

Université de Montréal

**Études des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes
de patients atteints de Scoliose Idiopathique de l'Adolescent**

par

Dominique Leboeuf

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc
en Sciences Biomédicales

Novembre, 2008

© Dominique Leboeuf, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Études des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes
de patients atteints de Scoliose Idiopathique de l'Adolescent**

présenté par :
Dominique Leboeuf

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr André Tremblay, président-rapporteur
Dre Florina Moldovan, directeur de recherche
Dr Alain Moreau, co-directeur
Dr Abderrahim Lomri, membre du jury

Résumé

Plusieurs éléments de la pathogenèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent indiquent que les estrogènes pourraient intervenir dans le développement et la progression de cette maladie. Ce projet avait donc pour but d'explorer l'expression et la fonctionnalité des récepteurs aux estrogènes ER α et ER β ainsi que leurs isoformes dans les ostéoblastes de patients scoliotiques et sains. L'induction des gènes de facteurs influençant la minéralisation et la différenciation des ostéoblastes par les estrogènes a également été étudié.

Par immunofluorescence, nous avons remarqué une augmentation de la présence protéique de ER β dans les ostéoblastes de patients SIA comparé aux sujets contrôles. Les récepteurs aux estrogènes provenant des ostéoblastes des patients sont fonctionnels tout comme ceux des contrôles et aucune différence dans l'interaction ADN-protéine n'a été observée. Il y a également une augmentation de l'expression génique de l'ostéopontine, l'ostéocalcine, le collagène de type I, la phosphatase alcaline et BMP2 dans les ostéoblastes des patients SIA. Un début de minéralisation *in vitro* a été observé dans les ostéoblastes de patients SIA et contrôles.

ER α et ER β sont présents et fonctionnels dans les ostéoblastes des patients SIA et sains. Leur expression est variable, mais ces variations existent chez les patients SIA et les contrôles. L'implication des estrogènes dans la SIA ne serait donc pas au niveau des récepteurs aux estrogènes mais au niveau de l'interactions des estrogènes avec d'autres facteurs étiologiques tels que la mélatonine, la formation/résorption osseuse ou autres facteurs neuro-endocriniens.

Mots clés : Estrogènes, Récepteurs aux estrogènes, Minéralisation, Ostéoblastes, Scoliose Idiopathique de l'Adolescent

Abstract

Recent developments in the research on pathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis indicate that estrogens could intervene in the development and progression of this disease. Therefore, this project focussed on the expression and functionality of estrogen receptors ER α and ER β and their isoforms in osteoblasts of scoliotic patients and controls. The induction by estrogens of the expression of factors influencing mineralization and osteoblast differentiation was also studied.

We observed by immunofluorescence, an increase of the presence of ER β in osteoblasts of AIS patients compared to controls. A higher level of expression of osteopontin, osteocalcin, type I collagen, alkaline phosphatase and BMP2 was found in osteoblasts of AIS patients compared to controls. Estrogen receptors in osteoblasts from AIS patients are functional, as they were in controls and no difference in DNA-binding activity was observed.

ER α et ER β are present and functional in osteoblasts from AIS patients and controls. Their expression is variable, but these variations exist in both populations. The implication of estrogens in AIS would therefore be in the interaction between these hormones and other factors influencing the aetiology of AIS like melatonin, bone formation and resorption and neuro-endocrin factors, rather than in a default in the estrogens receptors themselves.

Key words: Estrogens, Estrogen receptors, Mineralisation, Osteoblasts, Adolescent Idiopathic Scoliosis

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
Liste des tableaux.....	X
Liste des figures.....	XI
Liste des abréviations	XIII
REMERCIEMENTS	XV
1. INTRODUCTION	1
2. REVUE DE LA LITTÉRATURE	4
2.1. GÉNÉRALITÉS SUR LA SCOLIOSE	5
2.2. ÉTIOLOGIE DE LA SCOLIOSE IDIOPATHIQUE DE L'ADOLESCENT	6
2.2.1. <i>Éléments structuraux et les muscles</i>	6
2.2.2. <i>Biomécanique de la croissance</i>	7
2.2.3. <i>Facteurs biochimiques</i>	8
2.2.4. <i>Système nerveux central</i>	8
2.2.5. <i>Génétique</i>	9
2.2.6. <i>Endocrinologie</i>	10
2.2.6.1. Hormones de croissance	10
2.2.6.2. Mélatonine	11
2.2.6.2.1. La signalisation de la mélatonine.....	12
2.2.6.3. Estrogènes.....	13
2.3. LES ESTROGÈNES ET LA SCOLIOSE.....	15
2.3.1. <i>Les polymorphismes du récepteur ERα</i>	16
2.3.2. <i>Contrôle de la croissance par les estrogènes</i>	16
2.3.3. <i>Contrôle de la formation et de la résorption osseuse par l'action sur les ostéoblastes et les ostéoclastes</i>	18
2.3.3.1. Ostéoclastes	18
2.3.3.2. Ostéoblastes	19

2.3.4.	<i>Rôle sur la régression osseuse (ostéopénie et ostéoporose)</i>	21
2.3.5.	<i>Réponse au stress mécanique</i>	22
2.3.6.	<i>Interaction estrogène-mélatonine</i>	23
2.3.7.	<i>Interaction estrogène calmoduline</i>	24
2.4.	RÉCEPTEURS AUX ESTROGÈNES	24
2.4.1.	<i>Les récepteurs nucléaires aux estrogènes</i>	25
2.4.1.1.	Domaines protéiques.....	25
2.4.1.2.	Leurs isoformes.....	27
2.4.1.2.1.	ER α	27
2.4.1.2.2.	ER β	27
2.4.1.3.	Ligands.....	28
2.4.1.4.	Activité transcriptionnelle.....	29
2.4.1.4.1.	Dépendant à la liaison au ligand.....	29
2.4.1.4.2.	Indépendant au ligand.....	30
2.4.1.5.	Contrôle de la transcription.....	30
2.4.1.6.	Action sur l'os.....	31
2.4.2.	<i>Récepteurs membranaires</i>	32
2.4.3.	<i>Récepteurs Reliés aux ER (Estrogen Receptor-Related Receptors)</i>	33
2.5.	PHYTOESTROGÈNES	33
2.6.	LA MINÉRALISATION DU TISSUS OSSEUX.....	34
2.6.1.	<i>Les protéines impliquées dans la différenciation des ostéoblastes</i>	34
2.6.2.	<i>La différenciation des ostéoblastes</i>	35
2.6.3.	<i>Interaction des estrogènes avec les protéines de différenciation des ostéoblastes</i>	37
2.6.4.	<i>Les protéines de la matrice osseuse</i>	37
2.7.	HYPOTHÈSE	39
2.8.	OBJECTIFS.....	39
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	40
3.1.	ISOLATION DES OSTÉOBLASTES.....	41
3.2.	CULTURE DES CELLULES.....	45
3.3.	PASSAGE DES CELLULES	45

3.4.	PHOSPHATASE ALCALINE	45
3.5.	EXTRACTION DE L'ARN	46
3.6.	DOSAGE ARN.....	46
3.7.	TRANSCRIPTION INVERSE (RT)	47
3.8.	POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	47
3.9.	MIGRATION DE LA PCR	49
3.10.	PCR QUANTITATIVE (QPCR)	49
3.11.	EXTRACTION DES PROTÉINES TOTALES	50
3.12.	EXTRACTION DES PROTÉINES NUCLÉAIRES.....	51
3.13.	DOSAGE DES PROTÉINES	51
3.14.	COLORATION AU TRICHROME DE GOLDNER	52
3.15.	IMMUNOHISTOCHEMIE	52
3.16.	IMMUNOCYTOLOGIE	53
3.17.	SYNTHÈSE IN VITRO DE ER α ET ER β	54
3.18.	EMSA	54
3.19.	MINÉRALISATION.....	55
3.20.	STATISTIQUES.....	57
4.	RÉSULTATS.....	58
4.1.	EXPRESSION DES MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION OSTÉOBLASTIQUES DANS LES OSTÉOBLASTES DE PATIENTS SIA ET DES CONTRÔLES.....	59
4.2.	EXPRESSION GÉNIQUE DES RÉCEPTEURS AUX ESTROGÈNES DANS LES OSTÉOBLASTES DE PATIENTS SIA ET DE CONTRÔLES	64
4.2.1.	<i>Détection de l'expression de ERα et ERβ.....</i>	<i>64</i>
4.2.2.	<i>Quantification de l'expression de chaque isoforme de ERα et ERβ.....</i>	<i>66</i>
4.2.3.	<i>Mise en évidence d'un nouvel isoforme de ERβ dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles</i>	<i>69</i>
4.3.	EXPRESSION PROTÉIQUE DES ER ET RÉORGANISATION NUCLÉAIRE SUITE À LA STIMULATION AU 17 β -ESTRADIOL	71
4.3.1.	<i>ERα.....</i>	<i>71</i>
4.3.2.	<i>ERβ.....</i>	<i>74</i>

4.4.	LIAISON DES ER À L'ADN.....	78
4.4.1.	<i>Détermination du contrôle positif de la liaison de la sonde ERE (Estrogen Response Element) avec ERα</i>	78
4.4.2.	<i>Liaison de ERα à l'ADN chez les patients SIA et les sujets contrôles</i>	82
4.5.	EXPRESSION GÉNÉRIQUE DE BMP2 ET DE TGF β CHEZ LES PATIENTS SIA ET LES SUJETS CONTRÔLES	84
4.6.	MINÉRALISATION DES OSTÉOBLASTES DE PATIENTS SIA ET DE CONTRÔLES	87
5.	DISCUSSION.....	89
5.1.	EXPRESSION GÉNÉRIQUE DES RÉCEPTEURS AUX ESTROGÈNES DANS LES OSTÉOBLASTES DE PATIENTS ATTEINTS DE SIA	90
5.1.1.	<i>Présence de la forme génique de l'isoforme ERβS1 dans les ostéoblastes de patients atteints de SIA</i>	92
5.2.	EXPRESSION PROTÉIQUE DES RÉCEPTEURS AUX ESTROGÈNES DANS LES OSTÉOBLASTES DE PATIENTS ATTEINTS DE SIA.....	93
5.2.1.	<i>Rôle de ERβ dans l'os</i>	95
5.3.	LIAISON DES RÉCEPTEURS AUX ESTROGÈNES AVEC L'ADN	96
5.4.	EXPRESSION DES PROTÉINES DE DIFFÉRENCIATION DES OSTÉOBLASTES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE SCOLIOSE IDIOPATHIQUE DE L'ADOLESCENT	97
5.4.1.	<i>Les BMP</i>	98
5.4.2.	<i>Les facteurs de différenciation locaux</i>	98
5.4.3.	<i>Les protéines de la matrice extracellulaire</i>	99
5.5.	FORMATION IN VITRO DE MATRICE OSSEUSE	100
6.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	102
7.	RÉFÉRENCES	107
8.	ANNEXES	146
8.1.	ANNEXE 1: SÉQUENCE NUCLÉOTIDIQUE DE L'ISOFORME ER β S1 COMPARÉE À ISOFORME ER β 4	147
8.2.	ANNEXE 2 : COMPARAISON DES SÉQUENCES PROTÉIQUES DES ISOFORMES DE ER β	148

8.3. ANNEXE 3 : REVUE DE LA LITTÉRATURE SUR LES ESTROGÈNES ET LA SCOLIOSE.. 149

Liste des tableaux

Tableau I : Loci de susceptibilité et gènes candidats susceptibles d'être à l'origine de la Scoliose Idiopathique de l'Adolescent.	10
Tableau II : Ligands naturels et synthétiques des récepteurs aux estrogènes, avec leur spécificité pour ER α ou ER β	29
Tableau III : Données cliniques des patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent qui ont servi à cette étude.	42
Tableau IV : Données cliniques des sujets contrôles qui ont servi à cette étude.....	44
Tableau V : Amorces utilisées pour les réactions de PCR	48
Tableau VI : Amorces utilisées pour la PCR quantitative.....	50

Liste des figures

Figure 1. Contribution des estrogènes au développement de la scoliose.	15
Figure 2 : Effets des estrogènes sur la formation des ostéoclastes.	20
Figure 3: Comparaison des isoformes de ERα et ERβ et de leurs domaines protéiques.	26
Figure 4 : Différenciation des ostéoblastes sous l'action de différents facteurs.	36
Figure 5: Expression génique des différents facteurs et marqueurs de différenciation des ostéoblastes.	60
Figure 6 : Semi-quantification de l'expression des gènes de marqueurs de différenciation des ostéoblastes.	61
Figure 7: Différenciation des ostéoblastes.	63
Figure 8 : Détection de l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules HEK (contrôle négatif).	64
Figure 9: Expression génique des récepteurs aux estrogènes ERα et ERβ dans les ostéoblastes de patients SIA et sujets contrôles.	65
Figure 10: Quantification de l'expression génique de ERα et ERβ dans les osteoblastes de patients SIA et contrôles.	67
Figure 11: Expression génique des isoformes de ERβ dans les ostéoblastes de patients SIA et contrôles	68
Figure 12: Ratio de l'expression basale de ERα par rapport à ERβ dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.	69
Figure 13: Expression de l'isoforme ERβ S1 dans les ostéoblastes de patients SIA (A) et de sujets contrôles ainsi que dans divers tissus humains (B).	70
Figure 14: Relocalisation de ERα dans les noyaux suite à une stimulation à l'estradiol 10⁻¹⁰M.	72
Figure 15: Relocalisation de ERα dans les noyaux suite à une stimulation à l'estradiol 10⁻⁸M. X	73
Figure 16: Relocalisation de ERβ dans les noyaux suite à une stimulation à l'estradiol 10⁻¹⁰M.	75

Figure 17: Relocalisation de ERβ dans les noyaux suite à une stimulation à l'estradiol 10⁻⁸M.	76
Figure 18 : Détection de ERα et ERβ sur des coupes histologiques du tissu osseux d'un patient SIA.	77
Figure 19: Liaison spécifique de la sonde ERE (Estrogen Response Element) avec les récepteurs aux estrogènes ERα et ERβ.	79
Figure 20: Liaison de la sonde ERE (Estrogen Response Element) avec ERα.	81
Figure 21: Liaison de la sonde ERE (Estrogen Response Element) avec ERα dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.	83
Figure 22: Expression génique de BMP2 dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.	85
Figure 23: Expression génique de TGFβ dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.	86
Figure 24 : Formation d'une matrice minéralisée <i>in vitro</i> à partir d'ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.	88

Liste des abréviations

5'UTR : Région non transcrite 5' (5' Untranslated Region)

ADN : Acide Desoxyribonucléique

ADNc : Acide Desoxyribonucléique Complémentaire

AF-1 : Domaine d'activation 1 (Activation Function domain 1)

ALP : Phosphatase Alkaline

AMPC : Adenosine MonoPhosphate cyclique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger

BMP2 : Bone Morphogenetic Protein 2

BSP : Bone Sialoprotein

C57BL/6J : Souche de souris

Ca²⁺ : Ions Calcium

Cbaf1 : Core-binding factor alfa 1

C-EBP: CCAAT/enhancer binding protein

DAPI: 4',6' di-amidino-2-phényl indole

DBD : Domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain)

Dlx5 : Distal-less homeobox 5

DMO : Densité Minérale Osseuse

EMSA : Electro-Mobility Shift Assay (retard sur gel)

ER : Récepteur aux estrogènes

ER α : Estrogen Receptor alpha

ER β : Estrogen Receptor beta

ERE : Elément de Réponse aux Estrogènes

ERR : Estrogen receptor-related receptor

Fas: Récepteur de la mort cellulaire

Fas-L : Ligand du récepteur de la mort cellulaire

GH : Hormone de croissance

Gi: Protéine GTPase inhibitrice

HEK 293 : Human Embryonic Kidney cells
IL-1 : Interleukine 1
IL-6 : Interleukine 6
LBD : Domaine de liaison au ligand
LRP5 : LDL-R-Related Protein 5
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor
MT1 : Récepteur à la Mélatonine 1
MT2 : Récepteur à la Mélatonine 2
NF- κ B : Nuclear Factor kappa B
OCN : Ostéocalcine
OPG : Ostéoprotégerine
OPN : Ostéopontine
PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTH: Hormone Parathyroïdienne
PvuII: Enzyme de restriction
RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B
RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B - Ligand
Runx2 : Runt-Related Transcription Factor 2
SIA: Scoliose Idiopathique de l'Adolescent
SPARC: Secreted protein acidic and rich in cysteine
SRC-1: Steroid Receptor Co-activator 1
TBS : Tris Buffer Saline
TGF β : Transforming Growth Factor β
XbaI: Enzyme de restriction

Remerciements

J'aimerais remercier Dre Florina Moldovan, ma directrice, qui m'a donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans son laboratoire avec un projet de recherche aussi intéressant. Merci à mon co-directeur, Dr Alain Moreau, pour ses précieux conseils.

Un merci particulier au Dr André Tremblay qui m'a beaucoup aidé lors de mes expériences de retard sur gel par ses généreux conseils.

Je remercie les organismes FRSQ et MENTOR, qui m'ont permis d'étudier grâce à de généreuses bourses de recherche.

J'aimerais remercier mes collègues et amies qui m'ont non seulement soutenu mais aussi échangé avec moi des idées qui ont enrichi mon projet de recherche. Merci à Delphine, Michelle, Irène, Marie-Claude, Kareen, Karen, Mathilde et Kim d'avoir été là, pour vos rires, vos sourires.

Et finalement, merci à mes parents et ma grande famille de m'avoir soutenu dans ces deux longues années. Merci pour vos prières. Merci de m'avoir permis d'étudier aussi longtemps. Merci de m'avoir toujours encouragé.

I. Introduction

La scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) est une maladie qui affecte de 0,3 à 3% de la population générale et qui se manifeste par une déformation tridimensionnelle de la colonne vertébrale. Ces déformations peuvent être très souffrantes et n'affectent pas seulement la géométrie de la colonne vertébrale mais ont des répercussions sur le tronc, les organes internes, la respiration et l'activité physique. Les désordres scoliotiques sont plus fréquents et plus sévères chez les jeunes filles que chez les garçons. Ceci, couplé au fait que la scoliose de l'adolescent se développe et progresse durant la puberté, suggère un rôle possible des hormones pubertaires, et plus spécifiquement les estrogènes, dans cette pathologie.

Plusieurs études ont émis des hypothèses quant à l'éthiopathogénèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent, sans jamais arriver à une cause commune à tous les patients. Les éléments structuraux du tronc, la biomécanique de la croissance, les éléments biochimiques, le système nerveux central, la génétique et l'endocrinologie sont tous des domaines étudiés dans le but de comprendre l'origine de la SIA (Machida 1999). Chacune de ces études ont rapporté des anomalies qui pourraient expliquer la déformation de certains patients scoliotiques. Par contre, ces anomalies ne peuvent s'appliquer à tous les patients SIA.

Les estrogènes sont essentielles pour la croissance osseuse, autant chez les garçons que les filles. Elles contrôlent le début et la fin de la croissance rapide reliée à la puberté et à l'hormone de croissance (Balasch 2003). Elles gèrent également la formation d'ostéoblastes et d'ostéoclastes, cellules qui effectuent respectivement la résorption et la formation de nouvel os (Riggs, Khosla et al. 2002). Les estrogènes sont aussi nécessaires pour la réaction des os au stress mécanique (Damien, Price et al. 1998). Finalement, les estrogènes interagissent avec la mélatonine et la calmoduline, deux protéines biochimiques qui sont défectueuses dans les cellules dérivées des tissus de patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescence (Kindsfater, Lowe et al. 1994; Moreau, Wang et al. 2004).

Des recherches récentes démontrent un défaut de signalisation de la mélatonine présent chez les patients SIA (Moreau, Wang et al. 2004) qui pourrait être la cause de la plupart des

courbes retrouvées chez les patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent. Ce défaut pourrait être exacerbé par les estrogènes chez les patients qui ont une réponse plus prononcée que normale à la mélatonine et corrigée chez les patients qui ont une réponse inverse (Letellier, Azeddine et al. 2008). Ceci confirme l'importance des estrogènes dans le développement et la progression de la SIA.

Les résultats de notre groupe de recherche, sur l'interaction entre la mélatonine et les estrogènes dans les ostéoblastes de patients SIA (Letellier, Azeddine et al. 2008), nous ont incité à chercher quels seraient les facteurs conduisant à ces réponses opposées. Pour répondre à ces questions, nous avons étudié le profil d'expression des récepteurs spécifiques des estrogènes, dans les cellules dérivées de patients sains et atteints de SIA. Les estrogènes agissent principalement via l'activation de deux récepteurs nucléaires, l'ER α et l'ER β . Ces récepteurs lient les estrogènes, forment des homo- ou hétéro-dimères et se lient à l'ADN afin d'amorcer la transcription de gènes. Ces récepteurs ont plusieurs isoformes présents dans les ostéoblastes.

Malgré les différentes hypothèses avancées sur l'impact possible des estrogènes dans l'étiologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent, aucune étude s'est penchée sur le rôle précis joué par les estrogènes dans les cellules de patients SIA. Pour aborder ce manque dans la compréhension de cette maladie, nous avons étudié la présence et la fonctionnalité des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes des patients.

2. Revue de la littérature

2.1. Généralités sur la scoliose

La scoliose a été décrite en premier par Hippocrate comme étant une déformation en trois dimensions de la colonne vertébrale et de la cage thoracique (Machida 1999). Aujourd'hui, une scoliose est caractérisée par un angle de Cobb (angle formé par le prolongement de deux plateaux des vertèbres les plus inclinées) de plus de 10°. La déformation est causée par une rotation des vertèbres et un déplacement latéral entraînant une torsion de la cage thoracique, ce qui cause une gibbosité dans le plan sagittal, d'où la tridimensionnalité de la déformation (Dubousset 1999). La scoliose affecte de 0.2-3% de la population, et en particulier les filles (ratio filles :garçons, 2 :1), et ce ratio augmente lorsqu'il s'agit des courbes sévères (ratio de 7 :1) (Weinstein 1994). Il existe quatre principaux types de déformations scoliotiques, identifiées selon l'apex de la courbe: thoracique, thoraco-lombaire, lombaire et double et la majorité des scolioses sont de type thoracique droite (Harrington 1977). La scoliose est diagnostiquée par des examens cliniques et radiographiques, qui permettent de déterminer l'angle de Cobb, la gibbosité (saillie de la cage thoracique) et la rotation du bassin, indices de la gravité de la déformation.

Les traitements pour la scoliose consistent principalement en deux options : le corset ou la chirurgie de fusion des vertèbres en insérant une instrumentation métallique dans celles-ci. Le corset permet de stabiliser la courbe lors de la croissance, mais lorsque celle-ci continue de progresser au-delà de 30°, la chirurgie s'avère alors nécessaire (Kostuik 1990). La plupart des études effectuées sur la scoliose visent à établir quel patient progressera, afin d'éviter les effets négatifs du corset et de procéder rapidement à un traitement par chirurgie (Clayson, Luz-Alterman et al. 1987; Noonan, Dolan et al. 1997). Il est évident que les travaux actuels visent à offrir des options pharmaceutiques comme traitement à la scoliose, de façon à éviter complètement la chirurgie.

Les scolioses sont classées selon leur origine en scolioses familiales ou congénitales, scolioses neuromusculaires, scolioses adultes, infantiles, juvéniles et finalement en scolioses idiopathiques de l'adolescent, nommées ainsi puisque les causes de

ces déformations restent encore inconnues. La scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) débute et progresse lors de la puberté, en même temps que surgissent chez l'enfant plusieurs changements dus aux hormones et à la croissance. Il a d'ailleurs été démontré par Duval-Beaupère (Duval-Beaupere 1982; Duval-Beaupere 1996) que l'aggravation de la courbure scoliothique est fortement reliée à la croissance et à la maturation osseuse. Étant donné que la SIA se développe à l'adolescence durant la puberté et que cette maladie affecte principalement les filles, on peut supposer que les hormones sexuelles, particulièrement les estrogènes, sont impliquées dans le développement de cette déformation.

Il faut bien comprendre que la scoliose n'est pas une maladie à proprement parler mais bien un symptôme d'un autre défaut métabolique. Plusieurs études ont émis des hypothèses quand à la nature de ce déséquilibre, sans en arriver à des conclusions claires sur les causes exactes de la scoliose idiopathique de l'adolescent. Il en résulte que plusieurs de ces études se contredisent mais font ressortir que la scoliose idiopathique de l'adolescent est un problème multifactoriel.

2.2. Étiologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent

2.2.1. Éléments structuraux et les muscles

Il a été démontré que plusieurs éléments structuraux de la colonne vertébrale sont perturbés lors d'une scoliose. Par exemple, les côtes de certains patients SIA sont plus longues du côté concave de la courbe (Normelli, Sevastik et al. 1985; Agadir, Sevastik et al. 1989; Sevastik, Agadir et al. 1990; Sevastik, Willers et al. 1993; Sevastik, Xiong et al. 1995), résultats qui ont été contredits par Stokes *et al.* (Stokes, Dansereau et al. 1989). Le disque intervertébral subit lui aussi plusieurs changements, tout particulièrement au niveau des protéoglycanes et du collagène (Worthington and Shambaugh 1991). Une étude de Antoniou *et al.*, (Antoniou, Arlet et al. 2001) a analysé les disques des patients SIA pour leur contenu en eau, collagène et protéoglycanes. Elle stipule que le collagène, les protéoglycanes et l'eau étaient diminués chez les scoliothiques mais qu'il y aurait une augmentation de la proportion de collagène de type II par rapport aux autres types de

collagène dans ces mêmes tissus. Akhtar *et al.* (Akhtar, Davies et al. 2005) ont également démontré la désorganisation lamellaire du collagène et des fibres élastiques dans les disques intervertébraux des patients SIA, résultats qui ont été corroborés par Yu *et al.*, (Yu, Fairbank et al. 2005). Malgré que ces études clament que les déformations du disque pourraient être à l'origine de la scoliose, Oegema *et al.* (Oegema, Bradford et al. 1983) concluait très tôt que ces déformations n'étaient que des effets secondaires au développement de la scoliose.

Les muscles du dos font eux aussi partie intégrale de la problématique de la scoliose. Plusieurs études ont démontré une corrélation entre la scoliose et la déformation des muscles paraspinaux. Entre autres, on peut observer une diminution des fibres de type II dans les muscles à l'apex de la courbe (Whalen and Ecob 1982; Sahgal, Shah et al. 1983; Zetterberg, Aniansson et al. 1983). On voit aussi une accumulation de glycogène, lipides et mitochondries du côté concave de la courbe (Sahgal, Shah et al. 1983). Plusieurs des anomalies retrouvées dans les muscles des patients SIA sont indicatives de dénervation et de neuropathies (Spencer and Zorab 1976), que ce soit du côté convexe ou concave de la courbe. En général, les patients ayant une courbe plus importante ont aussi une augmentation de leur activité musculaire du côté convexe (Reuber, Schultz et al. 1983). Par contre, malgré les nombreuses recherches, il n'est pas possible de dire clairement si ces changements dans la musculature des patients scoliotiques sont des causes ou des conséquences de leur scoliose.

2.2.2. Biomécanique de la croissance

Une des théories les plus anciennes est sans doute que la scoliose serait d'abord produite par une lordose non-équilibrée (Somerville 1952; Dickson, Lawton et al. 1984). En compensation, la colonne développe une cyphose accentuée ainsi qu'une rotation des vertèbres (Somerville 1952). Ensuite, suivant la loi de Huerter-Volkman qui stipule que la croissance est retardée par une compression mécanique et accélérée par une distraction ou compression réduite sur la plaque de croissance (Hueter 1862; Volkman 1882), la croissance de l'os entre dans un cercle vicieux qui se termine par une croissance augmentée

sur un côté de la vertèbre et réduite du côté opposé. Ainsi, la scoliose serait une réponse biomécanique à une charge asymétrique induite sur les corps vertébraux (Stokes 2007). Une autre étude a aussi démontré que la moelle épinière des patients scoliotiques serait plus courte que celle des sujets contrôles, ce qui forcerait la colonne à plier afin d'accommoder la longueur du tube neural (Porter 2000).

2.2.3. Facteurs biochimiques

Les plaquettes sanguines ont été étudiées chez les patients scoliotiques, entre autres par leur ressemblance aux cellules musculaires. Kinsfater *et al.*, (Kinsfater, Lowe et al. 1994) ont remarqué une augmentation du niveau de calmoduline dans les plaquettes des patients SIA et Peleg *et al.* (Peleg, Eldor et al. 1989) ont démontré une augmentation de 2,5 à 3 fois de l'activité de cette même protéine, résultats qui ont été contredits par Suk *et al.* (Suk, Kim et al. 1991) et Kahmann *et al.* (Kahmann, Donohue et al. 1992). Ces premières études, ainsi que bien d'autres, montrent que l'augmentation de la quantité et de l'activité de la calmoduline des thrombocytes semble être un facteur de prédiction de la progression de la courbe (Meyer, More et al. 1987; Kinsfater, Lowe et al. 1994; Lowe, Lawellin et al. 2002). Plusieurs études montrent aussi des anomalies des thrombocytes, telles qu'une mauvaise agrégation (Muhlrad and Yarom 1982; Floman, Liebergall et al. 1983; Sabato, Rotman et al. 1985), des défauts dans la structure de la myosine (Peleg, Eldor et al. 1989), (Yarom and Robin 1979), et une élévation du calcium intracellulaire ainsi que du phosphore (Yarom and Robin 1979; Bredoux, Corvazier et al. 2006). Sans doute, ces études ainsi que la ressemblance des cellules musculaires et des thrombocytes pourraient mener à la conclusion que les cellules contractiles auraient une plus grande influence sur la pathogénèse de la scoliose que celle qui leur est accordée.

2.2.4. Système nerveux central

La scoliose semble être une conséquence de plusieurs maladies neurologiques (Petersen, Sahlstrand et al. 1979; Pincott and Taffs 1982; Barrios, Tunon et al. 1987; Akhtar and Rowe 2008), avec une prédominance des dommages au tube neural du côté convexe de la courbe scoliotique. Pincott *et al.* (Pincott, Davies et al. 1984) ont démontré

qu'une perte de l'innervation des muscles paraspinaux du côté convexe de la courbe pouvait causer une scoliose chez les primates. Yamada *et al.*, (Yamada, Ikata et al. 1969) ont aussi prouvé que la scoliose peut être provoquée par une destruction du tronc cérébral ainsi que de l'hypothalamus. Il a aussi été démontré que certains patients scoliotiques souffrent de troubles de proprioception (Sahlstrand, Petruson et al. 1979; Yekutieli, Robin et al. 1981; Herman, Mixon et al. 1985; Keessen, Crowe et al. 1992) ainsi que de difficultés à contrôler leur équilibre (Guo, Chau et al. 2006). Ces résultats sont corroborés par Yamada *et al.*, (Yamada, Ikata et al. 1969) qui stipulaient qu'un dérangement du système du réflexe postural peut causer la scoliose et qu'il y aurait une certaine corrélation entre ceci et le degré de courbure. Il semble y avoir un consensus dans ces études à savoir qu'il y aurait des dommages neurologiques sur le côté afférent du système postural chez les patients atteints de scoliose. Néanmoins, aucune preuve indique que ces dommages seraient plus que des conséquences de la déformation thoracique.

2.2.5. Génétique

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur la nature génétique de la scoliose. D'abord, nous savons qu'il existe une plus grande prévalence de la scoliose chez les individus d'une même famille (Riseborough and Wynne-Davies 1973; Wynne-Davies 1973) et que les jumeaux monozygotiques ont une plus grande concordance que les dizygotiques (Carr 1990; Kesling and Reinker 1997; Inoue, Minami et al. 1998; Andersen, Thomsen et al. 2007; Weiss 2007). La discussion sur le mode d'hérédité a longtemps été partagée entre un mode dominant et multifactoriel (Riseborough and Wynne-Davies 1973; Wynne-Davies 1973) ou lié au chromosome X (Cowell 1970; Miller, Justice et al. 2005). Des études utilisant l'approche des gènes candidats ont démontré plusieurs gènes qui semblaient reliés à la scoliose dans certaines populations (Wise, Barnes et al. 2000; Salehi, Mangino et al. 2002; Morcuende, Minhas et al. 2003; Bashiardes, Veile et al. 2004; Marosy, Justice et al. 2006; Ocaña, Zhao et al. 2008), sans toutefois pouvoir s'appliquer à toute la population d'individus scoliotiques. Par contre, ces mêmes études ont permis d'établir des locus de susceptibilité associés à la scoliose. Suite à l'arrivée de nouvelles techniques d'études génétiques, des analyses de polymorphismes ont été effectuées (Miller, Justice et al. 2005;

Montanaro, Parisini et al. 2006; Gao, Gordon et al. 2007; Qiu, Tang et al. 2007), qui n'ont cependant pas apporté de précisions quant aux gènes qui pourraient être impliqués dans la scoliose de façon globale.

Tableau I : Loci de susceptibilité et gènes candidats susceptibles d'être à l'origine de la Scoliose Idiopathique de l'Adolescent.

Étude	Région chromosomique	Gènes	Population
Ocaka et al, 2008	9q31.2-q34.2	-	Britannique
	17q25.3-qtel	-	Britannique
Miller et al, 2005	6, 9, 16, 17	-	Américaine
Chan et al, 2002	19p13.3	-	Chinoise
	2q13-2q22	-	Chinoise
Salehi et al, 2002	17p12	-	Italienne
Justice et al, 2003	Xq23-Xq26	-	Américaine
Wise et al, 2000	6q	-	Américaine
	10q	-	Américaine
	18q	-	Américaine
Gao et al, 2007	8q12	CHD7	Américaine
Qiu et al, 2007	-	MTNR1B	Chinoise
Bashiardes et al, 2004	-	SNTG1	
Montanaro et al, 2006	-	MATN1	Italienne

2.2.6. Endocrinologie

2.2.6.1. Hormones de croissance

Plusieurs études indiquent que les adolescents et jeunes adultes scoliotiques sont plus grands que les sujets normaux du même âge (Willner, Nilsson et al. 1976; Skogland and Miller 1981; Shohat, Shohat et al. 1988; Nissinen, Heliovaara et al. 1993). Une étude en 1978 (Dymling and Willner 1978) démontre qu'un cas de scoliose s'était produit suite

à un traitement à l'hormone de croissance. Par contre, par la suite plusieurs études établissaient que le traitement à l'hormone de croissance n'était pas significativement relié au déclenchement ou à la progression de la scoliose (Wang, Drummond et al. 1997; Vidil, Journeau et al. 2001; Nagai, Obata et al. 2006; Day, McPhee et al. 2007). Qiu *et al.* (Qiu, Tang et al. 2007) ont aussi établi par l'étude des polymorphismes du récepteur à l'hormone de croissance qu'une mutation de ce gène n'est pas un facteur de prédiction de la scoliose. En effet, cinq polymorphismes dans le gène de GH ont été identifiés chez les patients SIA, mais leurs prévalences sont semblables dans le groupe de patients sains.

2.2.6.2. Mélatonine

L'implication de la mélatonine dans la scoliose idiopathique de l'adolescent a été établie par Thillard (Thillard 1959) et Machida *et al.* (Machida, Dubousset et al. 1995), lorsqu'ils ont découvert qu'une pinéalectomie chez le poulet induisait une scoliose lors de la croissance de celui-ci. Cette scoliose demeure après ré-implantation de la glande pinéale (Bagnall, Raso et al. 1999; Bagnall, Beuerlein et al. 2001) mais peut être corrigée avec des injections de mélatonine (Wang, Moreau et al. 1998). Plusieurs études ont alors voulu déterminer si les patients atteints de SIA étaient déficients en mélatonine (Bagnall, Raso et al. 1996; Hilibrand, Blakemore et al. 1996; Machida, Dubousset et al. 1996; Brodner, Krepler et al. 2000; Sadat-Ali, al-Habdan et al. 2000). Les résultats demeurent contradictoires, mais la majorité semble toutefois indiquer que les niveaux circulants de mélatonine sont normaux chez ces patients. Afin de rapporter aux mammifères ce qui avait été démontré chez le poulet, Machida a développé un modèle de rat pinéalectomisé (Machida, Murai et al. 1999). Par contre, seulement le rat bipède et déficient en mélatonine développait la scoliose. Ensuite, un modèle de souris constitutivement déficientes en mélatonine (C57BL/6J) et bipèdes a été développé (Oyama, Murai et al. 2006). Au niveau de l'humain, les travaux de Moreau et al (Moreau, Wang et al. 2004) ont permis de déterminer un défaut de signalisation de la mélatonine permettant de classer les patients SIA selon trois groupes en fonction de leur réponse à la mélatonine. Normalement, lorsque des ostéoblastes sont stimulés à la mélatonine, il y a inhibition de production d'AMPC en fonction de la concentration de mélatonine utilisée (Vanecek 1998; Brydon, Roka et al.

1999). Selon Moreau *et al.* (Moreau, Wang et al. 2004), un premier groupe de patients SIA répond avec une augmentation de production d'AMPc, le deuxième ne répond pas à la stimulation à la mélatonine et le troisième répond avec une légère inhibition de la production d'AMPc, mais qui est tout de même plus élevée que normal. Ceci indique qu'il y aurait un défaut de signalisation de la mélatonine chez les patients SIA, qui ne serait pas causé par une mutation dans les récepteurs à la mélatonine (MT1 et MT2) (Gerdin, Mseeh et al. 2003; Morcuende, Minhas et al. 2003) mais bien par les protéines G inhibitrices (Gi) qui sont couplées à ces récepteurs ou par les protéines qui les phosphorylent (Azeddine, Letellier et al. 2007). Plus récemment dans notre laboratoire, Letellier *et al.*, (Letellier, Azeddine et al. 2008) ont découvert qu'une stimulation des ostéoblastes des patients scoliotiques appartenant au premier groupe fonctionnel de la classification de Moreau *et al.* (Moreau, Wang et al. 2004), avec des estrogènes, rétabli les niveaux d'AMPc à la normale. Ceci implique une interaction entre les estrogènes, la mélatonine et les récepteurs MT2 de la mélatonine.

2.2.6.2.1. La signalisation de la mélatonine

La signalisation de la mélatonine s'effectue par des récepteurs membranaires, MT1 et MT2, ainsi que par des récepteurs nucléaires, RZR et ROR. Les récepteurs membranaires sont constitués de sept segments transmembranaires et sont couplés aux protéines G, majoritairement inhibitrices (Brydon, Roka et al. 1999; Barrett, Conway et al. 2003; New, Tsim et al. 2003). Via le récepteur MT1, la mélatonine diminue les taux intracellulaires d'AMPc, diminue l'activation de la PKA et inhibe la phosphorylation de CREP (cAMP-Responsive Element Binding Protein) (Masana and Dubocovich 2001). MT1 peut également activer la voie de la PKC (Protéine kinase C) par la formation de DAG (diacylglycérol) ainsi qu'augmenter la phosphorylation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Hazlerigg, Barrett et al. 1996; MacKenzie, Melan et al. 2002). Le récepteur MT2 exerce lui aussi les fonctions d'inhibition du taux de production d'AMPc ainsi que l'hydrolyse de l'inositolphosphate en DAG et en IP3 (inositol 3,4,5 triphosphate) (MacKenzie, Melan et al. 2002). La diversité des réponses exercées par la mélatonine est due entre autres à la distribution inégale des récepteurs MT1 et MT2 dans les tissus. Le récepteur MT1 est retrouvé dans la plupart des tissus et organes tandis que la distribution de

MT2 est plus limitée. Une différence entre MT1 et MT2 est le fait que MT2 peut provoquer la diminution du cGMP. De plus, il existe des ligands synthétiques spécifiques à MT2, tel que le 4-P-PDOT (4-phenyl-2-propionamidotetralin).

2.2.6.3. Estrogènes

Les hormones estrogéniques sont considérées depuis longtemps comme des facteurs potentiellement impliqués dans le développement de la scoliose. Le fait que cette maladie affecte principalement les filles, en nombre et en sévérité (Goldbloom 1994) indique que les estrogènes pourraient jouer un rôle dans la progression de la déformation. De plus, le début de la progression de la déformation coïncide avec la puberté et la ménarche chez les jeunes filles.

En 1986, M.P. Warren (Warren, Brooks-Gunn et al. 1986) publiait une étude qui montrait une prévalence de la scoliose chez environ 25% des danseuses de ballet, et que ce pourcentage augmentait avec le retard de la ménarche. Ces danseuses étaient aussi sujettes à de secondes périodes d'aménorrhée, ce qui cause une hypoestrogénisation. Leurs données indiquent donc qu'une ménarche tardive et des périodes prolongées d'aménorrhée peuvent prédisposer des jeunes adolescentes à la scoliose. Deux autres études ont regardé la ménarche chez les jeunes filles scoliotiques (Goldberg, Dowling et al. 1993; Grivas, Vasiliadis et al. 2006) mais leurs conclusions sont contradictoires. Grivas et al (Grivas, Vasiliadis et al. 2006) ont remarqué une influence de la situation géographique sur la prévalence de la scoliose par un effet de la mélatonine sur l'âge à la ménarche. En effet, la latitude agit sur la sécrétion de la mélatonine en fonction du nombre d'heures d'ensoleillement, ce qui affecte également l'âge à la ménarche. Peu d'heures d'ensoleillement retarde généralement la puberté. Grivas et al ont conclu qu'il existe une corrélation entre une ménarche tardive et une prévalence élevée de la scoliose (SIA) dans les pays nordiques tandis que les pays du sud ont moins de jeunes filles scoliotiques et une ménarche plus précoce. Par contre, une étude sur des jeunes filles scoliotiques de Dublin a révélé que ces filles ont une ménarche plus hâtive que la moyenne des filles du même âge (Goldberg, Dowling et al. 1993).

Durant les années 1980, on traitait les jeunes filles jugées trop grandes, lorsqu'elles dépassent 180,75cm, avec des estrogènes afin d'arrêter la croissance de celles-ci (Trygstad 1986). Ces traitements, avec des estrogènes (17 β -estradiol et ethinyl oestradiol) ou avec des antagonistes aux estrogènes (ZM189,154) ont un impact direct sur le développement d'une scoliose (Iwamuro, Sakakibara et al. 2003; Boudreau, Courtenay et al. 2004). Suite à ceci, des études ont mesuré les niveaux d'estrogènes (estradiol) et de testostérone chez les filles scoliotiques sans en arriver à des conclusions comparables. Deux études ont démontré qu'il n'y a pas de différence significative dans les niveaux circulants d'estrogènes entre les contrôles et les patients (Skogland and Miller 1980; Raczkowski 2007) alors qu'une troisième démontrait que les filles scoliotiques avaient presque la moitié moins d'estrogènes circulantes (28,201 pg/ml) que les contrôles (50,030 pg/ml) (Kulis, Zarzycki et al. 2006). Skogland et Miller (Skogland and Miller 1980) ont également démontré que les filles scoliotiques entre 9 et 12 ans d'âge squelettique avaient plus de testostérone dans leur sang que les contrôles du même âge, données qui ont été confirmées par une autre étude (Raczkowski 2007). En comparant les résultats de ces études, il est possible de conclure que ce ne serait pas les estrogènes qui induiraient la scoliose mais plutôt la réponse à cette hormone (Letellier, Azeddine et al. 2008).

2.3. Les estrogènes et la scoliose

Plusieurs faits indiquent que les estrogènes pourraient avoir un rôle dans la pathogénèse de la scoliose. D'abord, l'immaturation osseuse et le sexe féminin, deux indicateurs principaux de la progression de la scoliose, sont directement reliés aux estrogènes (Goldbloom 1994). De plus, les estrogènes ont un rôle établi dans la maturation osseuse et une maturation tardive a aussi été reliée à la scoliose. Par contre, d'un point de vue moléculaire, il n'existe pas de lien connu dans la littérature entre les estrogènes et la scoliose. Néanmoins, les estrogènes interviennent ou interagissent avec plusieurs facteurs impliqués dans l'étiologie de la scoliose idiopathique de l'adolescent, tel que démontré dans la figure 1.

