

Université de Montréal

**L'effet des différents facteurs de croissance sur la  
viabilité et la prolifération des ostéoblastes scoliotiques**

Par

Alin Bogdan Circo

Centre de recherche, CHU Sainte-Justine

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M.Sc)

Sciences Biomédicales

Option Recherche Clinique Biomédicale

Mars 2009

© Alin Bogdan Circo, 2009

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'effet des différents facteurs de croissance sur la viabilité et la prolifération des  
ostéoblastes scoliotiques.

Présenté par :  
Alin Bogdan Circo

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Alain Moreau, président-rapporteur  
Dr Charles Hilaire Rivard, directeur de recherche  
Dr Christine Coillard, co-directeur  
Dr Reggie Hamdy, membre du jury

## Résumé

La Scoliose Idiopathique de l'Adolescent (SIA) est une condition débilitante qui peut avoir comme résultat une douleur importante, une altération du fonctionnement quotidien et une détérioration de la qualité de vie. Pour les patients qui ne répondent pas au traitement conservateur, la fusion vertébrale, en utilisant des greffes osseuses, est devenue un traitement de choix pour stabiliser la colonne. Des connaissances plus pointues à propos des facteurs impliqués dans l'ostéogénèse et la formation de l'os peuvent raccourcir le processus de guérison et permettre aux patients de réintégrer leurs activités dans un laps de temps plus court. Les plaquettes peuvent jouer un rôle important dans la première étape de la guérison des fractures car elles sont une source autologue de plusieurs facteurs de croissance qui soutiennent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes *in vivo* et *in vitro*. Au cours des dernières années, plusieurs tentatives ont été réalisées afin de trouver des traitements additionnels pour : 1) Raccourcir le temps de guérison des fractures relativement long ; 2) Obtenir une plus courte période de convalescence pour les patients qui ont besoin de prothèses ; 3) Corriger plus facilement plusieurs maladies congénitales; 4) Améliorer le processus de fusion vertébrale et 5) Développer de nouvelles approches thérapeutiques, notamment au niveau des processus régularisant le remodelage osseux et la régénération des tissus osseux.

Dans le cadre de la présente étude, j'ai étudié la contribution possible du facteur de croissance de l'insuline (IGF) et du facteur vasculaire endothélial de croissance (VEGF) sur

la maturation de l'ostéoblaste scoliotique dans des cultures cellulaires *in vitro* et j'ai comparé les résultats avec celles obtenues dans les mêmes conditions mais en stimulant les ostéoblastes avec de la mélatonine. Cette étude préliminaire a été réalisée sur des échantillons d'os récoltés de quatre patients atteints par la Scoliose Idiopathique de l'Adolescent (SIA), ainsi que sur des échantillons d'os issus de quatre sujets témoins (cas traumatiques). Les résultats montrent que l'IGFs et le VEGFs possèdent une action d'inhibition sur la prolifération d'ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques, et que cette action est proportionnelle à la concentration de ces facteurs. Les ostéoblastes scoliotiques tendent à avoir une prolifération cellulaire plus rapide et plus élevée que les témoins non scoliotiques. De façon générale les ostéoblastes provenant de patients scoliotiques ont une ostéogénèse *in vitro* plus accélérée que le sujet non scoliotique. De plus, il semble que la mélatonine joue un rôle physiologique dans la différenciation de l'ostéoblaste scoliotique et elle semble aider à avoir une différenciation plus précoce que chez les non traités. Les ostéoblastes scoliotiques expriment un défaut d'expression de l'IGF 1 et d'IGF 1R en présence de la mélatonine.

En conclusion, le VEGF A et l'IGF 1 peuvent également promouvoir la différenciation et la prolifération des ostéoblastes humains scoliotiques en culture primaire.

**Mots-clés** : Scoliose idiopathique de l'adolescent, facteurs de croissance, ostéoblaste, IGF, VEGF, mélatonine

## Abstract

The Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS) is a debilitating condition and as a result often produces significant pain, impaired daily functioning and a deterioration of the quality of life. For patients who do not respond to conservative treatment, spinal fusion using bone grafts has become a treatment of choice to stabilize the spine.

The more accurate knowledge of the factors involved in osteogenesis and the bone formation can shorten the healing process and reintegrate patients into their daily activities in a shorter period of time. Platelets can play an important role in the first stage of the healing of fractures and they are a source of several autologous growth factors that support the proliferation and differentiation of osteoblasts *in vivo* and *in vitro*.

A wide variety of techniques and approaches have been investigated for performing spinal fusion, yet surgeons continue to investigate alternative methods with the goal of improving surgical outcome and minimizing morbidity. We can use these methods to: 1.Reduce the relatively long time needed for healing fractures 2. Patients with prosthesis could benefit of a shorter convalescent time 3. Several congenital diseases could be easier to correct and 4. We could stimulate the vertebral fusion 5. Develop new therapeutic techniques, including that of the processes regulating bone remodelling and regeneration of bone tissue.

In the present study, we tried to find whether the insulin growth factor (IGF) and the vascular endothelial growth factor (VEGF) have an influence on the scoliotic osteoblasts *in vitro* cell cultures and we compared the results with those obtained in the same condition but by stimulating osteoblasts with melatonin. This preliminary study was performed on

osteoblasts cultured from four patients affected by Adolescent Idiopathic Scoliosis (AIS) and four controls. In all cases of AIS, bone specimens were obtained from the vertebral body or spinous process (in accordance with the surgical procedure performed). Our results show that IGFs as well as VEGF have an inhibitive effect on the proliferation of scoliotic and non-scoliotic cells and the effect is proportional with the growth factor concentration. In general osteoblasts cultured from scoliotic patients have an *in vitro* osteogenesis quicker than the subject without scoliosis. Moreover, it appears that melatonin plays a physiological role in the differentiation of scoliotic osteoblasts and it appears to help differentiate earlier than in the untreated group. We found that the expression of IGF 1 and IGF 1R in scoliotic osteoblasts was impaired in the presence of melatonin.

In conclusion, VEGF A and IGF both can influence the cell differentiation and proliferation of human scoliotic osteoblasts in primary cell culture.

