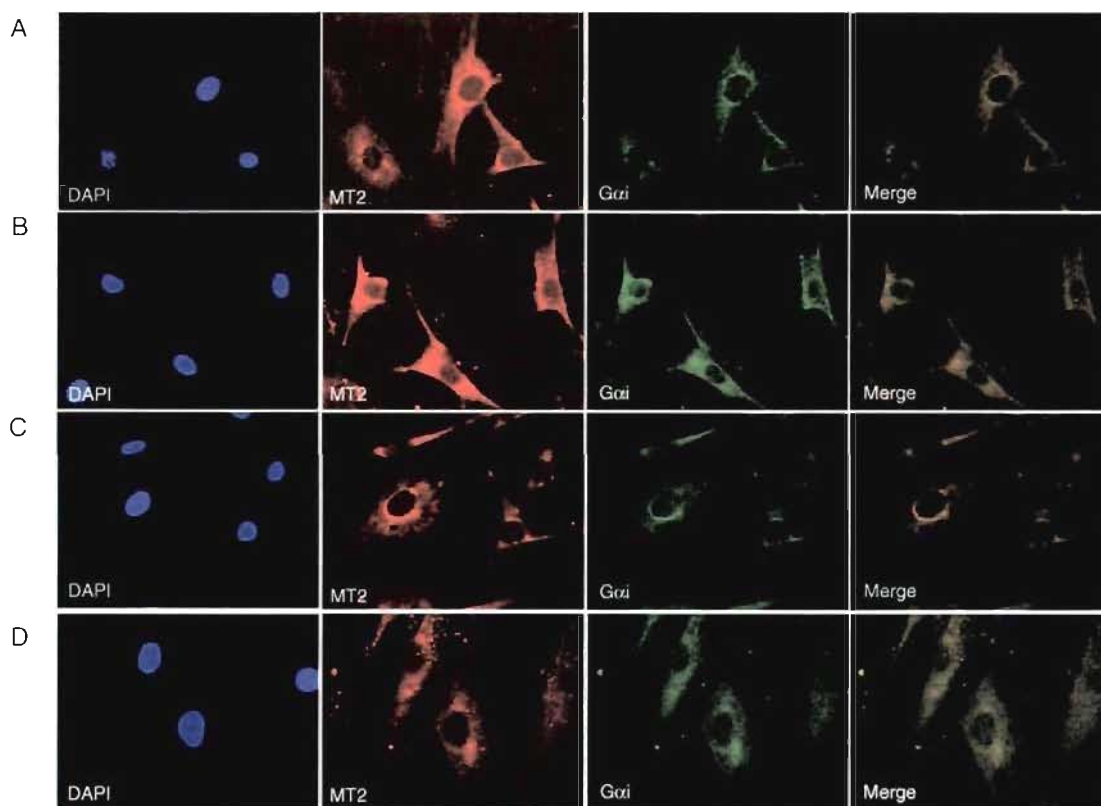


Figure 17 : Détection du récepteur MT2 et de la protéine $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes humains de patients SIA du groupe 1.

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA du groupe 1 ont été cultivées sur des lames de verre (labtek) (15 000 cellules/puits) et stimulées ensuite à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 30 minutes. Les ostéoblastes ont été incubés avec les anticorps spécifiques anti-MT2 et anti- $G\alpha_i$. La détection des anticorps primaires a été réalisée à partir d'anticorps couplés au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) ou à la rhodamine. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de DAPI. La ligne A correspond aux ostéoblastes non traités, la ligne B aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M), la ligne C aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M), la ligne D aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M).

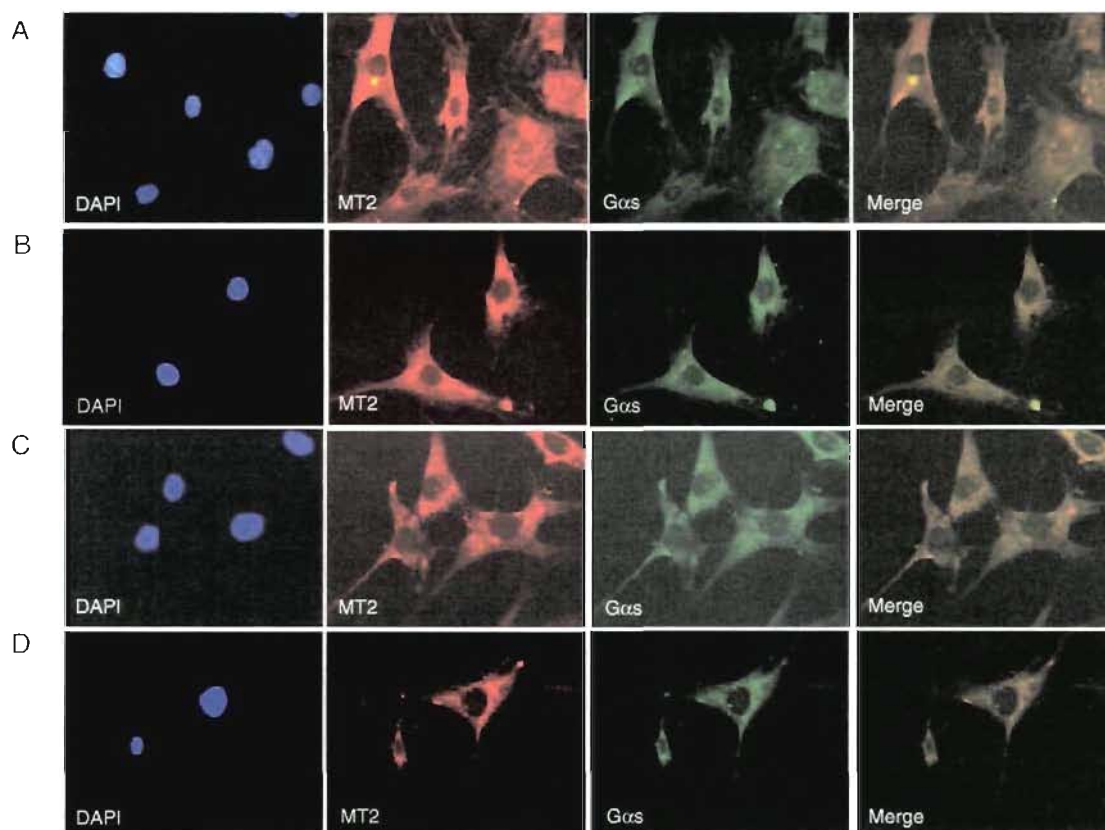


Figure 18 : Détection du récepteur MT2 et de la protéine $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes humains de patients SIA du groupe 1.

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA du groupe 1 ont été cultivées sur des lames de verre (labtek) (15 000 cellules/puits) et stimulées ensuite à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 30 minutes. Les ostéoblastes ont été incubés avec les anticorps spécifiques anti-MT2 et anti- $G\alpha_s$. La détection des anticorps primaires a été réalisée à partir d'anticorps couplés au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) ou à la rhodamine. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de DAPI. La ligne A correspond aux ostéoblastes non traités, la ligne B aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M), la ligne C aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M), la ligne D aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M).

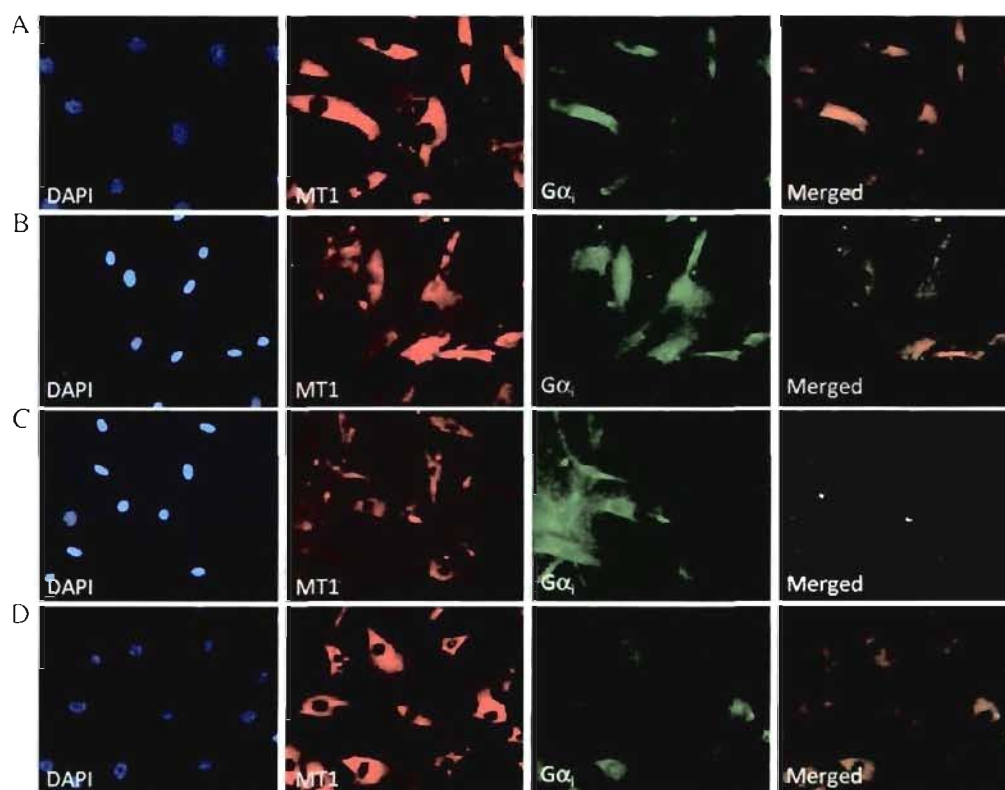


Figure 19: Détection du récepteur MT1 et de la protéine $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes humains d'un sujet témoin.

Les cellules provenant de fragments osseux de sujets témoins ont été cultivées sur des lames de verre (labtek) (15 000 cellules/puits) et stimulées ensuite à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 30 minutes. Les ostéoblastes ont été incubés avec les anticorps spécifiques anti-MT1 et anti- $G\alpha_i$. La détection des anticorps primaires a été réalisée à partir d'anticorps couplés au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) ou à la rhodamine. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de DAPI. La ligne A correspond aux ostéoblastes non traités, la ligne B aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M), la ligne C aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M), la ligne D aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M).

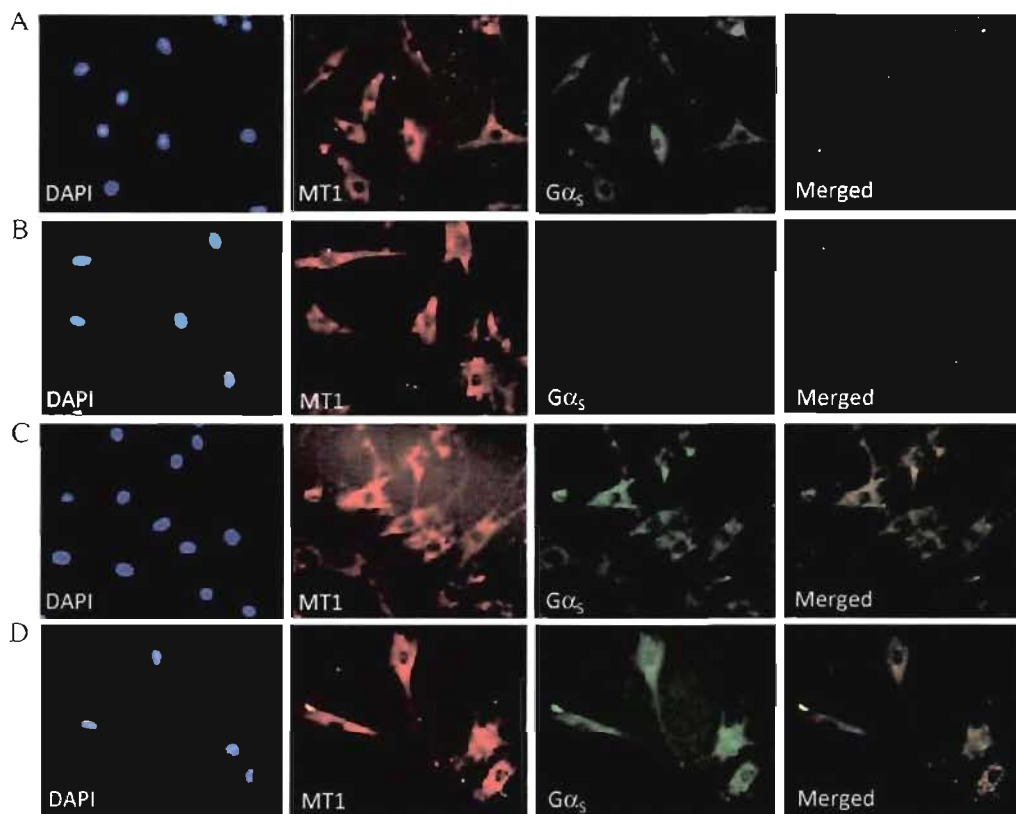


Figure 20 : Détection du récepteur MT1 et de la protéine $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes humains d'un sujet témoin.

Les cellules provenant de fragments osseux de sujets témoins ont été cultivées sur des lames de verre (labtek) (15 000 cellules/puits) et stimulées ensuite à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 30 minutes. Les ostéoblastes ont été incubés avec les anticorps spécifiques anti-MT1 et anti- $G\alpha_s$. La détection des anticorps primaire a été réalisée à partir d'anticorps couplés au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) ou à la rhodamine. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de DAPI. La ligne A correspond aux ostéoblastes non traités, la ligne B aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M), la ligne C aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M), la ligne D aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M).

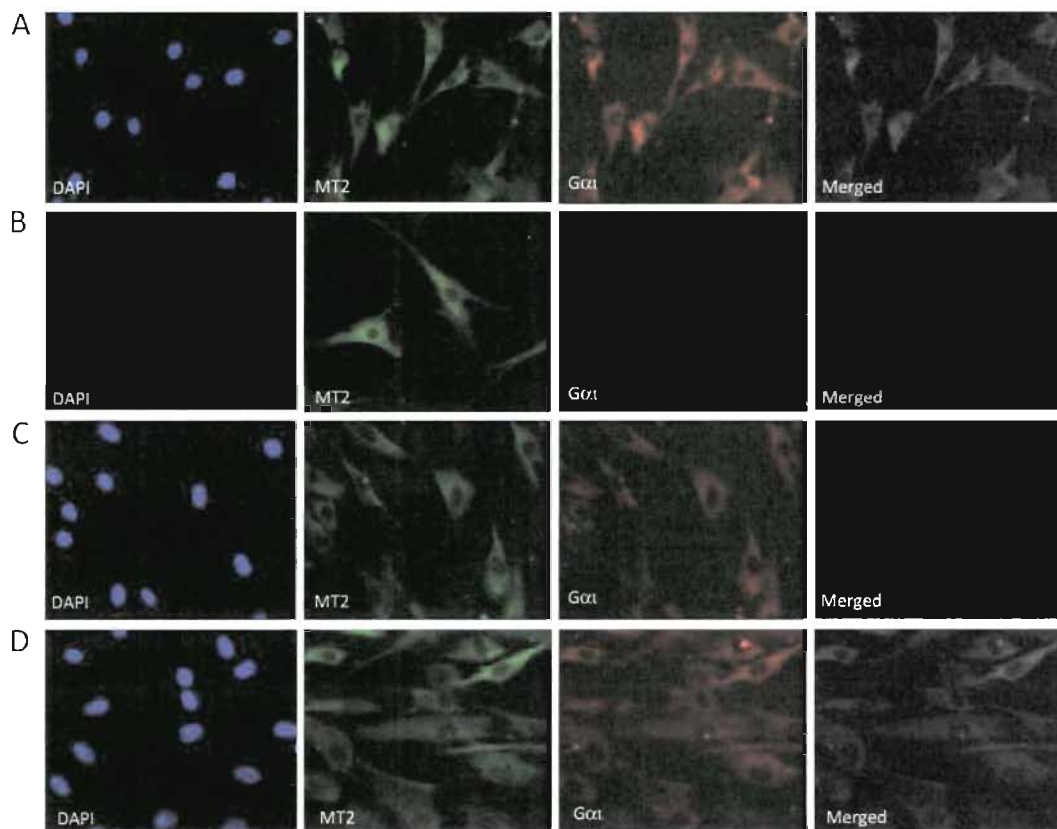


Figure 21 : Détection du récepteur MT2 et de la protéine $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes humains d'un sujet témoin.

Les cellules provenant de fragments osseux de sujets témoins ont été cultivées sur des lames de verre (labtek) (15 000 cellules/puits) et stimulées ensuite à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 30 minutes. Les ostéoblastes ont été incubés avec les anticorps spécifiques anti-MT2 et anti- $G\alpha_i$. La détection des anticorps primaires a été réalisée à partir d'anticorps couplés au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) ou à la rhodamine. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de DAPI. La ligne A correspond aux ostéoblastes non traités, la ligne B aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M), la ligne C aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M), la ligne D aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M).