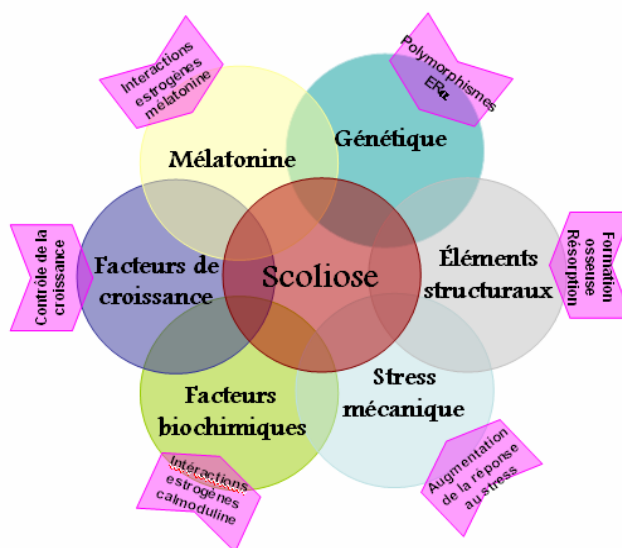


Figure 1. **Contribution des estrogènes au développement de la scoliose.** Les estrogènes agissent sur ou en concordance avec les facteurs étiologiques de la scoliose. Cette action est représentée par les flèches roses.

2.3.1. Les polymorphismes du récepteur ER α

L'action des estrogènes se fait majoritairement via deux récepteurs nucléaires, alpha (ER α) et beta (ER β). Depuis quelques années, ces deux récepteurs font l'objet d'intenses recherches, pour établir leur fonction et leur mode de signalisation. Certains polymorphismes du récepteur alpha ont été associés à des maladies, notamment au cancer de l'endomètre (Iwamoto, Fujino et al. 2003). Les polymorphismes PvuII (T/C 397) et XbaI (A/G 351) de l'intron 1 du gène *ER α* ont également été associés au type de courbure scoliothique, dans une population de jeunes japonaises, en 2002 par l'équipe de Inoue (Inoue, Minami et al. 2002). Selon leurs résultats, les filles ayant un phénotype XX ou Xx (c'est-à-dire les homozygotes Xba^{-/-} ou les hétérozygotes avec un allèle ne contenant pas le site Xba1) sont plus sujettes à faire des scoliothoses à haut degré de courbure. Par contre, cette étude ne comparait pas les patients SIA avec des sujets sains ou encore avec l'incidence de ces mêmes polymorphismes dans la population saine. En 2006, Wu *et al.* (Wu, Qiu et al. 2006) ont corrélié ces mêmes polymorphismes avec la susceptibilité à la SIA. Selon les résultats de cette étude faite sur une population de jeunes adolescentes chinoises, le génotype XX serait plus fréquent chez les patients SIA que chez les sujets contrôles. Cependant, il n'y a aucune différence significative entre la présence du polymorphisme PvuII chez les patients SIA et les sujets sains. La différence entre la fréquence du génotype XX était pourtant faible, ce qui a poussé l'équipe de J. Cheng (Tang, Yeung et al. 2006) à refaire une étude sur 800 jeunes adolescentes chinoises (540 patientes et 260 contrôles) afin de déterminer si il y avait bel et bien une association entre la susceptibilité et la sévérité de la SIA et les polymorphismes de l'intron 1 du gène du ER α . Ils sont arrivés à la conclusion qu'il n'y a aucune différence dans la prévalence des génotypes des polymorphismes XbaI et PvuII entre les sujets contrôles et les patients SIA. Par contre, aucune étude de fonctionnalité de ces polymorphismes n'a été faite jusqu'à ce jour.

2.3.2. Contrôle de la croissance par les estrogènes

Les estrogènes sont reconnus pour avoir un rôle sur l'os (Frank 2003) et la croissance osseuse (Weaver 2002; Balasch 2003). Le rôle crucial des estrogènes dans la régulation de la croissance a été confirmé par l'existence de deux mutations très rares. La

première est située dans le gène de l'aromatase et provoque le changement de l'arginine en position 375 en cystéine, ce qui diminue de 99,8% l'efficacité de cet enzyme et empêche la conversion des androgènes en estrogènes et testostérone (Morishima, Grumbach et al. 1995). La deuxième mutation affectant le récepteur aux estrogènes ER α est causé par l'introduction d'un codon d'arrêt dans l'exon 2, ce qui rend la protéine non-fonctionnelle (Smith, Boyd et al. 1994). Dans les deux cas, la croissance s'est poursuivie bien au-delà de la puberté ce qui implique, par conséquence, les estrogènes dans l'arrêt de la croissance.

L'impact majeur des estrogènes sur la croissance osseuse se passe au niveau de la plaque de croissance, ou plaque épiphysaire, et est médié par ses deux récepteurs, ER α et ER β . La présence de ces deux récepteurs dans les cellules humaines de la plaque de croissance a déjà été démontré (Kusec, Viridi et al. 1998; Nilsson, Chrysis et al. 2003). De plus, lors de la poussée de croissance à la puberté, ER α est exprimé plus fortement dans la plaque de croissance (Eastell 2005; Karperien, van der Eerden et al. 2005).

L'effet des estrogènes sur la croissance longitudinale des os est biphasique. À faibles concentrations, les estrogènes augmentent la croissance osseuse en stimulant la sécrétion de l'hormone de croissance (Frantz and Rabkin 1965; Ross, Cassorla et al. 1983; Veldhuis, Anderson et al. 2004). Par contre, à plus forte concentration, cette même hormone inhibe l'expansion clonale et la prolifération cellulaire de la zone hypertrophique, ce qui provoque la fermeture de la plaque épiphysaire et termine la croissance. De plus, les estrogènes induisent l'apoptose des chondrocytes de la plaque de croissance, ce qui inhibe la croissance linéaire (Weise, De-Levi et al. 2001; Parfitt 2002). À haute concentration, les estrogènes auront une action inhibitrice sur la sécrétion de l'hormone de croissance, ce qui provoque l'arrêt définitif de la croissance longitudinale (Drop, De Waal et al. 1998). Il existe aussi l'hypothèse que ce serait seulement une exposition continue à de faibles doses d'estradiol qui provoquerait la fermeture des plaques épiphysaires (Klein, Martha et al. 1996).

2.3.3. Contrôle de la formation et de la résorption osseuse par l'action sur les ostéoblastes et les ostéoclastes

Les estrogènes ont un rôle essentiel dans la gestion du remodelage osseux (Figure 2) (Riggs, Khosla et al. 2002). Ceci est bien illustré par la ménopause, période où la femme connaît une diminution des estrogènes circulants ainsi que plusieurs changements au niveau des os. La puberté est aussi une période importante où il y a une augmentation majeure du remodelage osseux, (Riis, Krabbe et al. 1985; Theintz, Buchs et al. 1992; Slemenda, Reister et al. 1994), ce qui coïncide avec la plus importante période de formation osseuse et augmentation de la masse osseuse (Magarey, Boulton et al. 1999).

2.3.3.1. Ostéoclastes

Les estrogènes ont des effets bien distincts sur chaque type cellulaire de l'os. D'abord, les ostéoclastes, responsables de la résorption osseuse, sont des cellules dérivées de la lignée hématopoïétique, et sont différenciées sous l'influence de plusieurs cytokines produites par les ostéoblastes, les cellules stromales et les lymphocytes, qui agissent de façon autocrine et paracrine (Suda, Nakamura et al. 1997). Les estrogènes, par leurs récepteurs, seraient responsables de gérer l'équilibre délicat de la production de ces cytokines, régissant par conséquent la formation de nouveaux ostéoclastes (Manolagas and Jilka 1992) (Figure 2). Par exemple, les estrogènes diminuent la production de M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) et de $TNF\alpha$ (Tumor Necrosis Factor), deux cytokines nécessaires à la formation d'ostéoclastes (Srivastava, Weitzmann et al. 1998; Srivastava, Weitzmann et al. 1999). De fait, les souris femelles ovariectomisées montrent une résorption osseuse accrue qui est caractérisée par une augmentation du $TNF-\alpha$ (Kitazawa, Kimble et al. 1994) et l'absence de récepteurs aux estrogènes provoque l'augmentation de la production du $TNF-\alpha$ (Cenci, Weitzmann et al. 2000). Aussi, les estrogènes suppriment via $NF-\kappa B$ (Nuclear Factor kappa B) et C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein), la production de IL-6 (Interleukine 6) par les ostéoblastes, la sécrétion de IL-6 par les monocytes (Bernard-Poenaru, Roux et al. 2001) et la production de deux sous-unités du récepteur à l'IL-6 (Lin, Yamate et al. 1997). Or, IL-6 est essentielle à la

prolifération des ostéoclastes (Manolagas, Kousteni et al. 2002). Une récente étude a mis en évidence un polymorphisme du gène de IL-6 associé à une prévalence plus élevée de la scoliose (Aulisa, Papaleo et al. 2007), mais l'impact de ce polymorphisme sur la fonctionnalité de IL-6 n'a pas été élucidé. Finalement, les estrogènes augmentent le taux d'apoptose des ostéoclastes (Kameda, Mano et al. 1997), (Kousteni, Chen et al. 2002) via le récepteur ER α (Nakamura, Imai et al. 2007), en induisant la production de Fas-L, ou « ligand de la mort ». Les estrogènes régissent donc étroitement sur le nombre d'ostéoclastes actifs qui peuvent résorber l'os.

2.3.3.2. Ostéoblastes

L'action des estrogènes sur les ostéoblastes est effectuée de façon indirecte et semble être destinée majoritairement à gérer la formation d'ostéoclastes. Premièrement, les estrogènes diminuent la production de RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B-Ligand) et augmentent la production de OPG (ostéoprotégérine), un récepteur de RANKL (Suda, Nakamura et al. 1997), ce qui empêche la liaison avec RANK et la différenciation des ostéoclastes (Zallone 2006). En effet, les ostéoblastes agissent directement sur la différenciation des ostéoclastes par le système RANK/RANKL (Wong, Josien et al. 1998). Le contact entre RANKL sur les ostéoblastes et RANK sur les ostéoclastes est nécessaire au passage des pré-ostéoclastes en ostéoclastes (Kong, Boyle et al. 1999; Lam, Takeshita et al. 2000). Deuxièmement, la diminution induite par les estrogènes de la production de l'interleukine-1 (IL-1) et du TNF- α par les monocytes de la moelle osseuse provoque également une diminution et une augmentation de la production de RANK-L et d'OPG respectivement par les ostéoblastes (Hofbauer, Gori et al. 1999; Bord, Ireland et al. 2003). Les estrogènes permettent ainsi une augmentation de la masse osseuse en diminuant la résorption par les ostéoclastes. L'effet général des estrogènes sur le remodelage osseux est donc de diminuer l'activation de ce processus et de diminuer le nombre d'ostéoclastes. (Eastell 2005). Les estrogènes ont aussi la propriété d'activation des BMP (Bone Morphogenic Proteins), afin de favoriser la différenciation des cellules pré-ostéoblastiques en ostéoblastes (Yamamoto, Saatcioglu et al. 2002; Cao, Bu et al. 2003; Zhou, Turgeman et al. 2003). Ceci augmenterait légèrement le nombre d'ostéoblastes et par conséquent la formation de nouvelle matrice osseuse.

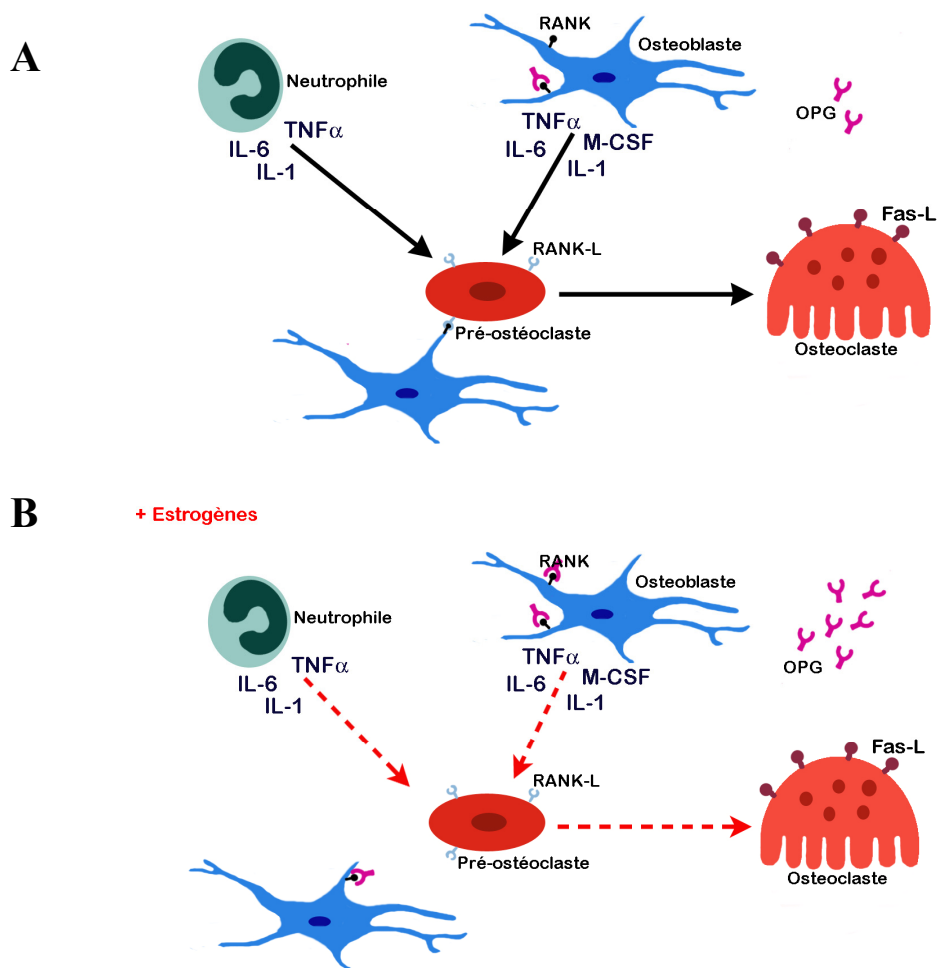


Figure 2 : **Effets des estrogènes sur la formation des ostéoclastes.** **A.** Situation physiologique sans estrogènes, où la formation des ostéoclastes est influencée par la sécrétion de cytokines par les neutrophiles et les ostéoblastes. **B.** Situation physiologique avec estrogènes, où la sécrétion des cytokines par les neutrophiles et les ostéoblastes ainsi que RANKL est diminuée, tandis que OPG est augmentée, ce qui inhibe la formation de nouveaux ostéoclastes.

2.3.4. Rôle sur la régression osseuse (ostéopénie et ostéoporose)

L'incidence de l'ostéopénie (densité osseuse diminuée) chez les scoliotiques est d'environ 20%, ce qui est beaucoup plus élevé que chez les enfants normaux (Burner, Badger et al. 1982; Velis, Healey et al. 1989; Cheng, Tang et al. 2001; Lee, Cheung et al. 2005; Cheung, Lee et al. 2006; Szalay, Bosch et al. 2008). De plus, plusieurs femmes ostéopéniques et ostéoporotiques montrent des courbures du rachis (Healey and Lane 1985), ce qui relie encore une fois l'ostéopénie et la scoliose. Une étude récente confirme que l'ostéopénie est généralisée chez les adolescents scoliotiques (Cheng, Qin et al. 2000) et pas seulement au niveau de la colonne vertébrale, comme prétendu dans certaines études (Cook, Harding et al. 1987; Thomas, Cook et al. 1992). Les patients atteints de SIA démontrent aussi un taux d'augmentation du contenu minéral osseux plus lent que celui des adolescents non scoliotiques (Cheng, Guo et al. 1999). Également, une étude a établi une corrélation inverse entre la densité minérale osseuse faible et la sévérité ajustée à l'âge de la déformation scoliotique (Lee, Cheung et al. 2005). Cheng *et al.*, (Cheng, Qin et al. 2000) ont même suggéré que l'ostéopénie chez les filles scoliotiques serait un problème primaire plutôt qu'une conséquence secondaire à la déformation et que la faible densité minérale osseuse pourrait être causée par une prise insuffisante de calcium à la puberté (Lee, Cheung et al. 2005; Cheung, Lee et al. 2006). Ces dernières études démontrent que malgré un taux de formation de l'os accru chez les patients SIA la faible consommation de calcium causerait un déséquilibre du contenu minéral osseux.

L'ostéopénie est aussi associée aux estrogènes puisque celles-ci contrôlent le taux de résorption osseuse. Lorsqu'il y a une diminution de la concentration d'estrogènes circulants, on constate une augmentation de la résorption et une diminution de la formation de nouvel os. L'ostéopénie est donc fortement reliée à une concentration décroissante d'estrogènes circulants. En effet, plusieurs études montrent que des femmes en aménorrhée ont des densités minérales osseuses inférieures à des densités minérales osseuses normales (Klibanski, Biller et al. 1988); (Biller, Coughlin et al. 1991); (Grinspoon, Miller et al. 1999).

2.3.5. Réponse au stress mécanique

La stimulation mécanique est reconnue pour activer la formation osseuse (Turner, Riggs et al. 1994; Cheng, Zaman et al. 1996) alors que l'immobilisation favorise la résorption osseuse (Tilton, Degioanni et al. 1980; Whedon and Damianos 1993). Le stress mécanique peut provenir de la croissance ou d'une force externe appliquée sur l'os mais la réaction de l'os demeure toujours la même: le remodelage osseux. Les estrogènes peuvent exacerber cet effet suite à une stimulation mécanique (Lanyon 1996; Lanyon, Armstrong et al. 2004).

Plusieurs études montrent que le processus de réponse des ostéoblastes au stress mécanique passe par le récepteur $ER\alpha$ (Damien, Price et al. 1998; Lee, Jessop et al. 2004; Zaman, Jessop et al. 2006; Aguirre, Plotkin et al. 2007) et par la voie des Wnt (protéine de signalisation impliquée entre autres dans l'embryogénèse) (Norvell, Alvarez et al. 2004; Hens, Wilson et al. 2005). L'étude de Armstrong *et al.*, (Armstrong, Muzylak et al. 2007) a définitivement relié les deux voies en montrant d'abord que la voie Wnt/ β -caténine est impliquée dans la réponse des ostéoblastes au stimulus mécanique et que cette réponse est beaucoup diminuée lorsque le récepteur $ER\alpha$ est inhibé ou absent. Ceci implique que les estrogènes interagissent directement ou indirectement avec la voie de Wnt pour modifier le comportement cellulaire suite à une pression mécanique.

L'implication de la voie des Wnt dans la réponse de l'os au stress mécanique a d'abord été proposée lorsque plusieurs mutations de la protéine LRP5 ont mené à des désordres osseux. Une mutation activatrice pour LRP5 est associée à une densité osseuse élevée (Boyden, Mao et al. 2002; Little, Carulli et al. 2002) et la perte de fonction cause une plus faible densité minérale osseuse (Gong, Slee et al. 2001). Il a été prouvé aussi que lorsqu'une stimulation mécanique est appliquée sur un os de souris qui a une mutation gain de fonction de LRP5, la réponse ostéogénique au stimulus mécanique est plus importante que celle des types sauvages (Gong, Slee et al. 2001). Ces faits impliquent LRP5 à la réponse des cellules osseuses au stress mécanique. Les ostéocytes, cellules situées profondément dans l'os et qui agissent comme des « mécanorécepteur », détectant la

pression mécanique, (Aarden, Burger et al. 1994) utiliseraient aussi la voie des Wnt afin d'envoyer des signaux chimiques (Bonewald and Johnson 2008) attirant sur place des ostéoblastes et des ostéoclastes, provoquant le remodelage osseux.

L'indication majeure que les estrogènes sont nécessaires pour la réponse aux ostéoblastes aux stimuli mécaniques nous vient de l'étude de Damien *et al.*, (Damien, Price et al. 1998) où il est décrit que la prolifération stimulée par une force mécanique appliquée est complètement bloquée par les antagonistes des estrogènes tamoxifène et ICI 182,780. De plus, l'ajout d'estrogènes sur des ostéoblastes qu'on stimule avec une charge mécanique augmente la prolifération cellulaire de façon additive. Les souris déficientes en ER α ont une réponse ostéogénique beaucoup moindre que les souris normales, ce qui indique que ER α est nécessaire au remodelage osseux associé à une perturbation mécanique (Lee, Jessop et al. 2004). ER β semble provoquer une réponse contraire à ER α lors de la réponse au chargement mécanique, par contre, son rôle est encore controversé (Lee, Jessop et al. 2004; Saxon and Turner 2005). Finalement, les ostéocytes utilisent les récepteurs aux estrogènes ER α afin de répondre au stimulus mécanique, ce qui suggère que leur rôle de « mécanostat » pourrait être via ces même récepteurs (Zaman, Jessop et al. 2006).

2.3.6. Interaction estrogène-mélatonine

Plusieurs études ont montré qu'un défaut de signalisation de la mélatonine pourrait être à l'origine de la scoliose idiopathique de l'adolescent (Thillard 1959; Machida, Dubousset et al. 1995; Moreau, Wang et al. 2004), sans pour autant expliquer pourquoi la scoliose atteint plus particulièrement les filles. Or, les estrogènes et la mélatonine exercent une régulation négative l'un sur l'autre (Cos, Fernandez et al. 1998). L'étude des interactions entre la mélatonine et les estrogènes a surtout été effectuée dans les cellules cancéreuses du sein, où la mélatonine semble avoir un rôle oncostatique (Cos and Sanchez-Barcelo 2000). La mélatonine, via le récepteur MT1 (Jones, Melan et al. 2000) diminue l'expression de l'ARNm des récepteurs aux estrogènes (Molis, Spriggs et al. 1994; Ram, Kiefer et al. 1998) et inhibe l'expression de protéines régulées par ceux-ci, par exemple TGF α , c-myc, et pS2 (Molis, Spriggs et al. 1994; Mediavilla, Guezmez et al. 1997). De

leur côté, les estrogènes inhibent la synthèse de la mélatonine (del Rio, Garcia Pedrero et al. 2004; Sanchez-Barcelo, Cos et al. 2005) en plus de diminuer la production des protéines Gi (Papaioannou, Tumber et al. 1999). Les estrogènes et la mélatonine ont des actions opposées sur l'AMPc; les estrogènes activent l'adénylate cyclase et augmente le taux d'AMPc tandis que la mélatonine diminue l'AMPc par les protéines G inhibitrices. Récemment dans notre laboratoire (Letellier, Azeddine et al. 2008), nous avons démontré que les estrogènes pourraient corriger la signalisation de la mélatonine dans le premier groupe fonctionnel de la classification de Moreau *et al.* (Moreau, Wang et al. 2004). Ainsi, le traitement aux estrogènes serait bénéfique dans le cas de ces patients.

2.3.7. Interaction estrogène calmoduline

Plusieurs études ont remarqué une augmentation du niveau de l'expression et de l'activité de la calmoduline dans les plaquettes des patients SIA (Peleg, Eldor et al. 1989; Kindsfater, Lowe et al. 1994). Ceci semblerait même être un facteur de prédiction de la progression de la courbe (Meyer, More et al. 1987; Lowe, Lawellin et al. 2002). Or, la calmoduline est essentielle pour la transcription des gènes qui répondent aux estrogènes (Li and Sacks 2007). Il y a une forte interaction entre le récepteur aux estrogènes ER α et la calmoduline qui module non seulement l'expression des gènes mais la dégradation de ce récepteur (Garcia Pedrero, Del Rio et al. 2002). Ceci implique que la signalisation des estrogènes pourrait être affectée par le malfonctionnement de la calmoduline chez les patients scoliotiques.

2.4. Récepteurs aux estrogènes

La réponse aux estrogènes est médiée par deux types de récepteurs, soient des récepteurs nucléaires, ER α et ER β et des récepteurs membranaires à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, tel que GPR30 (Prossnitz, Arterburn et al. 2008). Les premiers génèrent une réponse lente, qui implique la transcription de gènes, tandis que les autres provoquent une réponse rapide, qui implique l'accumulation intracellulaire de seconds messagers tels que le calcium et l'AMP cyclique (Morley, Whitfield et al. 1992; Moss, Gu et al. 1997).

2.4.1. Les récepteurs nucléaires aux estrogènes

Les récepteurs aux estrogènes, ER α et ER β font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, c'est-à-dire des récepteurs dont l'action principale se joue dans le noyau. Ces récepteurs médient l'action des estrogènes sur un grand nombre de tissus (Lindner, Kim et al. 1998; Weihua, Saji et al. 2000; Mitra, Hoskin et al. 2003; Barchiesi, Jackson et al. 2004; Valimaa, Savolainen et al. 2004). Ces deux récepteurs sont retrouvés en proportions différentes selon le type de tissus (Enmark, Pelto-Huikko et al. 1997) et ceci affectera aussi la réponse du tissu aux estrogènes. Les estrogènes ont aussi une action différente selon quel récepteur est présent en plus grande quantité (Faulds, Olsen et al. 2004; Helguero, Faulds et al. 2005).

Plus récemment, la présence des récepteurs aux estrogènes, ER α et ER β , dans les tissus osseux a été démontrée. Kusec *et al.* (Kusec, Virdi et al. 1998) ont illustré par hybridation *in situ* la présence de ER α dans différentes portions de la plaque de croissance ainsi que sur de l'os humain et léporidé. L'expression de ER β dans l'os a été d'abord caractérisé chez le rat, par Onoe *et al.* (Onoe, Miyaura et al. 1997) et ensuite chez l'humain, par immunohistochimie sur des biopsies osseuses obtenues de patients de 21-74 ans (Braidman, Hailey et al. 2001). Plus précisément, les récepteurs aux estrogènes sont retrouvés dans les ostéoblastes (Denger, Reid et al. 2001) et dans les ostéoclastes (Denger, Reid et al. 2008).

2.4.1.1. Domaines protéiques

Tous les récepteurs nucléaires, y compris les isoformes des récepteurs aux estrogènes ER α et ER β contiennent les domaines suivants : Domaines d'activation de la transcription ou transactivation (AF, région A/B) Domaine de liaison à l'ADN (DBD, région C), Domaine de liaison au ligand (LBD, région E et F), peptide-signal de localisation nucléaire (NLS, région D) et une région charnière (région D) (Kato, Sato et al. 2005) (Figure 3). Le domaine C possède deux structures en « doigt de zinc », qui sont impliqués dans la liaison à l'ADN (Schwabe, Neuhaus et al. 1990) et qui, conjointement avec la région E sont responsables de la dimérisation des récepteurs. Il y a deux domaines

de transactivation chez ER α ; un en N-terminal (AF-1) qui est ligand-indépendant et un en C-terminal (AF-2), ligand-dépendant (Shiau, Barstad et al. 1998). Une activation maximale du récepteur requiert la participation des deux domaines d'activation (Benecke, Chambon et al. 2000). Par contre, ER β semble avoir une activité diminuée du AF-1 mais possède un AF-2 complètement fonctionnel. Le domaine de liaison au ligand comprends une hélice α (H12) qui change de conformation selon le ligand qui est lié au récepteur (Moras and Gronemeyer 1998). Ces différentes conformations permettent de recruter différents cofacteurs transcriptionnels, ce qui provoque les variances dans les fonctions de ER α et ER β (Collingwood, Urnov et al. 1999; Mak, Hoare et al. 1999).

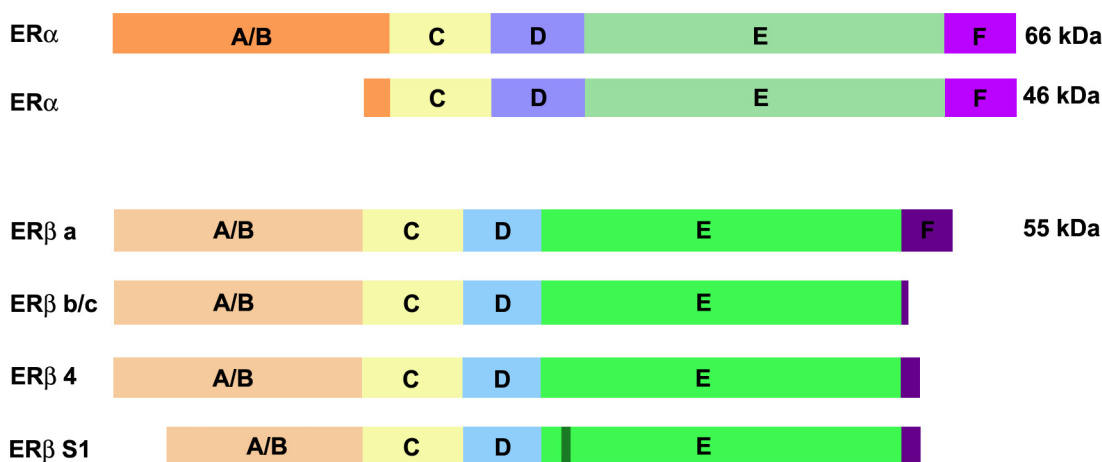


Figure 3: **Comparaison des isoformes de ER α et ER β et de leurs domaines protéiques.** Représentation de la longueur des différents domaines composant les récepteurs aux estrogènes. Le domaine A/B contient le domaine de transactivation (AF1). Le domaine de liaison à l'ADN est situé dans la région C tandis que le domaine de liaison au ligand est dans les régions E et F. Le peptide-signal de localisation nucléaire (NLS) et la région charnière font la région D. La zone ombragée du domaine E de l'isoforme ER β S1 représente une insertion de 52 paires de bases spécifiques à cet isoforme.

2.4.1.2. Leurs isoformes

2.4.1.2.1. *ER α*

Pendant plusieurs années, ER α était le seul récepteur connu pour les estrogènes. Découvert dans les années 1960 par Toft et Gorski (Toft, Shyamala et al. 1967), cela a pris quelques années avant qu'on identifie les isoformes de ER α . Le gène du récepteur ER α totalise environ 140 kb, et la formation des différents transcrits de ER α est un processus complexe qui implique au moins sept promoteurs différents. La plupart de ces transcrits donnent naissance à une protéine de 66kDa, variant dans la région non-codante 5'(Reid, Denger et al. 2002). En 2000, Flouriot *et al.* (Flouriot, Brand et al. 2000) ont identifié un isoforme de ER α de 46 kDa, comparativement à la forme native de 66 kDa (Figure 3). De plus, il ne contient pas le domaine de transactivation AF-1 (domaine d'activation 1). Cet isoforme est formé par épissage alternatif et est fonctionnel lorsqu'il homo-dimérise ou s'hétéro-dimérise avec la forme native de ER α ou bien avec ER β . De plus, il semble avoir une meilleure affinité avec l'ADN que la forme ER α de 66 kDa (Denger, Reid et al. 2001). Son action serait répressive vis-à-vis la forme complète de ER α (Flouriot, Brand et al. 2000).

2.4.1.2.2. *ER β*

En 1996, Mosselman *et al.* (Mosselman, Polman et al. 1996) ont découvert un deuxième récepteur aux estrogènes, qu'ils ont nommé ER β . En comparant les domaines protéiques de ER α et ER β , ils ont constaté une très grande homologie dans les domaines de liaison à l'ADN et de liaison au ligand. Par contre, tous les autres domaines montrent des différences significatives, qui confèrent à ces deux récepteurs des fonctions différentes. Lors de la découverte de ER β , les chercheurs ont d'abord cru que cette protéine était le fruit d'un épissage du gène de ER α . Par contre, cette hypothèse fut rapidement rejetée lorsqu'il fut découvert que les deux gènes sont situés sur des chromosomes différents (le locus de ER α est 6q25.1 et ER β est situé au locus 14q23-24.1) (Enmark, Pelto-Huikko et al. 1997). Le récepteur ER β se trouve sous plusieurs formes différentes, dont cinq qui ont été décrites par Moore *et al.* (Moore, McKee et al. 1998) et une autre par Wilkinson *et al.* (Wilkinson, Dahllund et al. 2002). Les exons forment des fragments d'environ 7 - 9,5 kb (Enmark,

Pelto-Huikko et al. 1997) et forment des protéines d'environ 55 kDa. Les différences majeures entre les isoformes de ER β se trouvent dans le domaine F, qui fait partie du domaine de liaison au ligand (Figure 3). Ces différences semblent donc jouer un rôle dans la spécificité de la liaison au ligand mais aussi dans l'expression tissulaire (Moore, McKee et al. 1998). De plus, certains isoformes n'ont pas d'activité transcriptionnelle mais servent à inhiber spécifiquement ER α (Ogawa, Inoue et al. 1998).

2.4.1.3. Ligands

Les récepteurs aux estrogènes lient plusieurs ligands physiologiques et synthétiques, avec des affinités différentes pour chaque ligand. Les deux récepteurs ont 56% d'homologie de leur domaine de liaison au ligand (McDonnell, Clemm et al. 1995; Kuiper, Lemmen et al. 1998), leur donnant la même affinité pour le ligand physiologique (estradiol, E2). Par contre, il n'y a que deux acides aminés de différents dans la séquence qui forme la poche de liaison avec le ligand. Ceci confère une légère différence entre les deux poches mais qui a des répercussions importantes sur les préférences des récepteurs au niveau de leurs ligands synthétiques. Ces dernières sont résumées dans le tableau II ci-dessous. Les SERMs (selective ER modulators), ligands synthétiques des ER dont font partie le tamoxifène et le raloxifène, ont un potentiel agoniste/antagoniste en fonction des récepteurs liés ainsi que des tissus cibles. Par exemple, le tamoxifène est antagoniste des ER dans le sein mais agoniste dans l'utérus et le raloxifène est antagoniste des ER dans le sein et agoniste dans l'os (Haskell 2003).

Tableau II : Ligands naturels et synthétiques des récepteurs aux estrogènes, avec leur spécificité pour ER α ou ER β .

Nom	Type	Agoniste/Antagoniste	Préférence	REF
17- β -estradiol	Estrogène endogène	Agoniste de ER α et ER β	ER α et ER β , même affinité	Kuiper <i>et al.</i> , 1997 ¹
Genistein	Phytoestrogen	Agoniste partiel ER β	ER β	Kuiper <i>et al.</i> , 1997 ¹
Daidzein	Phytoestrogène	Agoniste	ER β	Kuiper <i>et al.</i> , 1997 ¹
Diethylstilbestrol (DES)	Estrogène synthétique	Agoniste	ER α et ER β	Couse et Korach, 2004 ²
Tamoxifen	Anti-estrogène	Dépendant du tissu cible	ER α	Barkhem <i>et al.</i> , 1998 ³
Raloxifen	Anti-estrogène	Dépendant du tissu cible	ER α	Barkhem <i>et al.</i> , 1998 ³
ICI 164 384	Anti-estrogène	Antagoniste	ER β	Van den Bemb <i>et al.</i> , 1999 ⁴

1. (Kuiper, Lemmen et al. 1998); 2. (Couse and Korach 2004); 3. (Barkhem, Carlsson et al. 1998); 4. (Van Den Bemd, Kuiper et al. 1999)

2.4.1.4. Activité transcriptionnelle

2.4.1.4.1. Dépendant à la liaison au ligand

Les récepteurs aux estrogènes font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones stéroïdiennes (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995). Ces récepteurs sont des facteurs de transcription, c'est-à-dire qu'ils participent activement à la transcription de certains gènes (Ascenzi, Bocedi et al. 2006). Il existe deux types de gènes régulés ou influencés par les estrogènes : ceux qui possèdent une séquence consensus, élément de réponse aux estrogènes (ERE) 5'-GGTCAnnnTGACC-3' situé près du promoteur (Klein-Hitpass, Schorpp et al. 1986) et ceux qui sont régulés par un autre facteur de transcription qui recrute les ERs tel que SP-1 et AP-1 (Kushner, Agard et al. 2000; Safe 2001). Afin d'activer la transcription, les récepteurs doivent lier le ligand et former des dimères. Lorsqu'un homodimère se lie à la séquence palindromique consensus, des co-activateurs de la transcription sont recrutés afin de débiter la transcription du gène estrogène-dépendant (Beato, Chalepakis et al. 1989; Gorski 1993). Il a aussi été rapporté que ER α et ER β forment des hétérodimères en présence du co-activateur des récepteurs stéroïdiens SRC-1 (Cowley, Hoare et al. 1997; Pace, Taylor et al. 1997; Tremblay,

Tremblay et al. 1999). Le rôle physiologique de cet hétérodimère n'est pas encore élucidé, par contre il semblerait que l'hétérodimère mimique l'homodimère ER α -ER α (Li, Huang et al. 2004). ER α peut également lier un ERE incomplet, lorsque cette séquence est située près d'un site SP-1 et est en présence du facteur Sp1 (Porter, Saville et al. 1997).

2.4.1.4.2. Indépendant au ligand

Habituellement, les récepteurs doivent être liés aux estrogènes, afin de dimériser et activer la transcription (Nilsson and Gustafsson 2002). Par contre, il existe une activation des ER qui est hormone-indépendante. Ceci implique qu'un signal provenant de l'environnement de la cellule provoque une phosphorylation dans le domaine AF-1, au niveau de la sérine 118 pour ER α et de la sérine 106 et 124 pour ER β (Kato, Endoh et al. 1995; Bunone, Briand et al. 1996; Tremblay, Tremblay et al. 1999). Cette phosphorylation est surtout positive, c'est-à-dire active la formation de dimères et la liaison à l'ADN (Castano, Vorojeikina et al. 1997). Par contre, la phosphorylation de ER α sur la sérine 236, réprime et inhibe l'action de ce récepteur (Chen, Pace et al. 1999).

2.4.1.5. Contrôle de la transcription

Le contrôle de la transcription des gènes régulés par les récepteurs aux estrogènes semble être relié au contrôle de la demi-vie du récepteur lui-même. En effet, lorsque ER α est lié à l'estradiol ou un agoniste, la dégradation du complexe par le protéasome 26S est accélérée de sorte que la demi-vie du récepteur passe de 4h à 3h (Eckert, Mullick et al. 1984; Alarid, Bakopoulos et al. 1999; Lonard, Nawaz et al. 2000). Le signal d'activation par la phosphorylation est également impliqué dans la dégradation du récepteur, tel que démontré pour ER β (Picard, Charbonneau et al. 2008). Un contrôle est aussi assuré par les isoformes eux-mêmes. Par exemple, lorsque ER β est co-exprimé avec ER α , ER β exerce une action inhibitrice sur ER α , lorsque les concentrations d'estrogènes sont basses (Paech, Webb et al. 1997; Ogawa, Inoue et al. 1998; Lindberg, Moverare et al. 2003). Finalement, la forme active du récepteur régule aussi intrinsèquement la transcription des gènes dans la cellule. En effet, les domaines AF-1 et AF-2 de ER α ne sont pas actifs dans tous les tissus, ce qui implique que ER α n'aura pas une conformation et une action identiques dans tous

les tissus. ER α fonctionne donc d'une manière cellule et promoteur dépendant (Hall and McDonnell 1999). Contrairement à ER α , le domaine AF-2 de ER β fonctionne comme un domaine d'activation indépendant de AF-1, ce qui lui donne une action répressive dans certaines conditions (Ogawa, Inoue et al. 1998).

2.4.1.6. Action sur l'os

L'action des estrogènes sur l'os semble être déterminée en fonction de la concentration d'estrogènes présents, du récepteur qui est activé, de l'endroit dans l'os ainsi que du sexe. L'analyse de la croissance osseuse chez les souris invalidées pour ER α et ER β démontre que l'absence des récepteurs aux estrogènes ne produit pas les mêmes effets chez les mâles et les femelles (Windahl, Vidal et al. 1999; Lindberg, Alatalo et al. 2001; Sims, Dupont et al. 2002; Chagin, Lindberg et al. 2004). Chez la souris mâle et femelle, une délétion de ER α diminue le remodelage osseux, augmente le taux de formation osseuse, augmente le volume osseux trabéculaire et réduit l'épaisseur de l'os cortical (Sims, Dupont et al. 2002; Parikka, Peng et al. 2005). Les différences entre mâles et femelles résident dans la qualité de l'os puisque les os des mâles sont plus minces et plus fragiles et chez la femelle, les os sont plus courts (Lindberg, Alatalo et al. 2001; Parikka, Peng et al. 2005). ER β aurait également un effet sur la densité minérale osseuse chez la souris femelle puisqu'une délétion de ce récepteur augmente le contenu minéral osseux de l'os trabéculaire, l'aire de l'os cortical et la croissance radiale de l'os (Windahl, Vidal et al. 1999; Sims, Dupont et al. 2002). Chez les deux sexes, on observe chez les souris ER β -/- une croissance axiale et appendiculaire augmentée (Chagin, Lindberg et al. 2004). Par contre, ER β réprimerait la croissance longitudinale (Lindberg, Alatalo et al. 2001). Chez la souris femelle seulement, ER β aurait un rôle redondant avec ER α sur la fusion des épiphyses et sur la résorption osseuse lorsque ER α est absent (Lindberg, Alatalo et al. 2001; Sims, Dupont et al. 2002; Chagin, Lindberg et al. 2004). Ces phénomènes ne seraient pas observés chez le mâle (Windahl, Vidal et al. 1999; Sims, Dupont et al. 2002). Par conséquent, ER α influence la croissance osseuse chez le mâle et la femelle, et ER β seulement chez la femelle. Par contre, dans toutes ces études, il est possible que les souris mutantes n'étaient pas complets, ou bien qu'il y a eu interférence avec la testostérone et les

androgènes, ce qui aurait pu fausser les résultats de l'influence des récepteurs aux estrogènes sur l'os. Il est donc très difficile de discerner les effets indépendants des deux récepteurs, d'autant plus qu'ils ont des effets compensatoires l'un sur l'autre si ils sont co-exprimés dans les mêmes tissus. Chez l'humain, on remarque la présence du récepteur ER α principalement dans l'os cortical, tandis que ER β est plus présent dans l'os spongieux (Bord, Horner et al. 2001). Il a aussi été rapporté qu'un homme ayant une mutation homozygote de ER α montrait des signes d'ostéoporose sévère ainsi que des épiphyses non-fermées, bien qu'il avait terminé sa puberté (Smith, Boyd et al. 1994). Ceci implique ER α dans le contrôle de la croissance osseuse chez l'humain, ainsi que dans le remodelage osseux. Par contre, aucune étude n'a été faite sur ER β chez l'humain dans l'os.

2.4.2. Récepteurs membranaires

La réponse classique des estrogènes se passe via les récepteurs nucléaires. Par contre, les estrogènes peuvent aussi activer la production de messagers secondaires dont l'AMPc, l'entrée de calcium dans la cellule (Watson, Jeng et al. 2008) la génération de phosphate inositol (Le Mellay, Grosse et al. 1997) et l'activation des MAPK (Watson, Campbell et al. 2002), ce qui suppose l'activité de récepteurs membranaires. L'origine de ces récepteurs a longtemps été discutée à savoir si ceux-ci sont structurellement différents des récepteurs nucléaires (Tesarik and Mendoza 1995; Ramirez and Zheng 1996), ou bien si ce ne sont que des variants d'épissage des récepteurs nucléaires, situés à la membrane (Pietras and Szego 1980; Watson, Pappas et al. 1995; Razandi, Pedram et al. 1999). Par contre, depuis le début des années 2000, le récepteur GPR30 jusqu'alors un récepteur couplé aux protéines G orphelin, est considéré comme le récepteur membranaire responsable de l'activation de messagers secondaires par les estrogènes (Filardo, Quinn et al. 2000). Ce récepteur peut même intervenir dans la régulation des gènes qui répondent normalement à l'activation des récepteurs nucléaires, ER α et ER β (Maggiolini, Vivacqua et al. 2004; Ylikomi, Vienonen et al. 2004). Récemment, l'interaction entre les récepteurs membranaires des estrogènes et les récepteurs à la mélatonine a été mis en évidence chez les ostéoblastes de patients scoliotiques (Letellier, Azeddine et al. 2008). En effet,

l'estradiol aurait un effet sur la liaison des protéines G et le récepteur MT2, ce qui pourrait être bénéfique pour certains patients scoliotiques.