**Keywords:** Adolescent idiopathic scoliosis, growth factors, osteoblasts, IGF, VEGF, melatonin

## Table des matières

Chapitre 1.....	18
1. La scoliose idiopathique chez l'adolescent.....	19
1.1 Définition et classification de la scoliose idiopathique.....	19
1.2 Étiologie.....	23
1.3 Histoire naturelle de la scoliose idiopathique de l'adolescent.....	26
1.4 Prévalence.....	32
1.5 Pronostique.....	33
1.6 Le traitement de la scoliose idiopathique de l'adolescent.....	37
1.6.1 Le traitement non chirurgical.....	40
1.6.2 Le traitement chirurgical de la scoliose idiopathique de l'adolescent.....	44
Chapitre 2.....	52
2. L'os.....	53
2.1. Structure de l'os.....	55
2.1.1. Définition.....	55
2.1.2. Structure osseuse.....	58
2.1.3. Formation osseuse.....	64
2.1.5. Croissance osseuse.....	66
2.1.6. La minéralisation de l'os.....	68
2.2. Fracture et réparation de l'os.....	69
2.2.1 La régulation de la masse osseuse.....	70
2.2.2. Ostéogénèse.....	72
Chapitre 3 3. Facteurs de croissance.....	75
3. Facteurs de croissance.....	76
3.1. Classification.....	77
3.2. Plasma riche en plaquettes (PRP).....	95
3.3 Insulin growth factor (IGF).....	99

3.4. Vascular endothelial growth factor (VEGF).....	104
3.5. L'influence de la mélatonine sur l'ostéoblaste scoliotique.....	110
Chapitre 4. 4. Objectifs.....	113
4. Objectifs.....	114
Chapitre 5.....	116
5. Matériel et méthodes.....	117
5.1. Cultures cellulaires.....	117
5.2. Traitement des cellules.....	120
5.3. RT-PCR.....	121
5.3.1. Extraction de l'ARN.....	121
5.3.2. Dosage de l'ARN et évaluation de sa pureté.....	122
5.3.3. Réaction de reverse transcription (RT).....	122
5.3.4. Réaction en chaîne de la polymérase (PCR).....	123
5.4. Mesure de la prolifération cellulaire.....	124
Chapitre 6.....	128
6. Résultats.....	129
6.1. Culture cellulaire.....	129
6.2. Vérification de l'influence de l'IGF et du VEGF sur la prolifération cellulaire <i>in vitro</i> des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.....	135
L'influence de la VEGF A sur la prolifération cellulaire <i>in vitro</i> des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.....	139
L'influence de l'IGF 1 sur la prolifération cellulaire <i>in vitro</i> des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.....	143
6.3. Analyse de l'expression de l'IGF 1, du VEGF A et de leurs récepteurs et l'influence sur la différenciation cellulaire des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.....	148
L'expression génique de VEGF A et de VEGF R2, R3 chez les ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.....	150



L'expression génique d'IGF 1 et d'IGF 1R chez les ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.....	157
Chapitre 7. 7. Discussion .....	162
7. Discussion .....	163
Conclusion .....	180

## Liste des tableaux

Tableau no.1 Causes secondaires de la scoliose .....	25
Tableau no. 2. Le risque de la progression de la courbe scoliotique .....	36
Tableau no. 3 : Facteurs de croissance avec leurs activités.....	78
Tableau 4 : Les interférons et leurs activités.....	79
Tableau no. 5 : Les Interleukines et leurs activités.....	80
Tableau no 6 : Séquence des primeurs pour la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), les bandes attendues et l'amorce utilisée.....	123

## Liste des figures

Figure 1 : Classification des courbes.....	21
Figure no 2: Classification des courbes.....	22
Figure 3 : La technique pour mesurer l'angle de Cobb .....	27
Figure 4. Le signe de Risser .....	35
Figure 5 : Plusieurs types de corsets rigides .....	42
Figure 6 : Patient montrant le mouvement correcteur et le corset SpineCor .....	43
Figure 7 : La fusion spinale .....	45
Figure 8 : La fusion vertébrale postérieure .....	47
Figure 9 : La fusion vertébrale antérieure .....	48
Figure 10 : La structure de l'os .....	56
Figure 11 : Les cellules de la moelle dans le canal médullaire des os longs. ....	60
Figure 12 : La croissance de l'os .....	67
Figure 13 : Modèles des actions systémiques et locales de IGFBPs dans l'os. ....	100
Figure 14 : Traitement des cellules.....	126
Figure 15: Culture cellulaire primaire des ostéoblastes non scoliotiques colorés avec Von Kossa .....	132
Figure 16 : Culture cellulaire primaire des ostéoblastes scoliotiques colorés avec Von Kossa .....	133

Figure 17 : La prolifération d'ostéoblastes normaux (a) et dérivées de patients scoliotiques (b) pour chaque échantillon traité et l'évolution par jour.....	136
Figure 18 : La prolifération d'ostéoblastes provenant de sujets sains (a) et scoliotiques (b) non traités.....	138
Figure 19: La prolifération d'ostéoblastes non scoliotiques (a) et scoliotiques (b) traités avec VEGF A.....	140
Figure 20: L'influence de la concentration de VEGF A sur la prolifération d'ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.....	142
Figure 21: La prolifération d'ostéoblastes non scoliotiques (a) et scoliotiques (b) traités avec d'IGF 1.....	145
Figure 22: L'influence de la concentration d'IGF 1 sur la prolifération d'ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.....	147
Figure 23 : L'expression génique de VEGF A.....	151
Figure 24 : L'expression génique de VEGF R2.....	153
Figure 25 : L'expression génique de VEGF R3.....	155
Figure 26 : L'expression génique de IGF 1.....	157
Figure 27 : L'expression génique de IGF 1R .....	159
Figure 28 : L'expression génique de VEGF A pendant l'ostéogénèse .....	167
Figure 29 : Model potentiel explicatif représentant l'action de VEGF A et ses récepteurs VEGF R2 et VEGF R3, sur la différenciation et la prolifération des ostéoblastes provenant des sujets sains et scoliotiques.....	170

Figure 30 : Model potentiel représentant l'action d'IGF 1 et son récepteur IGF 1R sur la différenciation et la prolifération des ostéoblastes provenant des sujets sains et scoliotiques.....	175
---	-----

*Je dédie ce mémoire à mon épouse, Romana,  
et mon fils, David.*

## **Remerciements**

- Au Docteur Charles Hilaire Rivard, directeur de recherche, et au Docteur Christine Coillard, co-directrice de recherche, pour leur patience, leur disponibilité et leurs conseils scientifiques.
- Au Docteur Alain Moreau et au Docteur Reggie Hamdy pour avoir accepté d'être membres du jury de mon mémoire.
- Au Docteur Alain Moreau et à ses collaborateurs, Isabelle Turgeon et DaShen Wang, pour leurs supports techniques et logistiques.
- À Souad Rhalmi pour ses connaissances cliniques, techniques et statistiques.
- À madame Pauline Barrette, une adjointe administrative disponible et aidante.
- Aux sujets, dont la participation fut très appréciée.