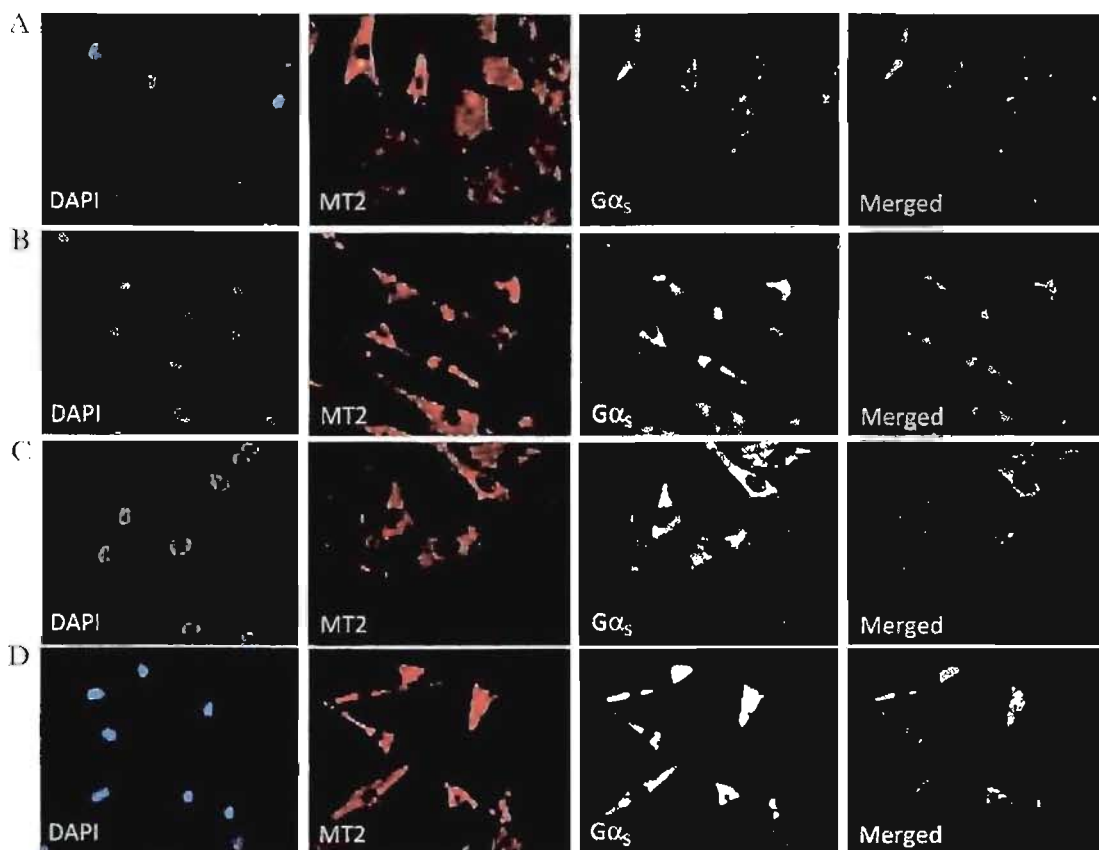


Figure 22 : Détection du récepteur MT2 et de la protéine $G\alpha_s$ dans les ostéoblastes humains d'un sujet témoin.

Les cellules provenant de fragments osseux de sujets témoins ont été cultivées sur des lames de verre (labtek) (15 000 cellules/puits) et stimulées ensuite à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (10^{-10} M) pendant 30 minutes. Les ostéoblastes ont été incubés avec les anticorps spécifiques anti-MT2 et anti- $G\alpha_s$. La détection des anticorps primaires a été réalisée à partir d'anticorps couplés au FITC (Fluoresceïne Iso Thio Cyanate) ou à la rhodamine. Les noyaux ont été colorés à l'aide d'une solution de DAPI. La ligne A correspond aux ostéoblastes non traités, la ligne B aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M), la ligne C aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol (10^{-10} M), la ligne D aux ostéoblastes traités avec une concentration physiologique de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β estradiol (10^{-10} M).

4.4 Phosphorylation du récepteur de la mélatonine MT2

Nous avons démontré l'existence du couplage des récepteurs de la mélatonine aux protéines $G\alpha_s$ et en particulier nous avons observés une diminution du couplage du récepteur MT2 aux protéines $G\alpha_s$ en présence de 17- β -estradiol chez les patients du groupe 1. Ces résultats nous ont amené à nous questionner sur le mécanisme impliqué dans la spécificité du couplage des récepteurs de la mélatonine aux protéines G. La littérature supporte un rôle important de la phosphorylation dans le couplage spécifique des récepteurs couplés aux protéines G aux différentes protéines G, en particulier chez les récepteurs β -adrénergiques. Nous avons ainsi regardé la phosphorylation des récepteurs de la mélatonine dans différentes conditions (mélatonine seule, 17- β -estradiol et mélatonine + 17- β -estradiol) afin de déterminer si la phosphorylation du récepteur MT2 pourrait expliquer les variations observées dans le couplage de ce récepteur avec les protéines G dans les différentes conditions de stimulation. Nous avons réalisés une purification des phosphoprotéines présentes dans les extraits membranaires d'ostéoblastes de patients SIA du groupe 1.

Les cellules ont été mises en culture en présence de concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M). Les extraits obtenus ont ensuite été passés dans des colonnes de purification de phosphoprotéine. Les immunobuvardages de type western utilisant l'anticorps spécifique anti-MT2 ont été réalisés par la suite avec les fractions éluées (figure 23). Nous avons observés une seule bande à 64,2 kDa correspondant au récepteur MT2 phosphorylé. Cette bande est plus intense lorsque les cellules ont été stimulées avec une concentration physiologique de mélatonine et/ou avec une concentration physiologique de 17- β -estradiol. L'intensité plus importante de la bande correspondant au récepteur MT2 dans les ostéoblastes stimulés comparativement aux ostéoblastes non stimulés met en évidence une phosphorylation plus importante en présence de mélatonine et de 17- β -estradiol. Cependant aucune variation n'est observée dans la quantité du récepteur MT2 entre les cellules stimulées à la mélatonine ou au 17- β -estradiol.

Les immunobuvardages réalisés avec des anticorps spécifiques anti-phospho-tyrosine ont permis de montrer la présence de résidus tyrosine phosphorylés au niveau des

récepteurs MT2 de deux patients du groupe 1 testés. La phosphorylation au niveau de ces résidus tyrosine est plus importante lorsque les cellules ont été stimulées avec des concentrations physiologiques de mélatonine seule (10^{-9} M) ou de concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) et de 17- β -estradiol (10^{-10} M) chez les patients testés (figure 24).

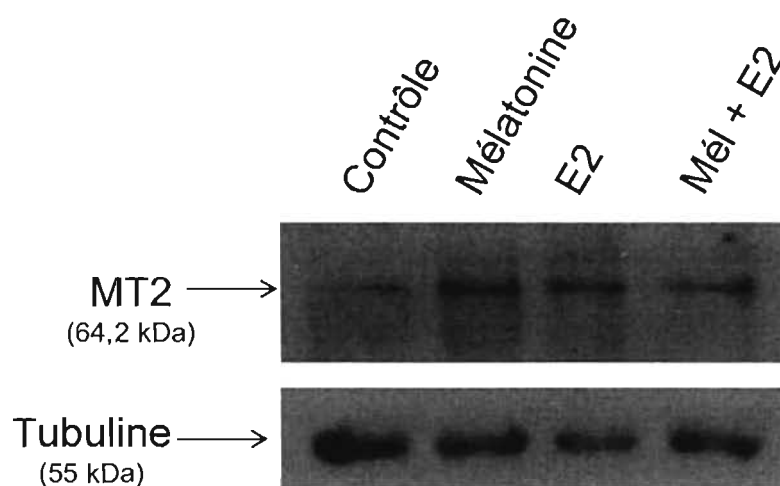


Figure 23 : Détection des récepteurs MT2 phosphorylés dans les ostéoblastes de patients SIA (groupe 1).

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA du groupe 1 ont été cultivées dans des pétris jusqu'à confluence dans du milieu α -MEM contenant 10% de SVF et 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules ont été privées de sérum durant 16 heures et stimulées à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (E_2) pendant 16 heures. Des extraits membranaires ont été réalisés et les phosphoprotéines ont été purifiées à partir qu'un kit de purification QIAGEN. Des immunobuvardages de type Western ont été réalisés ensuite à partir des extraits purifiés de phosphoprotéines et ont été révélés avec des anticorps spécifiques anti-MT2 et anti- α -tubuline. La bande à 64,2 kDa correspond à la protéine MT2 phosphorylée.

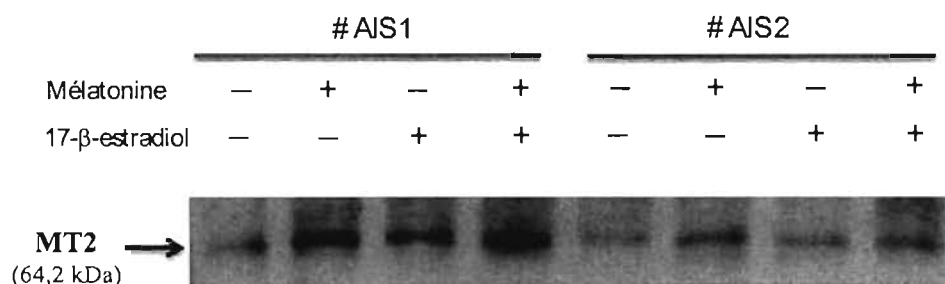


Figure 24 : Détection des récepteurs MT2 phosphorylés au niveau de résidus tyrosine dans les ostéoblastes de patients SIA (groupe 1).

Les cellules provenant de fragments osseux de patients SIA du groupe 1 ont été cultivées dans des pétris jusqu'à confluence dans du milieu α -MEM contenant 10% de SVF et 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules ont été privées de sérum durant 16 heures et stimulées à des concentrations physiologiques de mélatonine (10^{-9} M) en présence ou en absence de 17- β -estradiol (E_2) pendant 16 heures. Des extraits membranaires ont été réalisés. Les phosphoprotéines ont été purifiées à partir qu'un kit de purification QIAGEN. Des immunobuvardages de type Western ont été réalisés ensuite à partir des extraits totaux protéiques et ont été révélés avec des anticorps spécifiques anti-phosphotyrosine. La bande à 64,2 kDa correspond à la protéine MT2 phosphorylée au niveau de résidus phosphorylés.

4.5 Etude des différents sites de phosphorylations des récepteurs de la mélatonine

Afin d'identifier les kinases qui pourraient être potentiellement impliquées dans la phosphorylation des récepteurs de la mélatonine, nous avons également étudié, à partir de la séquence des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 obtenues dans NCBI, les différents sites de phosphorylations possibles (figure 25 et 26). Nous avons pu déterminer la présence de motifs de phosphorylation reconnus par certaines kinases dans les séquences protéiques des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2. Ces kinases pourraient ainsi potentiellement phosphoryler ces récepteurs au niveau de résidus spécifiques (tableau IX et tableau X). Nous avons ainsi pu observer que les sites de phosphorylation du récepteur MT1 sont différents de ceux observés dans le récepteur MT2. Ainsi, plusieurs protéines kinase C semble pouvoir phosphoryler un résidu thréonine au niveau T252 du récepteur MT1 alors que les protéines kinases C (PKC) semblent pouvoir phosphoryler un résidu sérine au niveau S336 dans le récepteur MT2.

De plus, les kinases semblant être impliquées dans ces phosphorylations sont également différentes. Certaines kinases semblent être capables de phosphoryler les deux récepteurs de la mélatonine, MT1 et MT2, telles que les kinases Lck, les protéines kinases C (PKC δ , PKC ζ , PKC ϵ , PKC μ) mais d'autres kinases phosphoryleraient uniquement l'un des deux récepteurs. En effet, seul le récepteur MT2 posséderait un site de reconnaissance de l'enzyme Erk1.

Il est important de souligner également que plusieurs sites de phosphorylation sont présents au niveau de la queue C-terminal cytoplasmique des récepteurs MT1 et MT2. En particulier, le site de phosphorylation du résidu tyrosine 308 au niveau du récepteur MT2, semble pouvoir être accessible par la kinase puisqu'il est présent au niveau du domaine intracellulaire de la queue C-terminal (tableau XI).

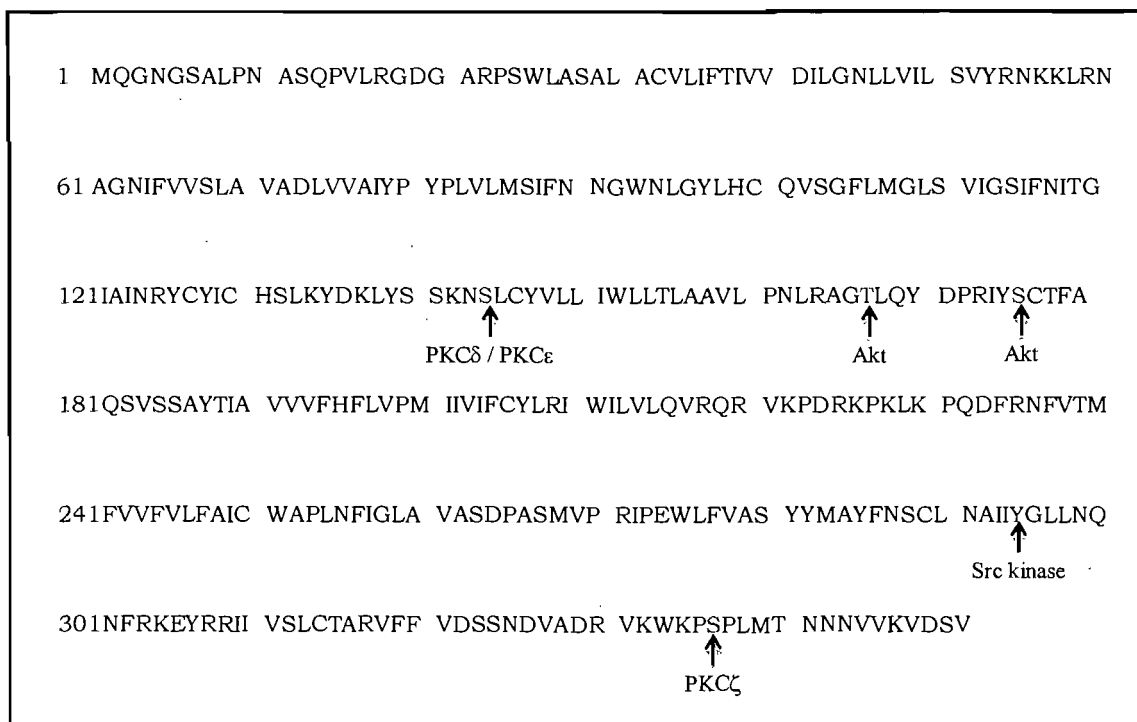


Figure 25 : Séquence du récepteur de la mélatonine MT1 (MEL1-A) de l’Homo Sapiens et sites de phosphorylation possibles au niveau de résidus tyrosine, sérine/thréonine (obtenu de NCBI, # P48039, PRI 10-JUL-2007).

Tableau IX : Résidus reconnus par différentes kinases dans la séquence du récepteur MT1

Groupe de kinases	Nom des kinases	Résidus
Tyrosine Kinase	Kinase Lck	Y295
	kinase Abl	Y295
	Insulin Receptor kinase	Y282
	Kinase Src	Y295
Groupe de kinase sérine/ thréonine basophile	PKCzeta	S132, S336
	PKCdelta	S144
	PKCepsilon	S144, S182
	PKCmu	S51
	PKCzeta	S132, S336
	Kinase Akt	S176
	PKA	S24
	PKCalpha/ beta/ gamma	S51
	PKCmu	T155, T167, T188
	PKCepsilon	T87
	PKA	T167
	PKCzeta	T239, T315
	Kinase Akt	T167
Groupe de kinase sérine/ thréonine acidophile	Casein kinase 1	S144
	GSK3 Kinase	T178
Groupe de Kinase sérine/ thréonine proline-dépendante	Cdk5 kinase	S336
	Cdc2 kinase	S336

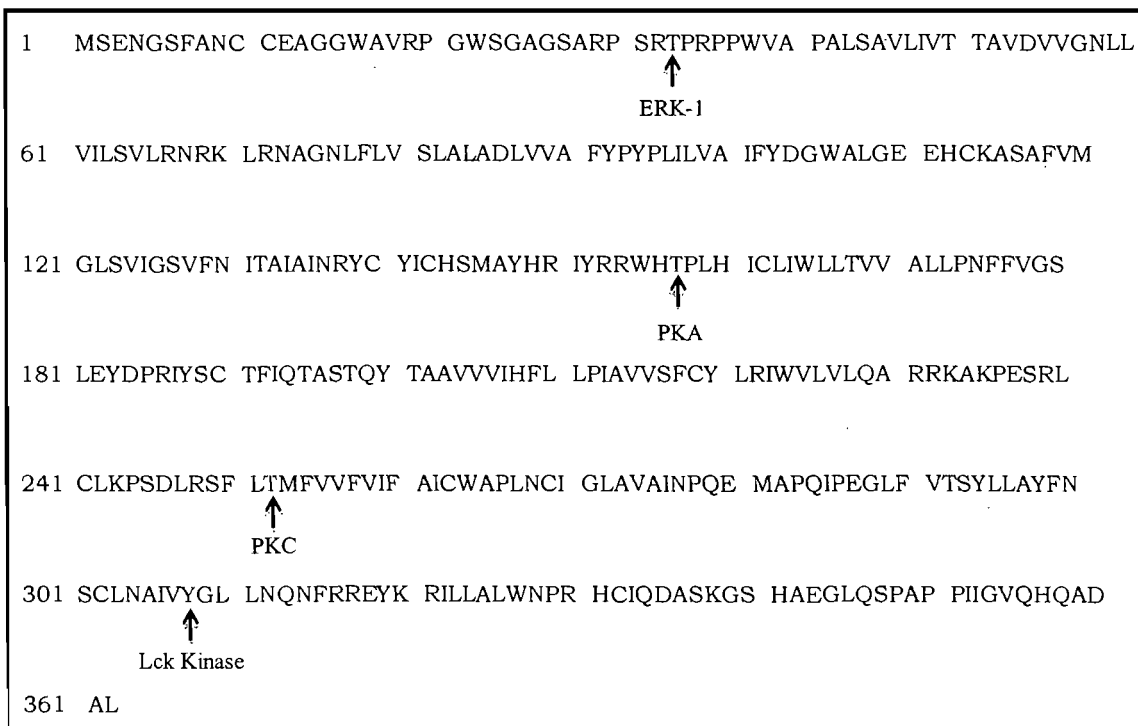


Figure 26 : Séquence du récepteur de la mélatonine MT2 (MEL1-B) de l'Homme Sapiens et sites de phosphorylation possibles au niveau de résidus tyrosine, sérine/thréonine (obtenu de NCBI, # P49286, PRI 10-JUL-2007).