2.4.3. Récepteurs Reliés aux ER (Estrogen Receptor-Related Receptors)

Les récepteurs $ERR\alpha$, $ERR\beta$ et $ERR\gamma$ font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires et ont été identifiés grâce à l'homologie de leurs séquences aux récepteurs des estrogènes (Giguere, Yang et al. 1988). Par contre, les ligands de ces récepteurs restent inconnus puisque ces récepteurs ne peuvent pas lier ou être activés par les estrogènes. L'expression de $ERR\beta$ est prédominante chez l'embryon (Luo, Sladek et al. 1997) mais $ERR\alpha$ est retrouvé dans plusieurs tissus adultes, y compris l'os (Bonnelye and Aubin 2005). Étant donné leur homologie avec les ER dans le domaine de liaison à l'ADN (Vanacker, Bonnelye et al. 1999), les ERR peuvent induire la transcription de gènes contenant la séquence ERE (Vanacker, Delmarre et al. 1998). En ce sens, ils peuvent interférer dans la régulation de gènes par les récepteurs aux estrogènes.

2.5. Phytoestrogènes

Les phytoestrogènes sont des composés chimiques retrouvés dans la nature qui ont des propriétés estrogéniques par leur capacité à se lier aux récepteurs aux estrogènes (Lieberman 1996; Kurzer and Xu 1997). Ces hormones naturelles sont retrouvées principalement dans la nourriture dérivée du soja, du treffle et de la luzerne (Bradbury and White 1954) et peuvent être classées en trois groupes : isoflavones, coumestans et lignans. Les principales sont la génisteine, la daidzein, le coumestrol et l'entérolactone (Kurzer and Xu 1997). Les phytoestrogènes ont des répercussions importante sur la formation de l'os. En effet, les phytoestrogènes peuvent se lier à Runx2 et au récepteur nucléaire $PPAR\gamma$ ou les phosphoryler de façon à commettre les ostéoprogéniteurs en ostéoblastes ou en adipocytes (Dang, Audinot et al. 2003). Lorsque la concentration circulante de génistéine ou de daidzein est faible, ces phytoestrogènes ont démontré des capacités d'augmenter

l'activité de la phosphatase alcaline et la production d'ostéoprotégérine ainsi que de TGF β (Transforming growth factor β), ce qui assure la différenciation des ostéoblastes (Heim, Frank et al. 2004; Kanno, Hirano et al. 2004). L'action des phytoestrogènes sur la minéralisation est aussi un effet positif; celle-ci augmente de façon proportionnelle à la concentration de phytoestrogènes circulantes (Ge, Chen et al. 2006). De façon générale, il est donc reconnu qu'à de faibles concentrations, les isoflavones stimulent l'ostéogénèse et diminuent la résorption osseuse et qu'à fortes concentrations ces mêmes molécules inhibent la formation d'ostéoblastes et favorisent l'adipogénèse (Dang and Lowik 2004). Aucune étude n'a été faite jusqu'à présent sur l'implication des phytoestrogènes sur le développement et la progression de la scoliose idiopathique de l'adolescent bien que leur influence sur le développement de l'os est très importante.

2.6. La minéralisation du tissu osseux

Il est reconnu que certains adolescents scoliotiques font de l'ostéopénie (Burner, Badger et al. 1982; Velis, Healey et al. 1989; Cheng, Tang et al. 2001; Lee, Cheung et al. 2005; Cheung, Lee et al. 2006), ce qui amène l'hypothèse qu'il y aurait un défaut dans la minéralisation ou au niveau du contrôle de la minéralisation de l'os.

2.6.1. Les protéines impliquées dans la différenciation des ostéoblastes

De nombreuses protéines sont impliquées dans la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation de l'os, telles que des hormones sexuelles (estrogènes) stéroïdiennes (glucocorticoïdes) (Reid and Grey 1993), et parathyroïdiennes (PTH) (Strewler 2001), des facteurs de différenciation locaux (BMP, TGF β) (Fromigue, Marie et al. 1998) et des facteurs de transcription (Runx2, Dlx-5 et Ostérix) (Komori 2006). Plusieurs évidences prouvent l'importance de ces protéines dans la différenciation des ostéoblastes. Par exemple, l'injection de BMP2 dans de l'os endommagé provoque la formation de nouvel os, sans passer par la formation de cartilage (Murakami, Saito et al. 2002). Ensuite, la

surexpression des antagonistes des BMP entraîne rapidement l'ostéopénie (Devlin, Du et al. 2003; Winkler, Sutherland et al. 2003; Wu, Li et al. 2003). Enfin, les souris déficientes en BMP2 ou BMP4 ne sont pas viables, suite à des malformations cardiaques ainsi que de tout tissu dérivé de la couche mésodermique (Winnier, Blessing et al. 1995; Zhang and Bradley 1996), ce qui indique que ces facteurs ne sont pas seulement impliqués dans le développement de l'os. Par contre, chez les souris invalidées de BMP6, aucun défaut majeur n'est présent dans les os de ces souris. Par conséquent, il est soupçonné que BMP2 remplace BMP6 puisque ces deux protéines sont co-exprimées dans les mêmes tissus (Chen, Zhao et al. 2004). De plus, les souris invalidées de Runx2 ou Ostérix ne forment pas d'ostéoblastes matures (Nakashima, Zhou et al. 2002; Komori 2006), ce qui prouve à quel point les BMP, Runx2 et Ostérix sont essentiels à la différenciation des ostéoblastes.

2.6.2. La différenciation des ostéoblastes

Durant la formation de l'os, des ostéoblastes sont formés à partir de cellules souches d'origine mésenchymateuse (Dennis, Merriam et al. 1999) sous l'effet de plusieurs facteurs comme les BMP, protéines qui appartiennent à la superfamille des TGF β (Chen, Zhao et al. 2004). Ces protéines sont les premières protéines essentielles à la différenciation des précurseurs ostéoblastiques en ostéoblastes (Figure 4) (Wozney 1992; Centrella, Horowitz et al. 1994; Linkhart, Mohan et al. 1996). L'action de TGF β sur l'os serait d'améliorer les propriétés mécaniques de la matrice osseuse en agissant sur la synthèse des composés de la matrice osseuse tels que la fibronectine et le collagène de type I (Ignotz and Massague 1986; Centrella, McCarthy et al. 1987; Pfeilschifter, Oechsner et al. 1990). TGF β va aussi réguler la prolifération des cellules pré-ostéoblastiques et inhiber la différenciation terminale des ostéoblastes (Fromigue, Marie et al. 1998; Alliston, Choy et al. 2001; Maeda, Hayashi et al. 2004). Malgré que tous les BMP sont des régulateurs de la prolifération et de la différenciation cellulaire durant le développement (Ozkaynak, Schnegelsberg et al. 1992; Hogan 1996), seuls BMP2, 3, 6, 7, 8 et 9 agissent au niveau de la formation de l'os, avec une prédominance de BMP2 et 7 (Luu, Song et al. 2007; Xiao, Xiang et al. 2007). Ces protéines exercent leurs fonctions biologiques en se liant à un récepteur hétérodimérique (BMPRI, BMPRII, T β RIII, etc) situé sur la membrane cellulaire qui transmet le signal à

l'intérieur de la cellule. Ensuite, les Smad sont recrutés afin de transmettre le signal au noyau et d'amorcer la transcription de gènes cibles comme *Runx2* et *Ostérix* (Wang, Wei et al. 2007; Xiao, Xiang et al. 2007; Javed, Bae et al. 2008). *Runx2* se lie à *Cbfb* afin d'induire le passage des cellules mésenchymateuses en précurseurs ostéoblastiques (Komori 2006). Ensuite, *Runx2* recrute *Ostérix* (dont il contrôle aussi la transcription) pour poursuivre la différenciation en ostéoblaste mature (Nakashima, Zhou et al. 2002). Il a aussi été démontré l'importance de la voie des Wnt, par le biais du récepteur LRP5, dans la différenciation des ostéoblastes, malgré que l'interaction avec *Runx2* et *Ostérix* reste à prouver (Day, Guo et al. 2005; Hill, Spater et al. 2005; Hu, Hilton et al. 2005). *BMP2* et *Runx2* augmentent de façon significative la production des marqueurs de différenciation des ostéoblastes tels que la phosphatase alcaline, l'ostéocalcine et l'ostéopontine (Katagiri, Yamaguchi et al. 1994; Komori 2005). Les BMP ont aussi des actions indirectes sur les ostéoclastes en influençant la sécrétion d'OPG et la production de RANK-L par les ostéoblastes (Hofbauer and Heufelder 1998; Huang, Teng et al. 2004).

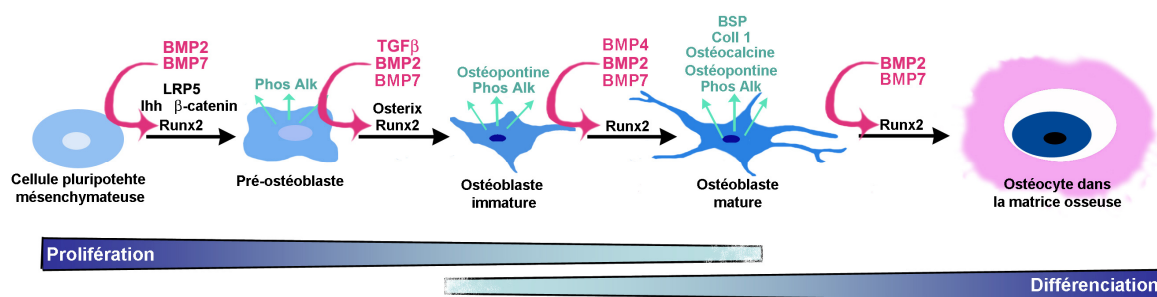


Figure 4 : **Différenciation des ostéoblastes sous l'action de différents facteurs.** Les facteurs de différenciation locaux (en rose) stimulent les facteurs de transcription (en noir), ce qui provoque la différenciation progressive des ostéoblastes et la sécrétion de protéines qui forment la matrice osseuse (en vert).

2.6.3. Interaction des estrogènes avec les protéines de différenciation des ostéoblastes

Il a été démontré que les estrogènes agissent positivement sur la régulation des BMP, ce qui augmente la différenciation des ostéoblastes (Mathieu and Merregaert 1994; Zhou, Turgeman et al. 2003). La phytoestrogène Daidzein augmente aussi la production de BMP2 ce qui favorise la différenciation ostéoblastique et la formation de l'os (Jia, Wang et al. 2003). Les estrogènes interagissent aussi avec TGF β de façon négative, en diminuant la transcription des gènes régulés par TGF β tels que le collagène de type IV (Matsuda, Yamamoto et al. 2001), ce qui pousse aussi à la différenciation des ostéoblastes. McCarthy *et al.*, (McCarthy, Chang et al. 2003) ont récemment rapporté que les estrogènes influencent la transcription de gènes par Runx2, par l'entremise du récepteur ER α . Celui-ci se lie à Runx2 par son domaine de liaison à l'ADN et retient Runx2 sur l'ADN, ce qui augmente son activité transcriptionnelle. Il semblerait également que le gène pour ER α soit une cible transcriptionnelle de Runx2 et que la régulation serait négative ou positive selon l'endroit où Runx2 se lie au promoteur F du gène de ER α , (Lambertini, Penolazzi et al. 2007).

2.6.4. Les protéines de la matrice osseuse

Les protéines de la matrice osseuse, sécrétées par les ostéoblastes, forment deux groupes. Le premier, composé principalement du collagène de type I et de protéines fibreuses, forme la matrice extracellulaire solide autour des ostéocytes. L'autre groupe de protéines, surnommé matricellulaire, est composé de l'ostéopontine (OPN), des sialoprotéines osseuses (BSP), des thrombospondines (TSP) et des SPARC (secreted protine, acidic and rich in cysteine). Ces protéines agissent comme modulateurs de la matrice osseuse et des protéines sécrétées par les ostéoblastes et les ostéoclastes (Bornstein and Sage 2002). L'ostéopontine est reconnue pour inhiber la formation de cristaux de minéraux, *in vivo* et *in vitro*, pour favoriser la résorption osseuse (Shapses, Cifuentes et al. 2003; Huang, Teng et al. 2004). L'OPN est sécrétée lorsque l'ostéoblaste est complètement différencié (Sato, Yasui et al. 1998), et son expression inhibe la prolifération et la différenciation des ostéoblastes (Huang, Teng et al. 2004). En contraste, BSP augmente la

différenciation des ostéoblastes et favorise la minéralisation (Gordon, Tye et al. 2007; Malaval, Wade-Gueye et al. 2008).

2.7. Hypothèse

L'hypothèse générale proposée par le laboratoire est que la Scoliose Idiopathique de l'Adolescent est un désordre systémique neuro-hormonal comprenant l'axe hypothalamo-gonadal. En d'autres termes, les hormones intervenant dans la puberté, telles les estrogènes, seraient impliquées dans la progression de la déformation de la colonne vertébrale des patients atteints de cette maladie. Les patients auraient également une prédisposition génétique et un profil différent d'expression des récepteurs nucléaires ER α et ER β .

Plus précisément, l'hypothèse de ce projet est qu'il pourrait exister dans les ostéoblastes de patients atteints de scoliose, un défaut dans la voie de signalisation des estrogènes, soit au niveau de l'expression des récepteurs aux estrogènes, soit au niveau de la fonctionnalité de ces mêmes récepteurs, ce qui inhiberait la transmission du signal provenant des estrogènes et affecterait de façon négative la minéralisation du tissu osseux.

2.8. Objectifs

Nous proposons d'explorer le rôle des récepteurs des estrogènes dans les ostéoblastes afin de répondre aux questions suivantes:

- Existe-t-il une forme prédominante des récepteurs ou de l'un de leurs isoformes dans les ostéoblastes de patients SIA?
- Est-ce que les récepteurs aux estrogènes (ER α et ER β) sont fonctionnels dans les ostéoblastes des patients scoliotiques?
- Est-ce que l'estradiol à des concentrations physiologiques pourrait avoir un impact sur la transcription des gènes impliqués dans la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation de l'os?

3. Matériel et Méthodes

3.1. *Isolation des ostéoblastes*

Les cellules utilisées afin d'effectuer les différentes expériences requises pour ce travail sont des ostéoblastes. Ces ostéoblastes sont dérivés à partir d'extraits de vertèbres recueillies lors de chirurgies effectuées sur 38 patients adolescents atteints de scoliose et 21 patients ayant subi un traumatisme osseux. Ces derniers servent de contrôles. Les spécimens pris des patients scoliotiques sont compris entre les vertèbres T3 à L4 et les fragments osseux provenant des contrôles sont du tibia, du fémur, des chevilles et des vertèbres. Les sujets sont appariés pour l'âge et le sexe. Les tissus ont été obtenus suite à la signature par les patients et leurs parents d'un formulaire de consentement approuvé 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 de Montréal. Toutes les variables cliniques indiquées dans les tableaux III et IV ont été recueillies au moment de la chirurgie ou juste avant.

Les morceaux d'os sont coupés afin de les réduire en fragments de quelques millimètres. Ces fragments sont déposés dans des flasques T75 et cultivés dans du milieu Alpha Modified Eagle Medium (α MEM) (Wisent, Inc, St-Bruno, Quebec, Canada), additionné de 10% de sérum de veau foetal (Wisent, Inc, St-Bruno, Quebec, Canada) et de 100 unités/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) (α MEM 10% SVF et 1% PS). Ces boîtes sont incubées à 37°C avec une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d'air. Après 10 jours de culture, les ostéoblastes sortent de l'os et envahissent le pétri.

Tableau III : **Données cliniques des patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent qui ont servi à cette étude.** Ces données sont: date de naissance, âge à la chirurgie, sexe, âge à la ménarche, taille à l'opération, poids à l'opération, angle de Cobb pré-opératoire, angle de Cobb post-opératoire, type de courbure et Risser à l'opération. Les symboles représentent les expériences dans lesquelles les spécimens ont été utilisés (*:RT-PCR, +:qPCR, i:immunocytologie, ;:immunohistologie, g:Gel Shift).

No	Date de naissance	Age à l'opération	Sexe	Ménarche	Taille à l'opération (cm)	Poids à l'opération (kg)	Cobb pré-op	Cobb post-op	Risser pré-op	Type de courbure	
1	03-juil-88	14,1	F	13	154,7	38,1	99-66	16-9	1	td/lg	*, +
2	28-févr-90	12,8	F	11	162,5	61,7	54	6	2	td/lg	*, +
3	24-août-89	13,2	M	-	147	54,8	75	19	1	td	*, +
4	07-avr-88	14,7	F	16	148,7	32	68	20	0	td	*, +
5	01-mai-92	11,2	F	10	158,7	55	54-37	37-28	2	td	*, +
6	28-juin-85	18	F	16,9	163,7	48,7	37-52	n/d	n/d	td/lg	*, +
7	04-juin-89	13	F	13	159,2	48,9	56	26	0	td	*, +
8	09-févr-88	14,8	F	14	151	40,5	67	15	0	td	*, +
9	03-août-89	16,15	F	14,5	159	45	64	23	3	td	*, +, g
10	19-oct-91	14,9	F	12	157	61,8	57-51	11-sept	2		*, +, g
11	01-mai-90	12,7	F	12	159	55	68	15	1	td	*, +, g
12	02-avr-90	16,18	F	12,4	164,5	52,7	58	19	3	td	*, +, g
13	06-avr-93	13,1	F	14,6	155,7	37,9	66	12	1-2	td	*, +, i, g
14	21-oct-92	13,11	F	13	152,3	41	51	n/d	1	td	*, +, g
15	29-mai-91	14,2	F	15	148,15	57,8	78	13	0	td	*, +, g
16	07-oct-91	14,61	F	11,8	148,4	47,6	41-48	n/d	1	td/lg	*, +, g
17	13-déc-91	14,6	F	12,8	174,6	58,2	50	n/d	1	n/d	*, +, g
18	08-mars-92	13,5	F	n/d	152,5	50,4	54	16	2	td	*, +, g
19	19-févr-92	14,22	F	16,1	158	47,9	88	25	2	td	*, +
20	13-nov-89	15,8	F	11	161	45,2	32	4	3+	tlg	*, +
21	13-juin-83	18	F	12	167,8	67,7	50	n/d	4	tlg	*, +

No	Date de naissance	Age à l'opération	Sexe	Ménarche	Taille à l'opération (cm)	Poids à l'opération (kg)	Cobb pré-op	Cobb post-op	Risser pré-op	Type de courbure	
22	14-août-90	13,1	F	13	159,5	76,7	58-49	11	1	td-g	*, +
23	29-sept-85	16,3	F	13	165	45,9	53	16	3+	td/lg	*, +
24	04-mai-89	12,6	F	12	158,2	54,2	74-62	37-37	1	td	*, +
25	n/d	16,60	F	n/d	n/d	n/d	65-95	n/d	n/d	td/lg	*, +
26	22-août-87	14,6	F	13	157	49,4	41-50	15-20	2	td/lg	*, +
27	15-mai-90	14,3	F	n/d	155	48	81-59	23	1	td/lg	*, +, i
28	23-sept-92	13,71	F	13,9	139,3	37,6	53	24	3	tld	*, +, g
29	05-mai-90	15,52	F	11	158,2	60,4	55-42	n/d	3	td/lg	*, +, i
30	20-déc-90	13,74	F	11,9	156,4	47,4	61	n/d	3	td	*, +
31	11-nov-90	15,41	F	12	161,8	59,2	58	19	3	td	i
32	08-janv-92	14,02	M	-	165,5	60	61	16	0	tld	i
33	30-janv-91	15,29	F	17,5	154,6	37	72-59	21	0	td/lg	i
34	13-nov-89	16,16	F	11	161	45,2	28	5	4	tg	i
35	n/d	11,4	M	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	td	;
36	03-juil-92	12,43	F	13,1	149,6	31,2	65	11	0	td	;
37	09-févr-90	15,26	F	12,5	149	46,3	42	6	3	tg	;
38	24-mai-87	18,06	M	-	n/d	72	70	n/d	n/d	td	;

Tableau IV : **Données cliniques des sujets contrôles qui ont servi à cette étude.** Ces données sont la date de naissance, l'âge à la chirurgie, le sexe, l'âge à la ménarche, le site du prélèvement, la taille à l'opération, et le poids à l'opération. Ces données sont suivies de symboles représentant les expériences dans lesquelles les spécimens de ces patients ont été utilisés. (*=RT-PCR, +=qPCR, i=immunocytologie, ;=immunohistologie, g=Gel Shift.

	Date de naissance	Age chirurgie	Sexe	Menarche	Site de prélèvement	Taille à l'opération (cm)	Poids à l'opération (kg)	
1	18-févr-92	14,1	M	-	femur gauche	172	60,7	*, +
2	13-sept-89	18,8	M	-	pied droit	n/d	n/d	*, +
3	15-févr-86	20	F	12	genoux droit	161,9	49,1	*, +
4	16-oct-85	18	F	n/d	colonne vertébrale	157,8	51,8	*, +, g
5	11-avr-92	12,7	M	-	genoux gauche	n/d	68	*, +
6	07-nov-89	17	F	n/d	Polytrauma	n/d	60,8	*, +
7	16-juin-90	14	F	-	genoux droit	n/d	64,6	*, +, g
8	09-août-93	13,8	M	-	tibia gauche	n/d	76	*, +, g
9	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	*, +, g
10	18-juin-91	14,6	M	-	rotule gauche	n/d	66	*, +, g
11	30-nov-93	12,3	F	n/d	genoux gauche	126	32	*, +
12	11-juin-97	8,9	F	-	tibia droit	129,5	25	*, +
13	09-nov-88	16	M	-	Polytrauma	n/d	72,4	*, +
14	16-juin-94	13	M	-	tibia droit	167	60	*, +
15	30-juil-89	17,2	M	-	femur droit	n/d	72,7	*, +
16	24-mars-91	14,6	F	14	colonne vertébrale	n/d	47	i
17	26-nov-86	18,9	F	10	tibia droit	n/d	53	i
18	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	i
19	20-nov-91	15,3	F	-	épiphyse gauche	n/d	40,6	i
20	14-janv-87	18,4	F	18	rotule gauche	170	68,9	;
21	29-août-90	13,8	M	-	tête fémorale gauche	153	64,5	i

3.2. Culture des cellules

Les ostéoblastes sont mis en culture dans des pétris de 100mm x 20mm avec du milieu α MEM 10% SVF et 1% PS et sont cultivés jusqu'à confluence. Pour l'extraction d'ARN et de protéines, une partie des cellules est traitée dans du milieu α MEM 2,5% SVF et 1% PS avec du 17β -estradiol 10^{-10} M (Sigma, Ontario, Canada). Avant de traiter les cellules, celles-ci sont privées de sérum pendant 6 heures (α MEM 0% SVF, 1% PS), afin de les synchroniser au même stade de division cellulaire. Les cellules contrôles ne reçoivent pas de traitement avec de l'estradiol. Le traitement des cellules pour les expériences d'immunocytochimie et de minéralisation sera décrit ultérieurement.

3.3. Passage des cellules

Les cellules sont utilisées au passage 3 ou 4 sauf pour les expériences de minéralisation et d'immunocytochimie, ce qui permet d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour extraire l'ARN, les protéines totales et nucléaires. Le milieu de culture des cellules est aspiré et la boîte de pétri est rincée au PBS (Phosphate buffer saline : NaCl 0,137M, Na_2HPO_4 $8,1 \times 10^{-3}$ M, KCL $2,7 \times 10^{-3}$ M, KH_2PO_4 $1,5 \times 10^{-3}$). Deux millilitres de Trypsine (0,25% trypsine-EDTA, Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) sont ajoutés et les cellules sont placées à 37°C pendant 1 à 2 minutes. Les cellules sont recueillies dans 5 ml de milieu α MEM 10% SVF et 1% PS et transférées dans un tube de 50 ml. Ce tube est centrifugé pendant 5 min à 2000 rotations par minute (rpm) et les cellules sont resuspendues dans du milieu de culture α MEM, 10% SVF, 1%PS selon le nombre de pétris nécessaires.

3.4. Phosphatase Alcaline

Ce test sert à mesurer par coloration la présence de la phosphatase alcaline active, ce qui permet de vérifier que les cellules sont bien des ostéoblastes. Les cellules sont mises en culture dans des plaques de 24 puits ou sur des lames labtek, avec du milieu α MEM

10% SVF et 1% PS. Après avoir aspiré le milieu et rincé les cellules au PBS, celles-ci sont fixées avec du formaldéhyde 3,7% (Laboratoire Mat, Montréal Qc, Canada) dans du PBS 1X pendant 5 min. Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS 1X. Une solution de 1,25 mg de natphtol AS-MX phosphate (Sigma, Ontario, Canada), 2,5 mg de fast red TR (Sigma, Ontario, Canada), 62,5 μ L d'éthylène glycol monoéthyl éther et 6 ml de TBS 0,1 M pH 9,5 (Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 9,5) est ajouté et les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante. Ensuite, les cellules sont rincées à l'eau et observées sous microscope.

3.5. Extraction de l'ARN

L'ARN des cellules traitées ou non à l'estradiol 10^{-10} M est extrait lorsque celles-ci sont à confluence. Pour cela, le milieu des cellules est aspiré et les boîtes de pétri sont rincées au PBS. Afin de décoller et lyser les cellules, 2 ml de Trizol (Invitrogen, Californie, États-Unis) par pétri sont ajoutés et les cellules sont grattées. Les cellules éclatées sont ensuite mises dans deux tubes eppendorf (1 ml chaque). 200 μ L de chloroforme (ACP Chemicals Inc, Montréal, Québec) sont ajoutés au lysat. Les tubes sont agités à la main vigoureusement pendant 45 secondes avant de les laisser reposer 2 à 3 min à température ambiante et ensuite centrifugés à 12 000g, +4°C, pendant 15 min. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube eppendorf auquel on ajoute 500 μ L d'isopropanol (Fisher Scientifique, Hampton, NH, États-Unis). Les tubes sont inversés quelques fois avant de laisser reposer dix minutes à température ambiante puis on centrifuge à 12 000 g, +4°C, 10 min. Le surnageant est prélevé et jeté. Le culot est lavé en ajoutant 1 ml d'éthanol 70% (Les alcools du commerce Inc., Brampton, Ontario) froid. Une dernière centrifugation à 7500g à +4°C 5 minutes est nécessaire. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans de l'eau, environ 25 μ L par culot.

3.6. Dosage ARN

Pour réaliser le dosage par spectrophotométrie (Spectrophotomètre Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japon), l'ARN est dilué au 1:100 dans du TE (Tris-HCl 200 mM

(Invitrogen, Californie, États-Unis), EDTA 20 mM (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, Ohio, USA), pH 7,5). La gamme étalon est réalisée par le programme UVProbe (version 1.11, Shimadzu) utilisé sur un ordinateur, entre les densités optiques 260 et 280 nm. La lecture de l'ARN se fait à 260 nm. Le blanc est le TE seul.

3.7. *Transcription inverse (RT)*

Une transcription inverse est nécessaire afin de produire de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN extrait précédemment. Chaque réaction est composée de solution tampon sans MgCl₂ 1X, de MgCl₂ 6 mM, des dNTP (di-nucléotides tri-phosphate) 1.2 mM, des hexamères 3 µM et du dithiothreitol (DTT) 3 mM. Les enzymes sont ensuite ajoutées à raison de 20 Unités de RNase Out et de 60U de Reverse Transcriptase (RT) par réaction. Tous les produits et enzymes pour la RT proviennent de Invitrogen (Californie, États-Unis). La réaction requiert 1 µg d'ARN et est complétée à 16,5µl avec de l'eau. Chaque réaction de transcription inverse est incubée 10 minutes à température ambiante, 15 minutes à 42 °C et 5 minutes à 99 °C.

3.8. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

L'ADN complémentaire obtenu par la transcription inverse (RT) sert de matrice pour la réalisation de la PCR. Des amorces, correspondant aux séquences nucléotidiques des gènes choisis sont utilisées. Chaque réaction de PCR correspond à un volume final de 50µL du mélange de solution tampon (sans MgCl₂) 1X, de MgCl₂ 1,25 mM, de Taq polymérase à raison de 2,5 unités par réaction, d'amorces sens et anti-sens à une concentration finale de 0,20 µM (Medicorp, Montréal, QC, Canada) et 2 µl d'ADNc. La réaction est complétée avec de l'eau. Les produits utilisés pour la PCR proviennent de Invitrogen (Californie, États-Unis), à l'exception des amorces.

Les cycles de PCR sont spécifiques à chaque paire d'amorce. Le tableau V donne les séquences des amorces ainsi que les températures d'hybridation et le nombre de fois que le cycle de PCR est répété. Par contre, tous les cycles de PCR sont construits ainsi : 95°C, 1 min ; Température d'hybridation, 1 min ; 72°C, 1 min. Après le nombre de

cycles voulu, la température reste à 72°C pendant 10 min. Les deux thermocycleurs utilisés sont le Tpersonal de Biometra (Göttingen, Allemagne) et PCR Express de Hybaid (Middlesex, Royaume Uni).

Tableau V : Amorces utilisées pour les réactions de PCR

Gène		Séquence (5'→3')	Température d'hybridation	Nb paire de base du produit	Nb de cycles
BMP2	Sens	5' tgc aac agc caa ctc gaa att ccc 3'	63,0	641	30
	A-Sens	5' aac cct cca caa cca tgt cct gat 3'			
TGFβ1	Sens	5' aca att cct ggc gat acc tca gca 3'	60,0	348	35
	A-Sens	5' tct tct ccg tgg agc tga agc aat 3'			
IGF1	Sens	5' gcc tgc gca atg gaa taa agt cct 3'	59,0	541	35
	A-Sens	5' tac ttc ctt ctg ggt ctt ggg cat 3'			
osteopontine	Sens	5'-cag cca tga att tca cag cc-3'	52,8	308	35
	A-Sens	5'-ggg agt ttc cat gaa gcc ac-3'			
Coll 1	Sens	5'-tga cct caa gat gtg cca ct-3'	52,8	176	35
	A-Sens	5' acc aga cat gcc tct tgt cc 3'			
Osteocalcine	Sens	5' aca ctc ctc gcc cta ttg 3'	55,0	248	35
	A-Sens	5' gat gtg gtc agc caa ctc 3'			
GAPDH	Sens	5' acc aca gtc cat gcc atc ac 3'	60,0	451	35
	A-Sens	5' tcc acc acc ctg ttg ctg ta 3'			
Runx2	Sens	5' tcc gga atg cct ctg ctg tta tga 3'	60,0	239	35
	A-Sens	5' act gag gcg gtc aga gaa caa act 3'			
BMP7	Sens	5' acc cat gtt cat gct gga cct gta 3'	56,5	249	35
	A-Sens	5' ttg ctg gtg gct gtg atg tca aac 3'			
Phos alk	Sens	5' aca cct gga aga gct tca aac cga 3'	60,0	401	35
	A-Sens	5' tcc acc aaa tgt gaa gac gtg gga 3'			
ERα	1	Sens	57	289	35
		A-Sens			
	2	Sens	63	484	35
		A-Sens			
	3	Sens	61	506	35
		A-Sens			
	4	Sens	61	639	35
		A-Sens			
ERβ	1	Sens	60	255	35
		A-Sens			
	2	Sens	64	892 + 500	35
		A-Sens			
	3	Sens	62	530	35
		A-Sens			
	4	Sens	64	669	35
		A-Sens			

3.9. Migration de la PCR

Afin de visualiser les différents fragments obtenus par PCR à l'aide du bromure d'ethidium 0.3 µg/ml, les résultats de celle-ci subissent une migration sur gel d'Agarose 1,2% (Wisent, Inc, St-Bruno, Quebec, Canada) dissout dans du TBE 1X (Tris 0.09 M, EDTA 2 mM (pH 8.0) Acide Borique 0.09 M). Les échantillons sont alourdis avec une solution d'Orange G et de sucrose 1X (Sucrose 14,6 M et Orange G 55 mM). La migration se fait à 90V dans un appareil à électrophorèse (BioRad, Hercules, Californie, États-Unis) rempli de TBE 1X. La visualisation du gel se fait aux rayons Ultra Violets à l'aide d'un transilluminateur (Herolab, Allemagne) via le logiciel BioDocAnalyse (Biometra, Hercules, Californie, Etats-Unis).

3.10. PCR quantitative (qPCR)

Les réactions de qPCR ont été effectuées par la plate-forme génétique de l'IRIC (Institut de recherche en immunologie et oncologie de l'Université de Montréal). L'ADN complémentaire utilisé pour les réactions de qPCR a été préparé selon la méthode de transcription inverse décrite en 3.7. Les gènes désirés sont amplifiés en utilisant des amorces spécifiques et détectés avec des sondes universelles fluorescentes provenant de TaqMan. Le contrôle interne (GAPDH) est amplifié avec un kit provenant de ABI. Les réactions des autres gènes sont : 2 µl d'ADNc (50 ng), 5 µl de SuperMix Express pour qPCR (Invitrogen), 2 µM de chaque amorce et 1 µM de sondes Universal TaqMan dans un volume total de 10 µl. Le système ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) a été utilisé afin de détecter l'amplification des gènes (programme : 3 min à 95°C, suivi de 45 cycles de 5 sec à 95°C et 30 sec à 60°C). Toutes les réactions sont faites en triplicata.

La quantification relative de l'expression génique est déterminée par la méthode $\Delta\Delta CT$: les valeurs de Ct (cycle threshold) des gènes d'intérêt sont normalisées avec le contrôle interne (GAPDH) ($\Delta CT = Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{GAPDH}}$) et comparé avec un calibrateur: $\Delta\Delta CT = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{calibreur}}$. L'expression relative (RQ) est calculée avec le système Sequence Detection System (SDS) 2.2.2 (Applied Biosystems) $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tableau VI : Amorces utilisées pour la PCR quantitative

Gène		Séquence (5'→3')
ER α	Sens	5' ttactgaccaacctggcaga 3'
	A-Sens	5' atcatggagggtcaaatcca 3'
ER β tous	Sens	5' cgagagttaaaactccaacacaaa 3'
	A-Sens	5' tcgctgtgaccagaggta 3'
ER β a	Sens	5' ttgggaatacactgagctttga 3'
	A-Sens	5' ggcctttaagctggttct 3'
ER β b/c	Sens	5' actggcccacagaggta 3'
	A-Sens	5' agggaccacacagcagaaaag 3'
ER β 4	Sens	5' cttcactggttcccctgag 3'
	A-Sens	5' cacagctgaccacacaatcc 3'
ER β S1	Sens	5' cctgctcaattccagtatgtacc 3'
	A-Sens	5' cagcaagtgagccagcttc 3'
BMP2	Sens	5' cagaccaccggttgaga 3'
	A-Sens	5' ccactcgttctgtagttcttc 3'
TGF β	Sens	5' agcagcacgtggagctgt 3'
	A-Sens	5' cagccggttctgaggtta 3'

3.11. Extraction des protéines totales

Le milieu des cellules confluentes est aspiré et les cellules sont lavées au PBS. Ensuite, pour un pétri de 100 mm x 20 mm, 500 μ L de tampon RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 10%, EDTA 1 mM) auquel sont additionnés des inhibiteurs de protéases (Aprotinine 100 μ M, Leupeptine 100 μ M, Pepstatine 100 μ M, PMSF 1 mM). Tous les inhibiteurs proviennent de Sigma (Ontario, Canada). Le pétri est mis à -80°C pour 60 minutes. Les cellules sont grattées et récupérées dans un eppendorf puis centrifugées 15 min à 1200 rpm à +4°C. On récupère le surnageant, dans lequel on quantifie les protéines par la technique de BCA (3.13).

3.12. Extraction des protéines nucléaires

L'extraction se fait sur des cellules stimulées (estradiol 10^{-10} M) et non stimulées (témoins) arrivées à confluence. Le milieu est d'abord aspiré et les cellules sont lavées au PBS. Ensuite, 500 μ l de Tampon A (Hépès 10 mM pH 7,9, $MgCl_2$ 1,5 mM, KCL 10mM, NP40 1%, PMSF 1 mM, Aprotinine 0,01 mg/ml, Leupeptine 0,01 mg/ml, Pepstatine 0,01mg/ml) est ajouté dans chaque pétri et les cellules sont grattées. Le lysat est recueilli dans un tube eppendorf qui est laissé au repos 20 min sur la glace en le vortexant tous les 5 min. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm, 3 min. Le surnageant (correspondant aux protéines cytoplasmiques) est aspiré et conservé à $-20^{\circ}C$. Ensuite, 40 μ L de Tampon C (Hépès 20 mM pH 7,9, Glycérol 25%, NaCl 420 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, EDTA 0.2 mM, PMSF 1 mM, Aprotinine 0,01 mg/ml, Leupeptine 0,01 mg/ml, Pepstatine 0,01mg/ml) sont ajoutés dans chaque tube. Ces tubes sont incubés sur glace pendant 20 min en les tapotant légèrement avec le doigt tous les 5 min. Suite à l'incubation, les tubes sont centrifugés à 12500 rpm durant 2 min. Le surnageant est aliquoté par 25 μ l, à l'exception de 5 μ l qui est utilisé pour le dosage par BCA. Les aliquots sont conservés à $-80^{\circ}C$.

3.13. Dosage des protéines

La technique utilisée afin de doser les protéines se fait à partir d'une solution d'acide bicinchonique et de sulfate de cuivre (10 ml de BCA et 200 μ l de sulfate de cuivre (II) (Sigma, Ontario, Canada). Chaque échantillon est composé de 5 μ l de protéines, 55 μ l d'eau et 240 μ L de solution BCA. La gamme étalon est réalisée avec la BSA (Albumine de sérum de bovin, Sigma, Ontario, Canada) allant de $1,7 \cdot 10^{-2}$ mg/ml à 1 mg/ml. La densité optique est lue à 550 nm (Expert Microplate Reader 96UV, Asys Hitech, Australie).

3.14. Coloration au Trichrome de Goldner

Les coupes histologiques utilisées pour cette expérience proviennent de tissus osseux obtenus lors des chirurgies effectuées sur des patients atteints de scoliose ou des patients sains qui servent de contrôles. Les spécimens ont été embloqués dans de la paraffine. Les lames sont déparaffinées par une série de lavages dans le Toluene 100%. Ensuite l'hydratation se fait par un bain d'éthanol 100% pour 2 minutes, alcool 95% 2 minutes, alcool 70% 2 minutes et eau pour 1 minute. Les lames sont ensuite plongées dans une solution d'hématoxyline de Weigert pendant 20 minutes. L'excès d'hématoxyline est enlevé par des bains d'eau désionisée pour un total de 8 minutes. Ceci est suivi par une coloration au Fushine-ponceau (0.16% dans de l'acide acétique glacial 0,5%) durant 36 minutes. Un bain d'acide acétique 1% de 20 secondes est suivi de la solution Orange G (2% dans de l'acide phospho-molybdique 5%) pour 10 minutes. Les lames sont rincées avec une solution d'acide acétique 1% durant 20 secondes. La dernière coloration au vert lumière (0,3% dans de l'acide acétique glacial 0,5%) dure 45 minutes. Les derniers rinçages sont comme suit : Acide acétique 1% pour 20 secondes; Butanol 33% dans l'eau 10 secondes; Butanol 66% dans l'eau 10 secondes; Butanol 100% 15 secondes, deux fois; Butanol 33% dans du Toluène 15 secondes; finalement, deux bains de Toluène 15 secondes chacun. Les lames sont montées avec de la colle Microkit (Mecalab, Montréal, Qc). Cette coloration colore les noyaux et les ostéocytes en noir, les bordures d'ostéoïdes, ostéoblastes et ostéoclastes en rouge et l'os minéralisé en vert.

3.15. Immunohistochimie

Les coupes histologiques utilisées pour cette expérience proviennent de tissus osseux obtenus lors des chirurgies effectuées sur des patients atteints de scoliose ou des patients sains qui servent de contrôles. Les coupes sont de 5 µm d'épaisseur et sont montées sur des lames SuperFrost (Fisher Scientific, Hampton, NH, Etats-Unis) Les lames sont déparaffinées par une série de lavages dans le Toluene 100% et sont réhydratées en passant dans des bains de mélange alcool/eau. Les lames sont baignées dans du tampon

citrate (0,01 M, pH 6,0) durant 20 minutes à 65°C. Ceci favorise la révélation des antigènes. Suite à un lavage au PBS, les lames sont immergées dans le triton 0,3% (dans PBS) durant 45 minutes et rincées au PBS. Les lames sont baignées dans une solution de H₂O₂ 2% dans du méthanol pendant 30 minutes afin de bloquer la peroxidase endogène. Après lavage au PBS, du sérum de chèvre 1,5% est déposé sur les coupes pendant 60 minutes à température de la pièce. Le sérum est remplacé par l'anticorps, ici l'anti ER α (Santa Cruz MC-20) et l'anti-ER β (Santa Cruz H-150) pour la nuit, à 4°C. Après rinçage au PBS, l'anticorps secondaire couplé à la biotine (anti-lapin) est ajouté sur les coupes, selon la dilution du fabricant (Vectastain ABC kit : Vector Laboratories, Burlingame, CA). Après incubation avec le complexe avidine-biotine (Vectastain ABC kit : Vector Laboratories, Burlingame, CA), le marquage est révélé avec le système diaminobenzidine (DAB) (Dako Diagnostics Canada Inc, Ontario). Les lames ont été observées au microscope (Leica DMR, Allemagne) à un grossissement de 200X.

3.16. Immunocytologie

Les cellules utilisées pour ces expériences sont des ostéoblastes dérivés de prélèvements osseux provenant de patients atteints de SIA (n=8) et de sujets contrôles (n=3). 5000 cellules au passage 2 ou 3 sont posées sur des lames lab-tek (Nalge Nunc International, IL, États Unis). Lorsque les cellules ont adhéré, elles sont privées avec du milieu aMEM 0%SVF 1%PS durant 4 heures. Ensuite, elles sont exposées à l'estradiol 10⁻¹⁰M ou à l'estradiol 10⁻⁸M pour 0, 30, 90 et 180 minutes. La fixation des cellules se fait pendant 15 min à l'aide d'un mélange 50% éthanol/50% acétone.

Les lames sont rincées 3 fois au PBS avant d'être traitées au Triton 0,3% dans du PBS pendant 10 minutes. Les lames sont de nouveau rincées au PBS. Ensuite, les sites de liaison non spécifiques sont bloqués avec de la BSA (Bovine Serum Albumine) 3% dans du PBS durant 45 min. L'anticorps primaire ER α MC-20 ou ER β H-150 (Santa Cruz) (1:200 dans la BSA 3%) est ajouté et laissé en contact avec les cellules à 4°C pendant toute la nuit. Suite à un rinçage au PBS, l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (1:600) est ajouté sur les cellules pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité. Puis les

lames sont montées avec de la colle Prolong Gold contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Les cellules sont observées au microscope en fluorescence à 40X.

3.17. Synthèse *in vitro* de $ER\alpha$ et $ER\beta$

Cette réaction de transcription – traduction couplée a été réalisée à partir d'un kit provenant de chez Promega (TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega Corporation, États Unis). Les protéines sont formées dans des leucocytes de lapin. 25 μ l de réticulocytes sont ajoutés à 2 μ l de tampon, 1 μ l de Polymérase ARN (Sp6, T3 ou T7), 0,5 μ l de mélange d'acides aminés sans leucine 1 mM, 0,5 μ l de mélange d'acides aminés sans méthionine 1mM, 0,25 μ g d'ADN (de la séquence désirée) et 1 μ l d'inhibiteur de ribonucléases. Le tout est complété à 50 μ l avec de l'eau sans nucléases. La réaction est incubée à 30°C pendant 90 minutes. Les protéines doivent être utilisées immédiatement après la réaction.

3.18. EMSA

L'expérience de retard sur gel, ou Gel Shift, ou Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) consiste à faire migrer des protéines sur un gel d'acrylamide en présence d'une sonde radioactive. Le complexe formé par la sonde et les protéines est visualisé par autoradiographie. Ces expériences ont été effectuées avec des extraits de protéines nucléaires provenant d'ostéoblastes de 15 patients SIA et 5 sujets contrôles.