## Introduction

Des connaissances plus exactes des facteurs impliqués dans l'ostéogénèse et la formation de l'os peuvent raccourcir le processus de guérison et permettre aux patients de réintégrer leurs activités dans un temps plus court. Les plaquettes peuvent jouer un rôle important dans la première étape de la guérison des fractures. Elles sont une source autologue de plusieurs facteurs de croissance qui soutiennent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes *in vivo* et *in vitro*. Au cours des dernières années, nous pouvons remarquer que des efforts ont été faits afin de trouver des traitements adjuvants pour :

1. Raccourcir le temps relativement long de guérison des fractures ;
2. Diminuer le temps de convalescence pour les patients nécessitant des prothèses;
3. Faciliter la correction de plusieurs maladies congénitales.
4. Faciliter la fusion vertébrale
5. Développer de nouvelles approches thérapeutiques, notamment au niveau des processus régularisant le remodelage osseux et la régénération des tissus osseux.

Pour ce faire, il est important de connaître le mécanisme de régulation du remodelage osseux, afin de mieux comprendre les causes de cette patho-physiologie osseuse et ainsi améliorer les traitements.

Les deux acteurs dans le remodelage osseux sont les ostéoblastes responsables de la synthèse osseuse et les ostéoclastes responsables de la résorption osseuse. Le remodelage



osseux résulte de l'alternance entre la dégradation osseuse faite par les ostéoclastes et la formation osseuse faite par les ostéoblastes.

Le but de ce projet est de mieux comprendre le phénomène et d'optimiser le processus de guérison tissulaire à l'aide de différents facteurs de croissance, soit l'IGF et le VEGF, en vue d'améliorer les résultats de nombreuses procédures chirurgicales liées à la SIA. Les objectifs spécifiques de cette étude sont:

- D'obtenir des ostéoblastes provenant de patients scoliotiques
- De vérifier l'influence de l'IGF et du VEGF auprès des cellules et d'évaluer leur mode d'action sur la prolifération et la différenciation cellulaire *in vitro* des ostéoblastes scoliotiques et normaux afin d'obtenir une meilleure compréhension du rôle physiologique de ces facteurs sur l'ostéogénèse.
- De vérifier l'influence de l'IGF et du VEGF auprès de ces cellules et de comparer les résultats avec celles traitées en présence de la mélatonine.

## **Chapitre 1.**

# **1. La scoliose idiopathique chez l'adolescent**

## **1.1 Définition et classification de la scoliose idiopathique**

La scoliose est une déformation structurale évolutive de la colonne dans les trois plans de l'espace, soit frontale, horizontale et sagittale. Une vulgarisation de la définition dirait que la scoliose est une déviation latérale de la colonne vertébrale, alors qu'en réalité, elle consiste en une déformation complexe tridimensionnelle (Asher and Burton 1999). En effet, la SRS (The Scoliosis Research Society) a défini la scoliose comme étant une déviation latérale de la colonne vertébrale selon un angle dépassant les dix (10) degrés, en utilisant la méthode de Cobb sur la radiographie en position debout (Dobbs, Buckwalter et al. 1999). La méthode de Cobb mesure la magnitude de la courbe scoliotique à l'aide de l'angle de Cobb. Ce dernier est formé d'une ligne qui représente la surface proximale de la vertèbre supérieure de la courbe scoliotique, et d'une autre qui indique la surface inférieure de la vertèbre inférieure de la courbe (Cobb 1948) (Voir figure 1). Ainsi, la scoliose idiopathique est une courbe structurale sans cause sous-jacente apparente.

La scoliose idiopathique est classifiée selon l'âge du patient au moment où la déformation a été diagnostiquée pour la première fois. La scoliose infantile comprend moins de 1 % des cas et peut s'installer jusqu'à l'âge de 3 ans. On rencontre la scoliose juvénile chez 12 à 21 % des patients diagnostiqués avec une scoliose idiopathique. La scoliose idiopathique de l'adolescent se manifeste généralement entre dix (10) ans et dix-

huit (18) ans. Cette classification, basée sur l'âge, permet donc une généralisation du risque de la progression et de la réponse au traitement médical ou chirurgical (Mehta 1992).

Les courbes scoliotiques sont classifiées en concordance avec l'apex de la courbe. Les côtés droit et gauche se réfèrent à la convexité de la courbe (Voir figure 1 et 2). La classification des termes suivants fut déterminée par le comité de la Société de Recherche en Scoliose :

- **Cervicale:** lorsque l'apex est situé entre les vertèbres C1 et C6
- **Cervicothoracique:** lorsque l'apex est situé entre C7 et T1
- **Thoracique:** lorsque l'apex est situé entre T2 et T11
- **Thoracolombaire:** lorsque l'apex est situé entre T12 et L1
- **Lombaire:** lorsque l'apex est situé entre L2 et L4
- **Lombo-sacrée :** lorsque l'apex est situé entre L5 et S1.

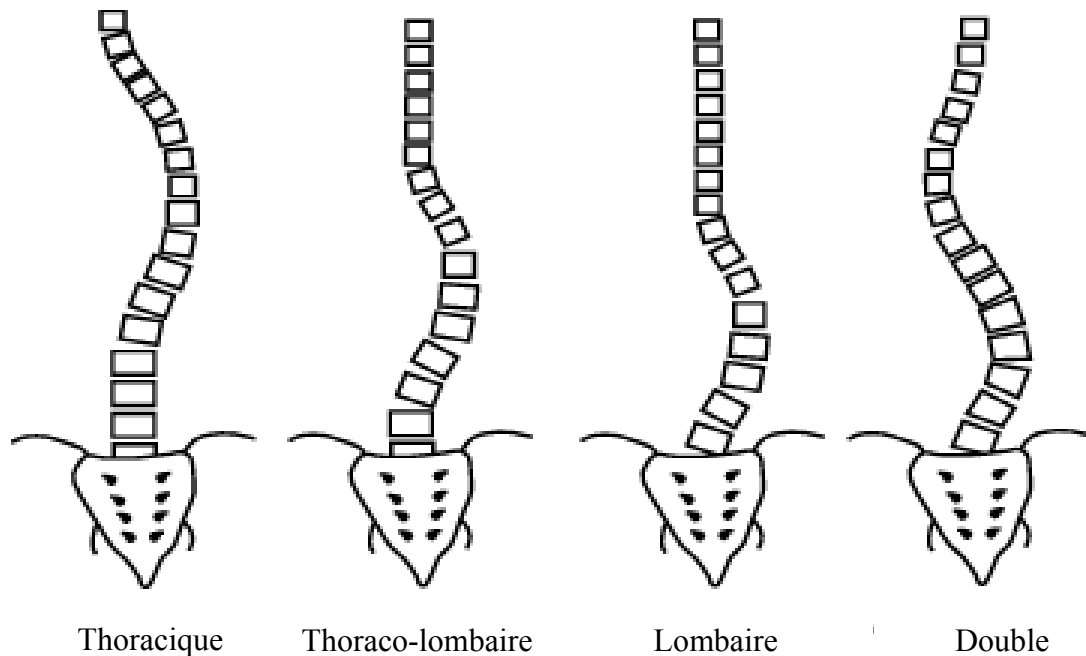
Les courbes doubles structurales :