Tableau X : Résidus reconnus par différentes kinases dans la séquence du récepteur MT2

Groupe de kinases	Nom des kinases	Résidus
Tyrosine Kinase	Lck kinase	Y308
Groupe de kinase sérine/thréonine basophile	PKCzeta	S145
	PKCdelta	S197
	PKCmu	S64, S123
	PKCzeta	S238, S245, S249
	Akt kinase	S189
	PKCmu	T252, T51
	PKCdelta	T252
	PKCzeta	T252
	PKCepsilon	T252
	PKA	T157
Groupe de kinase sérine/thréonine acidophile	Casein kinase 1	S340
	GSK3 Kinase	S27, S31 (chondrocytes)
Groupe de Kinase sérine/thréonine proline-dépendante	p38 MAPK	S347
	Erk 1 kinase	S347
	Qdc2 kinase	T33, T157
	Erk 1 kinase	T33

Tableau XI : Domaines protéique du récepteur MT2

Chaîne d'acides aminés

(de - à)

Domaine

1 - 42	extracellulaire
43 - 63	transmembranaire 1
64 - 76	cytoplasmique
77 - 97	transmembranaire 2
98 - 115	extracellulaire
116 - 136	transmembranaire 3
137 - 155	cytoplasmique
156 - 176	transmembranaire 4
177 - 200	extracellulaire
201 - 221	transmembranaire 5
222 - 253	cytoplasmique
254 - 274	transmembranaire 6
275 - 287	extracellulaire
288 - 308	transmembranaire 7
309 - 362	cytoplasmique

5 CHAPITRE 5. DISCUSSION

Nous avons choisi de réaliser notre étude sur le rôle des estrogènes dans la SIA avec des ostéoblastes humains car la SIA est une maladie qui affecte particulièrement le tissu osseux, notamment la colonne vertébrale mais également d'autres os. De plus, les ostéoblastes sont également connus pour répondre à la mélatonine et aux estrogènes *in vitro* et *in vivo* (Cardinali *et al.*, 2003) (Nakade *et al.*, 1999) (Roth *et al.*, 1999) (Balasch, 2003). La caractérisation phénotypique des cellules dérivées des patients SIA avec lesquelles nous avons réalisés nos expériences ont confirmé qu'il s'agissait bien d'ostéoblastes. La détection de l'expression de l'ostéopontine dans les cellules HEK utilisées comme cellules témoins n'est pas surprenant et concorde avec la littérature. En effet, l'ostéopontine est une protéine présente dans le tissu osseux mais elle est également exprimée dans d'autres tissus tels que le rein (Rodan, 1995). Ceci nous a donc permis de développer une banque de cellules humaines unique au monde provenant de fragments osseux obtenus lors des chirurgies de la colonne vertébrale sur des patients atteints de SIA.

5.1 Confirmation du défaut de signalisation de la mélatonine et clarification fonctionnelle des patients SIA

Dans les ostéoblastes dérivés de patients scoliotiques, nous avons confirmé la présence d'un défaut dans la signalisation de la mélatonine en mesurant l'accumulation d'AMPC induite par la forskoline. Chez les patients SIA appartenant au groupe 1, celle-ci est augmentée significativement par la mélatonine, maintenue chez les patients appartenant au groupe 2 ou légèrement diminuée chez les patients du groupe 3 ce qui contraste avec l'inhibition de la production de l'AMPC observée dans les ostéoblastes contrôles provenant des sujets non scoliotiques (figure 4). A ce jour, tous les patients SIA analysés ont montré un défaut dans cette voie de signalisation. Il est à noter que la présence de trois groupes fonctionnels selon la classification proposée par Moreau et al. suggère l'existence d'au moins trois groupes distincts qui sont affectés dans la SIA. Dans ce contexte, et en tenant compte de la prévalence de la SIA chez les filles, il nous a semblé important voir essentiel de déterminer la contribution des estrogènes dans la SIA

notamment au niveau de leur rôle possible comme facteur aggravant sur la signalisation de la mélatonine.

5.2 Effet du 17- β -estradiol sur la signalisation cellulaire de la mélatonine dans les ostéoblastes provenant de patients SIA

L'addition de doses physiologiques de 17- β -estradiol (10^{-10} M) lors des tests d'AMPc réalisés en présence de mélatonine a significativement aggravé voir complètement bloqué cette signalisation dans les ostéoblastes des patients SIA des groupes 2 et 3. En effet, chez les patients des groupes 2 et 3, nous avons observé une augmentation des taux d'AMPc par rapport aux taux observés en présence de mélatonine seule (figure 6 et 7). Cet effet pourrait être médié entre autre via une voie de signalisation rapide impliquant le récepteur GPR30 couplé aux protéines G situé au niveau de la membrane plasmique (Carmeci *et al.*, 1997). La liaison du 17- β -estradiol à ce récepteur permet l'activation de la phospholipase C (PLC) à travers la protéine $G\alpha_q$ ce qui aboutira à une augmentation de l'AMPc intracellulaire par l'activation des adénylates cyclases. Ces taux élevés d'AMPc, amplifié par le 17- β -estradiol, conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA) qui va phosphoryler la protéine CREB (cAMP response element-binding) aboutissant ainsi à l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation osseuse, la croissance cellulaire et le remodelage osseux (figure 27). De plus, l'augmentation de l'AMPc intracellulaire en présence d'estradiol pourraient avoir un effet néfaste dans ce sous groupe de patients car les taux élevés d'AMPc sont connus pour supprimer la fonction ostéoblastique à travers la dégradation protéolytique de Cbfa1, un facteur de transcription clé dans la formation de l'os (Plant *et al.*, 2002) (Tintut *et al.*, 1999), ce qui pourrait expliquer l'ostéopénie observé chez certains patients SIA. L'étude de la dégradation de Cbfa1 chez les patients scoliotiques du groupe 2 et 3 seraient ainsi intéressante. Cependant, l'étude de Cbfa1 in vitro (hors du contexte physiologique) est difficile car c'est un facteur régulé par beaucoup de facteurs de transcription. Des études ont montré que chez les adolescentes scoliotiques, la densité

minérale osseuse au niveau lombaire est significativement plus faible que dans la population contrôle (Cheng *et al.*, 1999). Cependant, la relation entre les niveaux circulants d'estrogènes et la présence d'ostéopénie n'a pas encore été clarifiée dans la pathogenèse de la SIA.

Ce résultat est important puisqu'il peut expliquer la plus grande incidence de cette maladie chez les jeunes filles au moment de la puberté en termes de nombre et de sévérité. Toutefois, l'effet de l'estradiol sur la signalisation de la mélatonine et la synthèse d'AMPC a montré des effets opposés chez les patients constituant le groupe 1. En effet, nous avons observé une inhibition de la synthèse d'AMPC sous l'influence du 17- β -estradiol comparativement aux mêmes cellules traitées qu'en présence de mélatonine (figure 8). La courbe d'inhibition observée en présence de 17- β -estradiol se rapproche de la courbe d'inhibition observée chez les sujets témoins suggérant ainsi une possible correction potentielle du défaut de signalisation chez les patients par le 17- β -estradiol. Il est également intéressant de souligner qu'on retrouve davantage de garçon dans ce groupe fonctionnel (Moreau *et al.*, 2004). Ceci pourrait s'expliquer par un effet potentiellement bénéfique du 17- β -estradiol sur ce groupe de patients. Il est possible que les taux circulants d'estradiol serait plus faible chez les patients du groupe 1 comparativement à celui des groupes 2 et 3 ou les filles saines, cependant aucune étude n'existe à ce sujet. Il serait donc intéressant de doser le taux d'estradiol circulant chez les jeunes filles du groupe 1 ainsi que chez les patients du groupe 2, du groupe 3 ou les filles non scoliotiques du même âge.

Il demeure incertain si des concentrations plus grandes ou l'utilisation d'agonistes pharmacologiques pourraient avoir un effet correcteur plus important au point de corriger complètement le défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA du groupe 1.

Les mécanismes conduisant à cette diminution du taux d'AMPC pourraient être dû à une diminution du couplage des récepteurs de la mélatonine aux protéines $G\alpha_s$ observés chez ce groupe de patients. Ces mécanismes seront discutés dans les paragraphes suivants.

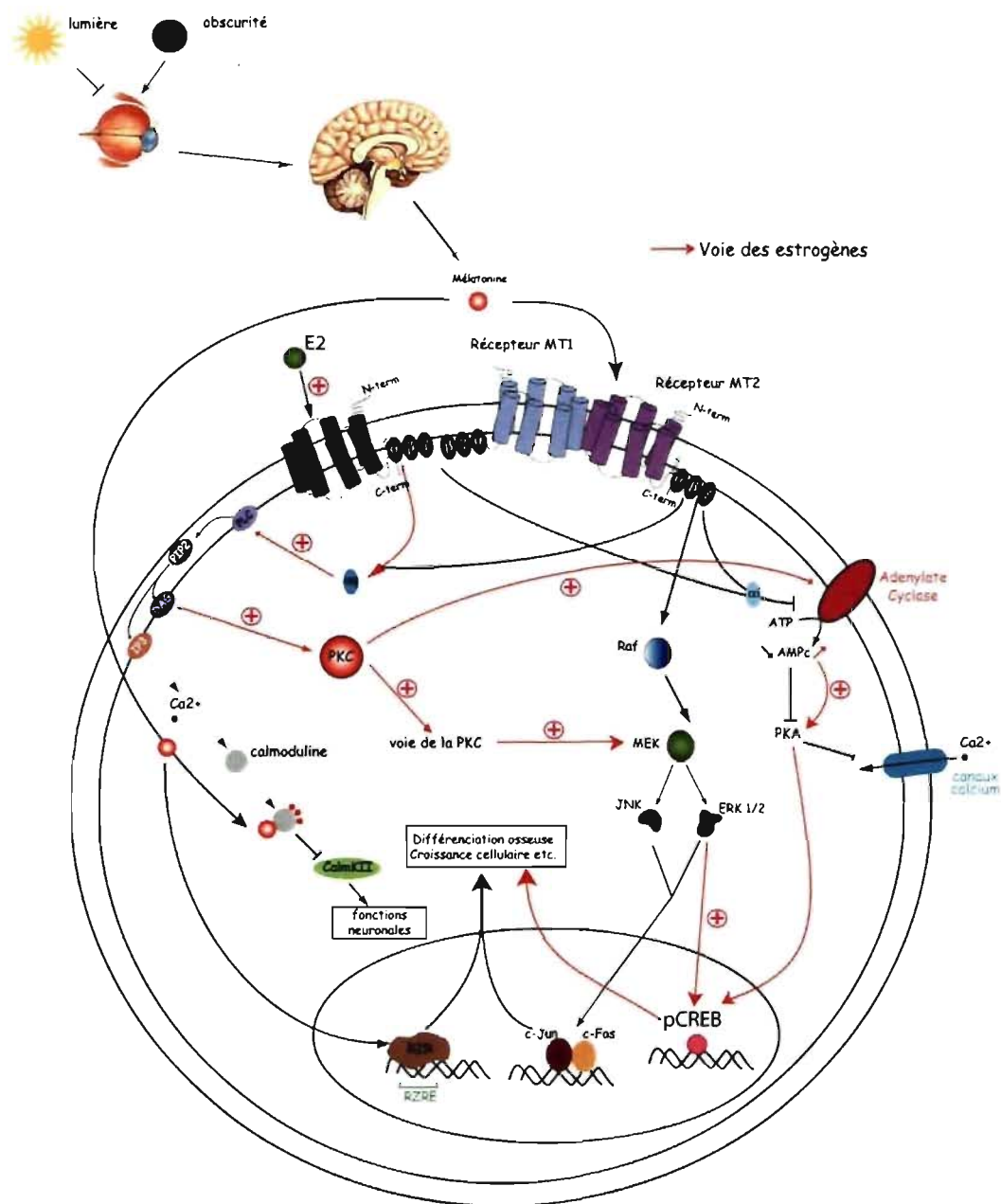


Figure 27 : Schéma de l'interaction de la voie rapide des œstrogènes avec les voies de signalisation de la mélatonine. → représente la voie rapide de signalisation des œstrogènes via le récepteur couplé aux protéines G (Adapté de ambion.com).

5.3 Couplage différentiel des récepteurs MT1 et MT2 aux protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ survient dans les ostéoblastes des patients SIA du groupe 1

Suite aux observations faites sur la réponse des ostéoblastes au 17- β -estradiol, nous pensons que les mécanismes impliqués dans le développement de la SIA chez les patients du groupe 2 et 3 est différent de celui observés chez les patients du groupe 1. D'ailleurs, les résultats obtenus chez les patients du groupe 1 où nous avons observé un effet positif du 17- β -estradiol contrebalançant le défaut de signalisation de la mélatonine, nous a conduit à nous intéresser plus particulièrement à ce groupe de patients. Le groupe 1 n'est pas le groupe le plus représentatif de la scoliose idiopathique adolescente toutefois compte tenu du patron spécifique de ce groupe quant aux résultats du dosage de l'AMPc intracellulaire, nous avons choisi de cibler notre étude sur ce groupe afin de caractériser plus particulièrement leur réponse aux estrogènes. Nous avons examiné si les réponses anormales observées chez les patients du groupe fonctionnel 1 et le rétablissement d'une inhibition de la production d'AMPc en présence de 17- β -estradiol étaient causées par des changements moléculaires survenant au niveau du couplage des récepteurs de la mélatonine avec les protéines G. Nous avons observé un couplage des récepteurs MT1 et MT2 avec les protéines $G\alpha_i$ dans les ostéoblastes de sujets contrôles et des patients SIA, ce qui est en accord avec la littérature (Brydon *et al.*, 1999). Cette observation a été faite dans les ostéoblastes de patients SIA non traités ainsi que dans les ostéoblastes stimulés avec les concentrations physiologiques de mélatonine et/ou de 17- β -estradiol. Cependant, nous avons également observés un couplage des récepteurs de la mélatonine MT1 et MT2 avec les protéines $G\alpha_s$ (figure 12 et 13). Le couplage des récepteurs MT1 aux protéines $G\alpha_s$ a été démontré dans la littérature dans les lignées cellulaires COS (cellules de rein de singe vert africain contenant une version du génome du virus SV40), cependant il n'avait pas encore été observé avec le récepteur MT2 (Chan *et al.*, 2002a). Ces résultats semblent fournir un mécanisme plausible expliquant le plus haut taux d'AMPc observés dans les ostéoblastes isolés de patients AIS du groupe 1 en présence de mélatonine seule. Les protéines $G\alpha_s$ couplés aux

récepteurs de la mélatonine augmenterait le taux d'AMPC intracellulaire en activant les adénylates cyclases (Sunahara *et al.*, 1996).

Les immunobuvardages de type Western suite aux immunoprécipitations avec les anticorps anti-MT1 et anti-MT2 ont montré que les récepteurs de la mélatonine sont couplés aux protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$. Nous avons détecté deux bandes correspondant aux protéines $G\alpha_i$ et deux bandes correspondant aux protéines $G\alpha_s$ dans ces immunobuvardages. Les bandes présentes à 45 kDa correspondent aux protéines $G\alpha_i$ non phosphorylées et les bandes présentes à 60 kDa correspondent aux protéines $G\alpha_i$ phosphorylées tel que démontré par Moreau *et al.* (Moreau *et al.*, 2004).

Nous avons également observé une diminution du couplage des récepteurs MT2 avec les protéines $G\alpha_s$ en présence de 17- β -estradiol. Il ne semble pas que cette diminution du couplage en présence de 17- β -estradiol soit due à une diminution de la quantité des protéines $G\alpha_s$ présentes puisqu'elle n'est pas observée avec le récepteur MT1 sur les mêmes échantillons et dans les mêmes conditions. Cette diminution du couplage de récepteurs MT2 avec les protéines $G\alpha_s$ en présence de 17- β -estradiol entrainerait une correction du défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients du groupe 1 en permettant aux protéines G_i de se coupler au récepteur MT2.

Un autre mécanisme pourrait également expliquer cette diminution de l'interaction des protéines $G\alpha_s$ avec les récepteurs MT2. En effet, Masana *et al.* ont montré que le 17- β -estradiol augmente la densité des récepteurs MT2 et compte tenu que les protéines $G\alpha_s$ sont dix fois moins abondantes que les protéines $G\alpha_i$ ceci expliquerait la diminution apparente du recrutement des protéines $G\alpha_s$ (Kaziro *et al.*, 1991) (Masana *et al.*, 2005). Cependant cela n'aurait pas ou peu d'impact sur le couplage des G_i au récepteur MT2 à cause de leur plus grand nombre permettant d'occuper presque tous les récepteurs MT2 (figure 8). Toutefois, cette augmentation possible de la densité des récepteurs MT2 par le 17- β -estradiol n'a pu être confirmée par nos expériences d'immunofluorescence. Des essais d'affinité avec l'iodomélatonine marquée devraient être réalisés afin de vérifier cette possibilité. Il serait également important de déterminer l'affinité des récepteurs de la mélatonine pour les protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_s$ grâce à des colonnes d'affinité.

De plus, l'étude du couplage des récepteurs de la mélatonine aux protéines G par des expériences d'immunofluorescence, nous a permis de reporter dans cette étude que l'exposition aux estrogènes et à la mélatonine n'agit pas de la même manière sur la localisation sub-cellulaire des protéines Gi dans les cellules AIS. Nous avons trouvé une colocalisation cytoplasmique des protéines Gai avec les récepteurs MT2 dans les cellules exposées au 17- β -estradiol. Cependant, dans les cellules exposées à la mélatonine seule, cette colocalisation n'a pas été observée. Plusieurs études ont montré la présence des protéines Gi au niveau du noyau (Willard *et al.*, 2000). La localisation cytoplasmique versus nucléaire des protéines Gi est importante pour la différenciation cellulaire et la prolifération et ainsi pour le métabolisme osseux et la fonctionnalité des cellules (Crouch, 1991; Crouch *et al.*, 1997; Gobeil *et al.*, 2006).