La sonde est d'abord préparée en ajoutant 2 μ g de sonde froide, du tampon Klenow 1X, 0.1 mM de chaque dNTP sauf celui marqué radioactivement, 50 μ Ci de 32 P dCTP 3000Ci/mmol et 6 unités de Klenow (Large Fragment Polymerase 1 – 3'-5' exo). La réaction est complétée à 50 μ L avec de l'eau et est incubée 45 minutes à 37°C. La sonde est ensuite passée sur une colonne G50 afin d'éliminer la radioactivité non liée à la sonde.

Les protéines utilisées pour le retard sur gel sont des extraits nucléaires (voir 3.12). Les échantillons consistent en 5 μ g de protéines, du tampon (Tris 50mM pH8, KCL 200mM, DTT 5 mM, NP-40 0,25%, glycerol 30%) et 0.2 μ g de Poly (dI-dC) complété à 20 μ L

avec de l'eau. Les échantillons sont incubés 10 minutes sur glace. Ensuite, 100 000 cpm de sonde sont ajoutés par échantillon. Les tubes sont laissés au repos 20 minutes à température pièce et déposés dans un gel d'acrylamide 5% et de tampon TBE 0,5% (Tris 0,045 M, EDTA 1 mM (pH 8.0) Acide Borique 0.045 M) qui a préalablement été migré à 160V. La migration se fait grâce à l'appareil Protean II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis) à 200V durant 3 heures. Le gel est ensuite séché sous vide et exposé sur un film autoradiographique toute la nuit à -80°C.

Un patient SIA et un sujet contrôle ont été utilisés pour les expériences de SuperShift (retard sur gel en présence d'un anticorps). Les échantillons sont composés de 5 µg de protéines, du tampon et 0,2 µg de Poly (dI-dC) complété à 20 µL avec de l'eau. Trois anticorps différents de ERα ont été utilisés (tous sont des anti-rabbit): ab3575 de Abcam (5 µg) (Cambridge, Royaume Uni), E0464 de Sigma (10 µl) (Missouri, États-Unis) et MC-20 de Santa Cruz (4 µg) (Californie, Etats-Unis). Les anticorps ont été ajoutés après la sonde radioactive et les échantillons ont été incubés 20 minutes supplémentaires à température pièce avant d'être migrés.

Un sujet contrôle a été utilisé pour l'expérience de compétition avec sondes froides. Les échantillons sont composés de la même façon que pour le retard sur gel. Des concentrations croissantes de sonde froide sont ajoutées (0,8 pmol/µl, 8 pmol/µl, 40 pmol/µl et 80 pmol/µl) en même temps que la sonde radioactive. Les échantillons sont incubés 20 minutes à température ambiante avant d'être migrés.

Les séquences des sondes sont :

- ERE (estrogen response element) : 5' tgc aca aag tca ggt cac agt gac ctg atc aag 3'
5' gat cct tga tca ggt cac tgt gac ctg act ttg 3'
- Intron 1 (de ERα) : 5' gag acc ctg agt gtg gtc aga gtt ggg atg agc a 3'
5' cca atg ctc atc cca act cta gac cac act cag gg 3'

3.19. Minéralisation

Les ostéoblastes provenant de patients atteints de scoliose (n=3) ainsi que de sujets sains (n=3) ont été cultivés dans des plaques de 6 puits jusqu'à confluence dans du

milieu α MEM 10%SVF 1%PS. Ensuite, les cellules ont été exposées à la BMP2 0,5 nM durant trois jours avec du milieu α MEM 10%SVF 1%PS additionné d'acide ascorbique 50 μ g/ml, de dexaméthasone 10 nM et de β -glycerophosphate 2.5 mM. Au bout de ces trois jours, ce milieu est retiré et remplacé par les différents milieux de stimulation (α MEM 10%SVF 1%PS). Ces milieux sont toujours additionnés d'acide ascorbique 50 μ g/ml, de dexaméthasone 10 nM et de β -glycerophosphate 2.5 mM. Les différentes conditions sont : 1. Contrôle; 2. 17β -estradiol 10^{-8} M; 3. 17β -estradiol 10^{-8} M; 4. Mélatonine 10^{-9} M; 5. Mélatonine 10^{-9} M et 17β -estradiol 10^{-8} M; 6. Tamoxifène 10^{-6} M; 7. Génistein 10^{-5} M; 8. Daidzein 10^{-5} M; 9. 4P-PDOT 10^{-6} M; 10. 4P-PDOT 10^{-6} M et Mélatonine 10^{-9} M; 11. 4P-PDOT 10^{-6} M, Mélatonine 10^{-9} M et 17β -estradiol 10^{-8} M; 12. 4P-PDOT 10^{-6} M et 17β -estradiol 10^{-8} M. Les milieux sont changés à tous les deux jours, jusqu'à concurrence de 28 jours. Ensuite, les cellules sont fixées avec de la paraformaldéhyde 10% durant 15 minutes.

La coloration de la minéralisation ainsi que sa quantification se font à la méthode du Rouge Alizarin. 1 ml de solution de rouge alizarin 40 mM (pH=4,1) est ajouté par puits et incubé 20 minutes à température ambiante. Le rouge non incorporé est aspiré et les puits sont lavés doucement avec de l'eau. L'eau est retirée et les puits séchés à l'air libre. Afin de quantifier le marquage, 800 μ l d'acide acétique 10% (v/v) sont ajoutés par puits et les plaques sont incubées 30 min avec agitation à température ambiante. Les cellules sont grattées et transférées avec l'acide dans un eppendorf. Les tubes sont chauffés à 85°C durant 10 min et transférés rapidement sur glace pendant 5 minutes. Ensuite, les tubes sont centrifugés à 20 000 g durant 15 min. 500 μ l du surnageant est prélevé dans un nouvel eppendorf, auquel sont ajoutés 100 μ l d'hydroxyde d'ammonium 10% (v/v). Les échantillons sont lus en triplicata à 405 nm et comparés à une courbe étalon de 0, 1,7708, 3,5417, 7,084, 14,167, 28,33, 56,66 et 113,32 μ g de Rouge Alizarin dans mélange acide acétique 10% et d'hydroxyde d'ammonium 10% (5:1).

3.20. Statistiques

Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel Statistica. Le test utilisé est le test de Mann-Whitney, ou le test de U. Les résultats sont considérés significatifs pour une valeur de $p < 0,05$.

4. Résultats

4.1. Expression des marqueurs de différenciation ostéoblastiques dans les ostéoblastes de patients SIA et des contrôles

Les cellules dérivées des fragments osseux provenant des chirurgies effectuées sur des patients sévèrement atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent ainsi que des fragments provenant des patients sains opérés pour des traumatismes (contrôles) ont été caractérisées phénotypiquement afin de vérifier le phénotype ostéoblastique ou pré-ostéoblastique. Premièrement, l'expression génique de plusieurs marqueurs de différenciation des ostéoblastes a été vérifiée par RT-PCR fait à partir de l'ARN extrait des cellules provenant des patients SIA (n=28) et des sujets contrôles (n=15). Les marqueurs étudiés sont : BMP2, BMP7, TGF β , Runx2, IGF1 et la phosphatase alcaline, qui sont exprimés tout au long de la différenciation des ostéoblastes; l'ostéopontine, exprimée à partir du stade de l'ostéoblaste immature; l'ostéocalcine et le collagène de type 1, présents à partir du stade d'ostéoblaste mature. La figure 5 démontre que les ostéoblastes des patients SIA expriment tous les marqueurs de différenciation à l'étude, tout comme les ostéoblastes des contrôles et ceci de façon basale ou lorsque stimulés au 17- β -estradiol. Ceci confirme que les cellules qui ont servi à cette étude sont des ostéoblastes.

La figure 5 montre une différence dans l'intensité des bandes de PCR de certains gènes, entre les contrôles et les patients, ce qui représente une expression plus importante chez les patients SIA. Ces différences sont résumées dans la figure 6 qui exprime la moyenne des mesures densitométriques effectuées sur les bandes de PCR de la figure 5. La figure 6 montre que l'ostéopontine et le collagène de type I sont exprimés plus fortement chez les patients SIA que chez les contrôles à l'état basal. Il n'y a pas de différence significative entre l'expression basale des marqueurs BMP7, Runx2 et la phosphatase alcaline dans les ostéoblastes des patients SIA et les contrôles. Par contre, le niveau d'ARNm de BMP7 est diminué dans les ostéoblastes des patients SIA et des contrôles lorsque ces cellules sont exposées au 17 β -estradiol durant 16h.

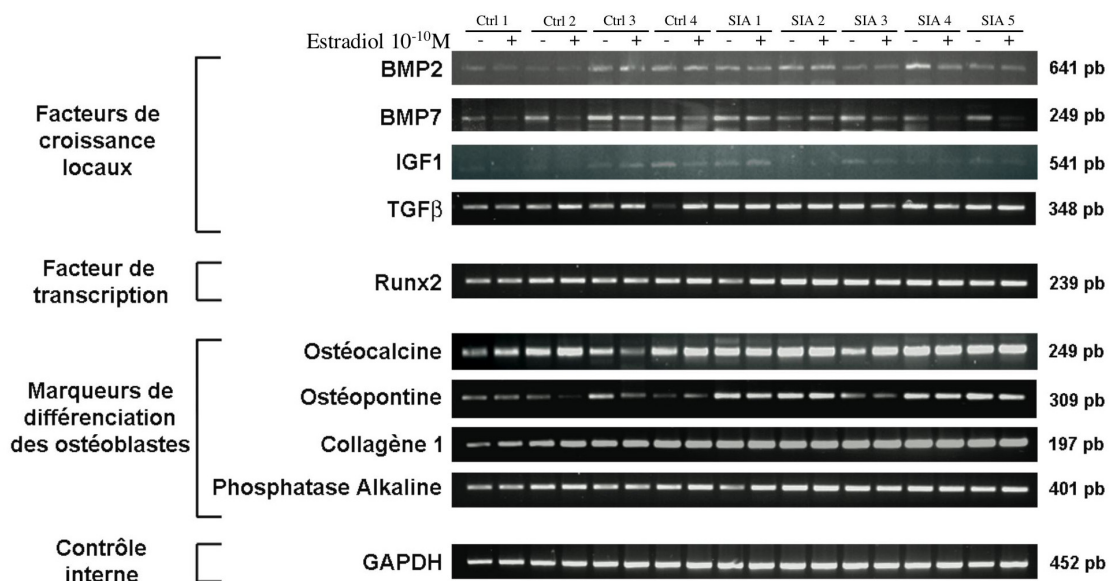


Figure 5: **Expression génique des différents facteurs et marqueurs de différenciation des ostéoblastes.** Les analyse de PCR ont été effectuées sur l'ARN extrait des ostéoblastes provenant de biopsies de patients SIA et de sujets sains cultivés jusqu'à confluence. L'analyse de l'ARN de 4 sujets sains et 5 patients SIA est représentée ici. Ensuite les cellules ont été privées 6h et stimulées au 17β -estradiol (10^{-10} M) durant 16h. Voir le tableau IV pour les conditions de PCR.

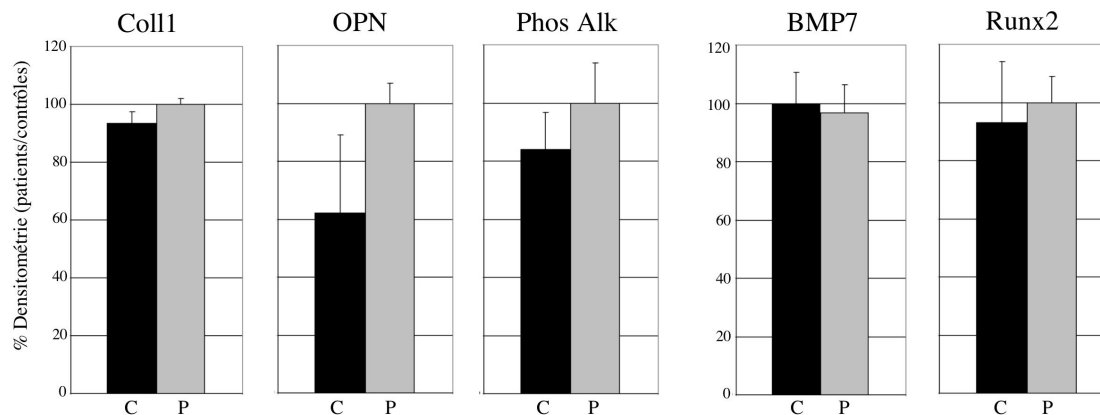
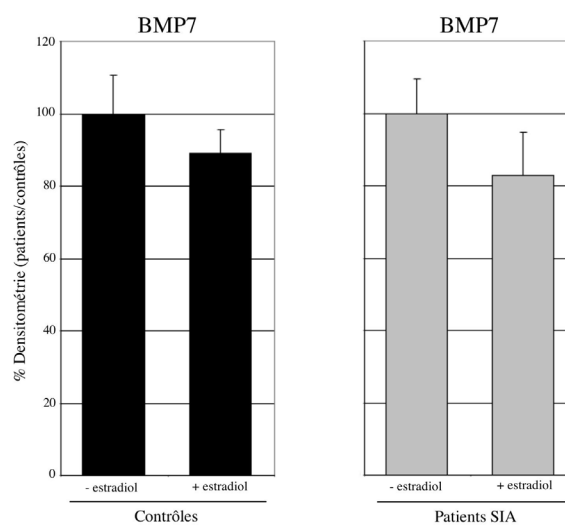
A**B**

Figure 6 : **Semi-quantification de l'expression des gènes de marqueurs de différenciation des ostéoblastes.** Les moyennes des mesures densitométriques ainsi que les déviations standards effectuées sur les résultats de PCR de la figure 5 ont été représentées par les bandes de l'histogramme. **A** Expression basale des marqueurs de différenciation des ostéoblastes et des facteurs de transcription ou de croissance dans les ostéoblastes des patients SIA et des sujets sains. TGF β et BMP2 ont été quantifiés avec la PCR quantitative. * Test de Mann-Whitney ($p < 0,05$). **B** : Expression de BMP7 en fonction de l'exposition ou non des ostéoblastes au 17 β -estradiol (10^{-10} M). C: sujets contrôles, P: patients SIA

Les ostéoblastes utilisés dans cette étude ont été colorés pour vérifier la présence de la phosphatase alcaline active, indicateur de la différenciation des ostéoblastes (figure 7a, c, e et g). En effet, la phosphatase alcaline est active dès le stade de pré-ostéoblaste. Plus la coloration est rouge foncée, plus l'ostéoblaste est différencié. Nous avons ensuite induit la différenciation des cellules avec la BMP2 0,5 nM afin de vérifier la réponse de ces cellules à ce facteur de croissance (figure 7b, d, f et h). La figure 7 montre que la phosphatase alcaline dans les cellules provenant des patients SIA ainsi que des sujets contrôles est présente à des degrés variables, ce qui indique que toutes les cellules ne sont pas au même stade de différenciation. Par contre, ces cellules répondent fortement à la BMP2 et se différencient en ostéoblastes. Il n'y a pas de différence dans la réponse des ostéoblastes à la BMP2 entre les patients SIA et les sujets contrôles. Tel qu'attendu, les cellules HEK (Cellules rénales embryonnaires humaines) utilisées comme contrôle négatif ne montrent pas de coloration pour la phosphatase alcaline (coloration rouge) puisque cet enzyme n'est pas actif dans ces cellules (figure 8).

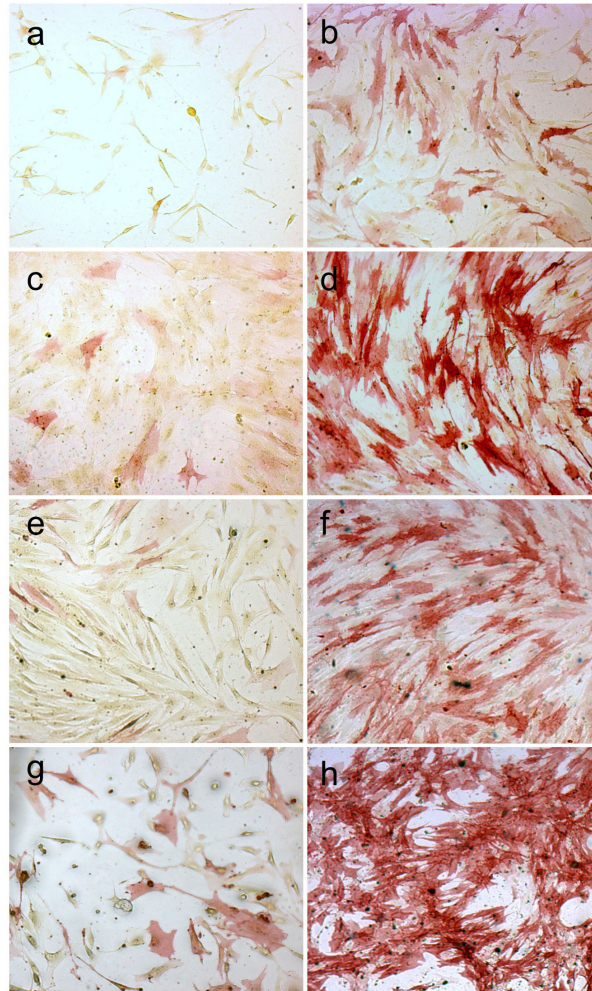


Figure 7: **Différenciation des ostéoblastes.** Les ostéoblastes provenant de sujets contrôles (a-d) et de patients SIA (e-h) sont dérivés à partir d'extraits d'os provenant de biopsies. Ces cellules sont mises dans des plaques de 24 puits. Une partie des cellules sont fixées dans du formaldéhyde 3,7% dès qu'elles ont adhéré (a, c, e et g). Le reste des cellules correspondantes (b, d, f et h) sont cultivées jusqu'à confluence et traitées pendant 72 heures avec 0,5nM de BMP2, 50 µg/ml d'acide ascorbique, dexaméthasone 10 nM et β -glycerophosphate 2.5 mM. Les cellules sont ensuite colorées pour la détection de la phosphatase alcaline.

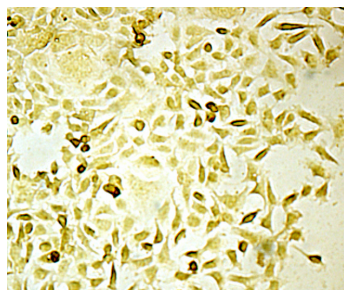


Figure 8 : **Détection de l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules HEK** (contrôle négatif). Les HEK sont mises dans des pétris de 100 mm et sont fixées dans du formaldéhyde 3,7% dès qu'elles ont adhéré. Les cellules sont ensuite colorées pour la détection de la phosphatase alcaline.

4.2. Expression génique des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles

4.2.1. Détection de l'expression de ER α et ER β

Afin de déterminer le profil d'expression des récepteurs aux estrogènes, ER α et ER β , dans les ostéoblastes de patients scoliotiques, cette étude a débuté par la caractérisation de l'expression génique de ces récepteurs, ainsi que de leurs isoformes dans ces cellules. Nous avons d'abord amplifié par RT-PCR certains fragments des récepteurs, plus particulièrement dans les domaines A-D, afin de vérifier la présence de l'ARNm de ces gènes dans les ostéoblastes, ainsi que de possibles délétions ou additions qui pourraient être présentes dans l'ARNm des récepteurs et qui seraient détectables par RT-PCR. Tel que démontré par la figure 9, les récepteurs aux estrogènes sont exprimés aussi bien chez les patients SIA que chez les contrôles. Par contre, l'expression de ces gènes est variable entre les individus (tel qu'observé par l'intensité des bandes). Aucun patient ni contrôle n'ont démontré des délétions ou des additions d'acides nucléiques détectables en RT-PCR. Également, l'expression des différents fragments du gène d'ER β est plus faible que celle de ER α , chez les contrôles et les patients SIA.

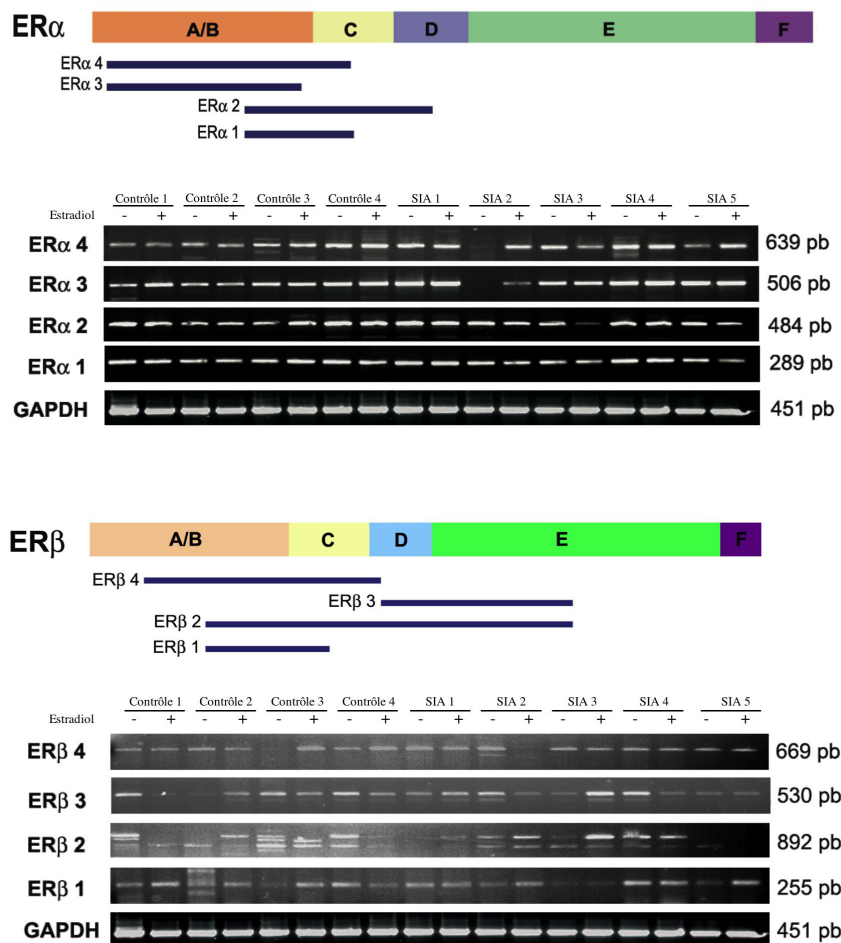


Figure 9: Expression génique des récepteurs aux estrogènes ERα et ERβ dans les ostéoblastes de patients SIA et sujets contrôles. L'ARN a été extrait des ostéoblastes provenant de biopsies de patients SIA et de sujets sains cultivés jusqu'à confluence. L'analyse de l'ARN de 4 sujets sains et 5 patients SIA est représentée ici. Ensuite les cellules ont été privées 6h et stimulées au 17β-estradiol 10^{-10} M durant 16h. Les mentions ERα1, ERα2, ERα3, ERα4, ERβ1, ERβ2, ERβ3 et ERβ4 correspondent aux paires d'amorces utilisées (tableau V).

La paire d'amorces ERβ2 a généré un doublet d'environ 500 pb présent en quantités variables chez tous les patients et les contrôles. Suite au séquençage du doublet, nous avons trouvé qu'il fait partie de la séquence de l'isoforme ERβS1, résultat qui sera discuté à la figure 13.

4.2.2. Quantification de l'expression de chaque isoforme de ER α et ER β

L'expression de chaque isoforme de ER α et ER β dans les ostéoblastes de patients SIA a été quantifiée par la technique de PCR quantitative et comparée à l'expression de ces mêmes isoformes chez les sujets sains. La technique de qPCR consiste à comparer l'expression d'un gène par rapport à un contrôle interne (un autre gène exprimé fortement dans la cellule, ici la GAPDH). Ce résultat établit la valeur « seuil » ou Ct (threshold value), qui sert à calculer l'expression relative de chaque gène (RQ). Le « fold change » ou rapport d'expression, est l'expression d'un gène rapporté sur celle d'un autre gène.

La figure 10 montre que ER α et ER β (tous les isoformes confondus) sont exprimés en quantités semblables dans les ostéoblastes des patients SIA et des contrôles. Cette expression est néanmoins extrêmement variable entre chaque individu, ce qui est représenté par les valeurs limites très écartées par rapport à la médiane. L'expression des deux récepteurs augmente légèrement suite à l'exposition au 17 β -estradiol, quoique cette augmentation ne soit pas significative. La figure 11 présente l'expression de 4 isoformes différents de ER β (voir la figure 3 pour les différences entre les isoformes): ER β 4 (figure 11a), ER β a (figure 11b), ER β b/c (figure 11c) et ER β S1 (figure 11d), chez les patients SIA ainsi que chez les contrôles. Encore une fois, les niveaux d'expression de ces gènes sont les mêmes entre les contrôles et les patients et l'expression inter-individus reste très variable. On observe une augmentation de l'expression de ER β 4 suite à l'exposition au 17- β -estradiol chez les patients SIA et les contrôles mais cette augmentation est non significative (Mann Whitney avec un $p=0,05$).

La figure 12 compare l'expression basale (sans exposition de 17 β -estradiol) de ER α par rapport à ER β dans les ostéoblastes dérivés des patients SIA et des contrôles. Dans le cas de la figure 12, ce rapport exprime la différence d'expression entre ER α et ER β , soit ER α /ER β . Dans les deux cas, ER α est exprimé environ 75 fois plus que ER β .

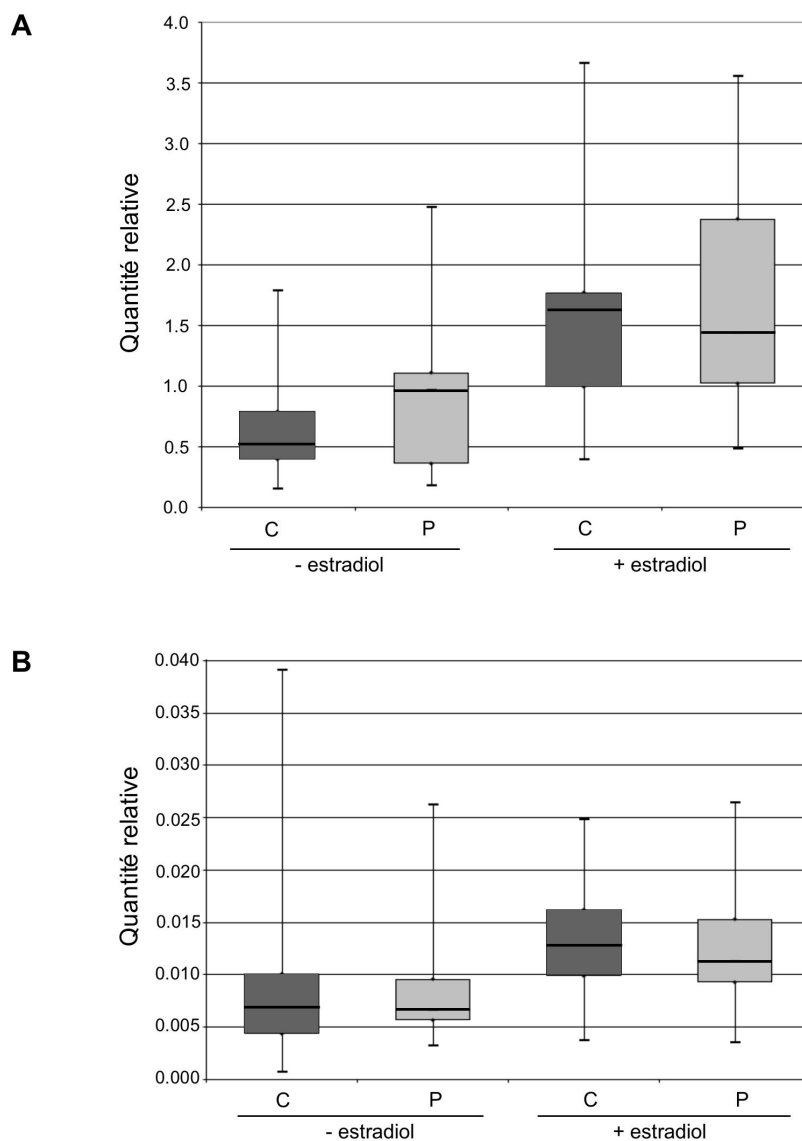


Figure 10: **Quantification de l'expression génique de ER α et ER β dans les osteoblastes de patients SIA et contrôles**, stimulés ou non à l'estradiol. Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence avant d'être privées 6h et traitées 16h avec 10^{-10} M d'estradiol. Une extraction au Trizol a été effectuée pour récupérer l'ARN qui a servi à produire du cDNA. La PCR quantitative est faite avec la méthode des sondes universelles TaqMan. **A**: Quantification relative de l'expression de ER α , tous isoformes confondus **B**: Quantification relative de l'expression de ER β , tous isoformes confondus.

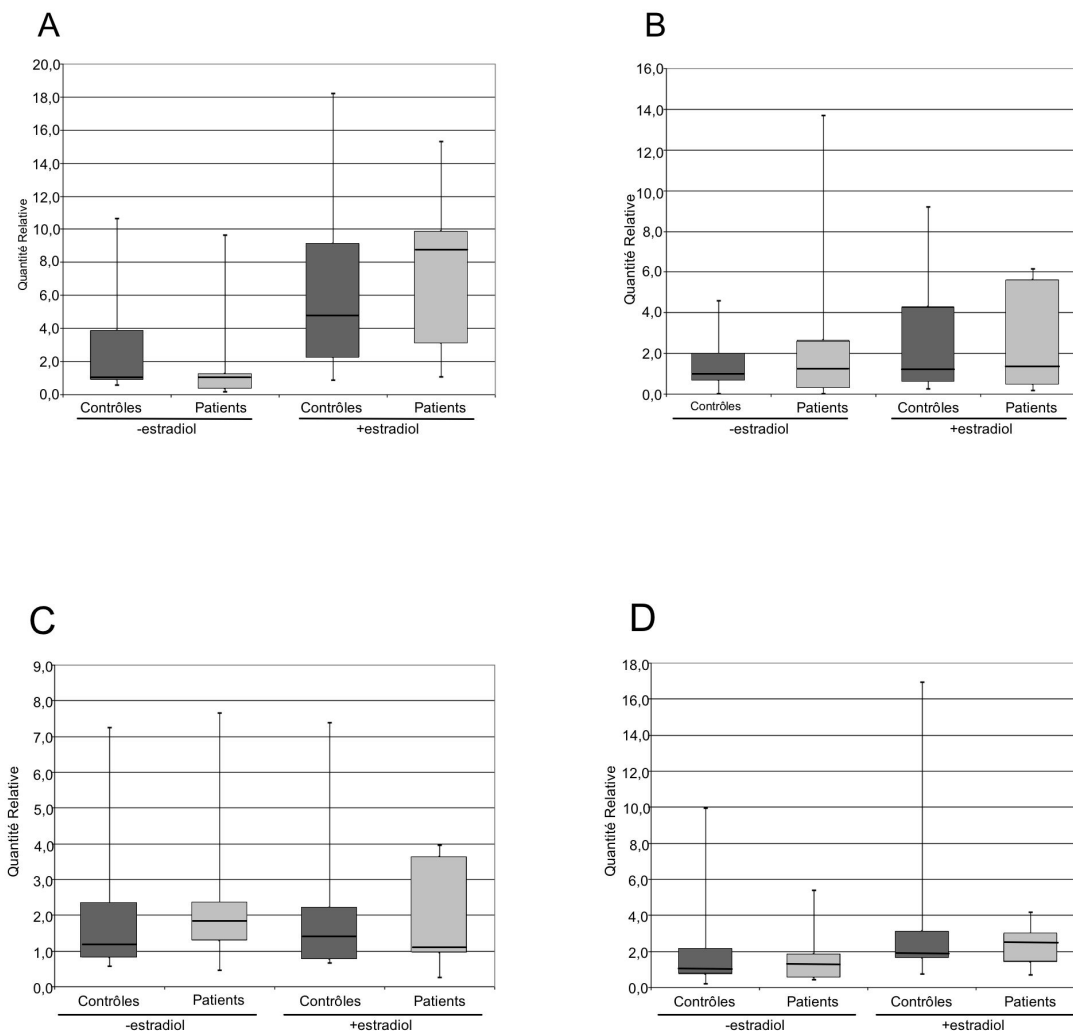


Figure 11: **Expression génique des isoformes de ERβ dans les ostéoblastes de patients SIA et contrôles, non-stimulés ou stimulés à l'estradiol 10^{-10} M.** Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence avant d'être privées 6h et traitées 16h avec du 17β -estradiol 10^{-10} M. Une extraction au Trizol a été effectuée pour récupérer l'ARN à partir duquel l'ADNc a été produit. La PCR quantitative a été réalisée par la méthode des sondes universelles TaqMan. **A:** Quantification relative de l'expression de l'isoforme ERβ 4. **B:** Quantification relative de l'expression de l'isoforme ERβ a. **C:** Quantification relative de l'expression de l'isoforme ERβ b/c. **D:** Quantification relative de l'expression de l'isoforme ERβ S1

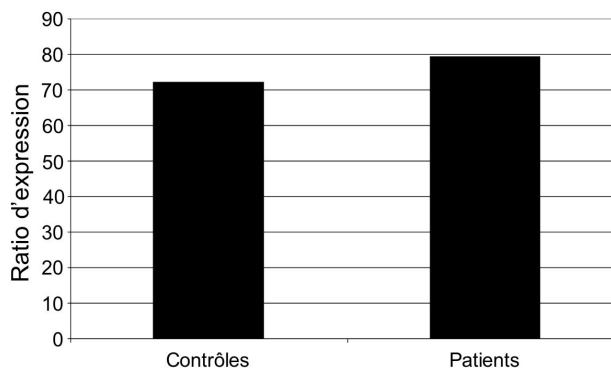


Figure 12: **Ratio de l'expression basale de ER α par rapport à ER β dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.** Les résultats de PCR quantitative (RQ, ou quantité relative) ont servi à calculer la moyenne de la quantité relative d'expression des deux récepteurs, tous isoformes confondus. Ensuite, le ratio de l'expression a été calculé comme suit : ER α contrôles/ ER β contrôles et ER α patients/ER β patients

4.2.3. Mise en évidence d'un nouvel isoforme de ER β dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles

Tel que présenté ci-haut, la paire d'amorces ER β 2 avait généré un deuxième fragment qui a été étudié par séquençage. Ce fragment fait partie de l'isoforme ER β S1. Cet isoforme n'est pas caractérisé dans la littérature; seule la séquence est disponible ([AY438022](#)). Nous avons vérifié l'expression de cet isoforme dans les ostéoblastes de patients et de contrôles (Figure 13A). Cet isoforme est exprimé chez les patients SIA de façon comparable aux contrôles (figure 13A). Les grands écarts types sont dus à la difficulté de détection de ce gène dans les ostéoblastes et à la grande variabilité de l'expression entre les individus. L'expression de ER β S1 a également été recherchée dans divers tissus humains (figure 13B) (l'ARN provient du kit *FirstChoice Human total RNA Survey Panel*, Ambion, Texas, États Unis). Les tissus qui expriment le plus cet isoforme sont les testicules, la prostate et les ovaires, à des niveaux d'environ 550X plus

que le muscle. L'expression de ER β S1 dans les ostéoblastes est faible, et les niveaux d'expression sont comparables à ceux observés dans le foie et les muscles.

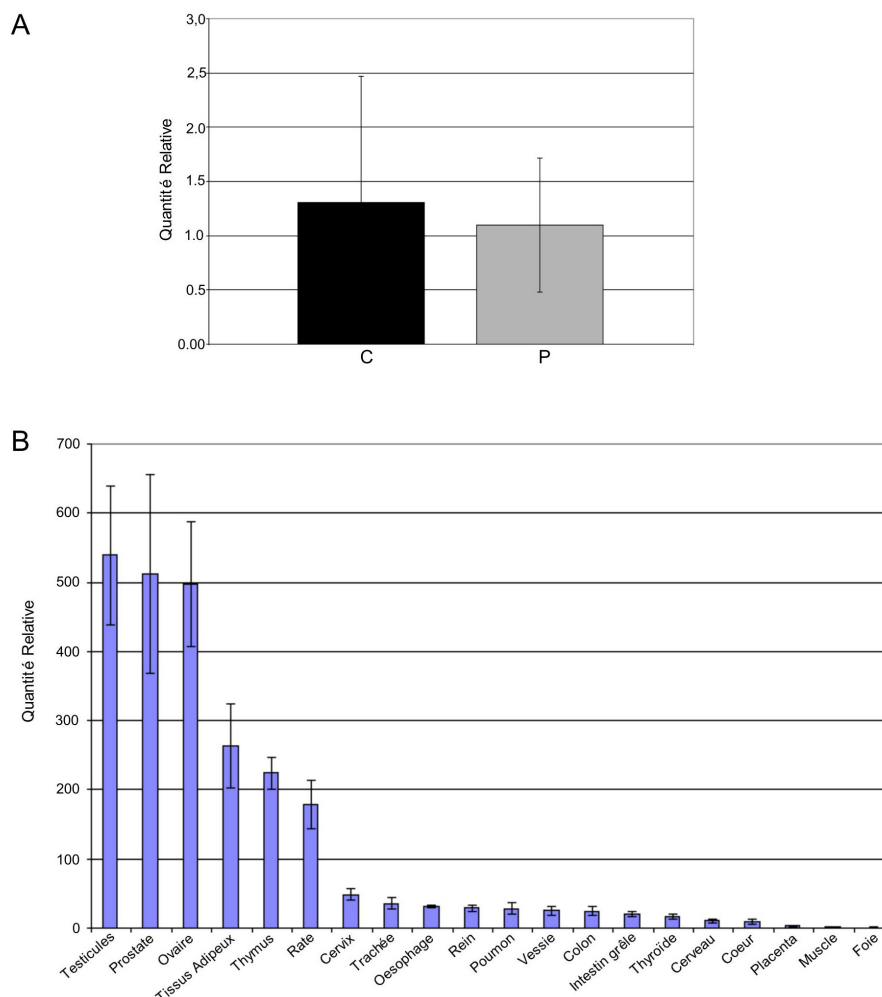


Figure 13: **Expression de l'isoforme ER β S1 dans les ostéoblastes de patients SIA (A) et de sujets contrôles ainsi que dans divers tissus humains (B).** L'ARN des tissus a été procuré chez Ambion (Texas, Etats-Unis). L'ARN des ostéoblastes a été récolté par une extraction au Trizol sur des cellules cultivés jusqu'à confluence, privées 6h et traitées ou non avec de l'estradiol 10^{-10} M durant 16h. L'ARN a servi à produire de l'ADNc. La PCR quantitative est réalisée à partir de la méthode des sondes universelles TaqMan.

4.3. Expression protéique des ER et réorganisation nucléaire suite à la stimulation au 17 β -estradiol

Lorsque stimulé au 17 β -estradiol, les récepteurs aux estrogènes forment des homo- ou hétérodimères et se réorganisent dans le noyau cellulaire pour amorcer la transcription de gènes. La réaction de dimérisation prend quelques minutes à se former et commence à diminuer après 3 heures lorsque les récepteurs sont ubiquitinés et dégradés (Ascenzi, Bocedi et al. 2006). Nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence mettant en évidence les récepteurs aux estrogènes afin de vérifier si les récepteurs aux estrogènes des ostéoblastes de patients atteints de scoliose se relocalisent normalement suite à l'exposition au 17 β -estradiol.

4.3.1. ER α

Un marquage nucléaire a été observé dans les cellules exposées à l'estradiol tel que démontré par les figures 14 et 15. Dans les cellules non exposées au 17 β -estradiol (état basal), un marquage plus faible est observé dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau. Suite à 30 minutes d'exposition à des doses physiologiques (10^{-10} M) ou pharmacologiques (10^{-8} M) d'estradiol, les récepteurs aux estrogènes ER α se relocalisent dans le noyau, de façon comparable chez les patients SIA et les contrôles. Le signal maximal est observé suite à 90 minutes d'exposition à des doses physiologiques de 17 β -estradiol (Figure 14) et à 30 minutes avec des doses pharmacologiques (Figure 15). On ne détecte pas de diminution du signal après 180 minutes d'exposition à l'estradiol, ni chez les patients SIA ou les contrôles et ce, dans les deux conditions expérimentales.

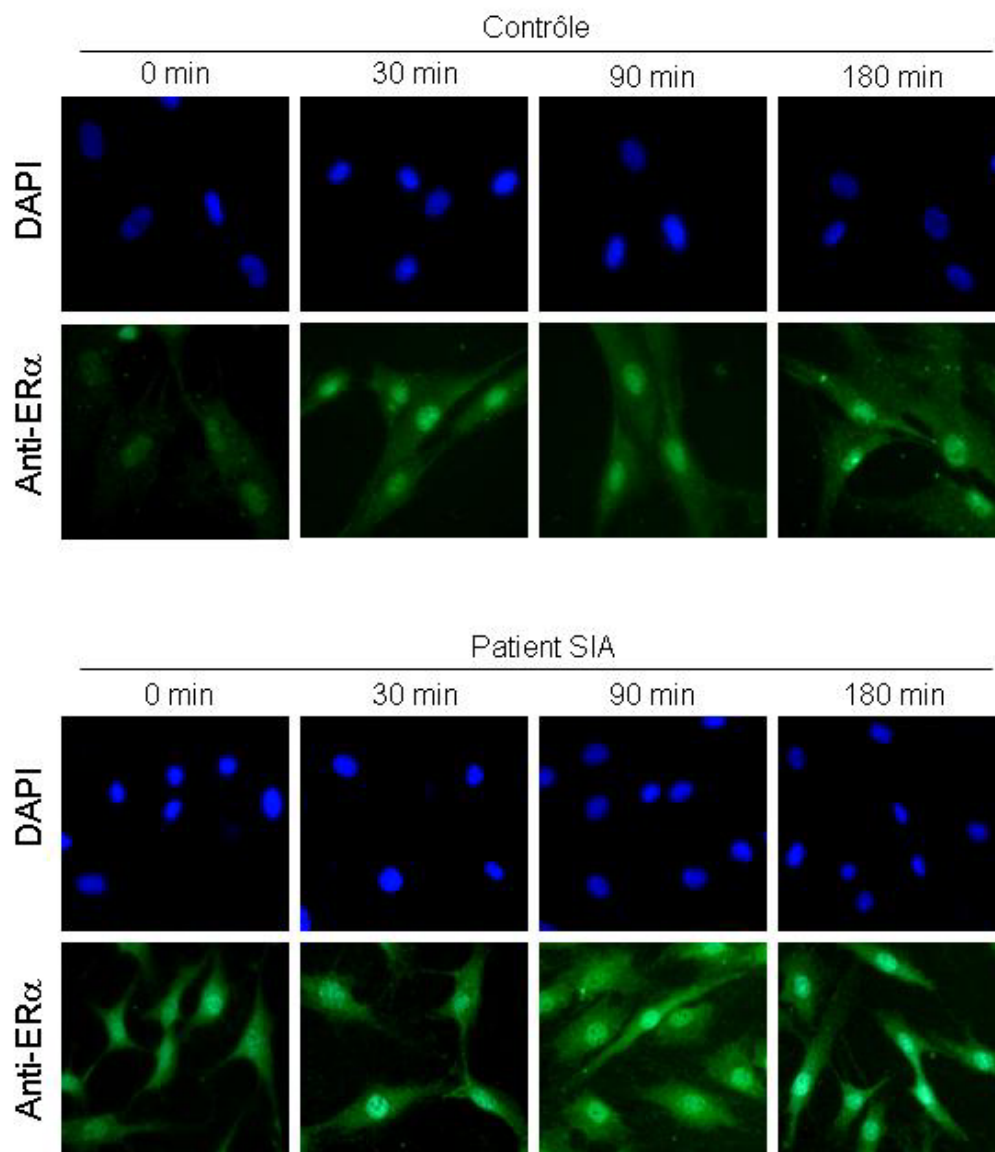


Figure 14: **Relocalisation de ER α dans les noyaux suite à une stimulation à l'estradiol 10^{-10} M.** Les ostéoblastes provenant de biopsies de patients SIA et de sujets contrôles ont été cultivés dans des chambres à culture à raison de 5000 cellules par puits et exposés à 10^{-10} M d'estradiol durant 0, 30, 90 et 180 minutes. Les cellules ont été fixées avec 50% éthanol/50% acétone et marquées avec un anticorps contre ER α (Santa Cruz MC-20). L'anticorps secondaire est couplé à la fluorescence ($\lambda 488$). Les noyaux sont contre-colorés au Dapi. Grossissement 400X.