- Courbes doubles thoraciques
- Courbes combinées thoracique et lombaire
- Courbes combinées thoracique et thoracolombaire (Ponseti and Friedman 1950)

Une autre classification vise les patrons des courbes combinées thoracique et lombaire :

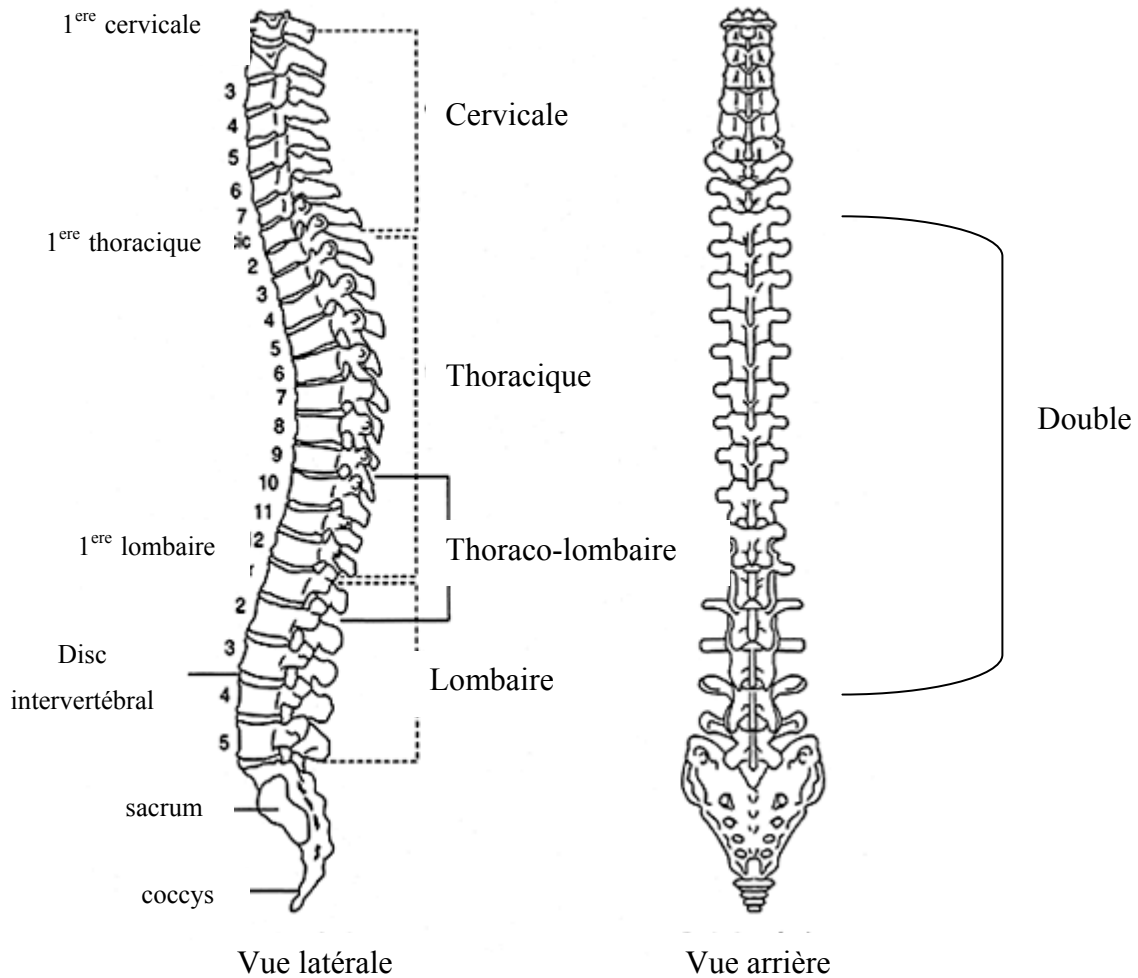
- Type I: Courbe en forme de S qui survient lorsque les courbes thoraciques et lombaires traversent la ligne médiane (courbe lombaire > courbe thoracique = index de flexibilité négatif).

- Type II : Courbe en forme de S qui survient lorsque la courbe thoracique et la courbe lombaire traversent la ligne médiane (Courbe thoracique = courbe lombaire = index de flexibilité nul)
- Type III : Courbe thoracique dont la courbe lombaire ne traverse pas la ligne médiane.
- Type IV : Courbe thoracique longue dont L5 est centrée au-dessus du sacrum, mais L4 se trouve dans une longue courbe thoracique.
- Type V : Courbe thoracique double avec T1 liée à la convexité de la courbe supérieure (King, Moe et al. 1983).



**Figure 1 : Classification des courbes**

(Adapté de <http://www.rad.washington.edu/academics/academic-sections>)



**Figure 2: Classification des courbes** (adapté de <http://www.rad.washington.edu/academics/academic-sections>)

La scoliose idiopathique de l'adolescent est une déviation structurale latérale jumelée à une rotation de la colonne vertébrale qui devient évidente durant la période de l'adolescence chez un enfant autrement sain (Kane and Moe 1970). Cette forme de

scoliose, située au-dessus des 20 degrés, affecte plutôt les filles que les garçons. En effet, la prévalence est dix (10) fois plus grande chez les filles que chez les garçons pour les courbes de plus de trente (30) degrés.

## 1.2 Étiologie

Malgré des efforts de recherche soutenus et dirigés vers l'étiologie de la scoliose idiopathique chez l'adolescent, la cause demeure encore obscure. Plusieurs hypothèses ont été proposées mais aucune n'est supportée par des évidences convaincantes et significatives. Pour ce qui est des observations, on remarque des anomalies du tissu conjonctif, des patrons de croissance différents, des aberrations neuromusculaires, des asymétries du système nerveux central et des variations hormonales chez certaines populations de patients. Malgré ces constatations, ces études n'ont pas réussi à déterminer l'agent initiateur de la scoliose. Il est néanmoins clair que la SIA possède une composante héréditaire puisque plusieurs cas peuvent survenir dans une même famille. Une hypothèse liée aux causes hormonales mentionne la progression rapide de la courbe scoliotique pendant les périodes de croissance, probablement à cause des changements hormonaux associés à la puberté. L'étiologie de l' AIS est multifactorielle : Facteurs génétiques (Miller, Justice et al.) et non-génétiques (environnementaux), tel que la croissance squelettique disproportionnelle (Cheung CSK); Osteopénia, (Cheng and Guo) un déficit de mélatonine

(Machida, Dubousset et al.) ou une dysfonction des voies de signalisation de la mélatonine au niveau des tissus musculo-squelettiques (Moreau, Wang et al.). Tous ont aussi été associés à la SIA. Parmi différentes théories, la cause de la SIA et la progression de la courbe sont possiblement le résultat d'un modèle de croissance asymétrique des vertèbres. (Bunnell) (Coillard and Rivard 1996).