5.4 Désensibilisation des récepteurs de la mélatonine

Des études montrent que le couplage préférentiel des récepteurs couplés aux protéines G à différentes protéines G serait sous le contrôle de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. En effet, la présence dix fois plus importante de protéines Gi que de protéines Gs (Kazirol *et al.*, 1991) dans un grand nombre de type cellulaire et tissus montre que le couplage des récepteurs aux protéines Gs nécessite un mécanisme spécifique pour favoriser leur couplage aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Des études réalisées sur les récepteurs β -adrénergiques ont montré un changement du couplage avec les protéines Gs, habituellement couplés à ces récepteurs, vers un couplage avec les protéines Gi (Baillie *et al.*, 2003). La phosphorylation des récepteurs β -adrénergiques diminue significativement leur capacité à se coupler aux protéines Gs, ce qui augmente simultanément leur couplage aux protéines Gi (Zamah *et al.*, 2002). La phosphorylation de ces récepteurs est médiée par la protéine kinase A (une sérine kinase activée par la voie rapide des estrogènes) et permet la désensibilisation hétérologue des récepteurs. Ainsi, le modèle retenu par Daaka *et al.* (Daaka *et al.*, 1997) est que la phosphorylation des récepteurs β -adrénergique par la PKA les rendent moins apte à se

coupler aux protéines Gs mais plus apte à se coupler aux protéines Gi in vitro. De plus, ce mécanisme de « switch moléculaire » par lequel les protéines Gs sont remplacées par les protéines Gi a été observé dans différents types cellulaires (cellules épithéliales de rein de hamster, les myocytes cardiaques de rat, cellules pancréatiques de souris et des cellules d'ovaire de hamster chinois) (Lefkowitz *et al.*, 2002). Cependant, bien que plusieurs études aient montré le remplacement des protéines Gs par les protéines Gi dans le couplage avec les récepteurs β -adrénergiques, aucune étude n'a mis en évidence le remplacement des protéines Gi par des protéines Gs et en particulier avec les récepteurs de la mélatonine. Nous sommes ainsi les premiers à montrer un tel changement dans le couplage des protéines G et les RCPG. Ainsi, il est possible que le couplage des récepteurs MT2 aux protéines G_S soient dû à une modification dans la phosphorylation des récepteurs MT2 (figure 28).

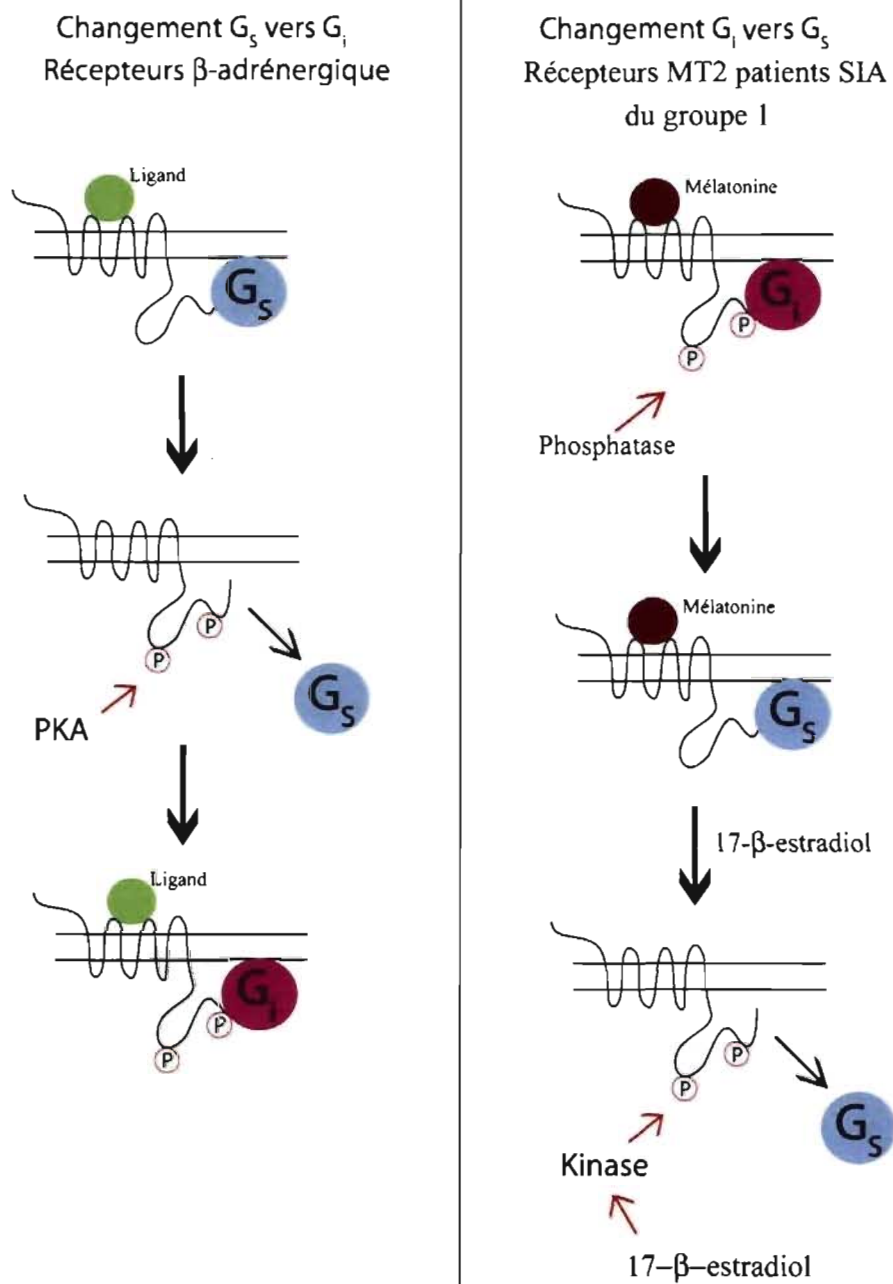


Figure 28 : Mécanisme impliqué dans le changement du couplage des récepteurs β -adrénergique avec les protéines G et mécanisme possible impliqué dans la diminution du couplage des récepteurs de la mélatonine MT2 avec les protéines $G\alpha_s$ en présence de 17- β -estradiol.

La phosphorylation des récepteurs MT2 en présence de 17- β -estradiol pourrait expliquer la diminution du couplage aux protéines G α S en stimulant l'activité d'une tyrosine kinase, d'autres kinases comme la PKA ou tout simplement en réduisant la synthèse de protéines G α S et en augmentant le nombre de récepteurs. L'analyse de la séquence du récepteur MT2 a montré qu'il possède, au niveau de la queue C-terminal, des motifs reconnus par deux serine kinase, Erk et p 38 MAPK, et une tyrosine kinase, Lck ("leukocyte-specific protein tyrosine kinase"). La tyrosine kinase inclut dans ce motif est situé en position 308 de la séquence en acides aminés. Le tableau XI montre que le dernier domaine cytoplasmique du récepteur de la mélatonine MT2 se situe au niveau de la région allant de l'acide aminé 309 à l'acide aminé 362. Ainsi, il est possible que la tyrosine 308 soit accessible aux tyrosines kinase. Plusieurs études ont montré que les kinases Erk-1 et p38 MAPK peuvent être activées par les estrogènes (Seval et al., 2006) (Gentilini et al., 2007). Contrairement au récepteur MT2, nous n'observons pas de diminution dans le couplage des récepteurs MT1 aux protéines G α S. Cette différence peut être expliquée par le fait que les récepteurs MT1 et MT2 n'ont pas les mêmes sites de phosphorylations (figures 25 et 26, tableaux VIII et IX). En effet, bien que les récepteurs partagent une grande homologie de séquence, les récepteurs MT1 et MT2 ne possèdent pas les mêmes motifs de reconnaissance des kinases. La queue C-terminale du récepteur MT1 ne possède pas de motifs reconnus par les kinases Lck, Erk-1 et p38 MAPK.

CHAPITRE 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons pu répondre à notre premier objectif qui était de déterminer les effets des estrogènes sur l'activité adénylate cyclase en réponse à la mélatonine en présence ou en absence de 17- β -estradiol. Nous avons démontré l'existence de trois groupes de patients en nous appuyant sur le défaut de signalisation de la mélatonine et de deux groupes en nous appuyant sur la réponse des ostéoblastes au 17- β -estradiol. Nous avons ainsi montré chez les patients du groupe 2 et 3 une augmentation significative du taux d'AMPc en présence de 17- β -estradiol qui pourrait se répercuter par un défaut de signalisation de la mélatonine exacerbé (en terme de niveau d'AMPc). Dans le cas de ce groupe, nous établissons que le traitement des ostéoblastes par les estrogènes pourrait être dommageable. Ces patients ne devraient donc pas être exposés aux substances ayant des propriétés de stimulation des récepteurs aux estrogènes tels que les anovulants ou les diètes riches en phytoestrogènes de même que certains polluants biomimétique des estrogènes. Nous avons également montré que chez les patients du premier groupe, le défaut de signalisation de la mélatonine conduisant à une augmentation des taux d'AMPc peut être corrigé partiellement *in vitro* par l'addition du 17- β -estradiol (E2). Ces résultats ont également permis d'établir un bénéfice potentiel, chez ce groupe de patient, du traitement des ostéoblastes par un agoniste des récepteurs aux estrogènes tel que les phytoestrogènes.

Les résultats obtenus chez les patients du groupe 1 nous ont conduits à nous intéresser au mécanisme impliqué dans la diminution du taux d'AMPc en présence de 17- β -estradiol. Ainsi nous avons pu montrer l'existence du couplage entre les récepteurs de la mélatonine et les protéines $G\alpha_s$. De plus, nous avons mis en évidence une diminution de l'interaction des protéines activatrices ($G\alpha_s$) couplées au récepteur MT2 de la mélatonine provoquée par l'exposition des cellules au 17- β -estradiol dans ce groupe de patients, semblant montrer que l'interaction entre la voie de signalisation de la mélatonine et le 17- β -estradiol passerait par le récepteur MT2.

Dans les perspectives futures il serait important de déterminer si la phosphorylation des récepteurs MT2 est impliquée dans la diminution du couplage de ces récepteurs aux protéines $G\alpha_s$ en présence de 17- β -estradiol. En effet, la littérature montre que la phosphorylation des récepteurs joue un rôle important dans la spécificité du couplage

des récepteurs couplés aux protéines G avec les différentes protéines G (Daaka *et al.*, 1997). Il serait donc intéressant d'étudier le profil de phosphorylation du récepteur MT2 chez les patients du groupe 1 en présence de 17- β -estradiol et/ou de mélatonine et de le comparer à celui observé chez les patients du groupe 2 et 3 ainsi que chez les sujets contrôles. Les sites de phosphorylations et les kinases pouvant être impliquées (PKA, Erk-1, Lck) devront être étudiés.

Des variations dans la désensibilisation des récepteurs de la mélatonine pouvant être également un mécanisme impliqué dans le défaut de signalisation observé aux niveaux des taux d'AMPC chez les patients SIA, il serait également important de déterminer s'il existe une variation dans la désensibilisation de la réponse à la mélatonine en présence de 17- β -estradiol dans les ostéoblastes de patients SIA et plus spécifiquement dans les deux sous-groupes montrant des réponses opposées en présence de 17- β -estradiol (groupe 2 et 3). La désensibilisation augmentée des récepteurs pourrait expliquer l'absence d'inhibition de l'activité adénylate cyclase en présence de mélatonine mais également en présence de 17- β -estradiol. Ainsi, pour aborder l'effet potentiel des estrogènes dans la désensibilisation de la voie de signalisation de la mélatonine il serait intéressant d'exposer des cellules provenant des patients SIA et de sujets témoins à la mélatonine en présence de l'E₂ (17- β -estradiol) et d'explorer la cascade classique adénylate cyclase, AMPC et PKA. Il faudrait explorer le phénomène de désensibilisation hétérologue et homologue car il est fort probable que les estrogènes exercent un effet de désensibilisation hétérologue qui serait additionnelle à la désensibilisation homologue des récepteurs à la mélatonine (MT1 et MT2) déjà connue dans la littérature. Le phénomène de translocation de la PKC à la membrane sera également étudié car cette enzyme est également impliquée dans la phosphorylation des récepteurs couplés aux protéines G.

D'autre part, les phytoestrogènes, ayant des propriétés semblables aux hormones naturelles, pourraient influencer le développement de la scoliose comme nos expériences semblent l'envisager chez les patients du groupe 1 (Cos *et al.*, 2003). En effet, le 17- β -estradiol semble avoir un effet positif sur le rétablissement de la voie de signalisation de la mélatonine défaillante dans les ostéoblastes des patients SIA de ce groupe. Dans ce but, nous sommes en train de mettre en place une étude clinique qui évaluera le potentiel

des suppléments en phytoestrogènes sur la maturation osseuse (radiologie), la densité minérale osseuse, l'état hormonal (dosages plasmatiques), de la croissance pubertaire, la réponse aux estrogènes (test *in vitro* de l'activité de créatine kinase, et test de l'AMP cyclique) et l'évolution (progression) de la déformation rachidienne.

Impact potentiels au niveau clinique et fondamental

Une meilleure compréhension concernant le mécanisme par lequel les estrogènes contribuent à réguler la voie de signalisation de la mélatonine et leurs fonctions pendant le développement et la croissance du rachis devrait fournir des informations essentielles sur les causes du développement et/ou de la progression de la SIA. L'élucidation de ces mécanismes permettra d'identifier et de valider de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la SIA. L'étude proposée permettra d'explorer plus directement le rôle des estrogènes dans le mécanisme pathogénique sous-jacent la formation des déformations scoliotiques dans la SIA.

CHAPITRE 7. RÉFÉRENCES

Acevedo, ML, Kraus, WL (2004). Transcriptional activation by nuclear receptors. *Essays Biochem* **40**: 73-88.

Akhtar, S, Davies, JR, Caterson, B (2005). Ultrastructural localization and distribution of proteoglycan in normal and scoliotic lumbar disc. *Spine* **30**: 1303-9.

Akhter, MP, Fan, Z, Rho, JY (2004). Bone intrinsic material properties in three inbred mouse strains. *Calcif Tissue Int* **75**: 416-20.

Alden, KJ, Marosy, B, Nzegwu, N, Justice, CM, Wilson, AF, Miller, NH (2006). Idiopathic scoliosis: identification of candidate regions on chromosome 19p13. *Spine* **31**: 1815-9.

Andersen, MO, Thomsen, K, Kyvik, KO (2007). Adolescent idiopathic scoliosis in twins: a population-based survey. *Spine* **32**: 927-30.

Aronica, SM, Katzenellenbogen, BS (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol Endocrinol* **7**: 743-52.

Aronica, SM, Kraus, WL, Katzenellenbogen, BS (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8517-21.

Augereau, P, Badia, E, Balaguer, P, Carascossa, S, Castet, A, Jalaguier, S, Cavailles, V (2006). Negative regulation of hormone signaling by RIP140. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**: 51-9.

Baillie, GS, Sood, A, McPhee, I, Gall, I, Perry, SJ, Lefkowitz, RJ, Houslay, MD (2003). beta-Arrestin-mediated PDE4 cAMP phosphodiesterase recruitment regulates beta-adrenoceptor switching from Gs to Gi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 940-5.

Balasz, J (2003). Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum Reprod Update* **9**: 207-22.

Baler, R, Coon, S, Klein, DC (1996). Orphan nuclear receptor RZRbeta: cyclic AMP regulates expression in the pineal gland. *Biochem Biophys Res Commun* **220**: 975-8.

Barrett, P, Conway, S, Morgan, PJ (2003). Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J Pineal Res* **35**: 221-30.

Becker-Andre, M, Wiesenberg, I, Schaeren-Wiemers, N, Andre, E, Missbach, M, Saurat, JH, Carlberg, C (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* **269**: 28531-4.

Benitez-King, G, Anton-Tay, F (1993a). Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* **49**: 635-41.

Benitez-King, G, Huerto-Delgadillo, L, Anton-Tay, F (1993b). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci* **53**: 201-7.

Benitez-King, G, Huerto-Delgadillo, L, Anton-Tay, F (1990). Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J Pineal Res* **9**: 209-20.

Benitez-King, G, Huerto-Delgadillo, L, Anton-Tay, F (1991). Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res* **557**: 289-92.

- Benitez-King, G, Rios, A, Martinez, A, Anton-Tay, F (1996). In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* **1290**: 191-6.
- Blumsohn, A, Hannon, RA, Wrate, R, Barton, J, al-Dehaimi, AW, Colwell, A, Eastell, R (1994). Biochemical markers of bone turnover in girls during puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* **40**: 663-70.
- Boudreau, M, Courtenay, SC, MacLatchy, DL, Berube, CH, Parrott, JL, Van der Kraak, GJ (2004). Utility of morphological abnormalities during early-life development of the estuarine mummichog, *Fundulus heteroclitus*, as an indicator of estrogenic and antiestrogenic endocrine disruption. *Environ Toxicol Chem* **23**: 415-25.
- Bouhoute, A, Leclercq, G (1995). Modulation of estradiol and DNA binding to estrogen receptor upon association with calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* **208**: 748-55.
- Bredoux, R, Corvazier, E, Dally, S, Chaabane, C, Bobe, R, Raies, A, Moreau, A, Enouf, J (2006). Human platelet Ca²⁺-ATPases: new markers of cell differentiation as illustrated in idiopathic scoliosis. *Platelets* **17**: 421-33.
- Brodner, W, Krepler, P, Nicolakis, M, Langer, M, Kaider, A, Lack, W, Waldhauser, F (2000). Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br* **82**: 399-403.
- 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**: 2025-38.
- Bunone, G, Briand, PA, Miksicek, RJ, Picard, D (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *Embo J* **15**: 2174-83.

Burwell, RG (2003). Aetiology of idiopathic scoliosis: current concepts. *Pediatr Rehabil* **6**: 137-70.

Cadogan, J, Blumsohn, A, Barker, ME, Eastell, R (1998). A longitudinal study of bone gain in pubertal girls: anthropometric and biochemical correlates. *J Bone Miner Res* **13**: 1602-12.

Cardinali, DP, Ladizesky, MG, Boggio, V, Cutrera, RA, Mautalen, C (2003). Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res* **34**: 81-7.

Carmeci, C, Thompson, DA, Ring, HZ, Francke, U, Weigel, RJ (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* **45**: 607-17.

Carr, AJ (1990). Adolescent idiopathic scoliosis in identical twins. *J Bone Joint Surg Br* **72**: 1077.