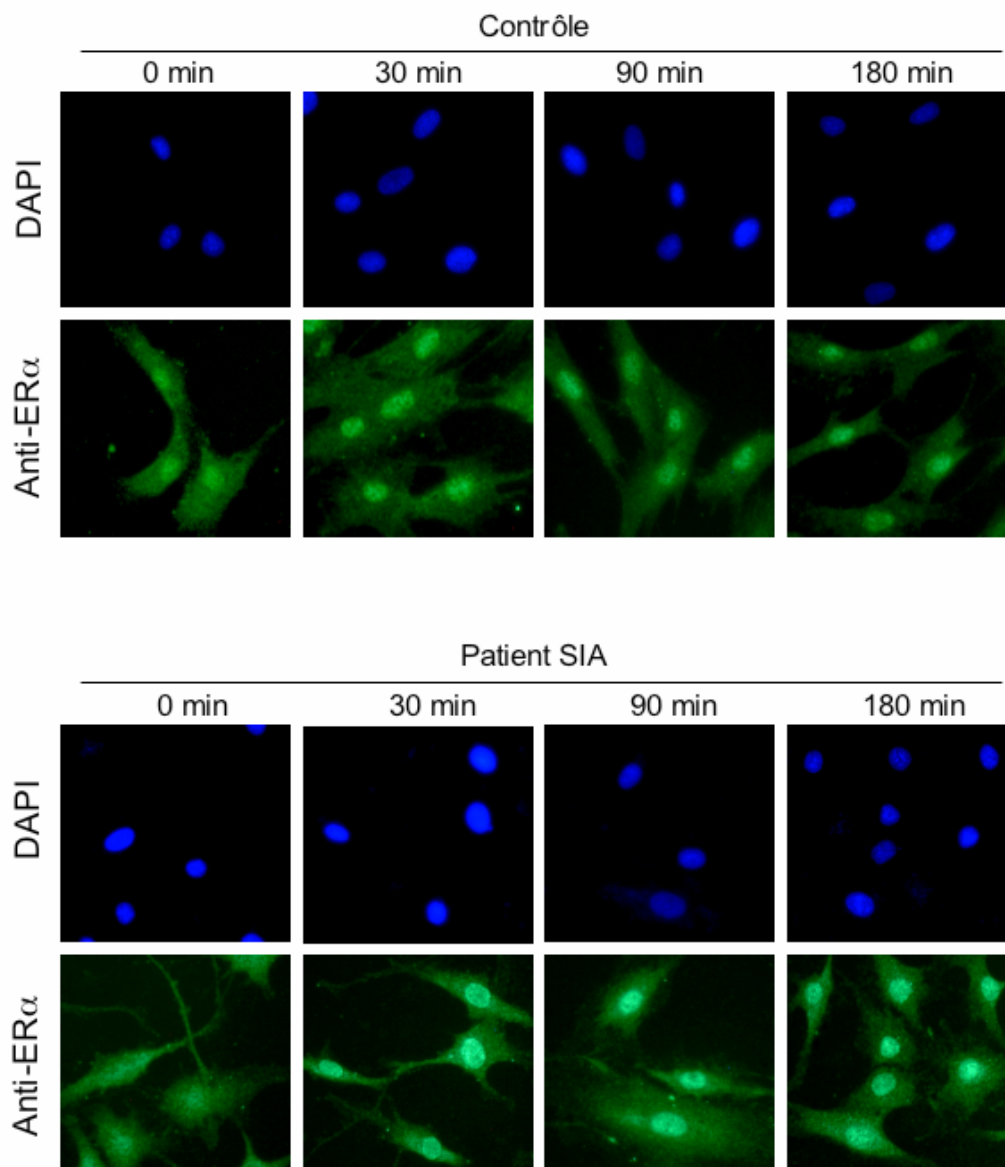


Figure 15: **Relocalisation de ER α dans les noyaux suite à une stimulation à l'estradiol 10^{-8} M.** Les ostéoblastes provenant de biopsies de patients SIA et de sujets contrôles ont été cultivés dans des chambres à culture à raison de 5000 cellules par puit et exposés avec l'estradiol 10^{-8} M durant 0, 30, 90 et 180 minutes. Les cellules ont été fixées avec 50% éthanol/50% acétone et marquées avec un anticorps contre ER α (Santa Cruz MC-20). L'anticorps secondaire est couplé à la fluorescence ($\lambda 488$). Les noyaux sont contre-colorés au Dapi. Grossissement 400X.

4.3.2. ER β

Les figures 16 et 17 illustrent la localisation cellulaire de ER β dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets sains suite à l'exposition de ces cellules à l'estradiol 10^{-10} M et 10^{-8} M. Lorsque les cellules étaient exposées à l'estradiol, nous avons observé que le signal fluorescent au niveau du noyau reste intense plus longtemps dans les ostéoblastes des patients que ceux des contrôles. Également, la réorganisation de ER β dans le noyau semble différent de celui de ER α puisque suite à 30 minutes d'exposition à des doses physiologiques (10^{-10} M) d'estradiol, les ER β sont concentrés au pourtour du noyau alors que les récepteurs ER α étaient répartis dans le noyau. Après 90 minutes d'exposition à l'estradiol 10^{-10} M, les récepteurs ER β se dispersent dans le noyau, de façon comparable chez les patients SIA et les contrôles. À 180 minutes, il y a diminution du signal nucléaire chez les contrôles seulement.

Suite à l'exposition des cellules à une dose pharmacologique de 17 β -estradiol (10^{-8} M), les récepteurs ER β se relocalisent plus rapidement dans le noyau (après 30 minutes), chez les patients SIA et les contrôles, comparativement aux mêmes cellules soumises à des doses physiologiques. Par contre, le signal diminue plus rapidement chez les contrôles que chez les patients.

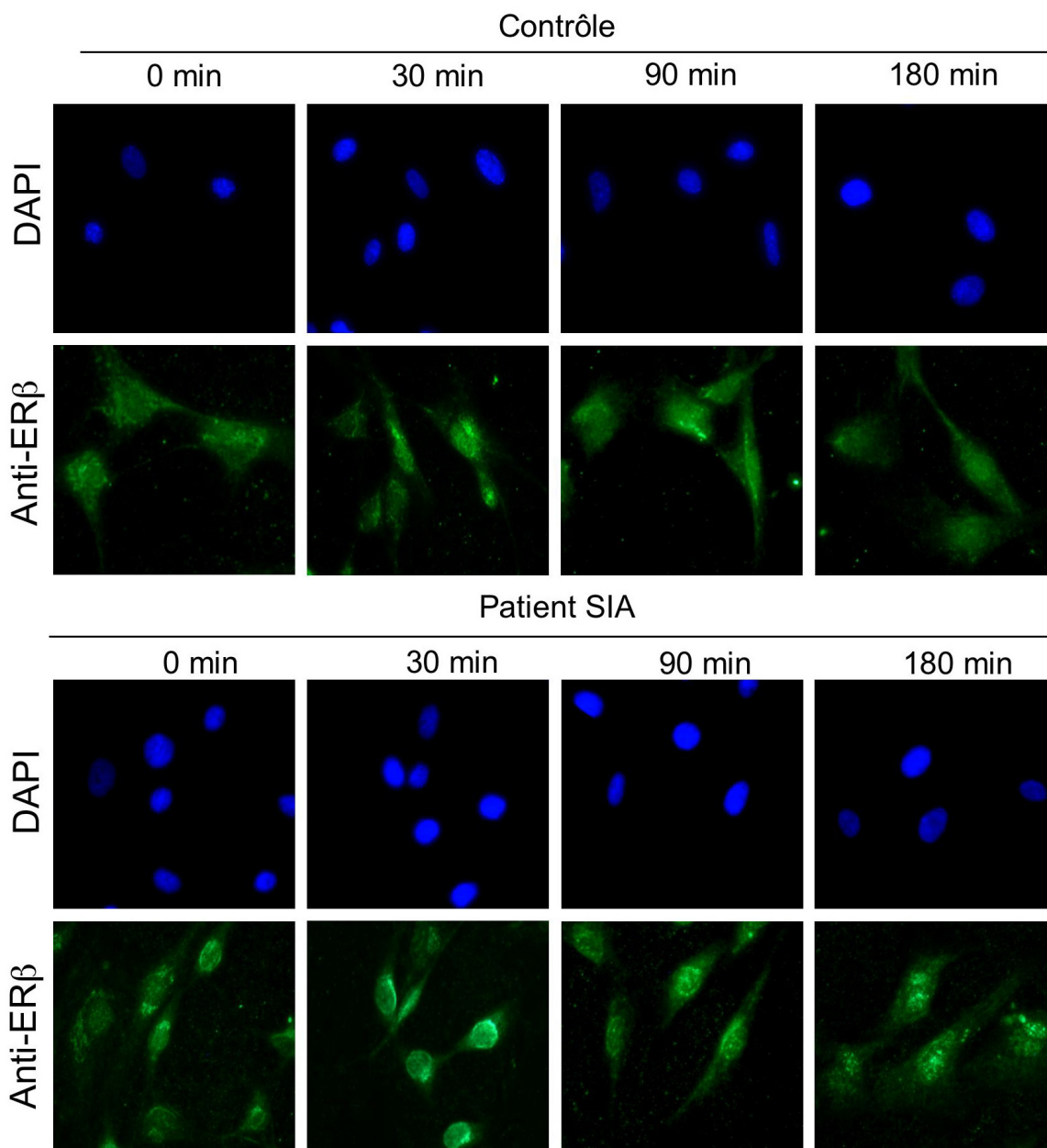


Figure 16: **Relocalisation de ER β dans les noyaux suite à une stimulation à l'estradiol 10^{-10} M.** Les ostéoblastes provenant de biopsies de patients SIA et de sujets contrôles ont été cultivés dans des chambres à culture à raison de 5000 cellules par puits et stimulés avec 10^{-10} M d'estradiol durant 0, 30, 90 et 180 minutes. Les cellules ont été fixées avec 50% éthanol/50% acétone et marquées avec un anticorps contre ER β (Santa Cruz H-150). L'anticorps secondaire est couplé à la fluorescence ($\lambda 488$). Les noyaux sont contre-colorés au Dapi. Grossissement 400X.

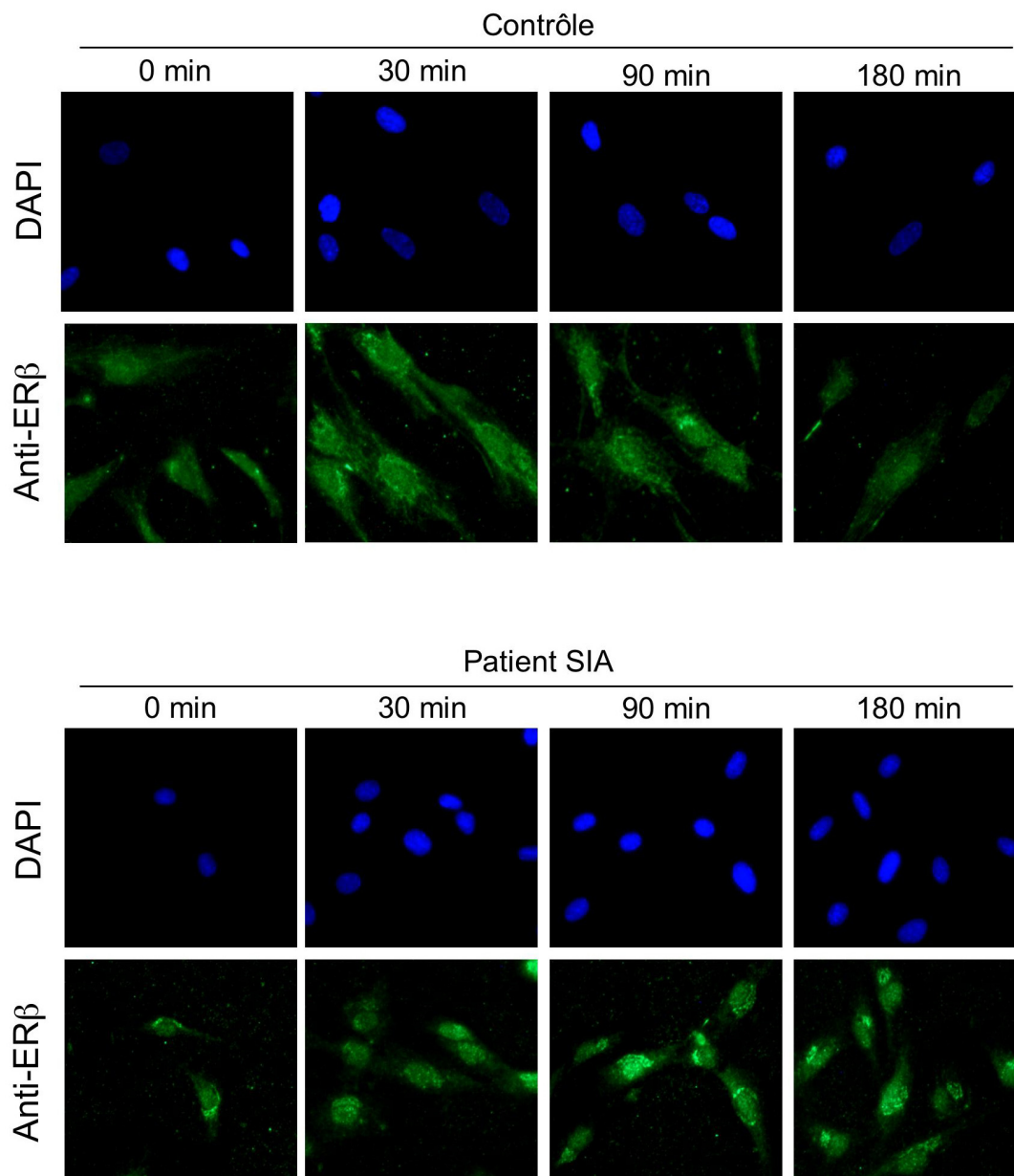


Figure 17: **Relocalisation de ER β dans les noyaux suite à une stimulation à l'estradiol 10^{-8} M.** Les ostéoblastes provenant de biopsies de patients SIA et de sujets contrôles ont été cultivés dans des chambres à culture à raison de 5000 cellules par puits et stimulés avec 10^{-10} M d'estradiol durant 0, 30, 90 et 180 minutes. Les cellules ont été fixées avec 50% ethanol/50% acetone et marquées avec un anticorps contre ER β (Santa Cruz H-150). L'anticorps secondaire est couplé à la fluorescence (λ 488). Les noyaux sont contre-colorés au Dapi. Grossissement 400X.

Des études préliminaires ont été faites afin de détecter les récepteurs ER α et ER β par immunohistochimie sur des coupes histologiques des biopsies osseuses prises lors des chirurgies sur des patients SIA et des sujets sains opérés pour trauma osseux. Les anticorps utilisés sont les mêmes que pour les expériences d'immunocytochimie. Une coloration Goldner a été effectuée auparavant, afin de vérifier la structure osseuse du spécimen.

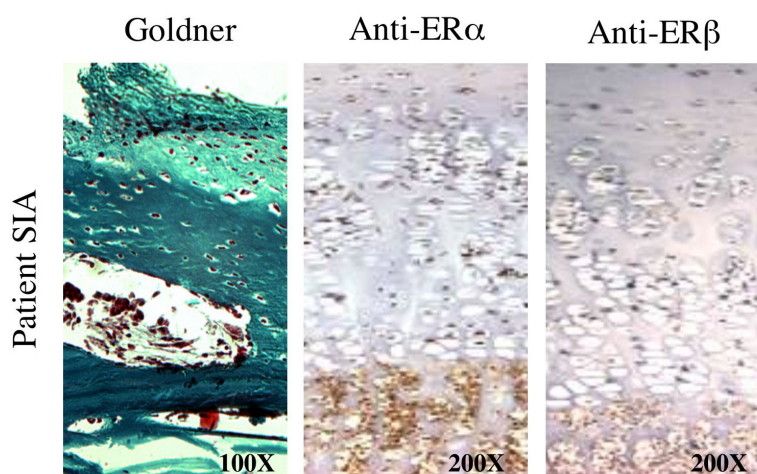


Figure 18 : **Détection de ER α et ER β sur des coupes histologiques du tissu osseux d'un patient SIA.** Les coupes de 5 μ m ont été déparaffinées, incubées dans un tampon citrate, du triton 0.3% et une solution de peroxyde. Les sites non spécifiques ont été bloqués avec du sérum de chèvre. L'anticorps primaire (ER α MC-20 ou ER β H-150) a été ajouté à une concentration de 1:50, pendant 16h à 4°C. L'anticorps secondaire (anti-rabbit) est utilisé à une concentration de 1:300, incubé à 25°C durant 45 min. Suite à l'exposition des coupes au complexe biotine-avidine, le marquage est révélé avec la DAB. Les spécimens sont observés au microscope à 100X et 200X.

4.4. Liaison des ER à l'ADN

4.4.1. Détermination du contrôle positif de la liaison de la sonde ERE (Estrogen Response Element) avec ER α

Les récepteurs aux estrogènes sont des facteurs de transcription qui reconnaissent une séquence consensus sur l'ADN, nommée Estrogen Response Element (ERE). Lorsqu'une sonde formée de la séquence ERE est mise en contact *in vitro* avec les récepteurs aux estrogènes présents dans les extraits nucléaires des cellules, il se forme une liaison détectable sur gel par une expérience de retard sur gel, ou EMSA. Afin de visualiser sur gel le complexe ERE-ER, nous avons d'abord fait migrer des récepteurs aux estrogènes ER α et ER β formés par une réaction *in vitro* de transcription – traduction effectuée dans les leucocytes de lapin, avec la sonde ERE. La colonne 2 de la figure 19 indique la position de la bande représentant le complexe formé de ER α et de la sonde. ER β semble s'être dégradé, ce qui explique la bande plus faible en intensité formée par le complexe ERE-ER β (colonne 3 de la figure 19). Le complexe ERE-ER β migre plus rapidement que le complexe ERE-ER α en vertu de la différence de poids moléculaire entre les deux isoformes.

Afin de vérifier la spécificité de la deuxième bande (plus basse que le complexe ER-ERE) apparente sur tous nos résultats de EMSA, nous avons effectué une compétition entre la sonde ERE radioactive et la sonde ERE froide de même qu'une compétition entre la sonde ERE radioactive et une sonde différente (provenant de l'intron 1 du gène de ER α). Dans le premier cas (sonde ERE froide), le signal radioactif de composition inconnue a diminué (les puits 4-8 de la figure 19). Donc, il y a une possibilité que ce signal soit lié à la sonde ERE. Par contre, le signal a diminué également avec la sonde non-spécifique (figure 19, bandes 9-12) et par conséquent, la bande en question est non spécifique puisqu'elle n'est pas reliée à une seule sonde. Ces expériences ont été réalisées avec des extraits nucléaires d'un sujet contrôle.

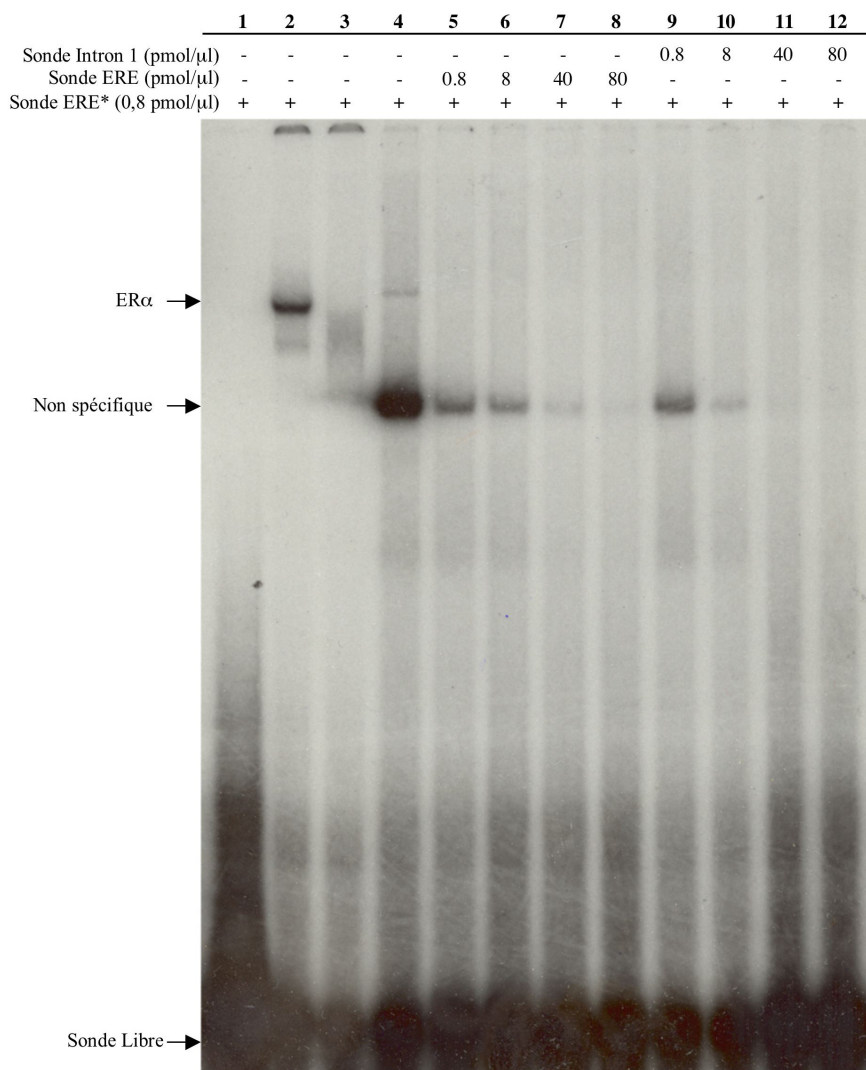


Figure 19: **Liaison spécifique de la sonde ERE (Estrogen Response Element) avec les récepteurs aux estrogènes ER α et ER β .** Le retard sur gel a été effectué avec des extraits de protéines nucléaires provenant des ostéoblastes d'un sujet contrôle (5 μ g/puits, à partir du puit 4). Chaque échantillon contient 100 000 cpm de sonde ERE marquée au 32 P. **1.** Sonde seule; **2 et 3.** ER α et ER β respectivement (synthétisé avec des leucocytes de lapins), avec la sonde ERE radioactive; **4.** Sonde ERE avec 5 μ g d'extraits nucléaires d'un sujet contrôle; **5-8.** Compétition avec des concentrations croissantes de sonde non-marquée; **9-12.** Compétition avec une sonde non-spécifique de la sonde chaude. Les échantillons ont été migrés sur un gel de polyacrylamide 5%, à 200V durant 3h 30 min. Le gel séché a été exposé 16h à -80°C.

Nous avons également vérifié que la bande produite par la liaison d'extraits nucléaires des ostéoblastes de patients et de sujets contrôles avec la sonde ERE contenait bien le complexe ER-ERE. Cette bande était située à la même hauteur que la bande produite par ER α synthétisé (Figure 20). Pour ce faire, nous avons ajouté des anticorps contre ER α au mélange d'extraits nucléaires et de sonde. Si l'anticorps se lie au complexe ER-ERE, ceci cause un ralentissement de la migration du complexe, produisant une bande radioactive située de façon plus haute que le complexe ER-ERE. Nous avons essayé 3 anticorps différents : ER α ABcam (ab3575), ER α Sigma (E0646), ER α Santa Cruz (MC-20). La figure 20 indique que l'anticorps contre ER α provenant de chez Sigma (Anticorp B) a lié le complexe ER-ERE, chez le patient contrôle et SIA. Par conséquent, nous démontrons que ER α est présent dans le complexe ER-ERE formé à partir de l'échantillon contrôle et celui du patient SIA.

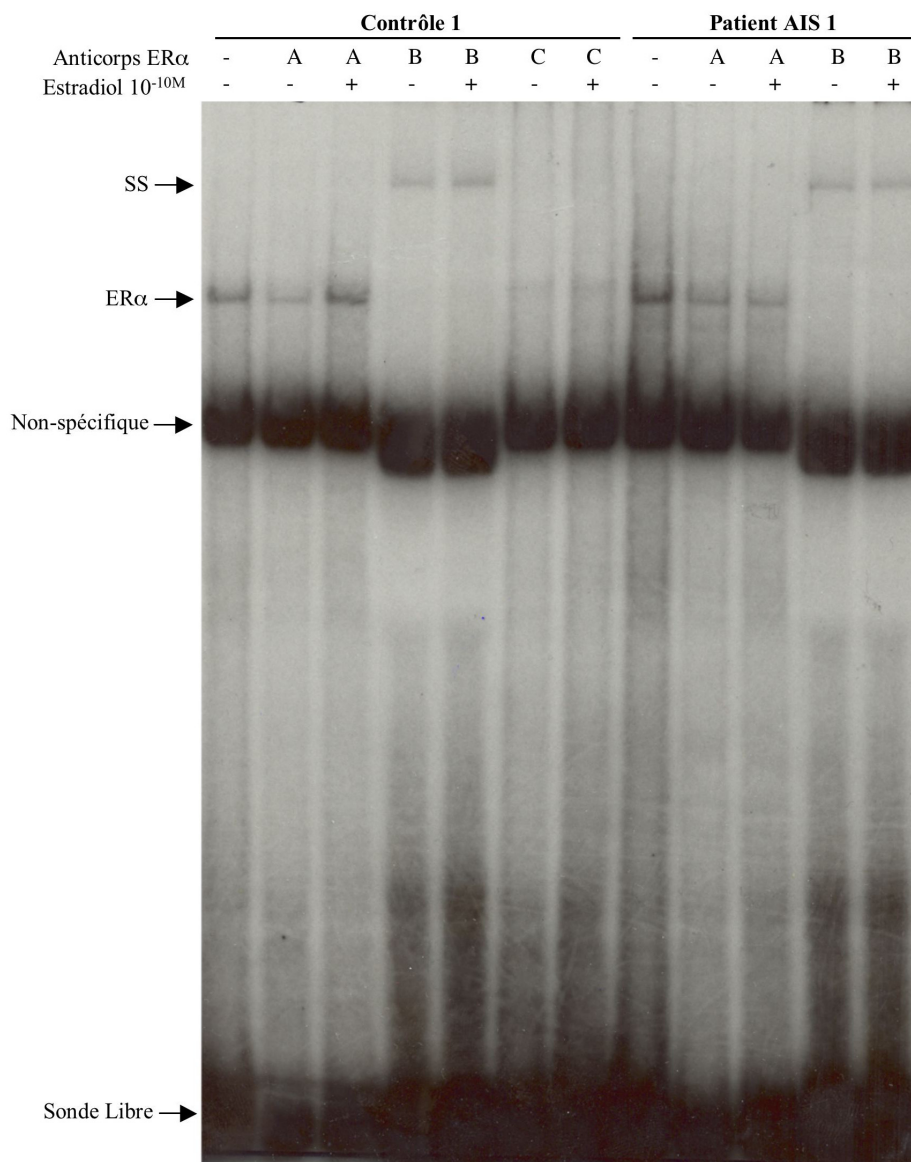


Figure 20: **Liaison de la sonde ERE (Estrogen Response Element) avec ER α .** Le retard sur gel a été effectué avec des extraits de protéines nucléaires provenant des ostéoblastes d'un sujet contrôle et d'un patient SIA (5 μ g/puits). Les protéines nucléaires ont été extraites d'ostéoblastes stimulés ou non à l'estradiol 10⁻¹⁰M. Chaque échantillon contient 100 000 cpm de sonde ERE marquée au ³²P. Les anticorps sont: **A.** Anti-ER α Abcam; **B.** Anti-ER α Sigma; **C.** Anti-ER α (MC-20) Santa Cruz. Les échantillons ont été migrés sur un gel de polyacrylamide 5%, à 200V durant 3h 30 min. Le gel séché a été exposé 16h à -80°C. SS= super shift (présence d'un complexe avec l'anticorps).

4.4.2. Liaison de ER α à l'ADN chez les patients SIA et les sujets contrôles

Afin de déterminer si les récepteurs aux estrogènes ER α et ER β extraits des ostéoblastes de patients SIA et de sujets sains servant de contrôles lient bien l'ADN *in vitro*, nous avons fait migrer ces échantillons en présence de sonde ERE radioactive (Figure 21). Cette expérience a été effectuée avec des échantillons de protéines nucléaires provenant d'ostéoblastes de 5 contrôles et 15 patients SIA. Les ostéoblastes ont été exposés à l'estradiol 10^{-10} M durant 16 heures. Tous les échantillons d'extraits protéiques normaux et de patients SIA ont lié l'ADN. Aucune anomalie de liaison entre les récepteurs aux estrogènes et la sonde ERE n'a été détectée puisqu'il n'y a pas de différence remarquée entre l'intensité des bandes radioactives. De plus, nous n'avons pas observé d'augmentation importante de la quantité de liaison lorsque les ostéoblastes étaient exposés à l'estradiol. On observe toutefois une certaine variation inter-individu dans l'intensité de la bande radioactive, ce qui pourrait correspondre à des variations dans le taux d'expression des récepteurs aux estrogènes retrouvés dans les ostéoblastes.

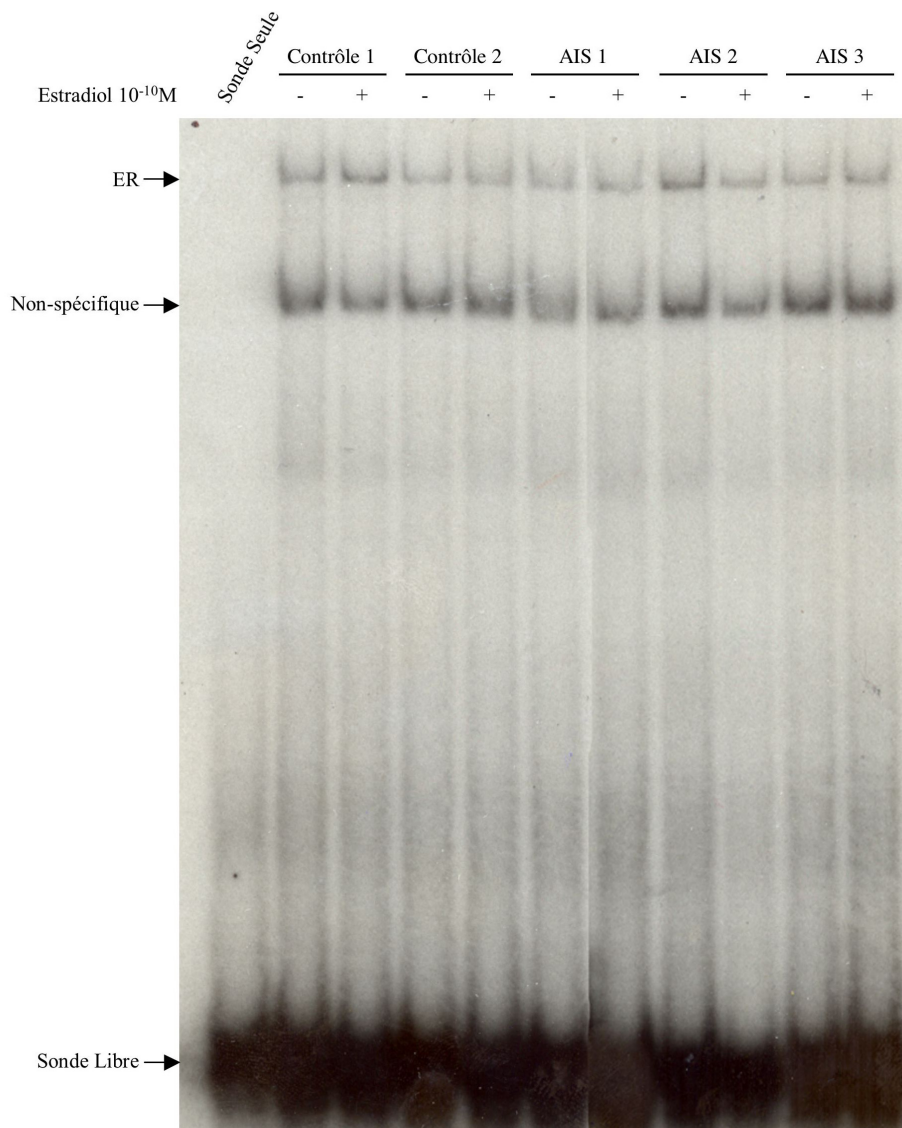


Figure 21: **Liaison de la sonde ERE (Estrogen Response Element) avec ER α dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.** Le retard sur gel a été effectué avec des extraits de protéines nucléaires provenant des ostéoblastes de sujets contrôles et de patients SIA (5 μ g/puit). Les protéines nucléaires ont été extraites d'ostéoblastes stimulés ou non à l'estradiol 10^{-10} M. Chaque échantillon contient 100 000 cpm de sonde ERE marquée au 32 P. Les échantillons ont été migrés sur un gel de polyacrylamide 5%, à 200V durant 3h 30 min. Le gel séché a été exposé 16h à -80° C.

4.5. Expression génique de *BMP2* et de *TGFβ* chez les patients SIA et les sujets contrôles

Nous avons observé par RT-PCR une augmentation de l'expression de *BMP2* dans les ostéoblastes provenant des patients atteints de SIA comparativement aux sujets sains (voir la figure 5). Nous avons par la suite quantifié cette expression par qPCR. La figure 22a montre la quantité relative des niveaux d'ARNm du gène *BMP2*. Nous avons relevé que les patients expriment *BMP2* de façon plus importante que les contrôles au niveau basal. Par contre, cette différence représente une tendance puisque l'analyse statistique donne un $p=0,056$ (test de Mann-Whitney). Encore une fois, les niveaux d'expression inter-individus sont très variables. Nous avons également représenté les résultats par le « fold change ». Dans la figure 22b, tous les résultats sont rapportés sur la moyenne d'expression basale de *BMP2* dans les ostéoblastes des sujets contrôles. Donc, la première colonne de l'histogramme est la moyenne d'expression basale de *BMP2* des contrôles rapportée à 1; la deuxième colonne est l'expression basale de *BMP2* des patients divisée par l'expression basale de *BMP2* des contrôles; la troisième est l'expression de *BMP2* en présence de 17β -estradiol des contrôles divisée par l'expression basale de *BMP2* des contrôles; finalement la quatrième est l'expression de *BMP2* en présence de 17β -estradiol des patients divisée par l'expression basale de *BMP2* des contrôles. L'expression de *BMP2* chez les patients serait environ 2 à 2,5 fois plus élevée que celle des sujets contrôles en absence ou en présence d'estradiol respectivement.

Nous avons également quantifié l'expression de *TGFβ* par qPCR, puisque les BMP font partie de la famille des TGF. Il n'y a aucune différence dans l'expression de *TGFβ* dans les ostéoblastes entre les patients SIA et les sujets contrôles, tel que démontré par la figure 23.

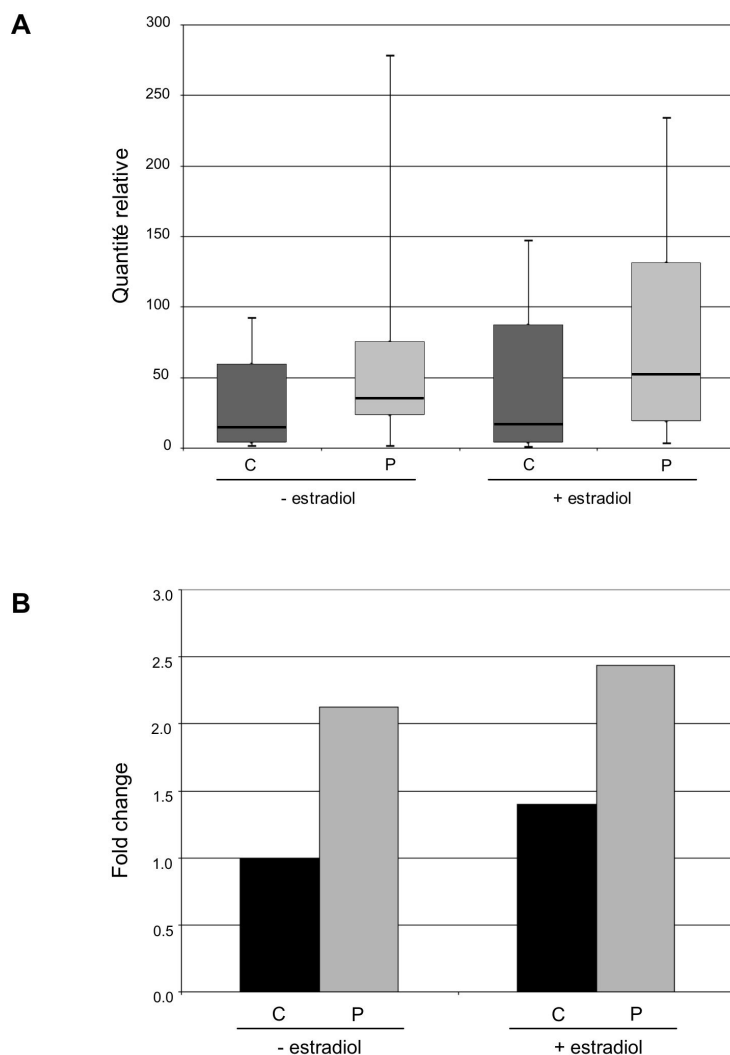


Figure 22: **Expression génique de BMP2 dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.** Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence avant d'être privées 6h et traitées 16h avec de l'estradiol 10^{-10} M. Une extraction au Trizol a été effectuée pour récupérer l'ARN qui a été transformé en ADNc. La PCR quantitative est faite à partir de la méthode des sondes TaqMan. **A:** Quantification relative de l'expression de BMP2 dans les ostéoblastes de patients SIA et contrôles, non-stimulés ou stimulés à l'estradiol 10^{-10} M. **B:** Ratio de l'expression de BMP2 dans les ostéoblastes de patients SIA comparé aux contrôles, non-stimulés ou stimulés à l'estradiol 10^{-10} M. La moyenne de la quantité relative d'expression de BMP2 a été utilisée pour calculer le fold change.

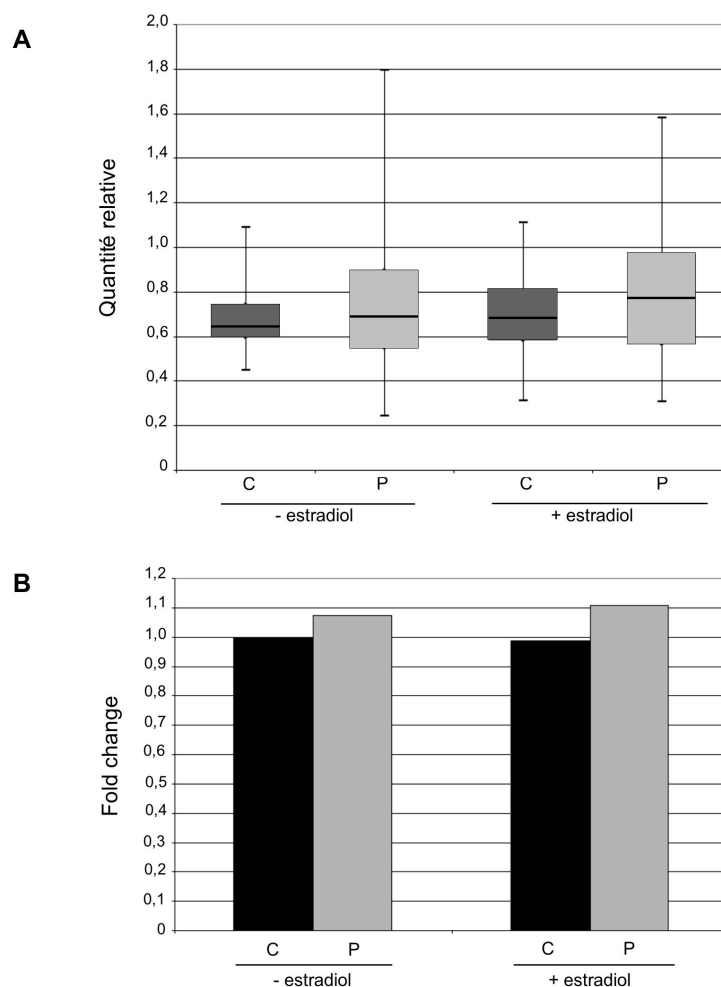


Figure 23: **Expression génique de TGFβ dans les ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.** Les cellules ont été cultivées jusqu'à confluence avant d'être privées de SVF durant 6h et traitées pendant 16h avec de l'estradiol 10^{-10} M. Une extraction au Trizol a été effectuée pour récupérer l'ARN qui a servi à faire du cDNA. La PCR quantitative est faite à partir de la méthode des sondes TaqMan. **A:** Quantification relative de l'expression de TGFβ dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles, non-stimulés ou stimulés à l'estradiol 10^{-10} M. **B:** Ratio de l'expression de TGFβ dans les osteoblastes de patients SIA comparé aux contrôles, non-stimulés ou stimulés à l'estradiol 10^{-10} M. La moyenne de la quantité relative d'expression de TGFβ a été utilisée pour calculer le « fold change » (rapport sur l'expression de TGFβ dans les ostéoblastes non-stimulés au 17β-estradiol, des sujets contrôles).

4.6. Minéralisation des ostéoblastes de patients SIA et de contrôles

Afin de vérifier le potentiel de minéralisation des ostéoblastes dérivés des patients SIA et des sujets contrôles, nous avons amorcé des études préliminaires de formation de matrice minéralisée *in vitro* par ces cellules (n=3 contrôles, 3 SIA). Nous avons également voulu établir la réponse de ces cellules à différentes hormones ou ligands synthétiques des ER (17 β -estradiol 10⁻¹⁰M et 10⁻⁸M, mélatonine 10⁻⁹M, tamoxifène 10⁻⁶M, génistein 10⁻⁵M, daidzein 10⁻⁵M et 4P-PDOT 10⁻⁶M). Nous n'avons pas détecté de formation de nodules de calcium par les ostéoblastes, ni chez les patients SIA, ni chez les contrôles. Il y a eu formation de nodules par les MC3T3, cellules qui servaient de contrôle positif de minéralisation (Figure 24a). Cependant, nous avons pu observer, en dosant la quantité de Rouge Alizarin qui s'est fixé sur la matrice, qu'il y avait eu formation d'une matrice de collagène et un début de minéralisation par les ostéoblastes dérivés des patients SIA et des sujets sains (Figure 24b). Cette matrice n'était pas suffisamment mature pour supporter la formation de cristaux lorsque nous avons arrêté l'expérience. Chez un contrôle en particulier, nous avons pu observer une augmentation de formation de matrice lorsque les cellules étaient exposées au 17 β -estradiol et à la génistéine (Figure 24c). Chez les trois patients SIA, l'estradiol n'a pas eu d'effet sur la quantité de minéral quantifiée par le Rouge alizarin. Nous n'avons pas obtenu de résultats pour le tamoxifène, le 4P-PDOT et la daidzein.