Plusieurs rapports ont déterminé un profil différent d'anthropométrie parmi des patients avec l'AIS, contrairement aux sujets témoins assortis selon le genre et l'âge. Aussi, l'ostéopénie généralisée est plus répandue parmi les patients avec l'AIS. La densité minérale osseuse (BMD) du fémur proximal et la BMD du tibia distal étaient inférieures chez les patients avec l'AIS à l'heure du diagnostic, comparativement aux sujets témoins d'âge comparable. Plus de 30% des patients avec l'AIS étaient ostéopéniques, ce qui est défini par une BMD d'un écart type en-dessous du moyen de contrôle (Cheng, Qin et al.).

Ces observations soutiennent l'hypothèse qui affirme que des variantes génétiques de l'axe GH-IGF1 sont associées à la prédisposition et/ou à la progression de l'AIS. Cette hypothèse est renforcée par les résultats précédents d'une association entre les polymorphismes dans les gènes du récepteur de l'hormone de croissance (GHR) et la taille du corps, aussi bien qu'une association entre l'axe IGF1 et la BMD. (Niu and Rosen)

Quelques études ont montré une activité musculaire accrue autour des courbes scoliothiques. Des différences dans la longueur des membres inférieurs ont aussi été associées à la SIA, mais ce type de changement peut causer qu'une scoliose compensatrice.



Une hypothèse mentionne que la scoliose idiopathique pourrait être liée aux facteurs qui affectent l'alignement normal du corps. Par exemple, si un enfant a des problèmes avec sa posture, son équilibre et la symétrie de son corps, cela pourrait affecter la façon dont sa colonne est positionnée. Si les problèmes sont chroniques, ils peuvent aller jusqu'à altérer le développement de la colonne vertébrale et des muscles (Barrack, Whitecloud et al. 1984) (Bushell, Ghosh et al. 1979) (Dickson 1988) (Dickson 1984) (Woods, Haller et al. 1995) (Sahlstrand and Petruson 1979). Le tableau 1 ci-dessous énumère les causes secondaires qui influencent la scoliose et qui peuvent être identifiées par la radiographie et l'examen clinique.

**Tableau 1 : Causes secondaires de la scoliose**

Troubles hérités du tissu conjonctif	Troubles neurologiques	Troubles musculo-squelettiques
Syndrome d'Ehlers-Danlos Syndrome de Marfan Homocystinurie	Syringomyélie Tumeur spinale Neurofibromatose Dystrophie musculaire Paralyse cérébrale Poliomyélite Ataxie de Friedrich Syndrome de Riley-Day Maladie Werdnig-Hoffmann	Différence dans la longueur des membres Dysplasie développementale de la hanche Ostéogénèse imparfaite Syndrome de Klippel-Feil

### **1.3 Histoire naturelle de la scoliose idiopathique de l'adolescent**

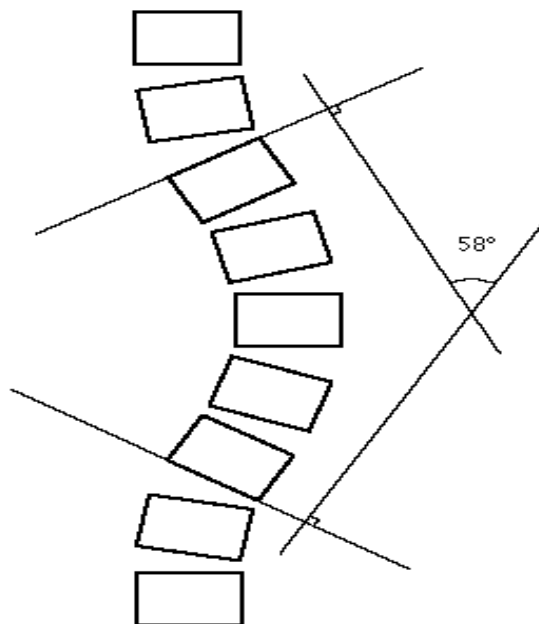
On remarque une lacune au niveau de la présentation de l'histoire naturelle de la SIA à travers les ouvrages littéraires, car les études rétrospectives ont perdu plusieurs patients, soit elles incluent un échantillon trop petit de patients. Plusieurs études ont été réalisées avec des patients présentant des scolioses d'étiologie différente par leur déformation de la colonne et des patients montrant les signes d'une scoliose infantile et juvénile. Les effets de la déformation de la colonne vertébrale sont très importants sur la croissance de cette dernière, en plus d'avoir un impact notable sur les structures adjacentes et les organes internes (p.ex. côtes et parenchyme pulmonaire). Les patrons de la courbe, le sexe, la magnitude, ainsi que plusieurs autres facteurs, influencent l'histoire naturelle, information qui n'est pas toujours disponible dans la littérature. D'autres variables incluent la validité et la variabilité des questionnaires utilisés pour mesurer les paramètres dans l'estimation de l'évolution de la scoliose de l'adolescent.

Par définition, la scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) est une courbe structurale latérale de la colonne vertébrale qui survient près du début de la puberté et dont la cause est inconnue (Kane 1977).

Le diagnostic de la SIA est mis de l'avant en présence d'asymétries en position debout. Celles-ci témoignent d'une variance dans la hauteur des épaules au niveau de

l'articulation acromio-claviculaire et des préminences scapulaires et thoraciques, ce qui résulte en une décompensation de la ligne verticale de C7 (Vercauteren, 1982; Willner, 1984, Willner 1982).

Les asymétries rotationnelles sont mieux décrites par le test d'Adams (Adams 1865). Malheureusement, tous les tests de « screening » pour le diagnostic de la scoliose (p.ex. la topographie Moirée, le scanning et le « forward bending » test) sont sensibles pour la détection des asymétries, mais sont pas spécifiques pour la scoliose ou pour la détection de la magnitude de la courbe (Armstrong, Livermore et al. 1982). Le diagnostic peut seulement être confirmé si l'angle de la courbe, mesuré à l'aide de la méthode de Cobb sur une radiographie debout de la colonne vertébrale, est de plus de dix (10) degrés, (Figure 3).



**Figure 3 : La technique pour mesurer l'angle de Cobb**

Les patrons de courbure devraient être considérés à chaque fois que l'on parle de l'histoire naturelle. Les quatre patrons majeurs de la SIA sont le thoracique, le lombaire, le thoracolombaire et le double majeur. Les autres, moins communs, sont les patrons cervicothoracique, double thoracique et thoracique thoracolombaire (Ponseti and Friedman 1950).