Carrillo-Vico, A, Calvo, JR, Abreu, P, Lardone, PJ, Garcia-Maurino, S, Reiter, RJ, Guerrero, JM (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *Faseb J* **18**: 537-9.

Castano, E, Vorobjikina, DP, Notides, AC (1997). Phosphorylation of serine-167 on the human oestrogen receptor is important for oestrogen response element binding and transcriptional activation. *Biochem J* **326 (Pt 1)**: 149-57.

Castoria, G, Migliaccio, A, Nola, E, Auricchio, F (1988). In vitro interaction of estradiol receptor with Ca²⁺-calmodulin. *Mol Endocrinol* **2**: 167-74.

- Chan, AS, Lai, FP, Lo, RK, Voyno-Yasenetskaya, TA, Stanbridge, EJ, Wong, YH (2002a). Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins. *Cell Signal* **14**: 249-57.
- Chan, V, Fong, GC, Luk, KD, Yip, B, Lee, MK, Wong, MS, Lu, DD, Chan, TK (2002b). A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet* **71**: 401-6.
- Chen, C, Kalu, DN (1999a). Strain differences in bone density and calcium metabolism between C3H/HeJ and C57BL/6J mice. *Bone* **25**: 413-20.
- Chen, CK, Inglese, J, Lefkowitz, RJ, Hurley, JB (1995). Ca(2+)-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *J Biol Chem* **270**: 18060-6.
- Chen, D, Ma, H, Hong, H, Koh, SS, Huang, SM, Schurter, BT, Aswad, DW, Stallcup, MR (1999b). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**: 2174-7.
- Chen, D, Pace, PE, Coombes, RC, Ali, S (1999c). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol* **19**: 1002-15.
- Cheng, JC, Guo, X, Sher, AH (1999). Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A longitudinal follow up study. *Spine* **24**: 1218-22.
- Cheng, X, Cole, RN, Zaia, J, Hart, GW (2000). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry* **39**: 11609-20.
- Cheng, X, Hart, GW (2001). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem* **276**: 10570-5.

Cheung, KM, Wang, T, Poon, AM, Carl, A, Tranmer, B, Hu, Y, Luk, KD, Leong, JC (2005). The effect of pinealectomy on scoliosis development in young nonhuman primates. *Spine* **30**: 2009-13.

Cheung, WY (1980). Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* **207**: 19-27.

Chien, PY, Ito, M, Park, Y, Tagami, T, Gehm, BD, Jameson, JL (1999). A fusion protein of the estrogen receptor (ER) and nuclear receptor corepressor (NCoR) strongly inhibits estrogen-dependent responses in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **13**: 2122-36.

Claustrat, B, Brun, J, Chazot, G (2005). The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Med Rev* **9**: 11-24.

Coleman, KM, Lam, V, Jaber, BM, Lanz, RB, Smith, CL (2004). SRA coactivation of estrogen receptor-alpha is phosphorylation-independent, and enhances 4-hydroxytamoxifen agonist activity. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 332-8.

Conway, S, Canning, SJ, Barrett, P, Guardiola-Lemaitre, B, Delagrangé, P, Morgan, PJ (1997). The roles of valine 208 and histidine 211 in ligand binding and receptor function of the ovine Mel1a beta melatonin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **239**: 418-23.

Conway, S, Drew, JE, Mowat, ES, Barrett, P, Delagrangé, P, Morgan, PJ (2000). Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor. *J Biol Chem* **275**: 20602-9.

Cos, P, De Bruyne, T, Apers, S, Vanden Berghe, D, Pieters, L, Vlietinck, AJ (2003). Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* **69**: 589-99.

Cos, S, Fernandez, R, Guezmes, A, Sanchez-Barcelo, EJ (1998). Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* **58**: 4383-90.

Cos, S, Sanchez-Barcelo, EJ (2000a). Melatonin and mammary pathological growth. *Front Neuroendocrinol* **21**: 133-70.

Cos, S, Sanchez-Barcelo, EJ (2000b). Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* **15**: 637-47.

Cowell, HR, Hall, JN, MacEwen, GD (1972). Genetic aspects of idiopathic scoliosis. A Nicholas Andry Award essay, 1970. *Clin Orthop Relat Res* **86**: 121-31.

Crouch, MF (1991). Growth factor-induced cell division is paralleled by translocation of Gi alpha to the nucleus. *Faseb J* **5**: 200-6.

Crouch, MF, Simson, L (1997). The G-protein G(i) regulates mitosis but not DNA synthesis in growth factor-activated fibroblasts: a role for the nuclear translocation of G(i). *Faseb J* **11**: 189-98.

Cruickshank, JL, Koike, M, Dickson, RA (1989). Curve patterns in idiopathic scoliosis. A clinical and radiographic study. *J Bone Joint Surg Br* **71**: 259-63.

Cui, Y, Niu, A, Pestell, R, Kumar, R, Curran, EM, Liu, Y, Fuqua, SA (2006). Metastasis-associated protein 2 is a repressor of estrogen receptor alpha whose overexpression leads to estrogen-independent growth of human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **20**: 2020-35.

Daaka, Y, Luttrell, LM, Lefkowitz, RJ (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**: 88-91.

Dai, J, Inscho, EW, Yuan, L, Hill, SM (2002). Modulation of intracellular calcium and calmodulin by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *J Pineal Res* **32**: 112-9.

Deacon, P, Berkin, CR, Dickson, RA (1985). Combined idiopathic kyphosis and scoliosis. An analysis of the lateral spinal curvatures associated with Scheuermann's disease. *J Bone Joint Surg Br* **67**: 189-92.

Del Rio, B, García Pedrero, J, Martínez-Campa, C, Zuazua, P, Lazo, PS, Ramos, S (2004). Melatonin, an Endogenous-specific Inhibitor of Estrogen Receptor {alpha} via Calmodulin. *J Biol Chem* **279**: 38294-38302.

den Hollander, P, Rayala, SK, Coverley, D, Kumar, R (2006). Ciz1, a Novel DNA-binding coactivator of the estrogen receptor alpha, confers hypersensitivity to estrogen action. *Cancer Res* **66**: 11021-9.

Dickson, RA (1992). The etiology and pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Acta Orthop Belg* **58 Suppl 1**: 21-5.

Docquier, PL, Mousny, M, Jouret, M, Bastin, C, Rombouts, JJ (2004). Orthopaedic concerns in children with growth hormone therapy. *Acta Orthop Belg* **70**: 299-305.

Duance, VC, Crean, JK, Sims, TJ, Avery, N, Smith, S, Menage, J, Eisenstein, SM, Roberts, S (1998). Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis. *Spine* **23**: 2545-51.

Dubousset, J, Machida, M (2001). [Possible role of the pineal gland in the pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental and clinical studies]. *Bull Acad Natl Med* **185**: 593-602; discussion 602-4.

Dubousset, J, Queneau, P, Thillard, M (1983). Experimental scoliosis induced by pineal and diencephalic lesions in young chickens: Its relation with clinical findings. *Orthop Trans* **7**.

Eastell, R (2005). Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche. *J Endocrinol* **185**: 223-34.

Echene, B, Barneon, G, Pages, M, Caillens, JP, Guibal, C, Jarrousse, Y, Dimeglio, A, Pous, JG (1988). Skin elastic fiber pathology and idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop* **8**: 522-8.

Endoh, H, Sasaki, H, Maruyama, K, Takeyama, K, Waga, I, Shimizu, T, Kato, S, Kawashima, H (1997). Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 99-102.

Enmark, E, Pelto-Huikko, M, Grandien, K, Lagercrantz, S, Lagercrantz, J, Fried, G, Nordenskjold, M, Gustafsson, JA (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 4258-65.

Fernandes, I, Bastien, Y, Wai, T, Nygard, K, Lin, R, Cormier, O, Lee, HS, Eng, F, Bertos, NR, Pelletier, N, Mader, S, Han, VK, Yang, XJ, White, JH (2003). Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell* **11**: 139-50.

Filardo, E, Quinn, J, Pang, Y, Graeber, C, Shaw, S, Dong, J, Thomas, P (2007). Activation of the novel estrogen receptor, GPR30, at the plasma membrane. *Endocrinology*.

Ford, DM, Bagnall, KM, Clements, CA, McFadden, KD (1988). Muscle spindles in the paraspinal musculature of patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* **13**: 461-5.

Galien, R, Garcia, T (1997). Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF-kappaB site. *Nucleic Acids Res* **25**: 2424-9.

García Pedrero, J, Del Rio, B, Martínez-Campa, C, Muramatsu, M, Lazo, P, Ramos, S (2002). Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors. *Mol Endocrinol*. **16**: 947-60.

Gentilini, D, Busacca, M, Di Francesco, S, Vignali, M, Viganò, P, Di Blasio, AM (2007). PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod* **13**: 317-22.

Gerdin, MJ, Masana, MI, Dubocovich, ML (2004). Melatonin-mediated regulation of human MT(1) melatonin receptors expressed in mammalian cells. *Biochem Pharmacol* **67**: 2023-30.

Giguere, V, McBroom, LD, Flock, G (1995). Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol Cell Biol* **15**: 2517-26.

Gobeil, F, Fortier, A, Zhu, T, Bossolasco, M, Leduc, M, Grandbois, M, Heveker, N, Bkaily, G, Chemtob, S, Barbaz, D (2006). G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol* **84**: 287-97.

Godson, C, Reppert, SM (1997). The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* **138**: 397-404.

Goldbloom, R (1994). Screening for Idiopathic Adolescent Scoliosis. . *Canadian Task Force on the Periodic Health Examination. Canadian Guide to Clinical Preventive Health Care. Ottawa: Health Canada* p.346-354.

Green, CB, Besharse, JC (2004). Retinal circadian clocks and control of retinal physiology. *J Biol Rhythms* **19**: 91-102.

Green, S, Walter, P, Greene, G, Krust, A, Goffin, C, Jensen, E, Scrace, G, Waterfield, M, Chambon, P (1986a). Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* **24**: 77-83.

Green, S, Walter, P, Kumar, V, Krust, A, Bornert, JM, Argos, P, Chambon, P (1986b). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**: 134-9.

Greene, GL, Gilna, P, Waterfield, M, Baker, A, Hort, Y, Shine, J (1986). Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* **231**: 1150-4.

Greiner, EF, Kirfel, J, Greschik, H, Dorflinger, U, Becker, P, Mercep, A, Schule, R (1996). Functional analysis of retinoid Z receptor beta, a brain-specific nuclear orphan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10105-10.

Grivas, TB, Vasiliadis, E, Mouzakis, V, Mihas, C, Koufopoulos, G (2006). Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche in different geographic latitudes. *Scoliosis* **1**: 9.

Gubitz, AK, Reppert, SM (2000). Chimeric and point-mutated receptors reveal that a single glycine residue in transmembrane domain 6 is critical for high affinity melatonin binding. *Endocrinology* **141**: 1236-44.

Hadley-Miller, N, Mims, B, Milewicz, DM (1994). The potential role of the elastic fiber system in adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* **76**: 1193-206.

Hay, E, Lemonnier, J, Modrowski, D, Lomri, A, Lasmoles, F, Marie, PJ (2000). N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Physiol* **183**: 117-28.

Hazlerigg, DG, Gonzalez-Brito, A, Lawson, W, Hastings, MH, Morgan, PJ (1993). Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in pars tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* **132**: 285-92.

Hazlerigg, DG, Thompson, M, Hastings, MH, Morgan, PJ (1996). 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* **137**: 210-8.

He, YW, Deftos, ML, Ojala, EW, Bevan, MJ (1998). RORgamma t, a novel isoform of an orphan receptor, negatively regulates Fas ligand expression and IL-2 production in T cells. *Immunity* **9**: 797-806.

Hirose, T, Smith, RJ, Jetten, AM (1994). ROR gamma: the third member of ROR/RZR orphan receptor subfamily that is highly expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **205**: 1976-83.

Ho, MK, Yung, LY, Chan, JS, Chan, JH, Wong, CS, Wong, YH (2001). Galpha(14) links a variety of G(i)- and G(s)-coupled receptors to the stimulation of phospholipase C. *Br J Pharmacol* **132**: 1431-40.

Horowitz, MC (1993). Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* **260**: 626-7.

Hosey, MM, Benovic, JL, DebBurman, SK, Richardson, RM (1995). Multiple mechanisms involving protein phosphorylation are linked to desensitization of muscarinic receptors. *Life Sci* **56**: 951-5.

Huang, H, Wang, H, Sinz, M, Zoekler, M, Staudinger, J, Redinbo, MR, Teotico, DG, Locker, J, Kalpana, GV, Mani, S (2007). Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketoconazole. *Oncogene* **26**: 258-68.

Hueter, C (1862). Anatomische studien an den Extramitaetengelenken Neugeborener en Erwachsener. *Virkows Archiv Path AnatPhysiol* **25**: 572-599.

Improta-Brears, T, Whorton, AR, Codazzi, F, York, JD, Meyer, T, McDonnell, DP (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4686-91.

Inaba, M, Hamada, N, Morii, H, Nishizawa, Y, Yamakawa, J, Ohno, M, Tsuda, S, No, J, Kanayama, Y, Saitoh, H, et al. (1984). Tissue calmodulin levels in normal and Graves' thyroids. *Endocrinol Jpn* **31**: 711-7.

Inoue, M, Minami, S, Nakata, Y, Kitahara, H, Otsuka, Y, Isobe, K, Takaso, M, Tokunaga, M, Nishikawa, S, Maruta, T, Moriya, H (2002). Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis. *Spine* **27**: 2357-62.

Ivanova, TN, Iuvone, PM (2003). Melatonin synthesis in retina: circadian regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase activity in cultured photoreceptor cells of embryonic chicken retina. *Brain Res* **973**: 56-63.

Iwamuro, S, Sakakibara, M, Terao, M, Ozawa, A, Kurobe, C, Shigeura, T, Kato, M, Kikuyama, S (2003). Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* **133**: 189-98.

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**: 1054-60.

Johansson, L, Thomsen, JS, Damdimopoulos, AE, Spyrou, G, Gustafsson, JA, Treuter, E (1999). The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem* **274**: 345-53.

Jones, MP, Melan, MA, Witt-Enderby, PA (2000). Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner. *Cancer Lett* **151**: 133-43.

Justice, CM, Miller, NH, Marosy, B, Zhang, J, Wilson, AF (2003). Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* **28**: 589-94.

Kallal, L, Gagnon, AW, Penn, RB, Benovic, JL (1998). Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **273**: 322-8.

Kaziro, Y, Itoh, H, Kozasa, T, Nakafuku, M, Satoh, T (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem* **60**: 349-400.

Kesley, J (1982). *Epidemiology of Musculoskeletal Disorders*. . New York: Oxford University Press.

Kesling, KL, Reinker, KA (1997). Scoliosis in twins. A meta-analysis of the literature and report of six cases. *Spine* **22**: 2009-14; discussion 2015.

- Kiefer, T, Ram, PT, Yuan, L, Hill, SM (2002). Melatonin inhibits estrogen receptor transactivation and cAMP levels in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **71**: 37-45.
- Kindsfater, K, Lowe, T, Lawellin, D, Weinstein, D, Akmakjian, J (1994). Levels of platelet calmodulin for the prediction of progression and severity of adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* **76**: 1186-92.
- Klee, CB (1991). Concerted regulation of protein phosphorylation and dephosphorylation by calmodulin. *Neurochem Res* **16**: 1059-65.
- Krupnick, JG, Benovic, JL (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289-319.
- Kusec, V, Viridi, AS, Prince, R, Triffitt, JT (1998). Localization of estrogen receptor-alpha in human and rabbit skeletal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 2421-8.
- Labhart, P, Karmakar, S, Salicru, EM, Egan, BS, Alexiadis, V, O'Malley, BW, Smith, CL (2005). Identification of target genes in breast cancer cells directly regulated by the SRC-3/AIB1 coactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1339-44.
- Laherty, CD, Billin, AN, Lavinsky, RM, Yochum, GS, Bush, AC, Sun, JM, Mullen, TM, Davie, JR, Rose, DW, Glass, CK, Rosenfeld, MG, Ayer, DE, Eisenman, RN (1998). SAP30, a component of the mSin3 corepressor complex involved in N-CoR-mediated repression by specific transcription factors. *Mol Cell* **2**: 33-42.
- Lahooti, H, Thorsen, T, Aakvaag, A (1998). Modulation of mouse estrogen receptor transcription activity by protein kinase C delta. *J Mol Endocrinol* **20**: 245-59.
- Le Mellay, V, Grosse, B, Lieberherr, M (1997). Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *J Biol Chem* **272**: 11902-7.

Lee, H, Bai, W (2002). Regulation of estrogen receptor nuclear export by ligand-induced and p38-mediated receptor phosphorylation. *Mol Cell Biol* **22**: 5835-45.

Lee, YC, Wolff, J (1984). The calmodulin-binding domain on microtubule-associated protein 2. *J Biol Chem* **259**: 8041-4.

Lefkowitz, RJ, Pierce, KL, Luttrell, LM (2002). Dancing with different partners: protein kinase a phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Mol Pharmacol* **62**: 971-4.

Letellier, K, Azeddine, B, Blain, S, Turgeon, I, Wang, DS, Samba Boiro, M, Moldovan, F, Labelle, H, Poitras, B, Rivard, CH, Grimard, G, Parent, S, Ouellet, J, Lacroix, G, Moreau, A (2007). Récents progrès dans l'étiopathogénèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent et nouveaux concepts moléculaires. *Médecine/Sciences*.

Levoye, A, Dam, J, Ayoub, MA, Guillaume, JL, Couturier, C, Delagrangé, P, Jockers, R (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *Embo J* **25**: 3012-23.

Li, L, Li, Z, Howley, PM, Sacks, DB (2006). E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability. *J Biol Chem* **281**: 1978-85.

Likhite, VS, Stossi, F, Kim, K, Katzenellenbogen, BS, Katzenellenbogen, JA (2006). Kinase-specific phosphorylation of the estrogen receptor changes receptor interactions with ligand, deoxyribonucleic acid, and coregulators associated with alterations in estrogen and tamoxifen activity. *Mol Endocrinol* **20**: 3120-32.