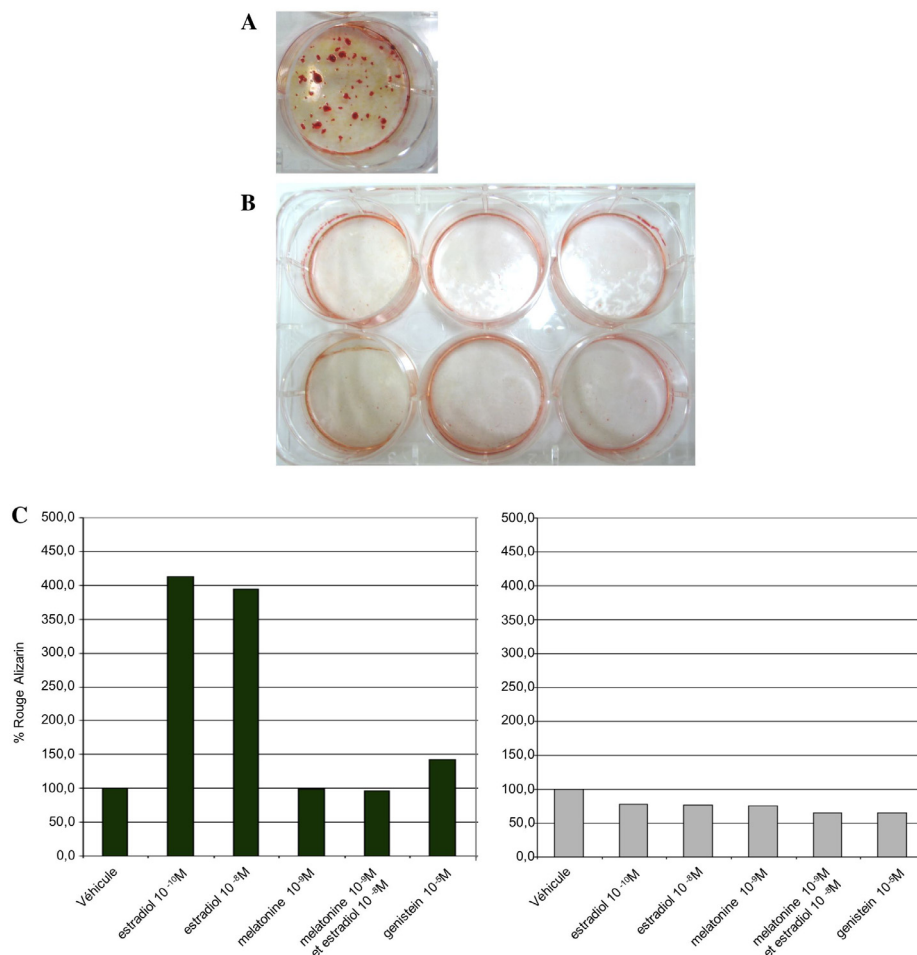


Figure 24 : **Formation d'une matrice minéralisée *in vitro* à partir d'ostéoblastes de patients SIA et de sujets contrôles.** Les cellules servant de contrôle positif de minéralisation sont les MC3T3 (A). Les ostéoblastes provenant de sujets contrôles et de patients SIA (B) sont dérivés à partir d'extraits d'os provenant de biopsies. Les cellules sont mises dans des plaques de 6 puits, cultivées jusqu'à confluence et traitées pendant 72 heures avec 0,5 nM de BMP2 dans du milieu de différenciation (α MEM avec acide ascorbique 50 μ g/ml, dexaméthasone 10 nM et β -glycerophosphate 2.5 mM). Les cellules sont maintenues dans un milieu de différenciation pour un total de 28 jours et traitées avec divers conditions (voir 3.19). Les cellules sont fixées au formaldéhyde 10% durant 15 minutes et colorées au Rouge Alizarin pour la détection de dépôts de calcium. (C) Induction de formation de matrice de collagène par différentes hormones dans les ostéoblastes d'un sujet contrôle (gauche) et d'un patient (droite).

5. Discussion

Plusieurs observations cliniques laissent croire que les estrogènes pourraient intervenir dans la pathogénèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent. Par exemple, les déformations scoliotiques sont présentes en plus grand nombre et sévérité chez les filles. Également, la maladie se développe lors de la puberté, période de croissance osseuse grandement contrôlée par les estrogènes, chez les filles et les garçons. Malgré ces évidences, aucune étude ne démontre le rôle précis de cette hormone dans le développement ou l'évolution de la maladie chez les sujets atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent. Nous avons étudié ces récepteurs dans les ostéoblastes de patients scoliotiques, afin de déterminer s'il existe des anomalies géniques ou protéiques qui affecteraient le fonctionnement de ER α et ER β dans ces cellules.

5.1. Expression génique des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes de patients atteints de SIA

Cette étude est la première qui examine le taux d'expression des transcrits des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes d'adolescents atteints de scoliose. En comparant les taux d'expression de ER α et ER β , nous avons trouvé que ER α est exprimé environ 75X plus abondamment que ER β dans les ostéoblastes de patients SIA et des sujets contrôles. Il est reconnu que ER α est exprimé plus fortement que ER β dans l'os cortical alors que l'inverse a été démontré pour l'os trabéculaire (Bord, Horner et al. 2001). Ainsi, le fait qu'on retrouve une plus forte expression génique de ER α que de ER β dans les ostéoblastes utilisés dans cette étude indique que ces cellules proviennent de l'os cortical des vertèbres.

Nous avons aussi trouvé par RT-PCR et par PCR quantitative qu'il n'y avait aucune différence significative dans l'expression de ER α et ER β entre les patients SIA et les sujets sains servant de contrôle, au niveau de l'ARN messager. Cependant, il existe une grande variabilité inter-individu de l'expression de ces deux isoformes. Ceci peut être dû à plusieurs facteurs. Par exemple, le fait que ER α et ER β sont exprimés très faiblement

dans l'os (Zallone 2006) affecte le ΔC_t (différence entre le cycle « seuil » du gène étudié avec le cycle « seuil » du gène calibrateur), ce qui a de grandes répercussions sur le calcul de la quantité relative (RQ). De faibles variations dans le ΔC_t peuvent engendrer des différences importantes dans le RQ (Livak and Schmittgen 2001). Un autre facteur qui a probablement influencé les résultats de PCR quantitative est la qualité de l'ARN utilisé. En effet, l'étape de dénaturation des structures secondaires de l'ARN était omise dans le protocole utilisé, ce qui n'empêchait pas la réaction de transcription inverse mais produisait de l'ARN de moindre qualité. L'étape de dénaturation est extrêmement importante afin de produire de l'ADN complémentaire de qualité qui pourra servir à la quantification de l'expression des gènes (Al-Bader 2006).

Étant donné que le profil de transcription d'un gène est bien souvent différent du profil de traduction de ce gène en protéine (Tian, Stepaniants et al. 2004), il serait difficile de déduire à partir des résultats de PCR quantitative le profil de traduction de ER α et ER β . En effet, il existe plusieurs mécanismes de contrôle de la traduction des ARNm en protéines, qui affectent le nombre d'ARN traduits. Un des mécanismes de contrôle de transcription de ER α et ER β est assuré par les récepteurs eux-mêmes (Castles, Oesterreich et al. 1997; Denger, Reid et al. 2001; Nomura, Korach et al. 2003). Par exemple, ER α est recruté pour l'activation de ER β dans les cellules T47D (cellules humaines du cancer du sein) (Matthews and Gustafsson 2003). Une autre forme de contrôle de la transcription pourrait être effectué par l'isoforme ER β S1, isoforme que nous avons identifié pour la première fois dans les ostéoblastes de patients SIA. Afin de connaître les taux protéiques de ER α et ER β dans les ostéoblastes de patients SIA comparé aux ostéoblastes de sujets sains, il faudrait effectuer des immunobuvardages de type Western avec des extraits protéiques de ces cellules ou exposer ces cellules à des ligands radioactifs ou fluorescents, spécifiques à ER α ou ER β .

5.1.1. Présence de la forme génique de l'isoforme ER β S1 dans les ostéoblastes de patients atteints de SIA

La séquence nucléotidique de l'isoforme ER β S1 a été identifiée en 2003 par Liu,H. et Voskuhl,R.R et elle est disponible dans *gene bank* ([AY438022](#)). La séquence de l'isoforme ER β S1 est semblable aux autres isoformes de ER β , à l'exception des domaines B et E. Le domaine B de l'isoforme ER β S1 a une délétion de 173 paires de bases, correspondant aux acides aminés E121 à G158 et le domaine E contient une insertion de 52 paires de bases à la position G318, comparé aux autres isoformes de ER β . De plus, le domaine F, qui fait partie du domaine de liaison au ligand et de dimérisation, est très court. Cependant, la séquence disponible sur *gene bank* ne semble pas complète puisqu'il manque une partie du domaine A et qu'elle ne débute pas par une méthionine.

Suite à la découverte que cet isoforme est présent dans les ostéoblastes des patients SIA et des contrôles, nous avons trouvé que l'ARNm de cet isoforme est également exprimé dans plusieurs tissus, à des divers niveaux qui leur sont propres. Par contre, cet ARNm ne semble pas pouvoir former de protéine, puisqu'il existe plusieurs codons de terminaison dans tous les cadres de lecture possibles. Néanmoins, le fait que l'expression de cet ER β S1 soit tissu-dépendant semble lui conférer un rôle dans les cellules. Il est possible que le rôle de cet isoforme de ER β soit de contrôler la transcription ou la traduction de gènes, particulièrement les autres isoformes de ER β . Il existe plusieurs exemples de ce type de contrôle de la traduction par l'ARNm, particulièrement avec les micro-ARN. Ces ARN sont des séquences d'environ 21 à 23 acides nucléiques et sont responsables de la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, en passant de la détermination cellulaire à l'apoptose (Guarnieri and DiLeone 2008). Généralement, ces micro-ARN vont causer la dégradation de l'ARNm ou réprimer la transcription en éloignant l'ARNm des ribosomes. Cette éventualité est cependant peu probable puisque l'ARNm de ER β S1 contient au moins 1400 acides nucléiques ce qui impliquerait un mécanisme d'interaction différent pour ER β S1 avec les autres gènes.

Il existe également des protéines régulées par de plus longs ARNm, par exemple *Msx1* (homeobox msh-like 1) (Babajko, Petit et al. 2008) et le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (Solda, Boi et al. 2005). Le gène *Msx-1* est soumis à de la transcription bidirectionnelle, ce qui génère un long ARNm anti-sens qui ne code pas pour une protéine. Babajko *et al.* (Babajko, Petit et al. 2008) ont démontré que cet ARN anti-sens diminue l'expression endogène de *Msx-1* durant la formation de la dent. *Msx-1* anti-sens pouvait également réguler l'expression de *Dlx5* et *BMP4* en modulant la fonction de *Msx-1*. Bien qu'hypothétique, un dernier mécanisme possible serait qu'un court peptide formé par la séquence de ER β S1 entre en interaction avec un autre isoforme de ER β ou avec ER α et agisse de façon inhibitrice.

Afin de déterminer le véritable rôle de l'isoforme ER β S1, il faudrait d'abord vérifier si ce transcrit peut former une protéine fonctionnelle ou un peptide qui pourrait interagir avec les autres isoformes de ER β et ER α . À cette fin, il serait important d'effectuer des expériences de transfection de ER β S1 afin de surexprimer cet isoforme dans des cellules qui expriment les autres isoformes de ER β en plus grande quantité que ER β S1. En marquant les différents isoformes de marqueurs fluorescents, les interactions entre les isoformes et ER β S1 deviendraient visibles. On pourrait également vérifier l'action de ER β S1 sur l'activité transcriptionnelle de ER α et ER β .

5.2. Expression protéique des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes de patients atteints de SIA

Nous avons observé par immunohistochimie sur des coupes de tissus osseux provenant d'un patient SIA, que le marquage pour le récepteur ER α est plus intense que pour ER β . Ceci pourrait être relié à la structure tissulaire (os cortical versus os trabéculaire) puisque l'os cortical exprime majoritairement ER α (Bord, Horner et al. 2001). Cependant nous n'avons pas étudié un nombre suffisant de tissus pour pouvoir apporter une conclusion définitive.

Par les expériences d'immunofluorescence, nous avons remarqué que la forme protéique de ER α et ER β est exprimée dans les ostéoblastes des patients atteints de scoliose et des sujets sains. Une augmentation de l'intensité du signal nucléaire a également été observée lorsque les cellules étaient exposées à des doses physiologiques (10^{-10} M) ou pharmacologiques (10^{-8} M) de 17 β -estradiol. Ce phénomène serait dû à la translocation des récepteurs nucléaires lors de l'entrée du ligand au noyau (Maruvada, Baumann et al. 2003) et au déplacement des récepteurs nucléaires qui sont encore dans le cytoplasme de la cellule (Stenoien, Mancini et al. 2000; Nonclercq, Journe et al. 2007). La réorganisation nucléaire de ER β suite à l'exposition aux estrogènes semble être plus lente que celle de ER α . Il est possible que la haute densité de ER α par rapport à ER β favorise ER α à se transloquer plus rapidement vers le noyau, mais ceci n'a pas été démontré dans la littérature,.

Nous avons également remarqué que le signal fluorescent pour ER β dans les ostéoblastes des patients SIA est intense au niveau nucléaire et ne diminue pas avec le temps, contrairement au signal pour ER β dans les ostéoblastes de sujets sains. Ceci pourrait être causé par une plus grande expression de ER β dans les noyaux des ostéoblastes des patients atteints de SIA que des sujets contrôles (Figures 16 et 17). Aucune différence significative d'intensité du marquage n'a été observée avec l'anticorps dirigé contre ER α , entre les ostéoblastes de patients versus les contrôles. Par contre, nous avons observé par immunofluorescence une augmentation de l'intensité du signal nucléaire de ER β dans les ostéoblastes de patients SIA comparés aux contrôles lorsque les cellules sont exposées à l'estradiol. Ces résultats n'étant pas quantifiables, des études de liaison au ligand ainsi que de la quantification par immunobuvardage de type Western seraient nécessaires. Nous n'avons pas comparé par immunohistochimie la quantité de marquage contre ER β dans les tissus osseux provenant des contrôles versus des patients.

Selon nos résultats obtenus par PCR quantitative les ostéoblastes dérivés des spécimens obtenus des patients SIA et des sujets sains proviendraient de l'os cortical. Étant donné

que ER β a un rôle inhibiteur sur l'action de ER α , une faible augmentation de ER β dans les ostéoblastes de l'os cortical pourrait avoir des répercussions sur ces cellules. ER α a plusieurs fonctions rapportées dans l'os, telles que la réponse au stress mécanique (Aguirre, Plotkin et al. 2007), la formation de l'os cortical (Parikka, Peng et al. 2005) et le contrôle du remodelage osseux (Sims, Dupont et al. 2002). Une augmentation des taux basal des récepteurs ER β dans les ostéoblastes des patients SIA tel qu'observé par immunofluorescence (Figure 16-17), pourrait inhiber davantage l'activité de ER α . Cette inhibition pourrait mener à une réduction de l'épaisseur de l'os cortical, une diminution du remodelage osseux et une réponse réduite au stress mécanique.

5.2.1. Rôle de ER β dans l'os

ER β exerce un rôle spécifique dans l'os qui pourrait être exacerbé chez les patients atteints de SIA puisque les taux de ces récepteurs sont augmentés dans les ostéoblastes. Plusieurs études démontrent des résultats qui pourraient impliquer ER β dans la scoliose idiopathique de l'adolescent. Premièrement, Yoshihara et al (Yoshihara, Kawakami et al. 2005) ont démontré une augmentation de l'épaisseur de l'os trabéculaire chez les poulets atteints de scoliose induite par pinéalectomie. Or, ER β contrôle l'action des estrogènes dans l'os trabéculaire. Il serait intéressant de déterminer si l'augmentation de l'épaisseur de l'os cortical perçue chez le poulet est le résultat de l'augmentation de l'expression de ER β , comme nous l'avons observé dans les ostéoblastes de patients atteints de SIA (Figure 16-17). Deuxièmement, une diminution de la résorption osseuse a été observée chez les patients scoliotiques par Cheung et al, (Cheung, Lee et al. 2006). En effet, les auteurs ont noté une diminution des marqueurs sanguins de résorption osseuse chez ces patients, comparé aux contrôles. Il est connu que les estrogènes augmentent la production d'OPG et diminuent la protéine RANKL via ER β (Liang, Yu et al. 2008). Ceci a pour conséquence de diminuer la formation d'ostéoclastes et la résorption osseuse. Finalement, il est connu que la scoliose affecte plus particulièrement les filles et plusieurs articles suggèrent que ER β a un effet accru sur l'os femelle comparativement à l'os mâle (Vidal, Lindberg et al. 2000; Sims, Dupont et al. 2002). Par exemple, ER β inhibe la croissance appendiculaire et axiale de l'os uniquement chez les

souris femelles (Chagin, Lindberg et al. 2004). Également, ER β active TIEG (TGF- β inducible early gene-1) dans l'os de façon sexe-spécifique. En effet, seules les femelles des souris TIEG1^{-/-} développent un phénotype ostéopénique (Subramaniam, Gorny et al. 2005; Hawse, Iwaniec et al. 2008; Hawse, Subramaniam et al. 2008). TIEG est une protéine impliquée dans la formation de l'os. Cette protéine est reconnue pour augmenter la voie de TGF β dans les ostéoblastes, ce qui augmente la prolifération des ostéoblastes et la sécrétion de protéines de la matrice aux stades précoces des ostéoblastes et inhibe la différenciation terminale des ostéoblastes (Hawse, Subramaniam et al. 2008). TIEG augmente également la transcription de Runx2, un facteur de différenciation des ostéoblastes, et contribue à l'augmentation de la transcription de Runx2 par les estrogènes et TGF β (Hawse, Subramaniam et al. 2008). L'augmentation de l'activité de TIEG par une sur-stimulation de ER β pourrait augmenter la formation osseuse de manière générale chez les patients atteints de scoliose idiopathique.

5.3. Liaison des récepteurs aux estrogènes avec l'ADN

Afin de vérifier si la liaison des récepteurs ER α et ER β à l'ADN est affectée dans les ostéoblastes des patients SIA, nous avons effectué des expériences de retard sur gel (EMSA) avec des extraits de protéines nucléaires. Ces expériences n'ont relevé aucune différence entre la liaison des récepteurs aux estrogènes extraits des ostéoblastes de patients scoliotiques avec l'ADN (sonde ERE) et ceux des contrôles avec la même sonde. Aucune différence n'a été relevée non plus entre la liaison à l'ADN des récepteurs provenant de cellules exposées à l'estradiol et celles non exposées. Il est possible que l'absence de différence entre les échantillons soit due à l'utilisation de concentrations physiologiques d'estradiol (10^{-10} M). En effet, plusieurs études utilisent des concentrations pharmacologiques, qui se situent autour de 10^{-8} M (Kassem, Okazaki et al. 1998; Saintier, Khanine et al. 2006; Liang, Yu et al. 2008). La faible réponse au 17 β -estradiol peut également être due à une dissociation de l'hormone d'avec son récepteur lors de la préparation des extraits nucléaires à partir des cellules traitées. Il

aurait donc été nécessaire d'ajouter de l'estradiol aux réactions de retard sur gel pour valider la capacité des récepteurs à se lier à l'hormone. Il est aussi possible que le milieu contenant du phénol rouge ait masqué l'effet de l'estradiol puisqu'il est connu que le phénol rouge mimique l'action des estrogènes dans les cellules. De plus, les taux d'estrogènes présents dans le sérum de veau foetal (10^{-12}M), pourraient influencer nos résultats. Finalement, le temps d'exposition des cellules au 17β -estradiol (16 heures) était trop long pour observer un effet sur les récepteurs $\text{ER}\alpha$ et $\text{ER}\beta$, puisque la dimérisation et la stimulation de la transcription par les ER dure environ 4 heures (Ascenzi, Bocedi et al. 2006). Des études de doses réponse (estradiol 10^{-6}M à 10^{-10}M) en fonction du temps (30 minutes à quatre heures d'exposition à l'estradiol) seraient nécessaires, avant de conclure que la liaison à l'ADN des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes de patients SIA n'est pas affectée par les estrogènes.

5.4. Expression des protéines de différenciation des ostéoblastes chez les patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent

Les estrogènes ont un rôle important dans le développement de l'os et le remodelage osseux. Ces hormones favorisent la différenciation des ostéoblastes par l'augmentation de production de BMP et de Runx2. Par conséquent, la sécrétion des protéines de la matrice est augmentée (Qu, Perala-Heape et al. 1998). Nous avons étudié l'effet des estrogènes sur l'expression des protéines de la matrice osseuse et sur le potentiel de minéralisation des ostéoblastes des patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent afin de vérifier si ces cellules répondent de la même façon que des ostéoblastes provenant de sujets sains. Nous avons remarqué que l'expression au niveau de l'ARN de plusieurs protéines de différenciation des ostéoblastes (ie. l'osteopontine, l'osteocalcine, BMP2 et la phosphatase alcaline) était augmentée dans les ostéoblastes à l'état basal (sans stimulation à l'estradiol) des patients scoliotiques par rapport aux ostéoblastes contrôles.

5.4.1. Les BMP

Nous avons observé par RT-PCR et par PCR quantitative que BMP2 est surexprimé chez les patients scoliotiques comparé aux sujets sains. L'analyse statistique confirme, à un seuil de significativité de 0,056% que les patients expriment environ 2 fois plus le gène de BMP2 que les contrôles. Une légère augmentation (non-significative) du taux d'expression de BMP2 est observable lorsque les ostéoblastes des patients SIA et des sujets contrôles ont été traités avec de l'estradiol. Ceci est conforme avec l'action des estrogènes sur BMP2 (Jia, Wang et al. 2003; Zhou, Turgeman et al. 2003). On note aussi que l'expression de BMP7 dans les ostéoblastes à l'état basal est semblable entre les patients et les contrôles. Par contre, on observe chez les deux groupes, une diminution de l'expression de BMP7 dans les ostéoblastes qui ont été exposés au 17β -estradiol 10^{-10} M. Effectivement, BMP7 est régulé négativement par les estrogènes dans les tissus reproducteurs, (Ozkaynak, Schnegelsberg et al. 1992; Monroe, Jin et al. 2000). Ceci est contradictoire avec le fait que BMP2 et BMP7 ont des rôles similaires dans l'os et que les estrogènes augmentent la production de BMP2 dans l'os (Zhou, Turgeman et al. 2003; Xiao, Xiang et al. 2007). Par contre, aucune étude n'a été effectuée sur l'effet des estrogènes sur BMP7 dans l'os.

BMP2 et BMP7 sont des protéines aussi importantes après que l'os est formé que lors du développement embryonnaire, pour favoriser la différenciation des ostéoblastes (Xiao, Xiang et al. 2007). Une surexpression de BMP2 pourrait ainsi mener à une trop grande formation d'ostéoblastes et causer un débalancement de la croissance.

5.4.2. Les facteurs de différenciation locaux

Nous avons observé que l'expression de Runx2 dans les ostéoblastes est similaire dans les cellules des patients SIA et les sujets contrôles. Étant donné que l'expression du gène de BMP2 est augmentée dans les ostéoblastes des patients SIA et que Runx2 est directement régulé par BMP2 (Wang, Wei et al. 2007; Xiao, Xiang et al. 2007; Javed, Bae et al. 2008), on se serait attendu à une augmentation de l'expression de Runx2. Cependant nous n'avons pas de résultats sur les taux protéiques de BMP2 dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles. Il pourrait donc être possible qu'il n'y ait

pas d'augmentation de la traduction de BMP2 en protéine malgré l'augmentation de l'expression de son gène. Par conséquent, l'expression de Runx2 ne serait pas accrue. L'augmentation de l'expression de BMP2 pourrait aussi servir à accroître l'activité transcriptionnelle de Runx2, sans affecter les taux d'ARNm de Runx2. Finalement, BMP2 peut affecter la transcription d'Osterix sans passer par Runx2 (Matsubara, Kida et al. 2008). Il faudrait donc vérifier les taux de transcription d'Ostérix chez les patients SIA comparativement aux sujets sains.

5.4.3. Les protéines de la matrice extracellulaire

L'expression génique de l'ostéopontine, la phosphatase alcaline et le collagène de type I est augmentée dans les ostéoblastes des patients scoliotiques comparé à l'expression dans les ostéoblastes de sujets sains. Ces résultats concordent avec l'étude de Cheung et al (Cheung, Lee et al. 2006) qui ont remarqué que le marqueur de formation osseuse (phosphatase alcaline osseuse) est augmentée dans le sang des adolescents atteints de scoliose idiopathique lorsque comparé aux sujets contrôles, malgré que les patients SIA présentent des signes d'ostéopénie. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'il y aurait une mauvaise intégration du calcium dans la matrice extracellulaire, d'autant plus que l'absorption de calcium chez ces adolescents est plus faible que la quantité recommandée pour leur âge. De ce fait, il est possible que les protéines de la matrice soient davantage produites, comme tentative de compensation du manque du calcium dans l'os.

Il est bien connu que l'ostéopénie chez la femme ménopausée est causée par une diminution des estrogènes circulants (Hui, Slemenda et al. 1990; Ejiri, Tanaka et al. 2008), ce qui favorise le contrôle de la formation des ostéoclastes et augmente le nombre de ceux-ci. Il y a donc un déséquilibre entre le taux de résorption et de formation osseuse. L'ostéopénie chez les adolescents est peu documentée, cependant il est connu que 20% des patients SIA présentent des signes d'ostéopénie (Cheng, Qin et al. 2000). Une augmentation du nombre des ostéoclastes a également été trouvée dans les os de poulets pinéalectomisés présentant des scoliose (Yoshihara, Kawakami et al. 2005).

Ceci pourrait également être la cause de l'ostéopénie chez les patients SIA, quoique l'augmentation du nombre des ostéoclastes dans les os de ces patients reste à prouver.

5.5. Formation *in vitro* de matrice osseuse

Les patients atteints de scoliose expriment les protéines de la matrice osseuse ainsi que les facteurs de différenciation des ostéoblastes plus fortement que les sujets contrôles. Par contre, il est reconnu que certains patients présentent des signes d'ostéopénie. Nous avons donc entrepris des études de minéralisation *in vitro* des ostéoblastes provenant de patients atteints de SIA et de sujets sains pour vérifier le potentiel de ces cellules à former de la matrice minéralisée. Après 28 jours d'exposition au β -glycérophosphate 2,5 mM, à l'acide ascorbique 50 mg/ml et au dexaméthasone 10^{-7} M, les ostéoblastes de patients et de contrôles n'avaient pas formé de nodules visibles macroscopiquement. Nous avons observé l'apparition d'une couche de collagène, plus ou moins dense selon les conditions de traitement expérimental utilisées. Il est possible que la concentration de β -glycérophosphate utilisée n'était pas assez forte pour forcer les ostéoblastes à former de la matrice *in vitro*. En effet plusieurs études utilisant des cellules humaines travaillent avec des concentrations plus élevées allant de 3 mM (Hay, Lemonnier et al. 2000) jusqu'à 10 mM (Rao, Liu et al. 2003; Ge, Chen et al. 2006). Dans la littérature, les expériences de minéralisation sont souvent effectuées en utilisant des lignées cellulaires immortelles. En utilisant des cellules de patient, il est possible que leur potentiel de production de matrice ait déjà été atteint et rendant le potentiel de minéraliser *in vitro* moins efficace. Il serait important de refaire ces expériences en modifiant les concentrations de β -glycérophosphate et en maintenant les cellules dans du milieu de différenciation pour plus de 28 jours.

Cependant, nous avons obtenu des résultats préliminaires sur des cellules de 3 sujets contrôles et de 3 patients. Les cellules ont été exposées au 17β -estradiol 10^{-10} M et 10^{-8} M, mélatonine 10^{-9} M, mélatonine et estradiol, génistein 10^{-5} M, tamoxifène 10^{-6} M, daidzein 10^{-5} M et 4P-PDOT 10^{-6} M mais nous n'avons eu des résultats que pour les cinq premières conditions. Nous avons observé par coloration au Rouge alizarin une mince couche de collagène qui pourrait supporter la minéralisation dans toutes les cellules. Les

cellules de 1 sujet contrôle ont également démontré un début de minéralisation suite à l'exposition des cellules au 17β -estradiol 10^{-8}M et 10^{-10}M . Par contre, ces résultats devront être confirmés avec un plus grand nombre d'échantillons.

6. Conclusion et Perspectives

En conclusion, notre étude nous a permis de répondre à plusieurs questions concernant le statut des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes de patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent. Premièrement, nous avons déterminé que le récepteur ER α est la forme prédominante des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes des patients SIA, tout comme dans les ostéoblastes des sujets sains servant de contrôles. Par contre, la présence de ER β semble être augmentée dans les ostéoblastes de patients SIA comparé aux contrôles, ce qui aurait des conséquences sur l'inhibition des fonctions de ER α , dans certaines conditions. Une action diminuée de ER α causerait une diminution de l'épaisseur et la densité de l'os cortical, une inhibition de la réponse des ostéoblastes au stress mécanique et un débalancement de l'équilibre entre la résorption et la formation d'os. Ensuite, en activant des gènes qui sont propres à sa signalisation, par exemple TIEG, ER β augmenterait le volume de l'os trabéculaire et causerait également la diminution du nombre d'ostéoclastes dans l'os. Afin de quantifier la présence protéique des récepteurs ER α et ER β dans les ostéoblastes de patients SIA et des contrôles, il serait nécessaire d'effectuer des expériences d'immunobuvardage de type Western. Une autre option serait d'effectuer des expériences de liaison à un ligand radioactif, par exemple au 17 β -estradiol. En utilisant de la daidzein ou de la génistéine marquée radioactivement, agonistes préférentiels de ER β dans l'os, nous pourrions cibler plus spécifiquement ER β dans les ostéoblastes des patients SIA. De même, les expériences de liaison à un ligand radioactif pourraient être faites en présence d'un ligand froid, de façon à créer une compétition entre le ligand froid et chaud. Ceci donnerait des informations sur la spécificité et la stabilité de la liaison entre les récepteurs aux estrogènes et les estrogènes et phytoestrogènes, dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles. Il serait également intéressant de quantifier la répartition cytoplasme-noyau des récepteurs aux estrogènes au niveau basal et en présence d'estradiol, dans les ostéoblastes de patients et de sujets contrôles. Ceci pourrait s'effectuer par immunobuvardage de type Western. On pourrait confirmer la répartition cytoplasme-noyau des récepteurs aux estrogènes au niveau tissulaire par immunohistochimie sur des coupes d'os. Enfin, pour vérifier l'activité des récepteurs aux estrogènes en présence d'estradiol dans les ostéoblastes de patients SIA comparé aux sujets sains, des études de liaison à un ligand radioactif seraient nécessaires.

Deuxièmement, les récepteurs aux estrogènes ER α et ER β sont fonctionnels dans les ostéoblastes des patients scoliotiques puisqu'aucune différence entre la liaison des récepteurs aux estrogènes provenant d'ostéoblastes de patients SIA avec l'ADN et la liaison des ER provenant des ostéoblastes des sujets contrôles avec la même sonde n'a été observée. Pour approfondir ces résultats, il faudrait vérifier l'impact des estrogènes sur cette liaison en exposant les cellules au 17 β -estradiol à différentes concentrations (entre 10⁻⁶ et 10⁻⁹M) et durant des temps variables (30 minutes à quatre heures), et se servir de ces échantillons pour des expériences de retard sur gel. De l'estradiol devrait également être ajoutée aux extraits nucléaires afin de compenser pour l'estradiol détachée des ER lors de l'extraction. Ceci permettrait de voir la réponse des ER présents dans les ostéoblastes au ligand. Normalement, la liaison à l'ADN est augmentée lorsque les récepteurs sont couplés au ligand (Ascenzi, Bocedi et al. 2006). Il faudrait aussi examiner la stabilité du complexe ERE-ER dans les cellules des patients SIA comparé aux sujets contrôles par des expériences de dissociation des ER-ERE radioactif en présence de ERE non-radioactif. Une activation plus longue ou plus courte de la transcription de gènes estrogènes-dépendants pourrait avoir des conséquences notables sur le fonctionnement des cellules et particulièrement sur la formation des ostéoblastes et le potentiel de minéralisation de ces cellules.

Finalement, nous avons examiné si l'estradiol à des concentrations physiologiques pouvait avoir un impact sur la transcription des gènes impliqués dans la différenciation des ostéoblastes et la minéralisation de l'os. Nous avons observé une diminution de la transcription de BMP7 dans les ostéoblastes de patients SIA et de contrôles, lorsque les cellules étaient exposées au 17 β -estradiol à une concentration de 10⁻¹⁰M. Par contre, les estrogènes n'ont eu aucun effet significatif sur les autres gènes observés, tels que l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline, BMP2, Runx2 et TGF β . Nous avons toutefois découvert que les ostéoblastes de patients SIA présentaient un taux d'expression de BMP2 deux fois plus élevé que celui des sujets contrôles. Il serait intéressant de vérifier si le profil d'expression protéique de BMP2 correspond au profil d'expression génique, soit par immunobuvardage de type Western ou par des tests

ELISA. Si les taux protéiques de BMP2 sont plus élevés chez les patients SIA, ceci pourrait correspondre à une augmentation du nombre d'ostéoblastes et une augmentation du taux de formation osseuse, ce qui concorderait avec les résultats de Cheung et al (Cheung, Lee et al. 2006).

Nous pouvons donc conclure que l'expression des récepteurs aux estrogènes est normale chez les patients atteints de scoliose idiopathique de l'adolescent et que l'impact des estrogènes sur cette maladie serait peut-être au niveau de la signalisation ou l'action de ces récepteurs, par une augmentation de l'expression protéique des récepteurs ou un défaut de signalisation. Par conséquent, les estrogènes auraient un impact sur la progression de la maladie, et non sur le développement ou l'initiation de la déformation. De ce fait, la ménarche tardive ou périodes d'aménorrhées secondaires chez les patientes atteintes de SIA aggraverait la progression de la déformation, puisque la période de croissance serait prolongée de par l'absence de taux d'estrogènes nécessaires à l'arrêt de la croissance par la fermeture des plaques épiphysaires.

L'hypothèse générale proposée par le laboratoire est que la Scoliose Idiopathique de l'Adolescent est un désordre neuro-hormonal d'ordre systémique comprenant l'axe hypothalamo-gonadal et plus particulièrement, les estrogènes. Or, les estrogènes sont des hormones impliquées dans plusieurs processus biologiques et entrent en contact avec plusieurs autres protéines afin d'effectuer leur signalisation. De ce fait, l'impact des estrogènes sur la scoliose pourrait s'effectuer par l'entremise de ces protéines et il serait essentiel de les étudier. Par exemple, la calmoduline est nécessaire au fonctionnement de ER α et à l'initiation de la transcription de gènes estrogènes-ER α dépendants (Li and Sacks 2007). La calmoduline est également nécessaire pour la formation des ostéoclastes (Shinohara and Takayanagi 2007). Toutefois, la calmoduline est défectueuse dans les plaquettes des patients scoliotiques (Meyer, More et al. 1987; Kindsfater, Lowe et al. 1994; Lowe, Lawellin et al. 2002). Il serait donc primordial de vérifier si la signalisation des estrogènes via la calmoduline est intacte dans les ostéoblastes des patients scoliotiques. Pour les patients du groupe 1 (Moreau, Wang et al. 2004), une

augmentation de l'activité de la calmoduline pourrait intervenir dans le rétablissement de la signalisation de la mélatonine par les estrogènes, mais cette hypothèse reste à vérifier.

Ensuite, les estrogènes interagissent avec la mélatonine. Il existe un défaut de signalisation de la mélatonine dans les ostéoblastes des patients SIA qui pourrait être exacerbé ou corrigé par les estrogènes, selon la réponse primaire de ces cellules à la mélatonine (Letellier, Azeddine et al. 2008). Il serait important de déterminer le mécanisme par lequel les estrogènes interviennent dans le couplage des protéines G inhibitrices ou stimulatrices avec le récepteur à la mélatonine MT₂, chez les patients des trois groupes de réponse à la mélatonine. Le récepteur GPR30 pourrait être impliqué dans ce mécanisme, de par son interaction avec les protéines G.

Finalement, l'impact des phytoestrogènes sur la scoliose serait à examiner attentivement, puisque la signalisation de ces hormones s'effectue préférentiellement via ER β et que les patients SIA semblent présenter des taux plus élevés de ER β que les sujets contrôles.

L'élucidation des mécanismes par lesquels les estrogènes interviennent dans la progression de la scoliose idiopathique de l'adolescent permettra sans nul doute de développer des plans d'intervention clinique qui pourraient empêcher ou diminuer la dégradation de la déformation scoliothique.

7. Références

- Aarden, E. M., E. H. Burger, et al. (1994). "Function of osteocytes in bone." J Cell Biochem **55**(3): 287-99.
- Agadir, M., B. Sevastik, et al. (1989). "Effects of intercostal nerve resection on the longitudinal rib growth in the growing rabbit." J Orthop Res **7**(5): 690-5.
- Aguirre, J. I., L. I. Plotkin, et al. (2007). "A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction." J Biol Chem **282**(35): 25501-8.
- Akhtar, O. H. and D. E. Rowe (2008). "Syringomyelia-associated Scoliosis With and Without the Chiari I Malformation." J Am Acad Orthop Surg **16**(7): 407-17.
- Akhtar, S., J. R. Davies, et al. (2005). "Ultrastructural localization and distribution of proteoglycan in normal and scoliotic lumbar disc." Spine **30**(11): 1303-9.
- Al-Bader, M. D. (2006). "Estrogen receptors alpha and beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real time PCR and Western blotting." Reprod Biol Endocrinol **4**: 13.
- Alarid, E. T., N. Bakopoulos, et al. (1999). "Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation." Mol Endocrinol **13**(9): 1522-34.
- Alliston, T., L. Choy, et al. (2001). "TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfal and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation." Embo J **20**(9): 2254-72.
- Andersen, M. O., K. Thomsen, et al. (2007). "Adolescent idiopathic scoliosis in twins: a population-based survey." Spine **32**(8): 927-30.
- Antoniou, J., V. Arlet, et al. (2001). "Elevated synthetic activity in the convex side of scoliotic intervertebral discs and endplates compared with normal tissues." Spine **26**(10): E198-206.

- Armstrong, V. J., M. Muzylak, et al. (2007). "Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha." J Biol Chem **282**(28): 20715-27.
- Ascenzi, P., A. Bocedi, et al. (2006). "Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health." Mol Aspects Med **27**(4): 299-402.
- Aulisa, L., P. Papaleo, et al. (2007). "Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study." Spine **32**(24): 2700-2.
- Azeddine, B., K. Letellier, et al. (2007). "Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis." Clin Orthop Relat Res **462**: 45-52.
- Babajko, S., S. Petit, et al. (2008). "Msx1 Expression Regulation by Its Own Antisense RNA: Consequence on Tooth Development and Bone Regeneration." Cells Tissues Organs.
- Bagnall, K., V. J. Raso, et al. (1999). "The effects of melatonin therapy on the development of scoliosis after pinealectomy in the chicken." J Bone Joint Surg Am **81**(2): 191-9.
- Bagnall, K. M., M. Beuerlein, et al. (2001). "Pineal transplantation after pinealectomy in young chickens has no effect on the development of scoliosis." Spine **26**(9): 1022-7.
- Bagnall, K. M., V. J. Raso, et al. (1996). "Melatonin levels in idiopathic scoliosis. Diurnal and nocturnal serum melatonin levels in girls with adolescent idiopathic scoliosis." Spine **21**(17): 1974-8.
- Balasch, J. (2003). "Sex steroids and bone: current perspectives." Hum Reprod Update **9**(3): 207-22.

- Barchiesi, F., E. K. Jackson, et al. (2004). "Differential regulation of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human aortic smooth muscle cells by oligonucleotides and estradiol." J Clin Endocrinol Metab **89**(5): 2373-81.
- Barkhem, T., B. Carlsson, et al. (1998). "Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists." Mol Pharmacol **54**(1): 105-12.
- Barrett, P., S. Conway, et al. (2003). "Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family." J Pineal Res **35**(4): 221-30.
- Barrios, C., M. T. Tunon, et al. (1987). "Scoliosis induced by medullary damage: an experimental study in rabbits." Spine **12**(5): 433-9.
- Bashiardes, S., R. Veile, et al. (2004). "SNTG1, the gene encoding gamma1-syntrophin: a candidate gene for idiopathic scoliosis." Hum Genet **115**(1): 81-9.
- Beato, M., G. Chalepakis, et al. (1989). "DNA regulatory elements for steroid hormones." J Steroid Biochem **32**(5): 737-47.
- Benecke, A., P. Chambon, et al. (2000). "Synergy between estrogen receptor alpha activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2." EMBO Rep **1**(2): 151-7.
- Bernard-Poenaru, O., C. Roux, et al. (2001). "Bone-resorbing cytokines from peripheral blood mononuclear cells after hormone replacement therapy: a longitudinal study." Osteoporos Int **12**(9): 769-76.
- Biller, B. M., J. F. Coughlin, et al. (1991). "Osteopenia in women with hypothalamic amenorrhea: a prospective study." Obstet Gynecol **78**(6): 996-1001.
- Bonewald, L. F. and M. L. Johnson (2008). "Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling." Bone **42**(4): 606-15.

- Bonnelye, E. and J. E. Aubin (2005). "Estrogen receptor-related receptor alpha: a mediator of estrogen response in bone." J Clin Endocrinol Metab **90**(5): 3115-21.
- Bord, S., A. Horner, et al. (2001). "Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone." J Clin Endocrinol Metab **86**(5): 2309-14.
- Bord, S., D. C. Ireland, et al. (2003). "The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts." Bone **32**(2): 136-41.
- Bornstein, P. and E. H. Sage (2002). "Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function." Curr Opin Cell Biol **14**(5): 608-16.
- Boudreau, M., S. C. Courtenay, et al. (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**(2): 415-25.
- Boyden, L. M., J. Mao, et al. (2002). "High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5." N Engl J Med **346**(20): 1513-21.
- Bradbury, R. B. and D. E. White (1954). "Estrogens and related substances in plants." Vitam Horm **12**: 207-33.
- Braidman, I. P., L. Hailey, et al. (2001). "Localization of estrogen receptor beta protein expression in adult human bone." J Bone Miner Res **16**(2): 214-20.
- Bredoux, R., E. Corvazier, et al. (2006). "Human platelet Ca²⁺-ATPases: new markers of cell differentiation as illustrated in idiopathic scoliosis." Platelets **17**(6): 421-33.
- Brodner, W., P. Krepler, et al. (2000). "Melatonin and adolescent idiopathic scoliosis." J Bone Joint Surg Br **82**(3): 399-403.

- Brydon, L., F. Roka, et al. (1999). "Dual signaling of human Mella melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins." Mol Endocrinol **13**(12): 2025-38.
- Bunone, G., P. A. Briand, et al. (1996). "Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation." Embo J **15**(9): 2174-83.
- Burner, W. L., 3rd, V. M. Badger, et al. (1982). "Osteoporosis and acquired back deformities." J Pediatr Orthop **2**(4): 383-5.
- Cao, L., R. Bu, et al. (2003). "Estrogen receptor-beta modulates synthesis of bone matrix proteins in human osteoblast-like MG63 cells." J Cell Biochem **89**(1): 152-64.
- Carr, A. J. (1990). "Adolescent idiopathic scoliosis in identical twins." J Bone Joint Surg Br **72**(6): 1077.
- Castano, E., D. P. Vorojeikina, et al. (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.
- Castles, C. G., S. Oesterreich, et al. (1997). "Auto-regulation of the estrogen receptor promoter." J Steroid Biochem Mol Biol **62**(2-3): 155-63.
- Cenci, S., M. N. Weitzmann, et al. (2000). "Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha." J Clin Invest **106**(10): 1229-37.
- Centrella, M., M. C. Horowitz, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta gene family members and bone." Endocr Rev **15**(1): 27-39.
- Centrella, M., T. L. McCarthy, et al. (1987). "Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone." J Biol Chem **262**(6): 2869-74.