Les patients souffrant d'une scoliose sont souvent désinformés à propos de leurs conditions et des conséquences de cette maladie sur leur vie, étant donné la faible quantité d'ouvrages au sujet de l'histoire naturelle de la scoliose idiopathique de l'adolescent (Weinstein 2001).

L'inquiétude majeure est liée à la progression de la courbe chez le patient ayant un squelette immature. Pour celui-ci, les décisions à prendre par rapport aux traitements chirurgicaux ou non-chirurgicaux sont basées sur la cause initiale et la probabilité de progression. Les médecins conviennent la plupart du temps que les courbes en progression peuvent causer de la douleur, une diminution de la fonction pulmonaire et des problèmes psychosociaux. Chez le patient immature, le risque de la progression est premièrement lié aux facteurs spécifiques de la courbe et au potentiel de croissance. Ce dernier est essentiel pour le pronostic concernant la progression de la courbe (Trevor 1980).

La plupart des informations sur la progression de la courbe sont obtenues dans les études réalisées avec des patients de sexe féminin, principalement chez les femmes

ayant une courbe thoracique. Les résultats obtenus montrent six (6) facteurs qui contribuent à la progression de la courbe :

1. Les patrons à doubles courbes tendent à progresser plus rapidement que les patrons à courbe simple.
2. Le risque de progression augmente en fonction de la magnitude de la courbe au moment du diagnostic (Coillard, Vachon et al.) (Bunnell 1986) (Bunnell 1988) (Duval-Beaupre, 1985) (Lonstein and Carlson 1984) (Scott and Piggott 1981).

Les facteurs de croissance pour la progression de la courbe sont :

1. Un patient jeune au moment du diagnostic augmente le risque de progression de la courbe scoliotique.
2. Il y a un risque accru de progression de la courbe chez les filles avant le début de la ménarche.
3. Plus le signe de Risser est près de 0 au moment du dépistage, plus le risque de progression est grand.
4. Les garçons montrant des courbes comparables aux filles en bas de vingt (20) degrés ont un risque de progression dix (10) fois plus bas que celles-ci (Weinstein and Ponseti 1983; Weinstein 1986 1987).

L'incidence de la douleur lombaire chez la population générale, située entre 60% et 80%, est variable et dépendante des questionnaires utilisés (Frymoyer, Newberg et al.

1984). (Bjure and Nachemson 1973) (Jackson, Simmons et al. 1983) (Nagi and Stockwell 1973) (Weinstein, Zavala et al. 1981) (Poitras, 1996).

L'incidence de la douleur lombaire chez les patients scoliotiques est comparable à l'incidence de la douleur lombaire chez la population générale (Weinstein, 1988) (Weinstein, Zavala et al. 1981) (Poitras 1997-98). Dans une étude effectuée sur une période de 40 ans, à l'aide d'un échantillon de 161 patients ayant une SIA, 80 % des participants ont mentionné la présence d'une douleur lombaire (Weinstein, 1988) (Weinstein, Zavala et al.) (LeBlanc, Labelle et al.). Dans le groupe témoin de 100 sujets, 86% ont rapporté des douleurs lombaires. Les patients avec une courbe thoracolombaire ou lombaire ont présenté une manifestation de douleur plus importante que les patients associés à d'autres patrons de courbe. Une autre étude a été réalisée avec les mêmes patients sur une période de 50 ans. Ils ont répondu au même questionnaire mais ils ont cette fois-ci été soumis à des instruments validés pour la quantification de la douleur et à un second questionnaire plus détaillé. L'incidence de la douleur chronique a été de 61% chez les patients scoliotiques et de 35% chez les sujets témoins. De plus, la facilité des patients scoliotiques à effectuer des activités quotidiennes, comme travailler a été comparable aux sujets témoins (Weinstein, 1998).

Les études sur la fonction pulmonaire indiquent que les patients avec une courbe thoracique n'ayant reçu aucun traitement démontrent une corrélation entre la diminution de la fonction pulmonaire et la sévérité de la courbe (Bergofsky, Turino et al. 1959; Lindh and Bjure 1975; Weinstein, Zavala et al. 1981; Aaro and Ohlund 1984; Ogilvie and

Schendel 1988). Cette diminution au niveau pulmonaire correspond à une maladie restrictive (Weinstein, Zavala et al. 1981).

Le taux de mortalité des patients avec scoliose idiopathique de l'adolescent est comparable à celui de la population générale (Weinstein, 1981; Weinstein, 1998). Quelques études plus anciennes ont toutefois mentionné une mortalité exagérée chez les patients scoliotiques (Nachemson 1968; Nilsonne and Lundgren 1968).

Chez les sujets scoliotiques, seulement ceux avec un angle thoracique qui dépasse les cent (100) degrés présentent un risque plus élevé de décès par *cor pulmonare* ou par une insuffisance ventriculaire droite (Weinstein, Zavala et al. 1981).

Plusieurs études ont mis en évidence les effets psychosociaux qui résultent de la maladie. Ceux-ci sont souvent mieux tolérés chez les patients plus âgés que chez les adolescents, alors que certains adultes avec une déformation qualifiée de modérée à sévère ont des troubles psychologiques plus importants en rapport avec leur situation. De nombreux patients ayant une courbe minimale ont plusieurs limitations psychosociales (Bjerkreim, Carlsen et al. 1982; Eliason and Richman 1984). Par ailleurs, l'aspect cosmétique de la déformation scoliotique n'est pas à négliger puisque toutes les localisations et les sévérités de la courbe ont un effet psychosocial (Weinstein, Zavala et al. 1981; Bjerkreim, Carlsen et al. 1982).

Une scoliose qualifiée de légère à modérée n'a aucun effet sur la grossesse et l'accouchement. Le taux d'accouchements par césarienne n'est pas supérieur à celui de la population générale (Weinstein, Zavala et al. 1981).

En conclusion, les décisions par rapport au traitement de la SIA doivent être prises de façon individuelle pour chaque cas en prenant bien soin de considérer la probabilité de la progression de la courbe en se basant sur la magnitude de celle-ci, la maturité squelettique, la maturité sexuelle et l'âge. Cette prise de décision demande aussi une compréhension approfondie de l'histoire naturelle et du pronostic de la maladie puisque seulement 10% des patients diagnostiqués avec une scoliose de l'adolescent, chez qui on remarque une progression de la courbe, nécessitent un traitement médical (Reamy and Slakey 2001).