Lindsay, R, Hart, DM, Aitken, JM, MacDonald, EB, Anderson, JB, Clarke, AC (1976). Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. Evidence for an increased bone mass after delayed onset of oestrogen treatment. *Lancet* **1**: 1038-41.

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.

Lonstein, J (1989). Adolescent idiopathic scoliosis : screening and diagnosis. . *Instructional Course Lectures for the American Academy of Orthopaedic Surgeons. Ann Arbor (Mich) : JW Edwards*: p. 105-113.

Lotufo, CM, Lopes, C, Dubocovich, ML, Farsky, SH, Markus, RP (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* **430**: 351-7.

Lowe, T, Lawellin, D, Smith, D, Price, C, Haher, T, Merola, A, O'Brien, M (2002). Platelet calmodulin levels in adolescent idiopathic scoliosis: do the levels correlate with curve progression and severity? *Spine* **27**: 768-75.

Lowe, TG, Edgar, M, Margulies, JY, Miller, NH, Raso, VJ, Reinker, KA, Rivard, CH (2000). Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* **82-A**: 1157-68.

Macchi, MM, Bruce, JN (2004). Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* **25**: 177-95.

Machida, M, Dubousset, J, Imamura, Y, Iwaya, T, Yamada, T, Kimura, J (1993). An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Spine* **18**: 1609-15.

Machida, M, Dubousset, J, Yamada, T, Kimura, J, Saito, M, Shiraishi, T, Yamagishi, M (2006). Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy. *J Pineal Res* **41**: 1-7.

Machida, M, Murai, I, Miyashita, Y, Dubousset, J, Yamada, T, Kimura, J (1999). Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats. *Spine* **24**: 1985-9.

MacKenzie, RS, Melan, MA, Passey, DK, Witt-Enderby, PA (2002). Dual coupling of MT(1) and MT(2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. *Biochem Pharmacol* **63**: 587-95.

Mamontova, A, Seguret-Mace, S, Esposito, B, Chaniale, C, Bouly, M, Delhaye-Bouchaud, N, Luc, G, Staels, B, Duverger, N, Mariani, J, Tedgui, A (1998). Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circulation* **98**: 2738-43.

Mannion, AF, Meier, M, Grob, D, Muntener, M (1998). Paraspinal muscle fibre type alterations associated with scoliosis: an old problem revisited with new evidence. *Eur Spine J* **7**: 289-93.

Masana, MI, Dubocovich, ML (2001). Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci STKE* **2001**: PE39.

Masana, MI, Soares, JM, Jr., Dubocovich, ML (2005). 17Beta-estradiol modulates hMT1 melatonin receptor function. *Neuroendocrinology* **81**: 87-95.

Masuihiro, Y, Mezaki, Y, Sakari, M, Takeyama, K, Yoshida, T, Inoue, K, Yanagisawa, J, Hanazawa, S, O'Malley B, W, Kato, S (2005). Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8126-31.

Matysiak-Scholze, U, Nehls, M (1997). The structural integrity of ROR alpha isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR alpha1 and ROR alpha4. *Genomics* **43**: 78-84.

McNulty, S, Ross, AW, Barrett, P, Hastings, MH, Morgan, PJ (1994). Melatonin regulates the phosphorylation of CREB in ovine pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* **6**: 523-32.

Mediavilla, MD, Guezmez, A, Ramos, S, Kothari, L, Garijo, F, Sanchez Barcelo, EJ (1997). Effects of melatonin on mammary gland lesions in transgenic mice overexpressing N-ras proto-oncogene. *J Pineal Res* **22**: 86-94.

Meeking, DR, Wallace, JD, Cuneo, RC, Forsling, M, Russell-Jones, DL (1999). Exercise-induced GH secretion is enhanced by the oral ingestion of melatonin in healthy adult male subjects. *Eur J Endocrinol* **141**: 22-6.

Migliaccio, A, Di Domenico, M, Castoria, G, de Falco, A, Bontempo, P, Nola, E, Auricchio, F (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J* **15**: 1292-300.

Migliaccio, S, Newbold, RR, McLachlan, JA, Korach, KS (1995). Alterations in estrogen levels during development affects the skeleton: use of an animal model. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 7**: 95-7.

Miller, NH (2002). Genetics of familial idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res*: 60-4.

Miller, NH, Justice, CM, Marosy, B, Doheny, KF, Pugh, E, Zhang, J, Dietz, HC, 3rd, Wilson, AF (2005). Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis. *Spine* **30**: 1181-7.

Misol, S, Ponseti, IV, Samaan, N, Bradbury, JT (1971). Growth hormone blood levels in patients with idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* **81**: 122-5.

Missbach, M, Jagher, B, Sigg, I, Nayeri, S, Carlberg, C, Wiesenberg, I (1996). Thiazolidine diones, specific ligands of the nuclear receptor retinoid Z receptor/retinoid acid receptor-related orphan receptor alpha with potent antiarthritic activity. *J Biol Chem* **271**: 13515-22.

Molis, TM, Spriggs, LL, Hill, SM (1994). Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* **8**: 1681-90.

Molis, TM, Spriggs, LL, Jupiter, Y, Hill, SM (1995). Melatonin modulation of estrogen-regulated proteins, growth factors, and proto-oncogenes in human breast cancer. *J Pineal Res* **18**: 93-103.

Morcuende, JA, Minhas, R, Dolan, L, Stevens, J, Beck, J, Wang, K, Weinstein, SL, Sheffield, V (2003). Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* **28**: 2025-8; discussion 2029.

Moreau, A, Wang, DS, Forget, S, Azeddine, B, Angeloni, D, Frascini, F, Labelle, H, Poitras, B, Rivard, CH, Grimard, G (2004). Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* **29**: 1772-81.

Mseeh, F, Gerdin, MJ, Dubocovich, MI (2002). Identification of cysteines involved in ligand binding to the human melatonin MT(2) receptor. *Eur J Pharmacol* **449**: 29-38.

Muhlrad, A, Yarom, R (1982). Contractile protein studies on platelets from patients with idiopathic scoliosis. *Haemostasis* **11**: 154-60.

Mullock, BM, Bright, NA, Fearon, CW, Gray, SR, Luzio, JP (1998). Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* **140**: 591-601.

Murphy, LC, Weitsman, GE, Skliris, GP, Teh, EM, Li, L, Peng, B, Davie, JR, Ung, K, Niu, YL, Troup, S, Tomes, L, Watson, PH (2006). Potential role of estrogen receptor alpha (ERalpha) phosphorylated at Serine118 in human breast cancer in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**: 139-46.

Murray, DW, Bulstrode, CJ (1996). The development of adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* **5**: 251-7.

Nagy, L, Kao, HY, Chakravarti, D, Lin, RJ, Hassig, CA, Ayer, DE, Schreiber, SL, Evans, RM (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**: 373-80.

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**: 106-10.

Navajas, C, Kokkola, T, Poso, A, Honka, N, Gynther, J, Laitinen, JT (1996). A rhodopsin-based model for melatonin recognition at its G protein-coupled receptor. *Eur J Pharmacol* **304**: 173-83.

New, DC, Tsim, ST, Wong, YH (2003). G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction. *Neurosignals* **12**: 59-70.

Niles, LP, Hashemi, FS (1990). Pharmacological inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in rat brain by melatonin, its analogs, and diazepam. *Biochem Pharmacol* **40**: 2701-5.

Niles, LP, Ye, M, Pickering, DS, Ying, SW (1991). Pertussis toxin blocks melatonin-induced inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in the chick brain. *Biochem Biophys Res Commun* **178**: 786-92.

- Nilsson, LO, Boman, A, Savendahl, L, Grigelioniene, G, Ohlsson, C, Ritzen, EM, Wroblewski, J (1999). Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 370-3.
- Nissinen, M, Heliövaara, M, Seitsamo, J, Poussa, M (1993). Trunk asymmetry, posture, growth, and risk of scoliosis. A three-year follow-up of Finnish prepubertal school children. *Spine* **18**: 8-13.
- Norris, JD, Fan, D, Stallcup, MR, McDonnell, DP (1998). Enhancement of estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP-1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology. *J Biol Chem* **273**: 6679-88.
- Nosjean, O, Ferro, M, Coge, F, Beauverger, P, Henlin, JM, Lefoulon, F, Fauchere, JL, Delagrangé, P, Canet, E, Boutin, JA (2000). Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* **275**: 31311-7.
- Nosjean, O, Nicolas, JP, Klupsch, F, Delagrangé, P, Canet, E, Boutin, JA (2001). Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol* **61**: 1369-79.
- Obata, K, Nagata, K, Iwase, M, Odashima, M, Nagasaka, T, Izawa, H, Murohara, T, Yamada, Y, Yokota, M (2005). Overexpression of calmodulin induces cardiac hypertrophy by a calcineurin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 1299-305.
- Oegema, TR, Jr., Bradford, DS, Cooper, KM, Hunter, RE (1983). Comparison of the biochemistry of proteoglycans isolated from normal, idiopathic scoliotic and cerebral palsy spines. *Spine* **8**: 378-84.

Ogura, Y, Azuma, M, Tsuboi, Y, Kabe, Y, Yamaguchi, Y, Wada, T, Watanabe, H, Handa, H (2006). TFII-I down-regulates a subset of estrogen-responsive genes through its interaction with an initiator element and estrogen receptor alpha. *Genes Cells* **11**: 373-81.

Oldberg, A, Franzen, A, Heinegard, D, Pierschbacher, M, Ruoslahti, E (1988). Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* **263**: 19433-6.

Oyama, J, Murai, I, Kanazawa, K, Machida, M (2006). Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels. *J Pineal Res* **40**: 219-24.

Pace, P, Taylor, J, Suntharalingam, S, Coombes, RC, Ali, S (1997). Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* **272**: 25832-8.

Paech, K, Webb, P, Kuiper, GG, Nilsson, S, Gustafsson, J, Kushner, PJ, Scanlan, TS (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**: 1508-10.

Papaioannou, S, Tumber, AM, Meikle, MC, McDonald, F (1999). G-protein signalling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta* **1449**: 284-92.

Pedrini, VA, Ponseti, IV, Dohrman, SC (1973). Glycosaminoglycans of intervertebral disc in idiopathic scoliosis. *J Lab Clin Med* **82**: 938-50.

Perdriolle, R, Becchetti, S, Vidal, J, Lopez, P (1993). Mechanical process and growth cartilages. Essential factors in the progression of scoliosis. *Spine* **18**: 343-9.

- 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**: 633-9.
- Pintor, J, Martin, L, Pelaez, T, Hoyle, CH, Peral, A (2001). Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol* **416**: 251-4.
- Plant, A, Samuels, A, Perry, MJ, Colley, S, Gibson, R, Tobias, JH (2002). Estrogen-induced osteogenesis in mice is associated with the appearance of Cbfa1-expressing bone marrow cells. *J Cell Biochem* **84**: 285-94.
- Porter, RW (2000). Idiopathic scoliosis: the relation between the vertebral canal and the vertebral bodies. *Spine* **25**: 1360-6.
- Pronin, AN, Satpaev, DK, Slepak, VZ, Benovic, JL (1997). Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. *J Biol Chem* **272**: 18273-80.
- Pyeritz, RE, McKusick, VA (1979). The Marfan syndrome: diagnosis and management. *N Engl J Med* **300**: 772-7.
- Qi, C, Chang, J, Zhu, Y, Yeldandi, AV, Rao, SM, Zhu, YJ (2002). Identification of protein arginine methyltransferase 2 as a coactivator for estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* **277**: 28624-30.
- Raap, DK, DonCarlos, L, Garcia, F, Muma, NA, Wolf, WA, Battaglia, G, Van de Kar, LD (2000). Estrogen desensitizes 5-HT(1A) receptors and reduces levels of G(z), G(i1) and G(i3) proteins in the hypothalamus. *Neuropharmacology* **39**: 1823-32.

- Radio, NM, Doctor, JS, Witt-Enderby, PA (2006). Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. *J Pineal Res* **40**: 332-42.
- Rafii-El-Idrissi, M, Calvo, JR, Harmouch, A, Garcia-Maurino, S, Guerrero, JM (1998). Specific binding of melatonin by purified cell nuclei from spleen and thymus of the rat. *J Neuroimmunol* **86**: 190-7.
- Raisz, LG (1988). Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N Engl J Med* **318**: 818-28.
- Ram, PT, Dai, J, Yuan, L, Dong, C, Kiefer, TL, Lai, L, Hill, SM (2002). Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett* **179**: 141-50.
- Rato, AG, Pedrero, JG, Martinez, MA, del Rio, B, Lazo, PS, Ramos, S (1999). Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. *Faseb J* **13**: 857-68.
- Raum, K, Hofmann, T, Leguerney, I, Saied, A, Peyrin, F, Vico, L, Laugier, P (2007). Variations of microstructure, mineral density and tissue elasticity in B6/C3H mice. *Bone* **41**: 1017-24.
- Reiter, RJ (1980). The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* **1**: 109-31.
- Reiter, RJ, Tan, DX, Mayo, JC, Sainz, RM, Leon, J, Czarnocki, Z (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* **50**: 1129-46.

- Reppert, SM (1997). Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* **12**: 528-31.
- Riggs, BL, Khosla, S, Melton, LJ, 3rd (2002). Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* **23**: 279-302.
- Roaf, R (1966). The basic anatomy of scoliosis. *J Bone Joint Surg Br* **48**: 786-92.
- Rodan, GA (1995). Osteopontin overview. *Ann N Y Acad Sci* **760**: 1-5.
- 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**: 1014-24.
- 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**: 189-97.
- Roth, JA, Kim, BG, Lin, WL, Cho, MI (1999). Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* **274**: 22041-7.
- Sadat-Ali, M, al-Habdan, I, al-Othman, A (2000). Adolescent idiopathic scoliosis. Is low melatonin a cause? *Joint Bone Spine* **67**: 62-4.
- Salehi, LB, Mangino, M, De Serio, S, De Cicco, D, Capon, F, Semprini, S, Pizzuti, A, Novelli, G, Dallapiccola, B (2002). Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet* **111**: 401-4.
- Salter, RS, Krinks, MH, Klee, CB, Neer, EJ (1981). Calmodulin activates the isolated catalytic unit of brain adenylate cyclase. *J Biol Chem* **256**: 9830-3.

Schrader, M, Danielsson, C, Wiesenberg, I, Carlberg, C (1996). Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers. *J Biol Chem* **271**: 19732-6.

Seval, Y, Cakmak, H, Kayisli, UA, Arici, A (2006). Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 2349-57.

Sharma, RK, Wang, JH (1986). Regulation of cAMP concentration by calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Cell Biol* **64**: 1072-80.

Simpson, E, Rubin, G, Clyne, C, Robertson, K, O'Donnell, L, Jones, M, Davis, S (2000). The role of local estrogen biosynthesis in males and females. *Trends Endocrinol Metab* **11**: 184-8.

Smirnov, AN (2001). Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* **66**: 19-26.

Smith, RM, Pool, RD, Butt, WP, Dickson, RA (1991). The transverse plane deformity of structural scoliosis. *Spine* **16**: 1126-9.

Somerville, EW (1952). Rotational lordosis; the development of single curve. *J Bone Joint Surg Br* **34-B**: 421-7.

Spencer, GS, Eccles, MJ (1976a). Spinal muscle in scoliosis. Part 2. The proportion and size of type 1 and type 2 skeletal muscle fibres measured using a computer-controlled microscope. *J Neurol Sci* **30**: 143-54.

Spencer, GS, Zorab, PA (1976b). Spinal muscle in scoliosis. Part 1. Histology and histochemistry. *J Neurol Sci* **30**: 137-42.

Stokes, IA, Aronsson, DD, Spence, H, Iatridis, JC (1998). Mechanical modulation of intervertebral disc thickness in growing rat tails. *J Spinal Disord* **11**: 261-5.

Stokes, IA, Spence, H, Aronsson, DD, Kilmer, N (1996). Mechanical modulation of vertebral body growth. Implications for scoliosis progression. *Spine* **21**: 1162-7.

Strewler, GJ (2001). Local and systemic control of the osteoblast. *J Clin Invest* **107**: 271-2.

Sunahara, RK, Dessauer, CW, Gilman, AG (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**: 461-80.

Tan, DX, Manchester, LC, Hardeland, R, Lopez-Burillo, S, Mayo, JC, Sainz, RM, Reiter, RJ (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J Pineal Res* **34**: 75-8.

Tang, NL, Yeung, HY, Lee, KM, Hung, VW, Cheung, CS, Ng, BK, Kwok, R, Guo, X, Qin, L, Cheng, JC (2006). A relook into the association of the estrogen receptor [alpha] gene (PvuII, XbaI) and adolescent idiopathic scoliosis: a study of 540 Chinese cases. *Spine* **31**: 2463-8.

Thomas, P, Pang, Y, Filardo, EJ, Dong, J (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* **146**: 624-32.

Tintut, Y, Parhami, F, Le, V, Karsenty, G, Demer, LL (1999). Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. Ubiquitin/proteasome-dependent regulation. *J Biol Chem* **274**: 28875-9.

Tobias, JH, Compston, JE (1999). Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women? *Bone* **24**: 121-4.

- Tzeng, DZ, Klinge, CM (1996). Phosphorylation of purified estradiol-liganded estrogen receptor by casein kinase II increases estrogen response element binding but does not alter ligand stability. *Biochem Biophys Res Commun* **223**: 554-60.
- Valcavi, R, Dieguez, C, Azzarito, C, Edwards, CA, Dotti, C, Page, MD, Portioli, I, Scanlon, MF (1987). Effect of oral administration of melatonin on GH responses to GRF 1-44 in normal subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* **26**: 453-8.
- Valcavi, R, Zini, M, Maestroni, GJ, Conti, A, Portioli, I (1993). Melatonin stimulates growth hormone secretion through pathways other than the growth hormone-releasing hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* **39**: 193-9.
- volkmann, R (1882). Verletzungen end Krankheiten des Bewegungsorgane, in von Pitha B (ed) : handbuch der allgemeine und speciellen chirurgie *Bd II Teil II Stuttgart, Germany, Ferdinand Enke*
- 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**: 964-72.
- von Gall, C, Stehle, JH, Weaver, DR (2002). Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res* **309**: 151-62.
- von Zastrow, M, Kobilka, BK (1992). Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem* **267**: 3530-8.
- Wang, S, Zhang, C, Nordeen, SK, Shapiro, DJ (2007). In vitro fluorescence anisotropy analysis of the interaction of full-length SRC1a with estrogen receptors alpha and beta

supports an active displacement model for coregulator utilization. *J Biol Chem* **282**: 2765-75.