- Chagin, A. S., M. K. Lindberg, et al. (2004). "Estrogen receptor-beta inhibits skeletal growth and has the capacity to mediate growth plate fusion in female mice." J Bone Miner Res **19**(1): 72-7.
- Chen, D., P. E. Pace, et al. (1999). "Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization." Mol Cell Biol **19**(2): 1002-15.
- Chen, D., M. Zhao, et al. (2004). "Bone morphogenetic proteins." Growth Factors **22**(4): 233-41.
- Cheng, J. C., X. Guo, et al. (1999). "Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A longitudinal follow up study." Spine **24**(12): 1218-22.
- Cheng, J. C., L. Qin, et al. (2000). "Generalized low areal and volumetric bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis." J Bone Miner Res **15**(8): 1587-95.
- Cheng, J. C., S. P. Tang, et al. (2001). "Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a histomorphometric study." Spine **26**(3): E19-23.
- Cheng, M. Z., G. Zaman, et al. (1996). "Mechanical loading and sex hormone interactions in organ cultures of rat ulna." J Bone Miner Res **11**(4): 502-11.
- Cheung, C. S., W. T. Lee, et al. (2006). "Generalized osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis--association with abnormal pubertal growth, bone turnover, and calcium intake?" Spine **31**(3): 330-8.
- Clayson, D., S. Luz-Alterman, et al. (1987). "Long-term psychological sequelae of surgically versus nonsurgically treated scoliosis." Spine **12**(10): 983-6.
- Collingwood, T. N., F. D. Urnov, et al. (1999). "Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription." J Mol Endocrinol **23**(3): 255-75.
- Cook, S. D., A. F. Harding, et al. (1987). "Trabecular bone mineral density in idiopathic scoliosis." J Pediatr Orthop **7**(2): 168-74.

- Cos, S., R. Fernandez, et al. (1998). "Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells." Cancer Res **58**(19): 4383-90.
- Cos, S. and E. J. Sanchez-Barcelo (2000). "Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment." Histol Histopathol **15**(2): 637-47.
- Couse, J. F. and K. S. Korach (2004). "Estrogen receptor-alpha mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract." Toxicology **205**(1-2): 55-63.
- Cowell, H. R. (1970). "Genetic aspects of orthopedic diseases." Am J Nurs **70**(4): 763-7.
- Cowley, S. M., S. Hoare, et al. (1997). "Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA." J Biol Chem **272**(32): 19858-62.
- Damien, E., J. S. Price, et al. (1998). "The estrogen receptor's involvement in osteoblasts' adaptive response to mechanical strain." J Bone Miner Res **13**(8): 1275-82.
- Dang, Z. and C. W. Lowik (2004). "The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzein-induced osteogenesis and adipogenesis." J Bone Miner Res **19**(5): 853-61.
- Dang, Z. C., V. Audinot, et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein." J Biol Chem **278**(2): 962-7.
- Day, G. A., I. B. McPhee, et al. (2007). "Growth rates and the prevalence and progression of scoliosis in short-statured children on Australian growth hormone treatment programmes." Scoliosis **2**: 3.
- Day, T. F., X. Guo, et al. (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis." Dev Cell **8**(5): 739-50.

- del Rio, B., J. M. Garcia Pedrero, et al. (2004). "Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin." J Biol Chem **279**(37): 38294-302.
- Denger, S., G. Reid, et al. (2008). "Expression of the estrogen receptor during differentiation of human osteoclasts." Steroids **73**(7): 765-74.
- Denger, S., G. Reid, et al. (2001). "ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins." Mol Endocrinol **15**(12): 2064-77.
- Dennis, J. E., A. Merriam, et al. (1999). "A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse." J Bone Miner Res **14**(5): 700-9.
- Devlin, R. D., Z. Du, et al. (2003). "Skeletal overexpression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation." Endocrinology **144**(5): 1972-8.
- Dickson, R. A., J. O. Lawton, et al. (1984). "The pathogenesis of idiopathic scoliosis. Biplanar spinal asymmetry." J Bone Joint Surg Br **66**(1): 8-15.
- Drop, S. L., W. J. De Waal, et al. (1998). "Sex steroid treatment of constitutionally tall stature." Endocr Rev **19**(5): 540-58.
- Dubousset, J. (1999). "[Idiopathic scoliosis. Definition--pathology--classification--etiology]." Bull Acad Natl Med **183**(4): 699-704.
- Duval-Beaupere, G. (1982). "[Surveillance, course, and prognosis of scoliosis]." Rev Prat **32**(51-52): 3261-4, 3269-71.
- Duval-Beaupere, G. (1996). "Threshold values for supine and standing Cobb angles and rib hump measurements: prognostic factors for scoliosis." Eur Spine J **5**(2): 79-84.
- Dymling, J. F. and S. Willner (1978). "Progression of a structural scoliosis during treatment with growth hormone. A case report." Acta Orthop Scand **49**(3): 264-8.

- Eastell, R. (2005). "Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche." J Endocrinol **185**(2): 223-34.
- Eckert, R. L., A. Mullick, et al. (1984). "Estrogen receptor synthesis and turnover in MCF-7 breast cancer cells measured by a density shift technique." Endocrinology **114**(2): 629-37.
- Ejiri, S., M. Tanaka, et al. (2008). "Estrogen deficiency and its effect on the jaw bones." J Bone Miner Metab **26**(5): 409-15.
- Enmark, E., M. Peltö-Huikko, et al. (1997). "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4258-65.
- Faulds, M. H., H. Olsen, et al. (2004). "Estrogen receptor functional activity changes during differentiation of mammary epithelial cells." Mol Endocrinol **18**(2): 412-21.
- Filardo, E. J., J. A. Quinn, et al. (2000). "Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF." Mol Endocrinol **14**(10): 1649-60.
- Floman, Y., M. Liebergall, et al. (1983). "Abnormalities of aggregation, thromboxane A2 synthesis, and 14C serotonin release in platelets of patients with idiopathic scoliosis." Spine **8**(3): 236-41.
- Flouriot, G., H. Brand, et al. (2000). "Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1." Embo J **19**(17): 4688-700.
- Frank, G. R. (2003). "Role of estrogen and androgen in pubertal skeletal physiology." Med Pediatr Oncol **41**(3): 217-21.

- Frantz, A. G. and M. T. Rabkin (1965). "Effects of estrogen and sex difference on secretion of human growth hormone." J Clin Endocrinol Metab **25**(11): 1470-80.
- Fromiguet, O., P. J. Marie, et al. (1998). "Bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta2 interact to modulate human bone marrow stromal cell proliferation and differentiation." J Cell Biochem **68**(4): 411-26.
- Gao, X., D. Gordon, et al. (2007). "CHD7 gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic scoliosis." Am J Hum Genet **80**(5): 957-65.
- Garcia Pedrero, J. M., B. Del Rio, et al. (2002). "Calmodulin is a selective modulator of estrogen receptors." Mol Endocrinol **16**(5): 947-60.
- Ge, Y., D. Chen, et al. (2006). "Enhancing effect of daidzein on the differentiation and mineralization in mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells." Yakugaku Zasshi **126**(8): 651-6.
- Gerdin, M. J., F. Mseeh, et al. (2003). "Mutagenesis studies of the human MT2 melatonin receptor." Biochem Pharmacol **66**(2): 315-20.
- Giguere, V., N. Yang, et al. (1988). "Identification of a new class of steroid hormone receptors." Nature **331**(6151): 91-4.
- Goldberg, C. J., F. E. Dowling, et al. (1993). "Adolescent idiopathic scoliosis--early menarche, normal growth." Spine **18**(5): 529-35.
- 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: 346-354.
- Gong, Y., R. B. Slee, et al. (2001). "LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development." Cell **107**(4): 513-23.

- Gordon, J. A., C. E. Tye, et al. (2007). "Bone sialoprotein expression enhances osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro." Bone **41**(3): 462-73.
- Gorski, R. A. (1993). "Estradiol acts via the estrogen receptor in the sexual differentiation of the rat brain, but what does this complex do?" Endocrinology **133**(2): 431-2.
- Grinspoon, S., K. Miller, et al. (1999). "Severity of osteopenia in estrogen-deficient women with anorexia nervosa and hypothalamic amenorrhea." J Clin Endocrinol Metab **84**(6): 2049-55.
- Grivas, T. B., E. Vasiliadis, et al. (2006). "Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche in different geographic latitudes." Scoliosis **1**: 9.
- Guarnieri, D. J. and R. J. DiLeone (2008). "MicroRNAs: a new class of gene regulators." Ann Med **40**(3): 197-208.
- Guo, X., W. W. Chau, et al. (2006). "Balance control in adolescents with idiopathic scoliosis and disturbed somatosensory function." Spine **31**(14): E437-40.
- Hall, J. M. and D. P. McDonnell (1999). "The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens." Endocrinology **140**(12): 5566-78.
- Harrington, P. R. (1977). "The etiology of idiopathic scoliosis." Clin Orthop Relat Res(126): 17-25.
- Haskell, S. G. (2003). "Selective estrogen receptor modulators." South Med J **96**(5): 469-76.
- Hawse, J. R., U. T. Iwaniec, et al. (2008). "TIEG-null mice display an osteopenic gender-specific phenotype." Bone **42**(6): 1025-31.

- Hawse, J. R., M. Subramaniam, et al. (2008). "Estrogen-TGFbeta cross-talk in bone and other cell types: role of TIEG, Runx2, and other transcription factors." J Cell Biochem **103**(2): 383-92.
- Hawse, J. R., M. Subramaniam, et al. (2008). "Estrogen receptor beta isoform-specific induction of transforming growth factor beta-inducible early gene-1 in human osteoblast cells: an essential role for the activation function 1 domain." Mol Endocrinol **22**(7): 1579-95.
- Hay, E., J. Lemonnier, et al. (2000). "N- and E-cadherin mediate early human calvaria osteoblast differentiation promoted by bone morphogenetic protein-2." J Cell Physiol **183**(1): 117-28.
- Hazlerigg, D. G., P. Barrett, et al. (1996). "Are nuclear receptors involved in pituitary responsiveness to melatonin?" Mol Cell Endocrinol **123**(1): 53-9.
- Healey, J. H. and J. M. Lane (1985). "Structural scoliosis in osteoporotic women." Clin Orthop Relat Res(195): 216-23.
- Heim, M., O. Frank, et al. (2004). "The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells." Endocrinology **145**(2): 848-59.
- Helguero, L. A., M. H. Faulds, et al. (2005). "Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11." Oncogene **24**(44): 6605-16.
- Hens, J. R., K. M. Wilson, et al. (2005). "TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro." J Bone Miner Res **20**(7): 1103-13.
- Herman, R., J. Mixon, et al. (1985). "Idiopathic scoliosis and the central nervous system: a motor control problem. The Harrington lecture, 1983. Scoliosis Research Society." Spine **10**(1): 1-14.

- Hilibrand, A. S., L. C. Blakemore, et al. (1996). "The role of melatonin in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis." Spine **21**(10): 1140-6.
- Hill, T. P., D. Spater, et al. (2005). "Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes." Dev Cell **8**(5): 727-38.
- Hofbauer, L. C., F. Gori, et al. (1999). "Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis." Endocrinology **140**(10): 4382-9.
- Hofbauer, L. C. and A. E. Heufelder (1998). "Osteoprotegerin and its cognate ligand: a new paradigm of osteoclastogenesis." Eur J Endocrinol **139**(2): 152-4.
- Hogan, B. L. (1996). "Bone morphogenetic proteins in development." Curr Opin Genet Dev **6**(4): 432-8.
- Hu, H., M. J. Hilton, et al. (2005). "Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development." Development **132**(1): 49-60.
- Huang, L., X. Y. Teng, et al. (2004). "Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone." Bone **34**(3): 393-401.
- Hueter, C. (1862). "Anatomische Studien an den Extremitätengelenken Neugeborener und Erwachsener." Virchows Arch **25**: 572-599.
- Hui, S. L., C. W. Slemenda, et al. (1990). "The contribution of bone loss to postmenopausal osteoporosis." Osteoporos Int **1**(1): 30-4.
- Ignatz, R. A. and J. Massague (1986). "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix." J Biol Chem **261**(9): 4337-45.

- Inoue, M., S. Minami, et al. (1998). "Idiopathic scoliosis in twins studied by DNA fingerprinting: the incidence and type of scoliosis." J Bone Joint Surg Br **80**(2): 212-7.
- Inoue, M., S. Minami, et al. (2002). "Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis." Spine **27**(21): 2357-62.
- Iwamoto, I., T. Fujino, et al. (2003). "Association of estrogen receptor alpha and beta3-adrenergic receptor polymorphisms with endometrial cancer." Obstet Gynecol **102**(3): 506-11.
- Iwamuro, S., M. Sakakibara, et al. (2003). "Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*." Gen Comp Endocrinol **133**(2): 189-98.
- Javed, A., J. S. Bae, et al. (2008). "Structural coupling of Smad and Runx2 for execution of the BMP2 osteogenic signal." J Biol Chem **283**(13): 8412-22.
- Jia, T. L., H. Z. Wang, et al. (2003). "Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production." Biochem Pharmacol **65**(5): 709-15.
- Jones, M. P., M. A. Melan, et al. (2000). "Melatonin decreases cell proliferation and transformation in a melatonin receptor-dependent manner." Cancer Lett **151**(2): 133-43.
- Kahmann, R. D., J. M. Donohue, et al. (1992). "Platelet function in adolescent idiopathic scoliosis." Spine **17**(2): 145-8.
- Kameda, T., H. Mano, et al. (1997). "Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts." J Exp Med **186**(4): 489-95.

- Kanno, S., S. Hirano, et al. (2004). "Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells." Toxicology **196**(1-2): 137-45.
- Karperien, M., B. C. van der Eerden, et al. (2005). "Genomic and non-genomic actions of sex steroids in the growth plate." Pediatr Nephrol **20**(3): 323-9.
- Kassem, M., R. Okazaki, et al. (1998). "Estrogen effects on insulin-like growth factor gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptor." Calcif Tissue Int **62**(1): 60-6.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, et al. (1994). "Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage." J Cell Biol **127**(6 Pt 1): 1755-66.
- Kato, S., H. Endoh, et al. (1995). "Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase." Science **270**(5241): 1491-4.
- Kato, S., T. Sato, et al. (2005). "Function of nuclear sex hormone receptors in gene regulation." Cancer Chemother Pharmacol **56 Suppl 1**: 4-9.
- Keessen, W., A. Crowe, et al. (1992). "Proprioceptive accuracy in idiopathic scoliosis." Spine **17**(2): 149-55.
- Kesling, K. L. and K. A. Reinker (1997). "Scoliosis in twins. A meta-analysis of the literature and report of six cases." Spine **22**(17): 2009-14; discussion 2015.
- Kindsfater, K., T. Lowe, et al. (1994). "Levels of platelet calmodulin for the prediction of progression and severity of adolescent idiopathic scoliosis." J Bone Joint Surg Am **76**(8): 1186-92.
- Kitazawa, R., R. B. Kimble, et al. (1994). "Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice." J Clin Invest **94**(6): 2397-406.

- Klein-Hitpass, L., M. Schorpp, et al. (1986). "An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells." Cell **46**(7): 1053-61.
- Klein, K. O., P. M. Martha, Jr., et al. (1996). "A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. II. Estrogen levels as determined by an ultrasensitive bioassay." J Clin Endocrinol Metab **81**(9): 3203-7.
- Klibanski, A., B. M. Biller, et al. (1988). "Effects of prolactin and estrogen deficiency in amenorrheic bone loss." J Clin Endocrinol Metab **67**(1): 124-30.
- Komori, T. (2005). "[Functions of BMPs, Runx2, and osterix in the development of bone and cartilage]." Nippon Rinsho **63**(9): 1671-7.
- Komori, T. (2006). "Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors." J Cell Biochem **99**(5): 1233-9.
- Kong, Y. Y., W. J. Boyle, et al. (1999). "Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development." Immunol Cell Biol **77**(2): 188-93.
- Kostuik, J. P. (1990). "Operative treatment of idiopathic scoliosis." J Bone Joint Surg Am **72**(7): 1108-13.
- Kousteni, S., J. R. Chen, et al. (2002). "Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids." Science **298**(5594): 843-6.
- Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, et al. (1998). "Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta." Endocrinology **139**(10): 4252-63.
- Kulis, A., D. Zarzycki, et al. (2006). "Concentration of estradiol in girls with idiopathic scoliosis." Ortop Traumatol Rehabil **8**(4): 455-9.
- Kurzer, M. S. and X. Xu (1997). "Dietary phytoestrogens." Annu Rev Nutr **17**: 353-81.

- Kusec, V., A. S. Viridi, et al. (1998). "Localization of estrogen receptor-alpha in human and rabbit skeletal tissues." J Clin Endocrinol Metab **83**(7): 2421-8.
- Kushner, P. J., D. Agard, et al. (2000). "Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements." Novartis Found Symp **230**: 20-6; discussion 27-40.
- Lam, J., S. Takeshita, et al. (2000). "TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand." J Clin Invest **106**(12): 1481-8.
- Lambertini, E., L. Penolazzi, et al. (2007). "Human estrogen receptor alpha gene is a target of Runx2 transcription factor in osteoblasts." Exp Cell Res **313**(8): 1548-60.
- Lanyon, L., V. Armstrong, et al. (2004). "Is estrogen receptor alpha key to controlling bones' resistance to fracture?" J Endocrinol **182**(2): 183-91.
- Lanyon, L. E. (1996). "Using functional loading to influence bone mass and architecture: objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptive process in bone." Bone **18**(1 Suppl): 37S-43S.
- Le Mellay, V., B. Grosse, et al. (1997). "Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol." J Biol Chem **272**(18): 11902-7.
- Lee, K. C., H. Jessop, et al. (2004). "The adaptive response of bone to mechanical loading in female transgenic mice is deficient in the absence of oestrogen receptor-alpha and -beta." J Endocrinol **182**(2): 193-201.
- Lee, W. T., C. S. Cheung, et al. (2005). "Generalized low bone mass of girls with adolescent idiopathic scoliosis is related to inadequate calcium intake and weight bearing physical activity in peripubertal period." Osteoporos Int **16**(9): 1024-35.

- Lee, W. T., C. S. Cheung, et al. (2005). "Association of osteopenia with curve severity in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 919 girls." Osteoporos Int **16**(12): 1924-32.
- Letellier, K., B. Azeddine, et al. (2008). "Estrogen cross-talk with the melatonin signaling pathway in human osteoblasts derived from adolescent idiopathic scoliosis patients." J Pineal Res.
- Li, L. and D. B. Sacks (2007). "Functional interactions between calmodulin and estrogen receptor-alpha." Cell Signal **19**(3): 439-43.
- Li, X., J. Huang, et al. (2004). "Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways." Mol Cell Biol **24**(17): 7681-94.
- Liang, L., J. F. Yu, et al. (2008). "Effect of estrogen receptor beta on the osteoblastic differentiation function of human periodontal ligament cells." Arch Oral Biol **53**(6): 553-7.
- Lieberman, S. (1996). "Are the differences between estradiol and other estrogens, naturally occurring or synthetic, merely semantical?" J Clin Endocrinol Metab **81**(2): 850-1.
- Lin, S. C., T. Yamate, et al. (1997). "Regulation of the gp80 and gp130 subunits of the IL-6 receptor by sex steroids in the murine bone marrow." J Clin Invest **100**(8): 1980-90.
- Lindberg, M. K., S. L. Alatalo, et al. (2001). "Estrogen receptor specificity in the regulation of the skeleton in female mice." J Endocrinol **171**(2): 229-36.
- Lindberg, M. K., S. Moverare, et al. (2003). "Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice." Mol Endocrinol **17**(2): 203-8.

- Lindner, V., S. K. Kim, et al. (1998). "Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury." Circ Res **83**(2): 224-9.
- Linkhart, T. A., S. Mohan, et al. (1996). "Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP." Bone **19**(1 Suppl): 1S-12S.
- Little, R. D., J. P. Carulli, et al. (2002). "A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait." Am J Hum Genet **70**(1): 11-9.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-8.
- Lonard, D. M., Z. Nawaz, et al. (2000). "The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation." Mol Cell **5**(6): 939-48.
- Lowe, T., D. Lawellin, et al. (2002). "Platelet calmodulin levels in adolescent idiopathic scoliosis: do the levels correlate with curve progression and severity?" Spine **27**(7): 768-75.
- Luo, J., R. Sladek, et al. (1997). "Placental abnormalities in mouse embryos lacking the orphan nuclear receptor ERR-beta." Nature **388**(6644): 778-82.
- Luu, H. H., W. X. Song, et al. (2007). "Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells." J Orthop Res **25**(5): 665-77.
- Machida, M. (1999). "Cause of idiopathic scoliosis." Spine **24**(24): 2576-83.
- Machida, M., J. Dubousset, et al. (1995). "Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomised chickens." J Bone Joint Surg Br **77**(1): 134-8.

- Machida, M., J. Dubousset, et al. (1996). "Melatonin. A possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis." Spine **21**(10): 1147-52.
- Machida, M., I. Murai, et al. (1999). "Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats." Spine **24**(19): 1985-9.
- MacKenzie, R. S., M. A. Melan, et al. (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**(4): 587-95.
- Maeda, S., M. Hayashi, et al. (2004). "Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells." Embo J **23**(3): 552-63.
- Magarey, A. M., T. J. Boulton, et al. (1999). "Bone growth from 11 to 17 years: relationship to growth, gender and changes with pubertal status including timing of menarche." Acta Paediatr **88**(2): 139-46.
- Maggiolini, M., A. Vivacqua, et al. (2004). "The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells." J Biol Chem **279**(26): 27008-16.
- Mak, H. Y., S. Hoare, et al. (1999). "Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface." Mol Cell Biol **19**(5): 3895-903.
- Malaval, L., N. M. Wade-Gueye, et al. (2008). "Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis." J Exp Med **205**(5): 1145-53.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell **83**(6): 835-9.
- Manolagas, S. C. and R. L. Jilka (1992). "Cytokines, hematopoiesis, osteoclastogenesis, and estrogens." Calcif Tissue Int **50**(3): 199-202.

- Manolagas, S. C., S. Kousteni, et al. (2002). "Sex steroids and bone." Recent Prog Horm Res **57**: 385-409.
- Marosy, B., C. M. Justice, et al. (2006). "Lack of association between the aggrecan gene and familial idiopathic scoliosis." Spine **31**(13): 1420-5.
- Maruvada, P., C. T. Baumann, et al. (2003). "Dynamic shuttling and intranuclear mobility of nuclear hormone receptors." J Biol Chem **278**(14): 12425-32.
- Masana, M. I. and M. L. Dubocovich (2001). "Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark." Sci STKE **2001**(107): PE39.
- Mathieu, E. and J. Merregaert (1994). "Characterization of the stromal osteogenic cell line MN7: mRNA steady-state level of selected osteogenic markers depends on cell density and is influenced by 17 beta-estradiol." J Bone Miner Res **9**(2): 183-92.
- Matsubara, T., K. Kida, et al. (2008). "BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation." J Biol Chem **283**(43): 29119-25.
- Matsuda, T., T. Yamamoto, et al. (2001). "Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3." J Biol Chem **276**(46): 42908-14.
- Matthews, J. and J. A. Gustafsson (2003). "Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta." Mol Interv **3**(5): 281-92.
- McCarthy, T. L., W. Z. Chang, et al. (2003). "Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts." J Biol Chem **278**(44): 43121-9.
- McDonnell, D. P., D. L. Clemm, et al. (1995). "Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens." Mol Endocrinol **9**(6): 659-69.

- Mediavilla, M. D., A. Guezmez, et al. (1997). "Effects of melatonin on mammary gland lesions in transgenic mice overexpressing N-ras proto-oncogene." J Pineal Res **22**(2): 86-94.
- Meyer, S., R. More, et al. (1987). "Platelet pathology in minimal curve idiopathic scoliosis: an attempt to predict curve progression." J Orthop Res **5**(3): 330-6.
- Miller, N. H., C. M. Justice, et al. (2005). "Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis." Spine **30**(10): 1181-7.
- Mitra, S. W., E. Hoskin, et al. (2003). "Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha." Endocrinology **144**(5): 2055-67.
- Molis, T. M., L. L. Spriggs, et al. (1994). "Modulation of estrogen receptor mRNA expression by melatonin in MCF-7 human breast cancer cells." Mol Endocrinol **8**(12): 1681-90.
- Monroe, D. G., D. F. Jin, et al. (2000). "Estrogen opposes the apoptotic effects of bone morphogenetic protein 7 on tissue remodeling." Mol Cell Biol **20**(13): 4626-34.
- Montanaro, L., P. Parisini, et al. (2006). "Evidence of a linkage between matrilin-1 gene (MATN1) and idiopathic scoliosis." Scoliosis **1**: 21.
- Moore, J. T., D. D. McKee, et al. (1998). "Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms." Biochem Biophys Res Commun **247**(1): 75-8.
- Moras, D. and H. Gronemeyer (1998). "The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function." Curr Opin Cell Biol **10**(3): 384-91.
- Morcuende, J. A., R. Minhas, et al. (2003). "Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis." Spine **28**(17): 2025-8; discussion 2029.

- Moreau, A., D. S. Wang, et al. (2004). "Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis." Spine **29**(16): 1772-81.
- Morishima, A., M. M. Grumbach, et al. (1995). "Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens." J Clin Endocrinol Metab **80**(12): 3689-98.
- Morley, P., J. F. Whitfield, et al. (1992). "A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium." Endocrinology **131**(3): 1305-12.
- Moss, R. L., Q. Gu, et al. (1997). "Estrogen: nontranscriptional signaling pathway." Recent Prog Horm Res **52**: 33-68; discussion 68-9.
- Mosselman, S., J. Polman, et al. (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." FEBS Lett **392**(1): 49-53.
- Muhlrad, A. and R. Yarom (1982). "Contractile protein studies on platelets from patients with idiopathic scoliosis." Haemostasis **11**(3): 154-60.
- Murakami, N., N. Saito, et al. (2002). "Repair of segmental defects in rabbit humeri with titanium fiber mesh cylinders containing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and a synthetic polymer." J Biomed Mater Res **62**(2): 169-74.
- Nagai, T., K. Obata, et al. (2006). "Growth hormone therapy and scoliosis in patients with Prader-Willi syndrome." Am J Med Genet A **140**(15): 1623-7.
- Nakamura, T., Y. Imai, et al. (2007). "Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts." Cell **130**(5): 811-23.
- Nakashima, K., X. Zhou, et al. (2002). "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation." Cell **108**(1): 17-29.

- New, D. C., S. T. Tsim, et al. (2003). "G protein-linked effector and second messenger systems involved in melatonin signal transduction." Neurosignals **12**(2): 59-70.
- Nilsson, O., D. Chrysis, et al. (2003). "Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages." J Endocrinol **177**(2): 319-26.
- Nilsson, S. and J. A. Gustafsson (2002). "Estrogen receptor action." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **12**(4): 237-57.
- Nissinen, M., M. Heliovaara, et al. (1993). "Trunk asymmetry, posture, growth, and risk of scoliosis. A three-year follow-up of Finnish prepubertal school children." Spine **18**(1): 8-13.
- Nomura, M., K. S. Korach, et al. (2003). "Estrogen receptor beta (ERbeta) protein levels in neurons depend on estrogen receptor alpha (ERalpha) gene expression and on its ligand in a brain region-specific manner." Brain Res Mol Brain Res **110**(1): 7-14.
- Nonclercq, D., F. Journe, et al. (2007). "Effect of nuclear export inhibition on estrogen receptor regulation in breast cancer cells." J Mol Endocrinol **39**(2): 105-18.
- Noonan, K. J., L. A. Dolan, et al. (1997). "Long-term psychosocial characteristics of patients treated for idiopathic scoliosis." J Pediatr Orthop **17**(6): 712-7.
- Normelli, H., J. Sevastik, et al. (1985). "The length and ash weight of the ribs of normal and scoliotic persons." Spine **10**(6): 590-2.
- Norvell, S. M., M. Alvarez, et al. (2004). "Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts." Calcif Tissue Int **75**(5): 396-404.
- Ocaka, L., C. Zhao, et al. (2008). "Assignment of two loci for autosomal dominant adolescent idiopathic scoliosis to chromosomes 9q31.2-q34.2 and 17q25.3-qtel." J Med Genet **45**(2): 87-92.

- Oegema, T. R., Jr., D. S. Bradford, et al. (1983). "Comparison of the biochemistry of proteoglycans isolated from normal, idiopathic scoliotic and cerebral palsy spines." Spine **8**(4): 378-84.
- Ogawa, S., S. Inoue, et al. (1998). "Cross-inhibition of both estrogen receptor alpha and beta pathways by each dominant negative mutant." FEBS Lett **423**(2): 129-32.
- Ogawa, S., S. Inoue, et al. (1998). "The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro." Biochem Biophys Res Commun **243**(1): 122-6.
- Onoe, Y., C. Miyaura, et al. (1997). "Expression of estrogen receptor beta in rat bone." Endocrinology **138**(10): 4509-12.
- Oyama, J., I. Murai, et al. (2006). "Bipedal ambulation induces experimental scoliosis in C57BL/6J mice with reduced plasma and pineal melatonin levels." J Pineal Res **40**(3): 219-24.
- Ozkaynak, E., P. N. Schnegelsberg, et al. (1992). "Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis." J Biol Chem **267**(35): 25220-7.
- Pace, P., J. Taylor, et al. (1997). "Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha." J Biol Chem **272**(41): 25832-8.
- Paech, K., P. Webb, et al. (1997). "Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites." Science **277**(5331): 1508-10.
- Papaioannou, S., A. M. Tumber, et al. (1999). "G-protein signalling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblasts." Biochim Biophys Acta **1449**(3): 284-92.
- Parfitt, A. M. (2002). "Misconceptions (1): epiphyseal fusion causes cessation of growth." Bone **30**(2): 337-9.

- Parikka, V., Z. Peng, et al. (2005). "Estrogen responsiveness of bone formation in vitro and altered bone phenotype in aged estrogen receptor-alpha-deficient male and female mice." Eur J Endocrinol **152**(2): 301-14.
- Peleg, I., A. Eldor, et al. (1989). "Altered structural and functional properties of myosins, from platelets of idiopathic scoliosis patients." J Orthop Res **7**(2): 260-5.
- Petersen, I., T. Sahlstrand, et al. (1979). "Electroencephalographic investigation of patients with adolescent idiopathic scoliosis." Acta Orthop Scand **50**(3): 283-93.
- Pfeilschifter, J., M. Oechsner, et al. (1990). "Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta." Endocrinology **127**(1): 69-75.
- Picard, N., C. Charbonneau, et al. (2008). "Phosphorylation of activation function-1 regulates proteasome-dependent nuclear mobility and E6-associated protein ubiquitin ligase recruitment to the estrogen receptor beta." Mol Endocrinol **22**(2): 317-30.
- Pietras, R. J. and C. M. Szego (1980). "Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes." Biochem J **191**(3): 743-60.
- Pincott, J. R., J. S. Davies, et al. (1984). "Scoliosis caused by section of dorsal spinal nerve roots." J Bone Joint Surg Br **66**(1): 27-9.
- Pincott, J. R. and L. F. Taffs (1982). "Experimental scoliosis in primates: a neurological cause." J Bone Joint Surg Br **64**(4): 503-7.
- Porter, R. W. (2000). "Idiopathic scoliosis: the relation between the vertebral canal and the vertebral bodies." Spine **25**(11): 1360-6.

- Porter, W., B. Saville, et al. (1997). "Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor." Mol Endocrinol **11**(11): 1569-80.
- Prossnitz, E. R., J. B. Arterburn, et al. (2008). "Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30." Annu Rev Physiol **70**: 165-90.
- Qiu, X. S., N. L. Tang, et al. (2007). "Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis." Spine **32**(16): 1748-53.
- Qiu, X. S., N. L. Tang, et al. (2007). "Genetic association study of growth hormone receptor and idiopathic scoliosis." Clin Orthop Relat Res **462**: 53-8.
- Qu, Q., M. Perala-Heape, et al. (1998). "Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture." Bone **22**(3): 201-9.
- Raczkowski, J. W. (2007). "The concentrations of testosterone and estradiol in girls with adolescent idiopathic scoliosis." Neuro Endocrinol Lett **28**(3): 302-4.
- Ram, P. T., T. Kiefer, et al. (1998). "Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors." Mol Cell Endocrinol **141**(1-2): 53-64.
- Ramirez, V. D. and J. Zheng (1996). "Membrane sex-steroid receptors in the brain." Front Neuroendocrinol **17**(4): 402-39.
- Rao, L. G., L. J. Liu, et al. (2003). "Estrogen added intermittently, but not continuously, stimulates differentiation and bone formation in SaOS-2 cells." Biol Pharm Bull **26**(7): 936-45.
- Razandi, M., A. Pedram, et al. (1999). "Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells." Mol Endocrinol **13**(2): 307-19.

- Reid, G., S. Denger, et al. (2002). "Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation." Cell Mol Life Sci **59**(5): 821-31.
- Reid, I. R. and A. B. Grey (1993). "Corticosteroid osteoporosis." Baillieres Clin Rheumatol **7**(3): 573-87.
- Reuber, M., A. Schultz, et al. (1983). "Trunk muscle myoelectric activities in idiopathic scoliosis." Spine **8**(5): 447-56.
- Riggs, B. L., S. Khosla, et al. (2002). "Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton." Endocr Rev **23**(3): 279-302.
- Riis, B. J., S. Krabbe, et al. (1985). "Bone turnover in male puberty: a longitudinal study." Calcif Tissue Int **37**(3): 213-7.
- Riseborough, E. J. and R. Wynne-Davies (1973). "A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts." J Bone Joint Surg Am **55**(5): 974-82.
- Ross, J. L., F. G. Cassorla, et al. (1983). "A preliminary study of the effect of estrogen dose on growth in Turner's syndrome." N Engl J Med **309**(18): 1104-6.
- Sabato, S., A. Rotman, et al. (1985). "Platelet aggregation abnormalities in idiopathic scoliosis." J Pediatr Orthop **5**(5): 558-63.
- Sadat-Ali, M., I. al-Habdan, et al. (2000). "Adolescent idiopathic scoliosis. Is low melatonin a cause?" Joint Bone Spine **67**(1): 62-4.
- Safe, S. (2001). "Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions." Vitam Horm **62**: 231-52.
- Sahgal, V., A. Shah, et al. (1983). "Morphologic and morphometric studies of muscle in idiopathic scoliosis." Acta Orthop Scand **54**(2): 242-51.
- Sahlstrand, T., B. Petruson, et al. (1979). "Vestibulospinal reflex activity in patients with adolescent idiopathic scoliosis. Postural effects during caloric labyrinthine stimulation recorded by stabilometry." Acta Orthop Scand **50**(3): 275-81.

- Saintier, D., V. Khanine, et al. (2006). "Estradiol inhibits adhesion and promotes apoptosis in murine osteoclasts in vitro." J Steroid Biochem Mol Biol **99**(4-5): 165-73.
- Salehi, L. B., M. Mangino, et al. (2002). "Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11." Hum Genet **111**(4-5): 401-4.
- Sanchez-Barcelo, E. J., S. Cos, et al. (2005). "Melatonin-estrogen interactions in breast cancer." J Pineal Res **38**(4): 217-22.
- Sato, M., N. Yasui, et al. (1998). "Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis." J Bone Miner Res **13**(8): 1221-31.
- Saxon, L. K. and C. H. Turner (2005). "Estrogen receptor beta: the antimechanostat?" Bone **36**(2): 185-92.
- Schwabe, J. W., D. Neuhaus, et al. (1990). "Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor." Nature **348**(6300): 458-61.
- Sevastik, B., U. Willers, et al. (1993). "Scoliosis induced immediately after mechanical medial rib elongation in the rabbit." Spine **18**(7): 923-6.
- Sevastik, B., B. Xiong, et al. (1995). "In vitro opto-electronic analysis of 3-D segmental vertebral movements during gradual rib lengthening in the pig." Acta Orthop Belg **61**(3): 218-25.
- Sevastik, J., M. Agadir, et al. (1990). "Effects of rib elongation on the spine. II. Correction of scoliosis in the rabbit." Spine **15**(8): 826-9.
- Shapses, S. A., M. Cifuentes, et al. (2003). "Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency." Calcif Tissue Int **73**(1): 86-92.

- Shiau, A. K., D. Barstad, et al. (1998). "The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen." Cell **95**(7): 927-37.
- Shinohara, M. and H. Takayanagi (2007). "Novel osteoclast signaling mechanisms." Curr Osteoporos Rep **5**(2): 67-72.
- Shohat, M., T. Shohat, et al. (1988). "Growth and ethnicity in scoliosis." Acta Orthop Scand **59**(3): 310-3.
- Sims, N. A., S. Dupont, et al. (2002). "Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males." Bone **30**(1): 18-25.
- Skogland, L. B. and J. A. Miller (1980). "Growth related hormones in idiopathic scoliosis. An endocrine basis for accelerated growth." Acta Orthop Scand **51**(5): 779-80.
- Skogland, L. B. and J. A. Miller (1981). "The length and proportions of the thoracolumbar spine in children with idiopathic scoliosis." Acta Orthop Scand **52**(2): 177-85.
- Slemenda, C. W., T. K. Reister, et al. (1994). "Influences on skeletal mineralization in children and adolescents: evidence for varying effects of sexual maturation and physical activity." J Pediatr **125**(2): 201-7.
- Smith, E. P., J. Boyd, et al. (1994). "Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man." N Engl J Med **331**(16): 1056-61.
- Solda, G., S. Boi, et al. (2005). "In vivo RNA-RNA duplexes from human alpha3 and alpha5 nicotinic receptor subunit mRNAs." Gene **345**(2): 155-64.
- Somerville, E. W. (1952). "Rotational lordosis; the development of single curve." J Bone Joint Surg Br **34-B**(3): 421-7.

- Spencer, G. S. and P. A. Zorab (1976). "Spinal muscle in scoliosis. Part 1. Histology and histochemistry." J Neurol Sci **30**(1): 137-42.
- Srivastava, S., M. N. Weitzmann, et al. (1999). "Estrogen decreases TNF gene expression by blocking JNK activity and the resulting production of c-Jun and JunD." J Clin Invest **104**(4): 503-13.
- Srivastava, S., M. N. Weitzmann, et al. (1998). "Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1." J Clin Invest **102**(10): 1850-9.
- Stenoien, D. L., M. G. Mancini, et al. (2000). "Subnuclear trafficking of estrogen receptor-alpha and steroid receptor coactivator-1." Mol Endocrinol **14**(4): 518-34.
- Stokes, I. A. (2007). "Analysis and simulation of progressive adolescent scoliosis by biomechanical growth modulation." Eur Spine J **16**(10): 1621-8.
- Stokes, I. A., J. Dansereau, et al. (1989). "Rib cage asymmetry in idiopathic scoliosis." J Orthop Res **7**(4): 599-606.
- Strewler, G. J. (2001). "Local and systemic control of the osteoblast." J Clin Invest **107**(3): 271-2.
- Subramaniam, M., G. Gorny, et al. (2005). "TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro." Mol Cell Biol **25**(3): 1191-9.
- Suda, T., I. Nakamura, et al. (1997). "Regulation of osteoclast function." J Bone Miner Res **12**(6): 869-79.
- Suk, S. I., I. K. Kim, et al. (1991). "A study on platelet function in idiopathic scoliosis." Orthopedics **14**(10): 1079-83.

- Szalay, E. A., P. Bosch, et al. (2008). "Adolescents with idiopathic scoliosis are not osteoporotic." Spine **33**(7): 802-6.
- Tang, N. L., H. Y. Yeung, et al. (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**(21): 2463-8.
- Tesarik, J. and C. Mendoza (1995). "Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential." J Clin Endocrinol Metab **80**(4): 1438-43.
- Theintz, G., B. Buchs, et al. (1992). "Longitudinal monitoring of bone mass accumulation in healthy adolescents: evidence for a marked reduction after 16 years of age at the levels of lumbar spine and femoral neck in female subjects." J Clin Endocrinol Metab **75**(4): 1060-5.
- Thillard, M. J. (1959). "[Vertebral column deformities following epiphysectomy in the chick.]" C R Hebd Seances Acad Sci **248**(8): 1238-40.
- Thomas, K. A., S. D. Cook, et al. (1992). "Lumbar spine and femoral neck bone mineral density in idiopathic scoliosis: a follow-up study." J Pediatr Orthop **12**(2): 235-40.
- Tian, Q., S. B. Stepaniants, et al. (2004). "Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells." Mol Cell Proteomics **3**(10): 960-9.
- Tilton, F. E., J. J. Degioanni, et al. (1980). "Long-term follow-up of Skylab bone demineralization." Aviat Space Environ Med **51**(11): 1209-13.
- Toft, D., G. Shyamala, et al. (1967). "A receptor molecule for estrogens: studies using a cell-free system." Proc Natl Acad Sci U S A **57**(6): 1740-3.
- Tremblay, G. B., A. Tremblay, et al. (1999). "Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the

- estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex." Mol Cell Biol **19**(3): 1919-27.
- Trygstad, O. (1986). "Oestrogen treatment of adolescent tall girls; short term side effects." Acta Endocrinol Suppl (Copenh) **279**: 170-3.
- Turner, R. T., B. L. Riggs, et al. (1994). "Skeletal effects of estrogen." Endocr Rev **15**(3): 275-300.
- Valimaa, H., S. Savolainen, et al. (2004). "Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands." J Endocrinol **180**(1): 55-62.
- Van Den Bemd, G. J., G. G. Kuiper, et al. (1999). "Distinct effects on the conformation of estrogen receptor alpha and beta by both the antiestrogens ICI 164,384 and ICI 182,780 leading to opposite effects on receptor stability." Biochem Biophys Res Commun **261**(1): 1-5.
- Vanacker, J. M., E. Bonnelye, et al. (1999). "Transcriptional activities of the orphan nuclear receptor ERR alpha (estrogen receptor-related receptor-alpha)." Mol Endocrinol **13**(5): 764-73.
- Vanacker, J. M., C. Delmarre, et al. (1998). "Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear receptor estrogen receptor related alpha." Cell Growth Differ **9**(12): 1007-14.
- Vanecek, J. (1998). "Cellular mechanisms of melatonin action." Physiol Rev **78**(3): 687-721.
- Veldhuis, J. D., S. M. Anderson, et al. (2004). "Estradiol supplementation in postmenopausal women doubles rebound-like release of growth hormone (GH) triggered by sequential infusion and withdrawal of somatostatin: evidence that estrogen facilitates endogenous GH-releasing hormone drive." J Clin Endocrinol Metab **89**(1): 121-7.

- Velis, K. P., J. H. Healey, et al. (1989). "Peak skeletal mass assessment in young adults with idiopathic scoliosis." Spine **14**(7): 706-11.
- Vidal, O., M. K. Lindberg, et al. (2000). "Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5474-9.
- Vidil, A., P. Journeau, et al. (2001). "Evolution of scoliosis in six children treated with growth hormone." J Pediatr Orthop B **10**(3): 197-200.
- Volkman, R. (1882). "Verletzungen und Krankheiten der Bewegungsorgane." von Pitha FR, Billroth Th (eds) Handbuch der allgemeinen und speziellen Chirurgie.
- Wang, E. D., D. S. Drummond, et al. (1997). "Scoliosis in patients treated with growth hormone." J Pediatr Orthop **17**(6): 708-11.
- Wang, Q., X. Wei, et al. (2007). "Bone morphogenetic protein 2 activates Smad6 gene transcription through bone-specific transcription factor Runx2." J Biol Chem **282**(14): 10742-8.
- Wang, X., M. Moreau, et al. (1998). "Changes in serum melatonin levels in response to pinealectomy in the chicken and its correlation with development of scoliosis." Spine **23**(22): 2377-81; discussion 2382.
- Warren, M. P., J. Brooks-Gunn, et al. (1986). "Scoliosis and fractures in young ballet dancers. Relation to delayed menarche and secondary amenorrhea." N Engl J Med **314**(21): 1348-53.
- Watson, C. S., C. H. Campbell, et al. (2002). "The dynamic and elusive membrane estrogen receptor-alpha." Steroids **67**(6): 429-37.
- Watson, C. S., Y. J. Jeng, et al. (2008). "Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation." Faseb J **22**(9): 3328-36.