## **1.4 Prévalence**

La scoliose est presque toujours discutée en fonction de sa prévalence (p.ex. le nombre total de cas existants dans une certaine population exposée au risque). Les valeurs peuvent varier significativement en fonction du type de définition de la scoliose utilisée et du type de population étudiée. Dans une étude réalisée sur 16 000 patients anglais âgés de 6 à 14 ans, la prévalence de la scoliose idiopathique était de 0.5% selon un angle de Cobb qui dépassait les dix (10) degrés (Stirling, Howel et al. 1996). La prévalence fut de 1.2% chez les patients âgés de 12 à 14 ans (Stirling, Howel et al. 1996). Ces données suggèrent que les



efforts de dépistage seraient plus efficaces à l'intérieur de ce groupe d'âge. Une autre étude utilisant des angles de Cobb de six (6) degrés ou plus a mis en évidence une prévalence de la scoliose de 4.5% (Rogala, Drummond et al. 1978). D'autres études qui ont été faites selon un angle de Cobb de dix (10) degrés pour définir la scoliose ont placé la prévalence entre 1.9% et 3.0% (Albanese, 2002).

La prévalence de la scoliose idiopathique chez l'adolescent est présente chez 2% à 4% des enfants âgés entre 10 et 16 ans (Roach 1999). La proportion des filles versus celle des garçons, ayant une courbe de dix (10) degrés, est égale, mais augmente à un rapport de dix filles pour un garçon lorsqu'une courbe plus grande que trente (30) degrés est utilisée (Roach 1999). La prévalence des courbes de plus de trente (30) degrés est de 0.2 % et la prévalence des courbes de plus de quarante (40) degrés est d'approximativement 0.1% lors de la première visite pour les filles et les garçons (Miller 1999).

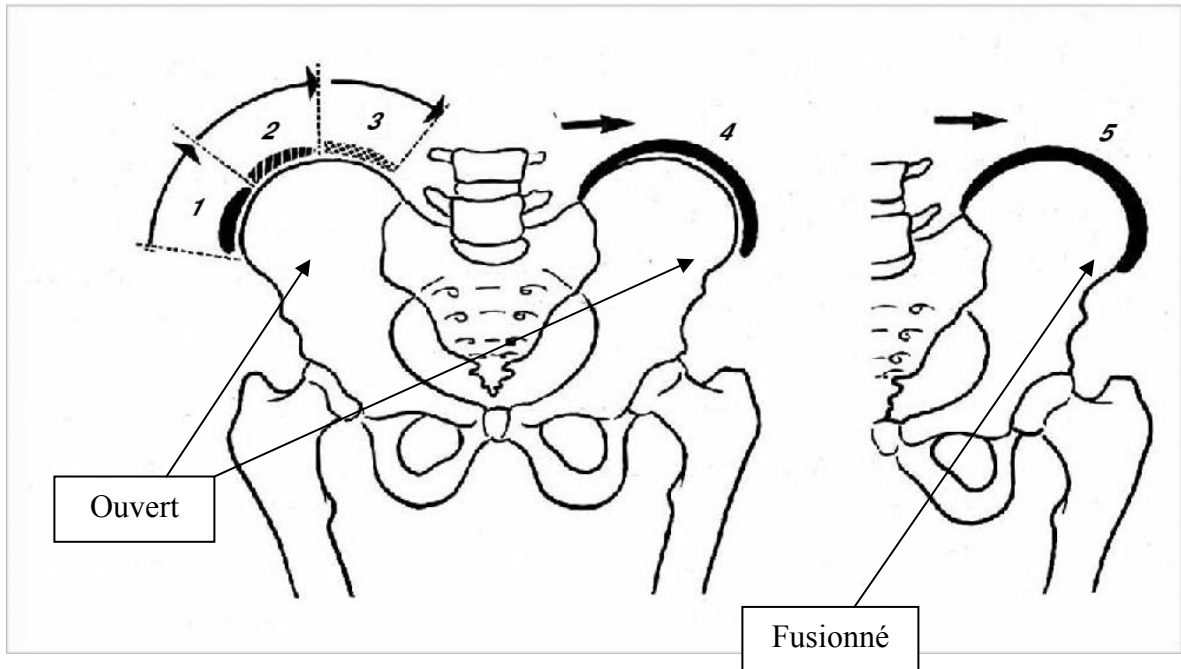
## **1.5 Pronostique**

Dès que le diagnostic de la scoliose est posé, le premier souci est de savoir s'il existe une cause sous-jacente et si la courbe va progresser. Les trois principaux déterminants de la progression sont le sexe, le potentiel de croissance future et la magnitude de la courbe au moment du diagnostic. Les filles sont plus à risque que les garçons en ce

qui concerne la progression de la courbe. Par ailleurs, si le potentiel de croissance est plus élevé et que l'angle de la courbe est important, la probabilité de la progression est augmentée (Miller 1999). L'évaluation du potentiel de croissance se fait en évaluant le stade de Tanner et le signe de Risser. Les stades de Tanner 2 et 3 surviennent juste après le pic de croissance de la puberté, ce qui correspond aussi au moment de la progression maximale de la scoliose. Il s'avère donc important d'identifier le début de la phase de croissance. Celle-ci se remarque grâce à l'apparition des caractères sexuels secondaires « Grade 2 Tanner » (Duval-Beaupere and Combes 1971; Tanner 1975).

Après le début de la ménarche, on remarque une période de ralentissement de la croissance chez les filles, pour qui il reste alors qu'environ 18 mois avant la maturité du squelette. Cette phase correspond auxiliairement à l'apparence de poils chez le garçon, fait qui signifie un ralentissement de la croissance. Cependant, chez le garçon, cette phase peut durer jusqu'à deux ans ou même plus. Le signe qui indique l'arrêt de croissance spinale est le signe Risser de 5 qui signifie l'ossification complète de l'apophyse iliaque (Risser 1958; Renshaw 1993). Les signes de Risser vont de 0 à 5 et donnent une estimation de la maturation du squelette en évaluant la progression de la fusion osseuse de l'apophyse iliaque. L'apophyse iliaque s'ossifie de façon prédictible de l'antéro-lateral vers le postero-medial tout au long de la crête iliaque. Le grade zéro signifie aucune ossification; le grade 1 correspond à une ossification allant jusqu'à 25%; le grade 2 correspond à une ossification de 26% à 50 %; le grade 3 correspond à une ossification de 51% à 75%; le grade 4

correspond à une ossification de 75% à 100%; et le grade 5 signifie la fusion osseuse de l'apophyse (Lonstein 1994) ( Figure 4).



**Figure 4. Le grade de Risser.** Le Risser 5 correspond à l'ossification complète de la crête iliaque (adapté de Pierre Mary 2004).

Le risque de la progression peut être estimé en considérant le sexe du patient, l'âge de la ménarche, le potentiel de croissance et la magnitude de la courbe scoliotique. Le risque est considéré élevé lorsque tous ces facteurs sont corroborés. Ces informations aident de plus à la prise de décisions par rapport au besoin de référer à un chirurgien orthopédiste et à évaluer la fréquence des examens nécessaires pour un patient à faible risque de progression qui a besoin de traitements conservateurs. Le risque général de la progression de la courbe scoliotique est présente dans le tableau 2.