Warren, MP, Brooks-Gunn, J, Hamilton, LH, Warren, LF, Hamilton, WG (1986). Scoliosis and fractures in young ballet dancers. Relation to delayed menarche and secondary amenorrhea. *N Engl J Med* **314**: 1348-53.

Watters, JJ, Campbell, JS, Cunningham, MJ, Krebs, EG, Dorsa, DM (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* **138**: 4030-3.

Weaver, CM, Peacock, M, Martin, BR, McCabe, GP, Zhao, J, Smith, DL, Wastney, ME (1997). Quantification of biochemical markers of bone turnover by kinetic measures of bone formation and resorption in young healthy females. *J Bone Miner Res* **12**: 1714-20.

Weigel, NL (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* **319** (Pt 3): 657-67.

Weise, M, De-Levi, S, Barnes, KM, Gafni, RI, Abad, V, Baron, J (2001). Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6871-6.

Wiesenberg, I, Missbach, M, Kahlen, JP, Schrader, M, Carlberg, C (1995). 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* **23**: 327-33.

Willard, FS, Crouch, MF (2000). Nuclear and cytoskeletal translocation and localization of heterotrimeric G-proteins. *Immunol Cell Biol* **78**: 387-94.

Willner, S, Johnson, B (1983). Thoracic kyphosis and lumbar lordosis during the growth period in children. *Acta Paediatr Scand* **72**: 873-8.

Wilson, ST, Blask, DE, Lemus-Wilson, AM (1992). Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **75**: 669-70.

Wise, CA, Barnes, R, Gillum, J, Herring, JA, Bowcock, AM, Lovett, M (2000). Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* **25**: 2372-80.

Witt-Enderby, PA, Bennett, J, Jarzynka, MJ, Firestine, S, Melan, MA (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* **72**: 2183-98.

Witt-Enderby, PA, Dubocovich, ML (1996). Characterization and regulation of the human ML1A melatonin receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* **50**: 166-74.

Witt-Enderby, PA, Masana, MI, Dubocovich, ML (1998). Physiological exposure to melatonin supersensitizes the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent signal transduction cascade in Chinese hamster ovary cells expressing the human mtl melatonin receptor. *Endocrinology* **139**: 3064-71.

Worthington, V, Shambaugh, P (1991). Systemic abnormalities in idiopathic scoliosis. *J Manipulative Physiol Ther* **14**: 467-71.

Wynne-Davies, R (1968). Familial (idiopathic) scoliosis. A family survey. *J Bone Joint Surg Br* **50**: 24-30.

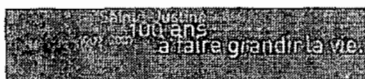
- Yamaguchi, A, Komori, T, Suda, T (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* **21**: 393-411.
- Yarom, R, Meyer, S, More, R, Robin, GC (1982). Metal impregnation abnormalities in platelets of patients with idiopathic scoliosis. *Haemostasis* **12**: 282-8.
- Yu, J, Fairbank, JC, Roberts, S, Urban, JP (2005). The elastic fiber network of the annulus fibrosus of the normal and scoliotic human intervertebral disc. *Spine* **30**: 1815-20.
- Yuan, L, Collins, AR, Dai, J, Dubocovich, ML, Hill, SM (2002). MT(1) melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **192**: 147-56.
- Zamah, AM, Delahunty, M, Luttrell, LM, Lefkowitz, RJ (2002). Protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system. *J Biol Chem* **277**: 31249-56.
- Zhang, H, Thomsen, JS, Johansson, L, Gustafsson, JA, Treuter, E (2000). DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem* **275**: 39855-9.
- Zhang, X, Krutchinsky, A, Fukuda, A, Chen, W, Yamamura, S, Chait, BT, Roeder, RG (2005). MED1/TRAP220 exists predominantly in a TRAP/ Mediator subpopulation enriched in RNA polymerase II and is required for ER-mediated transcription. *Mol Cell* **19**: 89-100.
- Zhou, G, Cummings, R, Li, Y, Mitra, S, Wilkinson, HA, Elbrecht, A, Hermes, JD, Schaeffer, JM, Smith, RG, Moller, DE (1998). Nuclear receptors have distinct affinities

for coactivators: characterization by fluorescence resonance energy transfer. *Mol Endocrinol* 12: 1594-604.

8 CHAPITRE 8 ANNEXES



» La scoliose est la déformation la plus fréquente en orthopédie pédiatrique. Elle survient principalement à l'adolescence affectant les filles en plus grand nombre et avec le plus de sévérité. Nos travaux ont mis en évidence un défaut dans la transmission du signal de l'hormone mélatonine chez des patients gravement atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA). Cette anomalie est causée par la phosphorylation de résidus sérine au niveau des protéines G inhibitrices (Gi) couplées aux récepteurs à mélatonine. Nous avons observé chez les patients SIA trois types de réponses anormales en présence de mélatonine ce qui suggère que ce défaut est attribuable à des gènes distincts en cause dans cette voie de signalisation. Cette découverte nous a permis de mettre au point un premier test de dépistage précoce à partir d'une simple prise de sang. Actuellement en cours de validation clinique au Canada, ce test devrait permettre l'identification des enfants porteurs au risque de développer une SIA.



La scoliose est la déformation la plus fréquente en orthopédie pédiatrique : elle se manifeste par une déformation structurale évolutive de la colonne vertébrale, de la cage thoracique et du bassin dans les trois plans de l'espace et dans le temps. Une large proportion soit 85 % des scolioses sont dites idiopathiques, cela signifie qu'on en ignore la cause ; les 15 % restants sont causées par des malformations congénitales, des maladies neuromusculaires ou associées à des pathologies osseuses ou à des pathologies des tissus conjonctifs. L'étiologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA), la forme la plus commune de scoliose, n'est pas claire bien que la SIA soit une maladie affectant un nombre important de jeunes adolescents (0,2-6 % de la population), touchant principalement les filles en nom-

Récents progrès dans l'étiopathogénie de la scoliose idiopathique de l'adolescent et nouveaux concepts moléculaires

Karen Letellier, Bouziane Azeddine, Sacha Blain, Isabelle Turgeon, Da Shen Wang, Mamadou Samba Boiro, Flărina Moldovan, Hubert Labelle, Benoît Poitras, Charles-Hilbire Rivard, Guy Grimard, Stefan Parent, Jean Ouellet, Ginette Lacroix, Alain Moreau



K. Letellier : Centre de recherche CHU Sainte-Justine, sous-centre de génétique moléculaire et de biologie cellulaire et tissulaire de maladies musculo-squelettiques, 3175, chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5 Canada
B. Azeddine, S. Blain, I. Turgeon, D.S. Wang, M. Samba Boiro, G. Lacroix : Centre de recherche CHU Sainte-Justine, Laboratoire de génétique moléculaire des troubles os-

musculo-squelettiques, 3175, chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec), H3T 1C5 Canada.
F. Moldovan : Département de stratiologie, faculté de médecine dentaire, Université de Montréal - Service d'orthopédie, CHU Sainte-Justine, Montréal, France.
H. Labelle, B. Poitras, J.P. Rivard, G. Grimard : Service d'orthopédie, CHU Sainte-Justine, Montréal ; Service d'orthopédie, Hôpital Shriners pour enfants de Montréal, Canada.
S. Parent : Service d'orthopédie, Hôpital Shriners pour enfants de Montréal, Canada.
J. Ouellet : Service d'orthopédie, Hôpital Shriners pour enfants de Montréal ; Service d'orthopédie Hôpital pour enfants de Montréal, Université McGill, Montréal, Canada.
A. Moreau : Centre de recherche CHU Sainte-Justine, Laboratoire de génétique moléculaire des maladies musculo-squelettiques, 3175, chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5 Canada. Département de stratiologie, faculté de médecine dentaire, Université de Montréal ; Département de biochimie, faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada.

REVUE
SYNTHÈSE



bre et avec le plus de sévérité. Outre la déformation du rachis, cette maladie peut avoir des conséquences importantes sur la santé des patients et affecter des fonctions d'équilibre, vestibulaire et proprioceptive, altérer le tonus musculaire et susciter l'apparition prématurée d'ostéoporose chez certaines patientes à l'âge adulte. De nos jours, on admet volontiers que la scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) est une maladie d'origine multifactorielle. En effet, des facteurs d'ordre génétique, neurologique, endocrinien, biomécanique, métabolique et autres peuvent intervenir tant dans le déclenchement que dans l'aggravation de cette maladie.

Facteurs étiologiques de la scoliose idiopathique

Plusieurs perspectives divergentes ont été présentées dans l'espoir de définir plus clairement l'étiologie de la SIA et d'expliquer les différentes perturbations associées à la déformation du rachis observée chez les patients SIA [1, 2]. Dans cette synthèse nous proposons un survol des différents facteurs considérés dans l'étiologie de la SIA et nous nous attarderons aux plus récents concepts moléculaires impliquant un défaut de signalisation de la mélatonine dans l'étiopathogénie de la SIA.

Facteurs génétiques

Des observations de vrais jumeaux atteints de scolioses ont été rapportées à de nombreuses reprises et montrent le développement de scoliose dans 73 % des cas pour les jumeaux identiques et 36 % des cas chez les jumeaux gémeaux [3, 4] confirmant la contribution de facteurs génétiques. Bien que la composante héréditaire puisse être présente dans certaines familles, on note que 85 % des scolioses idiopathiques constituent des cas sporadiques : elles surviennent dans des familles n'ayant aucun antécédent. Néanmoins, plusieurs études ont clairement mis en évidence que la SIA survient avec une fréquence plus élevée dans certaines familles [1]. Les travaux de Wynne-Davies [5] et de DeGeorge [6] ont permis de démontrer une incidence familiale suggérant un mode de transmission dominante et ont d'ailleurs établi une prévalence dans la transmission de la scoliose variant de 17 à 42 % chez les filles et de 7 à 29 % chez les garçons issus d'un parent atteint de SIA sans qu'il y ait une différence significative selon que la mère ou le père soit affecté d'une scoliose [5, 6]. La prédominance de la SIA chez les filles a conduit plusieurs groupes à examiner une possible transmission de la SIA via le chromosome X [7] ; d'autres groupes favorisent plutôt une transmission autosomale [8]. Les plus récentes données génétiques obtenues dans différentes populations ont mis en évidence un nombre croissant de loci de susceptibilité pour la SIA, contribuant ainsi à accroître la difficulté d'identifier un ou plusieurs gènes candidats responsables de cette maladie (Tableau 1). Certes ce décompte peut s'expliquer par le nombre limité de familles comprenant plusieurs cas de SIA recrutées à ce jour mais aussi on peut l'attribuer à l'absence de méthodes permettant de mieux classifier les patients scoliotiques. En effet, les analyses génétiques reposent sur le phénotype principal soit la courbure du rachis. Cependant, d'autres

paramètres cliniques, biochimiques ou métaboliques (endophénotypes) devraient être pris en compte afin de tirer profit des plus récentes études génétiques et de mieux définir l'étiopathogénèse de la SIA.

Éléments structuraux du rachis

La scoliose est un des signes cliniques qu'on retrouve dans plusieurs maladies affectant le tissu conjonctif (syndrome de Marfan, hyperlaxité articulaire d'Ehlers-Danlos, homocystinurie et ostéogénèse imparfaite) [9]. Des altérations du collagène seraient aussi reliées à des facteurs environnementaux notamment une insuffisance en cuivre déclenchant une scoliose, car le cuivre intervient dans la régulation de la lysiloxydase, co-facteur important du métabolisme du collagène [10]. Dans ce contexte, il n'est donc pas surprenant que les principaux éléments des structures vertébrales, soit le collagène et les protéoglycanes, aient été analysés dans l'espoir d'élucider la cause de la SIA [11, 12]. Ces différents changements de points de vue sont résumés au Tableau 1. En définitive, l'analyse des gènes codant pour ces différents composants a permis d'exclure la moindre implication de ces gènes dans l'étiopathogénèse de la scoliose [13, 14]. Conséquemment, les modifications observées dans la SIA seraient plutôt des événements secondaires associés à cette maladie : et ils se limiteraient seulement à l'aggravation des déformations.

Facteurs neurologiques et musculaires

Plusieurs preuves expérimentales relèvent des anomalies de fonctionnement des centres du contrôle postural situés dans le cerveau, qui priveraient la colonne vertébrale d'informations nécessaires à sa croissance régulière en hauteur [15]. La mauvaise intégration de ces informations dans le système nerveux central (SNC) ou encore dans le système nerveux périphérique pourrait expliquer la croissance asymétrique du rachis chez les enfants et adolescents atteints de SIA. En effet, la destruction de l'hypothalamus chez le rat par stéréotaxie électrique entraîne la formation d'une scoliose [16]. Une étude réalisée sur 150 sujets scoliotiques a montré que 79 % d'entre eux présentaient des anomalies de fonctionnement de l'équilibre orthostatique portant autant sur la proprioception que sur les réflexes oculomoteurs ; en comparaison, seulement 5 % des sujets témoins présentaient ces anomalies [17]. Le rôle de la musculature spinale dans la pathogénèse de la scoliose idiopathique a été également le sujet de nombreuses études, en particulier dans la distribution des différents

types de fibres associés à la déformation [18]. Mannion et al. ont montré chez 14 adolescentes scoliotiques qu'il y avait une proportion significativement plus faible de fibres de type I dans les muscles du

côté concave de la courbe scoliotique mais pas de différence du côté convexe [19].

Facteurs biochimiques

Les facteurs biochimiques en jeu dans l'étiopathogénie de la scoliose ont surtout été observés dans les plaquettes sanguines qui sont également des cellules présentant une activité contractile [20-22]. Une augmentation du calcium et du phosphore intracellulaire dans les plaquettes de patients SIA, ainsi qu'une diminution de l'activité de plusieurs protéines intracellulaires telles que les protéines contractiles et la myosine adénosine triphosphatase ont été observées [20]. L'augmentation des taux de calmoduline dans les plaquettes de patients SIA serait associée à la SIA et notamment à la progression de la courbure de la scoliose [21]. Plus récemment, les travaux provenant des équipes dirigées par les Drs Enouf à Paris et Moreau à Montréal ont mis en évidence un défaut dans la différenciation et dans la maturation des plaquettes sanguines des sujets atteints de SIA particulièrement en étudiant les profils d'expression de différents isoformes des ATPases calciques PMCA et SERCA. Cependant, les défauts observés dans les plaquettes représenteraient une indication des changements métaboliques survenant dans d'autres types cellulaires et dans les tissus tels que les muscles et les ostéoblastes plutôt qu'un événement primaire à l'origine de la SIA [20-22].

Facteurs neuroendocriniens

La piste neuroendocrinienne fondée sur l'hypothèse qu'une carence en mélatonine serait à la source de la SIA a suscité beaucoup d'intérêt et de controverses. Cette hypothèse découle du fait que l'ablation de la glande pinéale chez le poulet ou le rat maintenu dans un mode bipède, produit une scoliose similaire en plusieurs points à la maladie humaine [15]. Plus récemment, des résultats identiques ont été obtenus chez des

Facteurs neurologiques et musculaires	
Système nerveux central	Destruction de l'hypothalamus Anomalies de proprioceptions
Musculature spinale	Distribution différentes des fibres
Facteurs biochimiques	
Plaquettes sanguines	Calcium et phosphore intracellulaire élevé Taux augmenté de calmoduline
Protéines structurales	
Fibrilline	Désorganisation des fibres
Collagène / Protéoglycane	Dégénération du collagène Accumulation d'agrégats de protéoglycane
Collagène	Altération de la composition des protéoglycane Facteur non confirmé Réduction des liaisons des fibres de collagène
Fibres élastiques	Changements de morphologie d'isoforme
Facteurs endocriniens	
Mélatonine	Déficience en mélatonine Déficience en mélatonine Pas de variation significative Variants alléliques du récepteur de la mélatonine 1A: pas de corrélation avec le phénotype Défaut de la voie de signalisation de la mélatonine

Tableau 1. Facteurs étiologiques de la SIA.



souris bipèdes et quadrupèdes de souche C57Bl/6 (souris dont la voie de synthèse de la mélatonine est diminuée à la suite d'une mutation) [23]. En effet, la mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est une neurohormone principalement synthétisée par la glande pinéale selon un rythme circadien; elle est sécrétée dans la circulation où elle agit sur des tissus cibles [24]. La mélatonine est synthétisée également par d'autres cellules notamment les lymphocytes et les plaquettes et régule plusieurs activités physiologiques notamment l'horloge biologique (cycle circadien), le système nerveux et immunitaire de même que le métabolisme osseux. L'injection de doses quotidiennes de mélatonine exagène chez les animaux pinéalectomisés prévient la formation d'une scoliose [23]. La pertinence biologique de la mélatonine dans la SIA est cependant controversée puisque la plupart des études n'ont pu mettre en évidence une diminution significative du taux de mélatonine circulante chez les patients SIA. En outre, ni l'ablation de la glande pinéale par des traitements de radiothérapie chez les enfants atteints d'un cancer rare de la glande pinéale ne conduit au développement d'une scoliose: ces faits vont à l'encontre de l'hypothèse d'une carence en mélatonine comme facteur étiologique de la SIA. Voilà pourquoi nous avons été conduits à

vait compter parmi ses facteurs de déclenchement un défaut de signalisation de la mélatonine dans la cellule

Signalisation de la mélatonine et SIA

La mélatonine exerce ses effets par le biais de récepteurs spécifiques de haute affinité. Ces récepteurs de la mélatonine sont couplés à des petites protéines appelées protéines G inhibitrices ou Gi (guanine nucleotide-binding protein) et leur activation conduit à une inhibition des adénylates cyclases, enzymes responsables de la synthèse d'AMPc. Par clonage moléculaire, trois sous-types de récepteurs mélatoninergiques couplés aux protéines G ont été identifiés chez les vertébrés [25]. Les propriétés de liaison au ligand, ainsi que les mécanismes de signalisation de ces récepteurs sont remarquablement similaires. Chaque sous-type de récepteur est couplé à une inhibition de l'accumulation d'AMPc. Les gènes des récepteurs MT1 et MT2 sont présents chez les mammifères et de nombreuses données démontrent que MT1 est le récepteur qui régule les fonctions reproductives et circadiennes en réponse à la mélatonine [25]. Le troisième récepteur, Mel1c (deux isoformes α et β) a uniquement été détecté chez le paulet et le Xénape. Un deuxième type de récepteur de la mélatonine, appelé MT3, a d'abord été découvert grâce à ses propriétés pharmacologiques mais il est fort distinct des récepteurs MT1 et MT2 [26]. Récemment, les récepteurs MT3 de l'homme et de la souris ont été clonés; ils correspondent à une protéine codée par un gène homologue de la quinone réductase 2 (QR2). Le rôle exact de ce gène dans la transmission du signal de la mélatonine reste à déterminer. En dehors des récepteurs membranaires, les récepteurs nucléaires orphelins RZR α et β ont été proposés comme interagissant avec la mélatonine [27]. Nous avons été les premiers à démontrer un dysfonctionnement de la signalisation intracellulaire de la mélatonine dans les tissus musculo-squelettiques d'une cohorte de patients atteints de SIA [28] que nous avons comparée à une série de sujets témoins atteints ou non d'un autre type de scoliose cliniquement reconnu et décrit. Les tests que nous avons effectués ont permis d'observer trois types de réponses en présence de concentrations croissantes de mélatonine suggérant ainsi la participation possible de gènes distincts dans ce défaut de signalisation chez certains patients SIA (figure 1A). De plus, la faible capacité à inhiber l'activité des adénylates cyclases stimulées par la forskoline a également été observée avec un analogue non hydrolysable du GTP, le Gpp(NH)_p, permettant de penser qu'un tel dysfonctionnement de la signalisation de la mélatonine dans la SIA pourrait

Facteurs génétiques

locus	3q	[37]
	distal-10q	
	18q	
	19q13.3	[38]
	2q13	
	2q14.3	
	2q21.1	
	2q22.3	
	17p17	[8]
	17p11.2	
	Xq23	[7]
	Xq24	
	Xq25	
	Chromosome 6	[11]
	Chromosome 9	
	Chromosome 16	
	Chromosome 17	
	19p13	[37]
Gènes	aggrécans	[40]
	SNTG1	[41]

Tableau 1. Facteurs étiologiques de la SIA (suite).