- Watson, C. S., T. C. Pappas, et al. (1995). "The other estrogen receptor in the plasma membrane: implications for the actions of environmental estrogens." Environ Health Perspect **103 Suppl 7**: 41-50.
- Weaver, C. M. (2002). "Adolescence: the period of dramatic bone growth." Endocrine **17**(1): 43-8.
- Weihua, Z., S. Saji, et al. (2000). "Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5936-41.
- Weinstein, S. L. (1994). "Advances in the diagnosis and management of adolescent idiopathic scoliosis." J Pediatr Orthop **14**(5): 561-3.
- Weise, M., S. De-Levi, et al. (2001). "Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6871-6.
- Weiss, H. R. (2007). "Idiopathic scoliosis: how much of a genetic disorder? Report of five pairs of monozygotic twins." Dev Neurorehabil **10**(1): 67-73.
- Whalen, R. G. and M. S. Ecob (1982). "Two-dimensional electrophoretic analysis of muscle contractile proteins in patients with idiopathic scoliosis." Clin Chem **28**(4 Pt 2): 1036-40.
- Whedon, M. and F. L. Damianos (1993). "Nursing care issues in autologous bone marrow transplantation." Oncology (Williston Park) **7**(6): 78-88; discussion 91-2, 95.
- Wilkinson, H. A., J. Dahllund, et al. (2002). "Identification and characterization of a functionally distinct form of human estrogen receptor beta." Endocrinology **143**(4): 1558-61.
- Willner, S., K. O. Nilsson, et al. (1976). "Growth hormone and somatomedin A in girls with adolescent idiopathic scoliosis." Acta Paediatr Scand **65**(5): 547-52.

- Windahl, S. H., O. Vidal, et al. (1999). "Increased cortical bone mineral content but unchanged trabecular bone mineral density in female ERbeta(-/-) mice." J Clin Invest **104**(7): 895-901.
- Winkler, D. G., M. K. Sutherland, et al. (2003). "Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist." Embo J **22**(23): 6267-76.
- Winnier, G., M. Blessing, et al. (1995). "Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse." Genes Dev **9**(17): 2105-16.
- Wise, C. A., R. Barnes, et al. (2000). "Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis." Spine **25**(18): 2372-80.
- Wong, B. R., R. Josien, et al. (1998). "The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor." J Biol Chem **273**(43): 28355-9.
- Worthington, V. and P. Shambaugh (1991). "Systemic abnormalities in idiopathic scoliosis." J Manipulative Physiol Ther **14**(8): 467-71.
- Wozney, J. M. (1992). "The bone morphogenetic protein family and osteogenesis." Mol Reprod Dev **32**(2): 160-7.
- Wu, J., Y. Qiu, et al. (2006). "Association of estrogen receptor gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis." Spine **31**(10): 1131-6.
- Wu, X. B., Y. Li, et al. (2003). "Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice." J Clin Invest **112**(6): 924-34.
- Wynne-Davies, R. (1973). "Genetic aspects of idiopathic scoliosis." Dev Med Child Neurol **15**(6): 809-11.
- Xiao, Y. T., L. X. Xiang, et al. (2007). "Bone morphogenetic protein." Biochem Biophys Res Commun **362**(3): 550-3.

- Yamada, K., T. Ikata, et al. (1969). "Equilibrium function in scoliosis and active corrective plaster jacket for the treatment." Tokushima J Exp Med **16**(1): 1-7.
- Yamamoto, T., F. Saatcioglu, et al. (2002). "Cross-talk between bone morphogenic proteins and estrogen receptor signaling." Endocrinology **143**(7): 2635-42.
- Yarom, R. and G. C. Robin (1979). "Muscle pathology in idiopathic scoliosis." Isr J Med Sci **15**(11): 917-24.
- Yekutiel, M., G. C. Robin, et al. (1981). "Proprioceptive function in children with adolescent idiopathic scoliosis." Spine **6**(6): 560-6.
- Ylikomi, T., A. Vienonen, et al. (2004). "G protein-coupled receptor 30 down-regulates cofactor expression and interferes with the transcriptional activity of glucocorticoid." Eur J Biochem **271**(21): 4159-68.
- Yoshihara, H., N. Kawakami, et al. (2005). "A histomorphologic study of scoliosis in pinealectomized chickens." Spine **30**(20): 2244-51.
- Yu, J., J. C. Fairbank, et al. (2005). "The elastic fiber network of the annulus fibrosus of the normal and scoliotic human intervertebral disc." Spine **30**(16): 1815-20.
- Zallone, A. (2006). "Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts." Ann N Y Acad Sci **1068**: 173-9.
- Zaman, G., H. L. Jessop, et al. (2006). "Osteocytes use estrogen receptor alpha to respond to strain but their ERalpha content is regulated by estrogen." J Bone Miner Res **21**(8): 1297-306.
- Zetterberg, C., A. Aniansson, et al. (1983). "Morphology of the paravertebral muscles in adolescent idiopathic scoliosis." Spine **8**(5): 457-62.
- Zhang, H. and A. Bradley (1996). "Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development." Development **122**(10): 2977-86.

Zhou, S., G. Turgeman, et al. (2003). "Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells." Mol Endocrinol **17**(1): 56-66.

S. Annexes

8.2. Annexe 2 : Comparaison des séquences protéiques des isoformes de ER β

ERb4 MDIKNSPSSLNSPSSYNCSQSILPLEHGSIIYIPSSYVDSHHEY PAMTFYSPAVMNYSI PSNVTNLEGGP
ERb5 MDIKNSPSSLNSPSSYNCSQSILPLEHGSIIYIPSSYVDSHHEY PAMTFYSPAVMNYSI PSNVTNLEGGP
ERba MDIKNSPSSLNSPSSYNCSQSILPLEHGSIIYIPSSYVDSHHEY PAMTFYSPAVMNYSI PSNVTNLEGGP
ERb b/c MDIKNSPSSLNSPSSYNCSQSILPLEHGSIIYIPSSYVDSHHEY PAMTFYSPAVMNYSI PSNVTNLEGGP

ERb4 GRQTTSPNVLWPTPGHLSPLVVHRQLSHLYAEPQKSPWCEARSLEHTLPVNRETLKRK VSGNRCASPVT
ERb5 GRQTTSPNVLWPTPGHLSPLVVHRQLSHLYAEPQKSPWCEARSLEHTLPVNRETLKRK VSGNRCASPVT
ERba GRQTTSPNVLWPTPGHLSPLVVHRQLSHLYAEPQKSPWCEARSLEHTLPVNRETLKRK VSGNRCASPVT
ERb b/c GRQTTSPNVLWPTPGHLSPLVVHRQLSHLYAEPQKSPWCEARSLEHTLPVNRETLKRK VSGNRCASPVT

ERb4 GPGSKRDAHFCAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYICPATNQCTIDKNRRKSCQACRLR
ERb5 GPGSKRDAHFCAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYICPATNQCTIDKNRRKSCQACRLR
ERba GPGSKRDAHFCAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYICPATNQCTIDKNRRKSCQACRLR
ERb b/c GPGSKRDAHFCAVCSDYASGYHYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYICPATNQCTIDKNRRKSCQACRLR

ERb4 KCYEVGMVKCGSRRERCGYRLVRRQRSADQLHCAGKAKRSGGHAPRVRELLLDALSPEQLVLTLLLEAE
ERb5 KCYEVGMVKCGSRRERCGYRLVRRQRSADQLHCAGKAKRSGGHAPRVRELLLDALSPEQLVLTLLLEAE
ERba KCYEVGMVKCGSRRERCGYRLVRRQRSADQLHCAGKAKRSGGHAPRVRELLLDALSPEQLVLTLLLEAE
ERb b/c KCYEVGMVKCGSRRERCGYRLVRRQRSADQLHCAGKAKRSGGHAPRVRELLLDALSPEQLVLTLLLEAE

ERb4 PPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLT KLADKELVHMI SWAKKI PGFVELSLFDQVRLLES CWMEVLMGLMW
ERb5 PPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLT KLADKELVHMI SWAKKI PGFVELSLFDQVRLLES CWMEVLMGLMW
ERba PPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLT KLADKELVHMI SWAKKI PGFVELSLFDQVRLLES CWMEVLMGLMW
ERb b/c PPHVLI SRPSAPFTEASMMMSLT KLADKELVHMI SWAKKI PGFVELSLFDQVRLLES CWMEVLMGLMW

ERb4 RSIDHPGKLI FAPDLV LDRDEGKCV EGI LEI FDM LLATTSRFRELKLQHKEYLCVKAMILLN SSMYPLV
ERb5 RSIDHPGKLI FAPDLV LDRDEGKCV EGI LEI FDM LLATTSRFRELKLQHKEYLCVKAMILLN SSMYPLV
ERba RSIDHPGKLI FAPDLV LDRDEGKCV EGI LEI FDM LLATTSRFRELKLQHKEYLCVKAMILLN SSMYPLV
ERb b/c RSIDHPGKLI FAPDLV LDRDEGKCV EGI LEI FDM LLATTSRFRELKLQHKEYLCVKAMILLN SSMYPLV

ERb4 ATQDADSSRKLIAHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLM LLSHVRHARWGEKQFIHLKLS
ERb5 TATQDADSSRKLIAHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLM LLSHVRHARYAP
ERba TATQDADSSRKLIAHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLM LLSHVRHASNKGMEHLLNMCKKN
ERb b/c TATQDADSSRKLIAHLLNAVTDALVWVIAKSGISSQQQSMRLANLLM LLSHVRHARA EKASQTLT SFGMK

ERb4
ERb5
ERba VVPVYD LLEMLNAHVLRGCKSSITGSECS PAEDSKSKEGSQNPQSQ
ERb b/c METLLPEATMEQ

8.3. Annexe 3 : Revue de la littérature sur les estrogènes et la scoliose

Cette revue a été acceptée au journal « Trends in Endocrinology and Metabolism ».

De: em.tem.0.d3bf4.062cf501@editorialmanager.com de la part de Trends in Endocrinology & Metabolism Editorial Office [tem@elsevier.com]
29 Dec 2008

Ref.: Ms. No. TEM-D-08-00172R2

Dear Dr Moldovan,

We are pleased to inform you that your article has been accepted for publication in Trends in Endocrinology and Metabolism. Thank you again for writing for TEM.

You will receive a single set of proofs within the next month to six weeks. As it is important that either you or a representative will be available during this time to check the proofs, please let me know if you will be away at any time during this period.

Trends in: Biochemical Sciences; Biotechnology; Cell Biology; Cognitive Sciences; Ecology and Evolution; Endocrinology and Metabolism; Genetics; Immunology; Microbiology; Molecular Medicine; Neurosciences; Parasitology; Plant Science; Pharmacological Sciences

If you have any feedback for us regarding your interaction with the editorial office and in particular, our new submission system, please let me know.

Thank you again for an interesting contribution to Trends in Endocrinology and Metabolism.

With best regards,
Susanne

Susanne Tranguch, PhD
Editor, TEM
Cell Press

8.4 Accord des co-auteurs

Étudiante : Dominique Leboeuf

Programme : Maîtrise en Sciences Biomédicales (2-484-10)

Could estrogens impact progression of adolescent idiopathic scoliosis (AIS) during skeletal growth?

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Dominique Leboeuf inclus cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre *Études des récepteurs aux estrogènes dans les ostéoblastes de patients atteints de Scoliose Idiopathique de l'Adolescent*

Do estrogens impact adolescent idiopathic scoliosis?

Leboeuf Dominique¹, Letellier Karen¹, Alos Nathalie^{1,2}, Edery Patrick⁴, Moldovan Florina^{2,3}

1: Université de Montréal, Faculté de Médecine

2: CHU Sainte Justine

3: Université de Montréal, Faculté de Médecine Dentaire

4: Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

Abstract

Recent discoveries in the pathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS) suggest that various hormones, especially estrogens, play a role in its onset and development. This role for estrogen seems possible due to its interaction with many factors that influence the development and progression of this spinal deformity. Additionally, estrogens impact bone remodelling and growth, as well as bone acquisition, all of which are affected in AIS. Despite the fact that estrogens are not causative factors of AIS, they could impact the progression of spinal deformity by interacting with factors modulating bone growth, biomechanics, and structure. Thus, clarifying the role of estrogens is essential for understanding how AIS evolves during skeletal growth and eventual developing new therapeutic interventions.

Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS)

Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS) is the most common form of scoliosis, affecting up to 3% of the population. This pathology is characterized by a three-dimensional spinal deformity caused by the rotation of the vertebrae body. The curvature involves torsion, angulation and translation in the transverse, coronal and sagittal planes simultaneously. In paediatric patients, scoliosis can be classified by age (infantile, juvenile, and adolescent) and etiology (neuromuscular, congenital, or idiopathic). Currently, the consensus on AIS is of a multifactorial etiology, but the involvement of genetic factors is widely accepted. Adolescent idiopathic scoliosis occurs and progresses, primarily in girls, during pre-pubertal and pubertal growth, a crucial period for bone mass acquisition that seems to be problematic at the spinal level. Progression of this pathology is not predictable; however, skeletal immaturity as well as curve magnitude and anatomical location are crucial factors for selecting treatment options. Current treatments include bracing

or surgical correction, both of which do not target the cause of the disease.

Several physiopathological and clinical observations suggest that hormones including estrogens and phytoestrogens (Box 1) play a critical role in bone mass acquisition and/or formation and consequently in the pathogenesis of AIS, but the precise mechanisms involved are yet unclear. In fact, the increased occurrence of scoliosis in girls is striking, with clinically significant spinal deformities (at least 10° of deformity) found twice as often in girls, and this ratio increases to 8:1 for scoliosis of more than 30° in the frontal plan [1].

It is well known that progression of scoliosis occurs during skeletal growth [2] and that estrogens are large contributors to puberty and growth. Data from the literature and clinical orthopaedic practice recognize skeletal immaturity as a critical factor in the progression of spinal deformity [3]. Skeletal growth is controlled by a complex interplay of sex hormones, parathyroid, growth and thyroid hormones. All these hormones act on bone metabolism, but estrogens exert a distinct role by acting on cells of both mesenchymal (osteoblast) and hematopoietic (osteoclast) origin [4]. Estrogens could therefore be considered contributing factors in the

progression of scoliosis, through their putative roles in bone formation, growth, maturation and turnover.

Box 1

Phytoestrogens

Phytoestrogens, natural molecules of vegetable origin that mimic antagonist and/or agonist biological activity of estrogens, can impact growth, bone remodelling and bone mineral density [73]. Studies suggest the possible contribution of environmental factors including phytoestrogens to the etiology of scoliosis. Depending on the amount used, phytoestrogens in animals cause skeletal abnormalities such as scoliosis and lordosis [20]. Despite being approximately 1,000 times less potent than estrogens, phytoestrogens activate estrogen receptors in bone cells [74] and affect the expression of estrogen responsive genes [75]. *In vitro*, genistein and daidzein can bind with ER β ; these phytoestrogens have a marked estrogenic biological activity [76]. Genistein was also reported to affect the melatonin receptor (MT2) in human osteoblasts of the MG63 cellular line (immortalized osteoblasts derived from osteosarcoma) by directly affecting phosphorylation of Gi proteins coupled with MT2 [70]. Therefore, phytoestrogens could be involved in the melatonin signalling defect observed at the level of Gi protein phosphorylation, leading to an accumulation of cAMP in AIS patient cells.

protein 7 (*CHD7* gene) has been associated with AIS [9]. On the other hand, very few loci for major AIS genes (i.e. loci identified through parametric linkage studies that supposedly contain genes mandatory to develop scoliosis in the families studied) have been described to date [10, 11]. The genes responsible for AIS have yet to be identified, and the faulty proteins remain to be identified and functionally validated.

Collagen, disc and muscle abnormalities are suggested as etiologic factors in AIS, although these are perhaps secondary degenerative changes. Studies suggest that faulty collagen, proteoglycans and elastic fibres induce scoliosis [12, 13]. Diseases of the connective tissue, such as Marfan syndrome, caused by mutations in the Fibrillin 1 (*FBNI*) gene, can lead to scoliosis, although the phenotype of this scoliosis differs from that of idiopathic scoliosis [14].

Other possible factors of AIS include the mechanical strain put on the spine during puberty which could aggravate the progression of the scoliotic curve [15], alter the control of proprioception [16], and affect biochemical factors. Indeed, several studies have illustrated the role of biochemical factors in platelets of AIS patients by finding a higher concentration of intracellular calcium [17] and a diminished activity of contractile proteins [18].

Scoliosis, a Multifactorial Pathology

Many factors, including neuroendocrine, neurological, muscular, biochemical and structural, have been proposed for AIS pathogenesis [5]. In terms of its genetic component, AIS is more frequent in certain families, and autosomal dominant inheritance was suspected; however, the way it is transmitted is still unclear. Moreover, the gene or genes responsible for AIS are yet to be discovered [6, 7]. Many susceptibility loci (i.e. loci identified through model free linkage methods that supposedly contain genomic variation predisposing to scoliosis) have been identified [8]. For instance, a polymorphism in the chromodomain helicase DNA binding

We hypothesize that estrogens could play a critical role in the progression of AIS through their roles in bone formation, growth, maturation and bone turnover. Our position is that estrogens are not at the origin of AIS, but that they interact with defective genes or gene products yet to be identified, as well as with melatonin signalling, in AIS patients. It seems likely that hormones such as estrogens could influence AIS as they have a decisive responsibility in determining progression versus non-progression of the deformity. Estrogen activity may also be affected by the interplay between hormones and environmental factors that alter bone cell signalling and function (Figure 1).

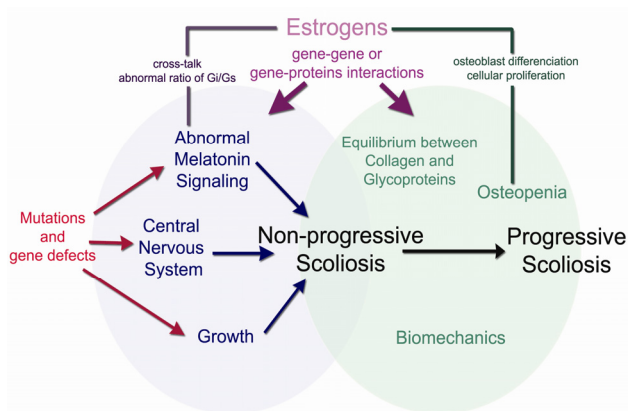


Figure 1. Our hypothesis is that estrogens are not at the origin of adolescent idiopathic scoliosis (AIS) but that they interact with gene defects that have yet to be identified. Estrogens can influence AIS and have a decisive responsibility in determining progression versus non-progression of the deformity. Estrogens' activities potentially influence osteoblast differentiation, the ratio of Gi to Gs proteins, and the balance between collagen and glycoproteins in bone tissues, all effects that potentially lead to osteopenia. After the initial deformity, progressive scoliosis can evolve with spinal growth through estrogenic effects on both bone structural and compositional characteristics and biomechanics.

Estrogens and Adolescent Idiopathic Scoliosis

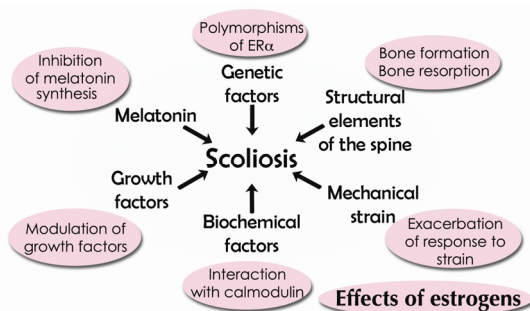


Figure 2: The etiology and molecular mechanisms of adolescent idiopathic scoliosis are not clear; however, the generally accepted concept is a multifactorial pathology that is attributed to a broad variety of factors. Although unknown genetic factors play a role in AIS, many hypotheses implying biochemical neurological, mechanical and hormonal factors are also proposed. Estrogens could impact these various factors implicated in the pathogenesis of this disease. Estrogens cross-talk with melatonin signaling, affect melatonin receptor activation and inhibit melatonin synthesis. Gene defects at the level of estrogen receptors (e.g. polymorphisms of *ESR1* gene) are suspected to modify the progression of the tridimensional deformation of the spine. Estrogen activity can also affect structural elements of the spine by controlling bone formation and bone resorption. These hormones also exacerbate the response to strain and

consequently can modulate the loads of the spine and vertebral growth alteration. Finally, estrogens interact with other hormones and biochemical factors like calmodulin, a calcium-binding protein that can bind to and regulate a multitude of different protein targets and muscle contractility.

Several studies have found that estrogens and estrogen antagonists (17- α -ethynylestradiol) directly impact the development of scoliosis [19, 20]. Treatment of *Xenopus laevis* blastulae with a pharmacological dose of 17- β -estradiol (E2), and treatment of *Fundulus heteroclitus* with the estrogen antagonist 17- α -ethynylestradiol (EE2) led to a significantly higher incidence of scoliosis [19, 20]. However, contradictions exist as to whether young girls with scoliosis have different levels of circulating estrogens. While one study performed on girls with AIS revealed significant differences in serum estradiol concentrations (finding less than half in AIS girls compared to controls [21]), other studies demonstrated no significant difference in the amount of circulating estrogens between controls and patients [3, 22]. This clearly demonstrates that the influence of estrogens on the development of AIS resides not in the level of circulating steroid hormones, such as estradiol and testosterone, but in their action on their respective target cells.

Age at menarche has also been correlated with prevalence of AIS [23, 24], but these studies also show contradictions. By studying ballet dancers, Warren et al [24] found that late menarche is correlated with a higher risk of developing AIS. This study also suggested that hypoestrogenism predisposes young ballet dancers to scoliosis and fractures. Grivas et al [23] implied that latitude, which is an indication of the number of sunshine hours, influences the secretion of melatonin, which in turn influences age at menarche in addition to the effect of estrogens. Age at menarche was proposed as a reliable prognostic factor for AIS [23], hence, the correlation between menarche and AIS is certainly an indication of the implication of estrogens in the progression of this disease. From a clinical point of view, estrogen depletion (during late menarche) reduces osteoblast proliferation and activity causing osteopenia. A low level of circulating

estrogens also causes a decrease in osteoblast differentiation with impact on the rigidity, elasticity and strength properties of bone including mineralisation.

Nonetheless, the molecular mechanisms by which estrogens affect the initiation and/or progression of scoliosis has not yet been determined, although it is known that estrogens interact with many physiopathological factors believed to influence the development of scoliosis (Figure 2). Recent studies support the hypothesis that it is not the presence or absence of estrogens that induces scoliosis but rather the response of bone cells to estrogens as suggested in Letellier et al [25].

Estrogen Receptor Polymorphisms and Their Relationship with AIS

Estrogen works through its two nuclear receptors, ER α and ER β . Several alternative splicing forms were identified for ER α and ER β [26]. While these isoforms are known to be present in osteoblasts and osteoclasts [27], their presence in cells derived from scoliotic tissues remains to be documented. Two polymorphisms of the *ESR1* gene encoding the estrogen receptor alpha (ER α) protein were recently studied in AIS patients [28, 29, 30]. Two of these studies suggested that the XbaI and PvuII polymorphisms found in intron I were correlated with progression of AIS. Inoue et. al showed that patients with a spinal deformity localized on the thoracic region and curved on the right side that were homozygotes for the XbaI allele [30] showed advanced disease progression. Wu et al found a potential association between the XbaI polymorphism and risk of developing scoliosis [28]. Yet, a Chinese study contradicts these results and maintains that no relationship exists between the PvuII and XbaI polymorphisms of the *Esr1* gene

and AIS severity or progression since the frequency of both polymorphisms was similar in normal and AIS patients [29]. Therefore, the association between AIS and *ESR1* gene polymorphisms remains controversial. A study of different populations (Caucasians, for instance) could be useful in determining if these polymorphisms are found in different proportions in AIS and control subjects compared to the proportions found in the Asian population.

ESR1 gene polymorphisms have been correlated with bone mass density, and estrogens are known to play an active role in the accretion of bone mineral content and bone mass. Bone mass accretion is impaired in AIS and could contribute to the osteopenia found in many AIS patients [31]. Mutations in *ESR1* and *CYP19* genes, the latter encoding aromatase, an enzyme needed for the synthesis of estrogens, are associated with skeletal development problems [32, 33]. This implies that ER α and aromatase play a role in the development of bone.

Scoliosis is affected by bone growth: impact of Estrogens on Bone Modelling and Remodelling

AIS develops during puberty, a period that coincides with the fluctuation of circulating hormones, including estrogens. It is well known that estrogens have an active role in bone remodelling [34], a process that increases during puberty [35]. Estrogens are also responsible for balancing cytokine secretion necessary for osteoclast formation [36]. This inhibits the differentiation of osteoprecursor cells into osteoclasts, reducing bone resorption, impacting both bone mass and density, both of which are already affected in AIS [37]. Contrary to what one would expect, however, the number and function of osteoclasts are increased in the presence of scoliosis [38]. The relationship between the progression of spinal deformity and bone resorption is not clearly understood. However, bone resorption through mechanical load was correlated with AIS progression [39]. Bone

resorption is mainly performed by osteoclast proliferation which is induced by the cytokine IL-6. Estrogens suppress this essential cytokine for osteoclast proliferation [27], and in addition, a polymorphism of the *IL-6* gene was recently associated with a higher risk of scoliosis [40]. Indeed, connection between the estrogens, AIS and bone resorption is supposed.

Estrogens are also known for their impact on longitudinal bone growth [41]. This activity is concentrated on the growth plate (epiphyses) and is mediated by both ER α and ER β . The presence of these two receptors in the growth plate has been shown [42], as has the increased expression of ER α during the growth spurt [4]. Estrogens have a dual effect on longitudinal bone growth. At low concentrations, estrogens increase growth by stimulating growth hormone (GH) secretion [41]; however, at higher concentrations, they inhibit clonal expansion and cell proliferation in the hypertrophic zone and induce apoptosis of chondrocytes in the growth plate [43], closing the epiphyses and ending growth. At these high concentrations, estrogens also inhibit GH secretion, triggering the end of longitudinal growth [44]. AIS patients who are known to be taller than normal children of the same age [45] could therefore be affected by a miscommunication between estrogens and growth hormone.

AIS and Modulation of Growth by Estrogens

As of yet, there is no direct connection between estrogen signalling and the progression of scoliosis. However, estrogens interact with growth hormones and growth factors, both of which are also considered potential etiological factors in AIS. Numerous studies clearly report that scoliotic adolescents and young adults are taller than paired controls [45], which

could be explained by increased circulating GH levels [46]; however, Saunders' study contradicts this hypothesis [3]. Another study reported that scoliosis occurred after treatment with growth hormones [47], while another was not able to replicate this finding [48]. However, genetically predicted height, intervertebral disc and longitudinal bone growth occurring within the growth plates of long bones and vertebrae were not taken into account in either of the studies mentioned above [47, 48]. This raises the question of whether scoliotic patients are, in fact, taller than their paired controls, and whether they are genetically predisposed to growth pattern problems. Several other factors including nutrition, genetics, and systemic hormones including estrogens can also affect growth and posture [49].

Estrogens and Mechanical Load

Mechanical strain is known to stimulate bone formation [50] while long-term immobilization favours bone resorption [51]. The presence of estrogens can exacerbate these two effects, particularly during puberty [52]. One very important mechanical strain is growth. As stipulated by the Hueter-Volkman law, growth is hindered by a mechanical load and accelerated by a distraction or reduced compression on the growth plate [53]. This implies that the wedging of vertebrae in AIS will increase with the pressure of growth [2]; these effects can be aggravated by estrogens during puberty. Therefore, it is important to understand the interaction between estrogens and strain in order to decrease the pressure applied on the vertebrae and to diminish the wedging of the growth plates.

Many studies have shown that the osteoblast response to mechanical stress occurs via ER α and Wnt signalling [54, 55 56]. For example, mutations found in the gene coding for the Frizzled-coreceptor protein (*LRP5*) gene implicate the Wnt pathway in strain-related bone disorders, with a gain of function mutation of *LRP5* associated with high bone density disorder [57], and a loss of function

mutation associated with a low bone mineral density phenotype [58]. Armstrong et al [56] demonstrated that the Wnt/ β -catenin signalling pathway is necessary for osteoblasts to respond to stress and that this response is greatly diminished when ER α is inhibited or absent. This study shows that estrogens interact with the Wnt pathway to modify osteoblasts behaviour following mechanical strain. However, because spinal deformity in AIS progresses during growth, it will be important to investigate if bone cells derived from scoliotic patients respond to strain and to clarify the relationship between ER and the Wnt pathway in AIS.

Estrogens Interact with Melatonin

Since the discovery that pinealectomized chickens and rats develop scoliosis, the role of melatonin (MT) in AIS has been a subject of investigation [59]. Recently, it was proposed that a defect in melatonin signalling could be at the origin of AIS development [60]. However, these melatonin studies do not explain why AIS develops during puberty and affects young girls in greater number and severity. We recently reported an interplay between estrogens and the melatonin signalling dysfunction in AIS patients [25] (Box 2). As demonstrated in previously published literature, estrogens play a critical role in the regulation, coupling and signalling of melatonin receptors [25, 61]. Buhimschi et al [62] and our laboratory [25] demonstrated that MT1 receptor activation in presence of estradiol occurs through an increase in inhibitory G-protein-coupled receptor coupling. In rats, activated melatonin receptors on granulosa cells were observed after 17- β -estradiol and 4-P-PDOT (4-phenyl-2-propionamidotetralin, an MT2 receptor antagonist) treatment, indicating that estrogen may favour the synthesis of melatonin receptor MT1 [61].

Box 2

Cross-talk between estrogens and melatonin in AIS

Cross-talk between estrogens and the melatonin signalling defect found in osteoblasts of human AIS patients indicates a new possible role for estrogens in AIS by controlling the coupling of G α_s protein with melatonin receptors and by regulating the function of melatonin receptor MT2. Physiologically, melatonin signalling is transmitted via G protein-coupled receptors (GPCRs) with an inhibitory α subunit, which decreases the amount of cAMP in the cell. However, in some AIS patients, cAMP is found to increase in the cell cytoplasm, which may be caused by a switch between G α_i and G α_s [25, 70]. G α_i proteins are known to be regulated by estrogen activity, in that estrogens increase G α_i and G α_q and decrease G α_s expression [77]. We recently demonstrated an abnormal balance of G α_i and G α_s protein ratio promoted by estrogen-melatonin cross-talk in AIS cells. The importance of the *in vitro* results of this study lies in the fact that estrogens may correct *in vivo* melatonin signalling defect by decreasing cAMP production in a specific group of AIS patients, but not in all patients [25]. Thus estrogens can reverse the effect of melatonin in bone cells derived from AIS patients who have a melatonin signalling dysfunction. From a clinical point of view, this suggests that late menarche (frequently observed in scoliotic patients) could be an important factor in the aggravation and progression of this deformity. This finding implies that the lack of circulating estrogens that results from late menarche may be corrected by ER agonists possessing the ability to improve cAMP activity and have a positive effect on bone tissue remodelling. As a result, estrogens or estrogen receptor agonists can become important compounds to consider in AIS osteoblast cell functioning in some AIS patients. This may open new avenues in AIS pharmacotherapy to correct the signalling dysfunction existing in AIS cells.

Conversely, studies show that melatonin affects estrogen signalling especially in breast cancer cells (MCF-7) [63, 64]. Melatonin appears to have an oncostatic role in these cells, and consequently an anti-estrogenic effect by decreasing ER mRNA levels and inhibiting expression of proteins regulated by estrogens [65]. In addition, melatonin increases the sensitivity of cells to estrogen

antagonists [66]. Melatonin and estrogens also have opposing effects on secondary messengers, like cAMP. Estrogens, by their rapid non-genomic action, activate adenylate cyclase and increase intracellular cAMP [67], while melatonin inhibits cAMP production by binding to inhibitory G-proteins [68]. Melatonin interferes with estrogen signalling by impairing the estrogen receptor (ER) pathway. In fact, melatonin acts as a calmodulin antagonist; it induces conformational changes in the ER-calmodulin complex, thus impairing the binding of the E₂-ER-Calmodulin complex to DNA, consequently preventing ER-dependent transcription [69]. Finally, estrogens can influence melatonin signalling by inhibiting melatonin synthesis and interacting with melatonin membrane receptors [69].

Our recent study revealed that increased cAMP levels induced by melatonin can be corrected by treating cells with 17- β -estradiol [25]. Thus, estrogens are important pharmacological target to consider in AIS therapy directed to patients selected based on their functional response to melatonin.[25, 60, 70].

Osteopenia and AIS

Scoliosis is associated with a high prevalence of generalized osteopenia (~20%) [31, 50]. Patients with AIS also demonstrate a lower bone mineral content (BMC) than non-scoliotic adolescents [31]. Low bone mineral density (BMD) has been inversely correlated with age-adjusted severity of the scoliotic deformation [71]. Cheng et al [50] suggested that osteopenia in scoliotic girls is a primary problem, rather than a secondary consequence of scoliosis and low BMD could be caused by a low intake of calcium during puberty [72]. However, due to the low intake of calcium, the new bone would be expected to be poor in mineral density. In our opinion, estrogen depletion (during the late menarche) or estrogen dysfunction are

important factors to be considered in osteopenia and poor spinal bone mineralization.

Box 3:

Future questions

- When does AIS start, i.e. at the embryonic level, at birth, during childhood, puberty and/or during growth?
- What is the role and what are the implications of puberty in the various systems affected in AIS?
- Are there interactions between estrogens and genes located in susceptible loci associated with AIS?
- Can we classify patients based on their response to different hormones, such as estrogens and melatonin, in order to predict those patients at risk for AIS progression?
- Can we develop a new strategy for the development of innovative therapeutic interventions aimed at stopping AIS progression?

Conclusion

The main challenge in the field of AIS research is to predict progression of this pathology and to understand why it is manifested mainly in girls during puberty. During pubertal growth, bone mass acquisition and bone turnover are crucial events. Hormones such as estrogens that affect these events could impact the aggravation of the spinal deformity. The active role played by estrogens, and their interaction with other hormones and etiologic factors involved in AIS physiopathology, requires more in-depth studies. In this article, we examined the possible role of estrogens in AIS progression and suggested a new avenue for potential pharmacological interventions that could stop AIS progression during skeletal growth. Future studies on AIS need to clarify the genetic and lifestyle determinants for optimal skeletal development at puberty, a critical time when this disease occurs and progresses.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Yves Cotrel Foundation-Institut de France (FM and PE), the Hospices Civils de Lyon (PE), and scholarships from the FRSQ and MENTOR, a Canadian Institutes of Health Research program (FM, DL and KL). We would like to thank Heather Yampolsky for her editorial assistance.

References

1. Weinstein, S.L., *et al.* (2008) Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet* 371, 1527-1537
2. Sarwark, J., and Aubin, C.E. (2007) Growth considerations of the immature spine. *J Bone Joint Surg Am* 89 Suppl 1, 8-13
3. Sanders, J.O., *et al.* (2007) Maturity assessment and curve progression in girls with idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am* 89, 64-73
4. Eastell, R. (2005) Role of oestrogen in the regulation of bone turnover at the menarche. *J Endocrinol* 185, 223-234
5. Parent, S., *et al.* (2005) Adolescent idiopathic scoliosis: etiology, anatomy, natural history, and bracing. *Instr Course Lect* 54, 529-536
6. Heary, R.F., and Madhavan, K. (2008) Genetics of scoliosis. *Neurosurgery* 63, 222-227
7. Miller, N.H. (2002) Genetics of familial idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res*, 60-64
8. Salehi, L.B., *et al.* (2002) Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet* 111, 401-404
9. Gao, X., *et al.* (2007) CHD7 gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic scoliosis. *Am J Hum Genet* 80, 957-965
10. Wise, C.A., *et al.* (2000) Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 25, 2372-2380
11. Ocaka, L., *et al.* (2008) Assignment of two loci for autosomal dominant adolescent idiopathic scoliosis to chromosomes. *J Med Genet* 45, 87-92
12. Akhtar, S., *et al.* (2005) Ultrastructural localization and distribution of proteoglycan in normal and scoliotic lumbar disc. *Spine* 30, 1303-1309
13. Antoniou, J., *et al.* (2001) Elevated synthetic activity in the convex side of scoliotic intervertebral discs and endplates compared with normal tissues. *Spine* 26, E198-206
14. Pyeritz, R.E., and McKusick, V.A. (1979) The Marfan syndrome: diagnosis and management. *New Engl J Med* 300, 772-777
15. Lupporelli, S., *et al.* (2002) Biomechanical factors affecting progression of structural scoliotic curves of the spine. *Stud Health Technol Inform* 91, 81-85
16. Spencer, G.S., and Zorab, P.A. (1976) Spinal muscle in scoliosis. Part 1. Histology and histochemistry. *J Neurol Sci* 30, 137-142
17. Bredoux, R., *et al.* (2006) Human platelet Ca²⁺-ATPases: new markers of cell differentiation as illustrated in idiopathic scoliosis. *Platelets* 17, 421-433
18. Lowe, T., *et al.* (2002) Platelet calmodulin levels in adolescent idiopathic scoliosis: do the levels correlate with curve progression and severity? *Spine* 27, 768-775
19. Iwamuro, S., *et al.* (2003) Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol* 133, 189-198
20. Boudreau, M., *et al.* (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, 415-425
21. Kulis, A., *et al.* (2006) Concentration of estradiol in girls with idiopathic scoliosis. *Ortop Traumatol Rehabil* 8, 455-459
22. Raczkowski, J.W. (2007) The concentrations of testosterone and estradiol in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Neuro Endocrinol Lett* 28, 302-304
23. Grivas, T.B., *et al.* (2006) Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche in different geographic latitudes. *Scoliosis* 1, 9
24. Warren, M.P., *et al.* (1986) Scoliosis and fractures in young ballet dancers. Relation to delayed menarche and secondary amenorrhea. *New Engl J Med* 314, 1348-1353
25. Letellier, K., *et al.* (2008) Estrogen cross-talk with the melatonin signaling pathway in human osteoblasts derived from adolescent idiopathic scoliosis patients. *J Pineal Res* 45, 383-393
26. Ascenzi, P., *et al.* (2006) Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med* 27, 299-402

27. Zallone, A. (2006) Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 173-179
28. Wu, J., *et al.* (2006) Association of estrogen receptor gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 31, 1131-1136
29. Tang, N.L., *et al.* (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, 2463-2468
30. Inoue, M., *et al.* (2002) Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis. *Spine* 27, 2357-2362
31. Cheng, J.C., *et al.* (1999) Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A longitudinal follow up study. *Spine* 24, 1218-1222
32. Grumbach, M.M., and Auchus, R.J. (1999) Estrogen: consequences and implications of human mutations in synthesis and action. *J Clin Endocrinol Metabol* 84, 4677-4694
33. Bilezikian, J.P., *et al.* (1998) Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *New Engl J Med* 339, 599-603
34. Riggs, B.L., *et al.* (2002) Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 23, 279-302
35. Slemenda, C.W., *et al.* (1994) Influences on skeletal mineralization in children and adolescents: evidence for varying effects of sexual maturation and physical activity. *J Pediatr* 125, 201-207
36. Manolagas, S.C., and Jilka, R.L. (1992) Cytokines, hematopoiesis, osteoclastogenesis, and estrogens. *Calif Tissue Int* 50, 199-202
37. Cheng, J.C., *et al.* (2006) Persistent osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis--longitudinal monitoring of bone mineral density until skeletal maturity. *Stud Health Technol Inform* 123, 47-51
38. Yoshihara, H., *et al.* (2005) A histomorphologic study of scoliosis in pinealectomized chickens. *Spine* 30, 2244-2251
39. Goto, M., *et al.* (2003) Buckling and bone modeling as factors in the development of idiopathic scoliosis. *Spine* 28, 364-371
40. Aulisa, L., *et al.* (2007) Association between IL-6 and MMP-3 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: a case-control study. *Spine* 32, 2700-2702
41. Perry, M.J., *et al.* (2008) Impaired growth plate function in bmp-6 null mice. *Bone* 42, 216-225
42. Nilsson, O., *et al.* (2003) Localization of estrogen receptors-alpha and -beta and androgen receptor in the human growth plate at different pubertal stages. *J Endocrinol* 177, 319-326
43. Weise, M., *et al.* (2001) Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6871-6876
44. Drop, S.L., *et al.* (1998) Sex steroid treatment of constitutionally tall stature. *Endocr Rev* 19, 540-558
45. Ylikoski, M. (2003) Height of girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J* 12, 288-291
46. Docquier, P.L., *et al.* (2004) Orthopaedic concerns in children with growth hormone therapy. *Acta Orthop Belg* 70, 299-305
47. Dymling, J.F., and Willner, S. (1978) Progression of a structural scoliosis during treatment with growth hormone. A case report. *Acta Orthop Scand* 49, 264-268
48. Vidil, A., *et al.* (2001) Evolution of scoliosis in six children treated with growth hormone. *J Pediatr Orthop* 10, 197-200
49. Nilsson, O., *et al.* (2005) Endocrine regulation of the growth plate. *Hormone Res* 64, 157-165
50. Cheng, J.C., *et al.* (2000) Generalized low areal and volumetric bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Miner Res* 15, 1587-1595
51. Whedon, M., and Damianos, F.L. (1993) Nursing care issues in autologous bone marrow transplantation. *Oncology* 7, 78-88
52. Lanyon, L.E. (1996) Using functional loading to influence bone mass and architecture: objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptive process in bone. *Bone* 18, 37S-43S
53. Willy, C., *et al.* (2008) Richard von Volkmann: surgeon and Renaissance man. *Clin Orthop Relat Res* 466, 500-506
54. Zaman, G., *et al.* (2006) Osteocytes use estrogen receptor alpha to respond to strain but their ERalpha content is regulated by estrogen. *J Bone Miner Res* 21, 1297-1306
55. Damien, E., *et al.* (1998) The estrogen receptor's involvement in osteoblasts' adaptive response to mechanical strain. *J Bone Miner Res* 13, 1275-1282

56. Armstrong, V.J., *et al.* (2007) Wnt/beta-catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 282, 20715-20727
57. Boyden, L.M., *et al.* (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *New Engl J Med* 346, 1513-1521
58. Gong, Y., *et al.* (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 107, 513-523
59. Machida, M., *et al.* (2001) Pathologic mechanism of experimental scoliosis in pinealectomized chickens. *Spine* 26, E385-391
60. Azeddine, B., *et al.* (2007) Molecular determinants of melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res* 462, 45-52
61. Soares, J.M., Jr., *et al.* (2003) Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 694-702
62. Buhimschi, I.A., *et al.* (2001) Pregnancy and estradiol decrease GTPase activity in the guinea pig uterine artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281, H2168-2175
63. Cos, S., *et al.* (1998) Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res* 58, 4383-4390
64. Cos, S., and Sanchez-Barcelo, E.J. (2000) Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol Histopathol* 15, 637-647
65. Ram, P.T., *et al.* (2000) Differential responsiveness of MCF-7 human breast cancer cell line stocks to the pineal hormone, melatonin. *J Pineal Res* 28, 210-218
66. Wilson, S.T., *et al.* (1992) Melatonin augments the sensitivity of MCF-7 human breast cancer cells to tamoxifen in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 669-670
67. Watson, C.S., *et al.* (2008) Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. *FASEB J* 22, 3328-3336
68. Godson, C., and Reppert, S.M. (1997) The Mela melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138, 397-404
69. del Rio, B., *et al.* (2004) Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J Biol Chem* 279, 38294-38302
70. Moreau, A., *et al.* (2004) Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 29, 1772-1781
71. Lee, W.T., *et al.* (2005) Association of osteopenia with curve severity in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 919 girls. *Osteoporos Int* 16, 1924-1932
72. Lee, W.T., *et al.* (2005) Generalized low bone mass of girls with adolescent idiopathic scoliosis is related to inadequate calcium intake and weight bearing physical activity in peripubertal period. *Osteoporos Int* 16, 1024-1035
73. Cos, P., *et al.* (2003) Phytoestrogens: recent developments. *Planta medica* 69, 589-599
74. Rickard, D.J., *et al.* (2003) Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *J Cell Biochem* 89, 633-646
75. Wang, H., *et al.* (2005) Variation in commercial rodent diets induces disparate molecular and physiological changes in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9960-9965
76. De Wilde, A., *et al.* (2004) A low dose of daidzein acts as an ERbeta-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. *J Cell Physiol* 200, 253-262
77. Papaioannou, S., *et al.* (1999) G-protein signalling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1449, 284-292