être induit par une hypo-fonctionnalité sélective des protéines Gi, fait d'ailleurs occredité par une augmentation de la phosphorylation des protéines Gi couplées aux récepteurs de la mélatonine. En effet, les modifica-

tions post-traductionnelles des protéines Gi impliquant la phosphorylation de résidus sérine à leur extrémité amino-terminale sont bien connues pour bloquer la formation d'hétérotrimères fonctionnels avec les sous-unités Gβ et Gγ, empêchant ainsi l'inhibition de l'activité des

adénylates cyclases en présence d'un ligand spécifique [29]. Cette phosphorylation anormale nichée dans les ostéoblastes et dans plusieurs autres types cellulaires testés témoignant d'un défaut systémique (figure 1B). Fait intéressant, les œstrogènes inhibent fortement l'expression et la synthèse de la sous-unité α des protéines G (Gi_{1,2} et Gs) dans des cultures d'ostéoblastes [30], suggérant ainsi que la signalisation de la mélatonine pourrait être modulée par les œstrogènes. On peut remarquer que la capacité des œstrogènes à moduler les niveaux des protéines G (Gs et Gi) pourrait expliquer la prévalence des manifestations cliniques de la SIA à l'adolescence et le fait que les filles soient plus sévèrement atteintes que les garçons. Dans ce sens, la mise en évidence d'un défaut de signalisation de la mélatonine vient non seulement actualiser le rôle de cette hormone dans la pathogénie de la scoliose mais, de plus, constitue un concept unificateur pouvant expliquer la majorité des affections associées à la scoliose (figure 2). De plus, ce nouveau concept moléculaire a permis de développer un premier test de dépistage fonctionnel de la SIA actuellement en cours de validation clinique.

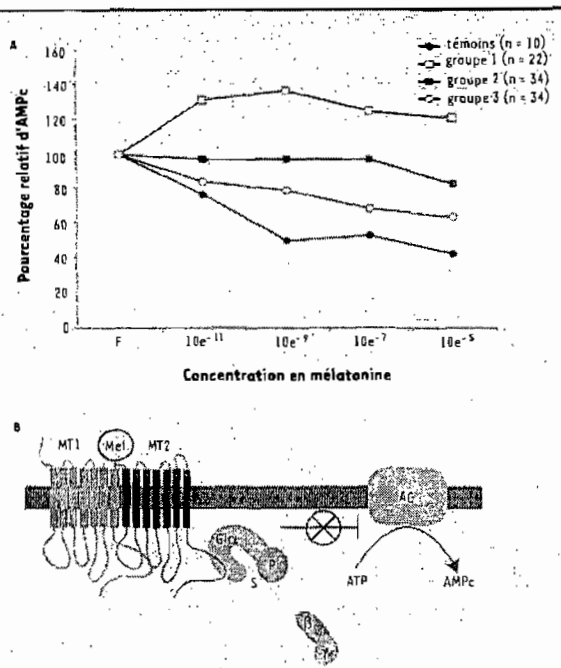


Figure 1. A. Évaluation de l'effet inhibiteur de la mélatonine sur l'accumulation intracellulaire d'AMPc dans les ostéoblastes humains. Effet de doses croissantes de mélatonine (10^{-11} à 10^{-5} M) sur les niveaux d'AMPc intracellulaire induit par la stimulation de l'activité adénylate cyclase par la forsskalin (10^{-3} M) dans les ostéoblastes dérivés de patients scoliotiques. Les courbes d'inhibition ont permis de classer les patients SIA en trois groupes fonctionnels. Le groupe 1 (—) montre une augmentation des niveaux d'AMPc au lieu d'une diminution comme on l'observe dans le groupe contrôle. Dans le groupe 2 (—), on n'observe presque pas d'inhibition, alors que les cellules des patients du groupe 3 (—) montrent une réponse partielle. B. Défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA. La mélatonine peut se lier à ses récepteurs membranaires MT1 ou MT2 (principalement présents à l'état d'hétérodimères). Ce sont des récepteurs couplés aux protéines Gi (G inhibitrices) qui, une fois activées, inhibent l'activité des adénylates cyclases. Chez les patients SIA, les sous-unités Gα des protéines Gi sont phosphorylées dans les résidus sérine, ce qui prévient la formation de trimères avec les sous-unités Gβ et Gγ, ce qui induit leur inactivation et leur incapacité à inhiber l'activité des adénylates cyclases. La phosphorylation des protéines Gi a été démontrée chez les patients SIA par Mareau et al. [28].

Développement d'un test fonctionnel pour le dépistage précoce de la SIA

Comme il n'existe pour le moment aucun test ni une quelconque façon de prévenir l'apparition d'une scoliose; celle-ci n'est diagnostiquée que lorsque la déviation de la colonne commence à être apparente. Ainsi c'est toute la manière dont on traite les patients scoliotiques depuis des décennies qui sera bouleversée, voire



transformée, par la mise au point d'un test de dépistage précoce. Le test cible deux populations distinctes. Premièrement, les enfants dits à risque, c'est-à-dire ceux provenant de familles présentant plusieurs cas de scoliose ou encore ceux dont l'un des deux parents est scoliotique [5, 6]. Deuxièmement les enfants et les adolescents en début de maladie (c'est-à-dire, victimes d'une déformation du rachis apparente comprise entre 10° et 30°) au sein desquels il sera possible d'identifier ceux qui présentent un risque de progression rapide. Le test est relativement simple puisque à partir d'un échantillon sanguin, les lymphocytes possèdent des récepteurs de la mélatonine, sont isolés et utilisés pour déterminer la présence d'un défaut dans la transmission de la mélatonine. Ce défaut est déterminé par un test biochimique mesurant la capacité de la mélatonine à inhiber la synthèse d'AMPc, molécule chimique produite par la cellule et agissant comme messager intracellulaire secondaire (Figure 1). La production d'AMPc est artificiellement stimulée par un traitement en présence de forskaline, molécule qui stimule l'activité des adénylate cyclases, enzymes membranaires chargées de la synthèse d'AMPc. En présence de concentrations croissantes de mélatonine, on observe une réduction rapide de cette synthèse dans les lymphocytes des sujets sains ; en revanche, dans les lymphocytes des patients SIA, on observe une absence d'inhibition. Nous avons identifié trois types de réponses anormales chez les sujets SIA ce qui nous permet de faire une classification fonctionnelle des patients. En outre, ce test fonctionnel permet le dépistage précoce de la SIA sans avoir a priori une connaissance des mutations ou des gènes en cause

dans la SIA puisqu'il cible une voie de signalisation ce qui couvre un ensemble plus général. 0

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier sincèrement les patients et leur famille qui ont participé à cette étude, de même que les cliniciens qui nous ont référés ces patients. Ce projet de recherche est subventionné par la Fondation Yves Cochet de l'Institut de France (Dr. Marono et Isabelle) et la validation des tests cliniques par la société Paradigme Syntex de New York (Dr. Horvath).

SUMMARY

Etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis and new molecular concepts

Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is the most common form of scoliosis that affects a significant number of young teenagers, mainly females (0.2-6% of the population). Historically, several hypothesis were postulated to explain the aetiology of AIS, including genetic factors, biochemical factors, mechanical, neurological, muscular factors and hormonal factors. The neuroendocrine hypothesis involving a melatonin deficiency as the source for AIS has generated great interest. This hypothesis stems from the fact that experimental pinealectomy in chicken, and more recently in rats

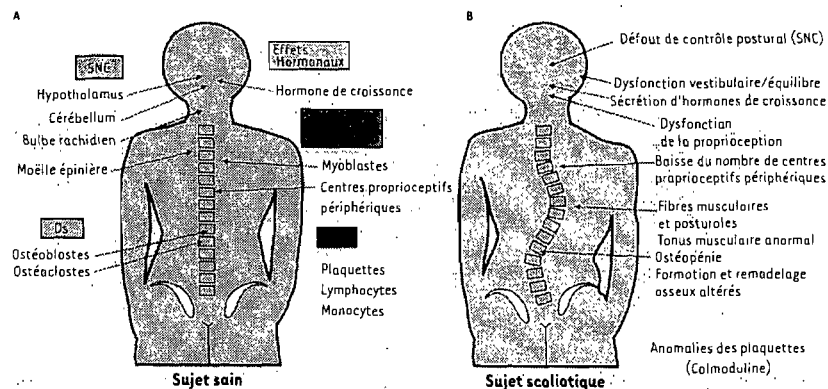


Figure 2. Systèmes ciblés par l'action de la mélatonine et symptômes observés chez les patients scoliotiques. Représentation schématique des effets physiologiques de la mélatonine chez les sujets normaux et leurs liens avec les pathologies observées chez les patients SIA. A. Tissus ciblés par l'action de la mélatonine. Une défaillance de la signalisation de cette hormone dans ces systèmes pourrait expliquer la majorité des anomalies et des symptômes observés chez les patients SIA (B), ce qui confère à ce modèle la portée d'un concept unificateur pour expliquer l'étiologie de la SIA.

maintained in a bipedal mode, produces a scoliosis. The biological relevance of melatonin in idiopathic scoliosis is controversial since no significant decrease in circulating melatonin levels has been observed in a majority of studies. Analysis of melatonin signal transduction in musculoskeletal tissues of AIS patients demonstrated for the first time a defect occurring in a cell autonomous manner in different cell types isolated from AIS patients suffering of the most severe form of that disease. These results have led to a classification of AIS patients in three different functional groups depending on their response to melatonin, suggesting that the cause of AIS involves several genes. Molecular analysis showed that melatonin signaling dysfunction is triggered by an increased phosphorylation of G α proteins inactivating their function. This discovery has led to development of a first scoliosis screening assay. This test, using blood sample, is currently in clinical validation process in Canada and could be used for screening children at high risk of developing AIS. O

RÉFÉRENCES

- Cowell HR, Hall JM, MacEwen GO. Genetic aspects of idiopathic scoliosis. A Nicholas Andry Award essay, 1970. *Clin Orthop Relat Res* 1972; 86: 121-31.
- Iowr TG, Edger M, Margolis JY, et al. Etiology of idiopathic scoliosis: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82-A: 1157-68.
- Curr AJ. Adolescent idiopathic scoliosis in identical twins. *J Bone Joint Surg Br* 1990; 72: 1077.
- Burwell RG. Aetiology of idiopathic scoliosis: current concepts. *Pediatr Rehabil* 2003; 6: 137-70.
- Mynne-Davies R. Familial (idiopathic) scoliosis: A family survey. *J Bone Joint Surg Br* 1948; 50: 74-30.
- De George FV, Fisher RL. Idiopathic scoliosis: genetic and environmental aspects. *J Med Genet* 1967; 4: 251-7.
- Justice CM, Miller NH, Marasy B, et al. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* 2003; 28: 589-94.
- Salehi LB, Mangina M, De SS, et al. Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet* 2002; 111: 401-4.
- Pyezik RE, McKusick VA. The Marfan syndrome: diagnosis and management. *N Engl J Med* 1979; 300: 772-7.
- Dostych M, Ciencia J. Idiopathic scoliosis and concentrations of zinc, copper, and selenium in blood plasma. *Biol Trace Elem Res* 2002; 89: 103-10.
- Hadley-Miller N, Mims B, Milewicz DM. The potential role of the elastic fiber system in adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 1193-206.
- Akhtar S, Davies JR, Cuterson B. Ultrastructural localization and distribution of proteoglycan in normal and scoliotic lumbar disc. *Spine* 2005; 30: 1303-9.
- Miller NH, Mims B, Child A, et al. Genetic analysis of structural elastic fiber and collagen genes in familial adolescent idiopathic scoliosis. *J Orthop Res* 1996; 14: 994-9.
- Carr AJ, Ogilvie DJ, Wordsworth BP, et al. Segregation of structural collagen genes in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 1992; 274: 305-10.
- Dubouset J, Machida M. Possible role of the pineal gland in the pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental and clinical studies. *Bull Acad Natl Med* 2001; 185: 593-602.
- Yamada K, Iketo T, Yamamoto H, et al. Equilibrium function in scoliosis and active corrective plaster jacket for the treatment. *Tokushima J Exp Med* 1969; 16: 1-7.
- Yamada K, Yamamoto H, Nakagawa Y, et al. Etiology of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 1984; 184: 50-7.
- Porter RW. The pathogenesis of idiopathic scoliosis: uncoupled neuro-osseous growth? *Eur Spine J* 2001; 10: 473-81.
- Mannion AF, Meier M, Grab D, et al. Paraspinal muscle fibre type alterations associated with scoliosis: an old problem revisited with new evidence. *Eur Spine J* 1998; 7: 289-93.
- Yoram R, Meyer S, Mazi R, et al. Metal impregnation abnormalities in platelets of patients with idiopathic scoliosis. *Haemostasis* 1987; 12: 287-8.
- Kindtloer K, Lowe T, Lowelin D, et al. Levels of platelet calmodulin for the prediction of progression and severity of adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 1186-92.
- Machida M, Dubouset J, Imamura Y, et al. Melatonin: A possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996; 21: 1147-52.
- Machida M, Dubouset J, Yamada T, et al. Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6 mice without pinealectomy. *J Pineal Res* 2004; 41: 1-7.
- Harachi NM, Bruce JH. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol* 2004; 25: 177-95.
- Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzyńska MJ, et al. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 2003; 72: 2183-98.
- Masjean O, Ferao M, Cagg E, et al. Identification of the melatonin-binding site ME1 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem* 2000; 275: 31313-7.
- Srinivas AN. Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry (Mosc)* 2001; 66: 19-26.
- Mareau A, Wang DS, Faiget S, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2004; 29: 1772-81.
- Strassheim D, Malban CC. Phosphorylation of G α attenuates inhibitory adenylyl cyclase in neuroblastoma/glioma hybrid (NG-108-15) cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 14307-13.
- Papaioannou S, Tumber AM, Meikle MC, et al. G-protein signalling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1449: 284-92.
- Ogemo TR, Jr, Bradford DS, Cooper KH, et al. Comparison of the biochemistry of proteoglycans isolated from normal, idiopathic scoliotic and cerebral palsy spines. *Spine* 1983; 8: 378-84.
- Donce VC, Crean JK, Sims TJ, et al. Changes in collagen cross-linking in degenerative disc disease and scoliosis. *Spine* 1998; 23: 2545-51.
- Yu J, Fairbank JC, Roberts S, et al. The elastic fiber network of the annulus fibrosus of the normal and scoliotic human intervertebral disc. *Spine* 2005; 30: 1815-20.
- Bagnall KM, Beucler 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.
- Bradner M, Krepler P, Nicolakis M, et al. Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br* 2008; 90: 399-403.
- Marcuende JA, Minhas R, Delon L, et al. Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2003; 28: 2025-8.
- Wise CA, Barnes R, Gullam J, et al. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2000; 25: 2372-80.
- Chan V, Fong GC, Luk KD, et al. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 15p14.3. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 451-6.
- Alden KJ, Marasy B, Nzeogu H, et al. Idiopathic scoliosis: identification of candidate regions on chromosome 15p13. *Spine* 2004; 31: 1815-9.
- Shapiro RM, Tawil RM, Terakawa W, et al. Polymorphism of aggrecan gene in families with idiopathic scoliosis. *Mol Biol (Wash)* 2006; 40: 554-7.
- Baskiandes S, Vite R, Allen M, et al. SNTG1, the gene encoding gamma1-syntrophin: a candidate gene for idiopathic scoliosis. *Hum Genet* 2004; 115: 81-9.

TIRÉS À PART
A. Mareau