**Tableau 2. Le risque de la progression de la courbe scoliothique**

Courbe (Degrés)	Potentiel de croissance (Grade de Risser)	Risque
10 à 19	Limité (2 à 4)	Diminué (5 à 15%)
10 à 19	Élevé (0 à 1)	Modéré (15 à 40%)
20 à 29	Limité (2 à 4)	Diminué/Modéré
20 à 29	Élevé (0 à 1)	Élevé (40 à 70 %)
>29	Limité (2 à 4)	Élevé (40 à 70 %)
>29	Élevé (0 à 1)	Très élevé (70 à 90%)

Les courbes scoliothiques de moins de trente (30) degrés à la maturité osseuse sont moins susceptibles de progresser, tandis que les courbes situées entre trente (30) et cinquante (50) degrés ont une progression moyenne de dix (10) à quinze (15) degrés pendant la durée de la vie adulte. Les courbes de plus de cinquante (50) degrés à la maturité osseuse progressent constamment selon un ratio d'un degré par année. Pour la plupart des patients, les effets importants sur la fonction pulmonaire qui peuvent mettre sa vie en danger ne surviennent que si la courbe est de cent (100) degrés ou plus (Miller 1999).

Par ailleurs, un trouble psychologique important est décelé chez les femmes qui présentent une courbe scoliothique de plus de quarante (40) degrés à l'âge adulte. L'isolation sociale, les opportunités professionnelles limitées et le taux inférieur de mariage sont des conséquences possibles.

## 1.6 Le traitement de la scoliose idiopathique de l'adolescent

Chaque décision concernant le traitement non chirurgical et chirurgical est basée sur la prémisse que le traitement va influencer l'histoire naturelle de la scoliose idiopathique de l'adolescent. Pour faciliter la prise de décision, les paramètres de la condition pré-traitement sont comparés aux résultats de courte et de longue durées du traitement. Un traitement est considéré efficace lorsque son influence est favorable sur l'évolution de la scoliose. De plus, le traitement ne doit pas avoir des conséquences adverses à long terme (Lonstein 2006).

Suite à un diagnostic de SIA, une décision doit être prise par rapport au traitement, qu'il soit chirurgical ou non-chirurgical. Les facteurs qui aident à faire un choix sont ceux précédemment mentionnés, soit l'angle de Cobb, le patron de la courbe, le niveau de la maturité squelettique de l'adolescent (Ramirez, Johnston et al. 1997), la déformation cosmétique et le profil sagittal. Chez un enfant, pendant la période de croissance, le but du traitement est d'établir la magnitude de la courbe en fonction de laquelle sera choisit le corset ou le traitement chirurgical. Il est bien connu que la réponse au corset est meilleure lorsque la courbe scoliothique est petite (Mayo, Goldberg et al.). Généralement, les courbes qui dépassent cinquante (50) degrés sont traitées chirurgicalement. Les patients avec une courbe située entre quarante (40) et cinquante (50) degrés appartiennent à une zone d'incertitude, ce qui nécessite une évaluation plus pointue afin de choisir le traitement le

plus efficace (Carr, Moe et al. 1980) (Emans, Kaelin et al. 1986) (Lonstein 1994) (Lonstein 1994).

Une décision orientée vers le corset dépend de l'histoire naturelle qui, de façon générale, indique que la chance de progression est moindre pour les courbes plus petites, spécialement chez les patients qui montrent une courbe de moins de vingt (20) degrés. La prise de décision dépend aussi de la magnitude de la courbe et du potentiel de croissance de l'enfant. Une courbe de trente (30) degrés chez un enfant de onze (11) ans qui se trouve dans sa période pré-ménarchale avec un stade Risser de 0 recevra un traitement par corset, tandis qu'un enfant de quatorze (14) ans, post-ménarche, avec la même magnitude de la courbe et un stade Risser 3, sera plutôt gardé sous observation. Des facteurs additionnels sont utilisés pour établir le potentiel de croissance de l'adolescent, comme la taille de la parenté, leur sommet de croissance et leur âge au début de la ménarche (Lonstein 2006). L'origine de la scoliose idiopathique est probablement **multifactorielle** et implique des facteurs génétiques, des troubles du métabolisme, des facteurs hormonaux, des facteurs de croissance, des facteurs neurologiques et enfin, des facteurs biomécaniques (la scoliose ayant un potentiel d'aggravation à partir d'un certain seuil angulaire de la déformation anatomique structurale). Dans plus de 80% des cas, la vraie cause de la scoliose demeure inconnue mais plusieurs hypothèses sont présentement étudiées par les chercheurs. L'hérédité et les mécanismes de contrôle de la croissance sont les sujets principaux de la recherche moderne. Malgré le fait qu'il n'y ait aucun consensus scientifique concernant la

cause précise de la progression de la scoliose idiopathique, nous en connaissons suffisamment pour améliorer les traitements non-chirurgicaux.

Des études expérimentales sur des animaux de laboratoire ont montré que la stimulation électrique peut produire des déformations scoliotiques (Axelgaard and Brown 1983). Plusieurs études qui utilisent ce genre de stimulations ont rapporté des résultats satisfaisants dans l'arrêt de la progression de la courbe, et ce dans 72% à 84% des cas (Axelgaard and Brown 1983 1984; Fisher, Rapp et al. 1987; Herbert and Bobechko 1987; Anciaux, Lenaert et al. 1991). De ces études sont nés des rapports préliminaires, toutefois effectués sans surveillance à long terme ou avec des patients qui présentaient un risque minimal de progression de la courbe (Axelgaard and Brown 1983; Brown, Axelgaard et al. 1984; Anciaux, Lenaert et al. 1991).

La tolérance à l'étude s'est cependant avérée difficile à cause d'effets secondaires comme la douleur lombaire, l'insomnie et l'irritation tégumentaire causée par l'implantation des électrodes (Bradford, Tanguy et al. 1983; Kahanovitz and Weiser 1986; Bylund, Aaro et al. 1987; Fisher, Rapp et al. 1987; Anciaux, Lenaert et al. 1991). Présentement, il n'existe aucune indication qui encadre l'utilisation de la stimulation électrique dans le traitement de la scoliose idiopathique de l'adolescent (Weinstein 2001).

### **1.6.1 Le traitement non chirurgical**

Le corset reste le traitement non-chirurgical de la scoliose idiopathique de l'adolescent le plus utilisé suscitant les meilleurs résultats. La plupart des études discutent de l'efficacité de ce traitement et de son effet sur l'histoire naturelle de la scoliose idiopathique (Weinstein, 1998). Les objectifs du corset sont de prévenir la progression d'une courbe minime, de corriger les changements cosmétiques (p.ex. l'asymétrie de la taille, etc.) et d'éviter la chirurgie.

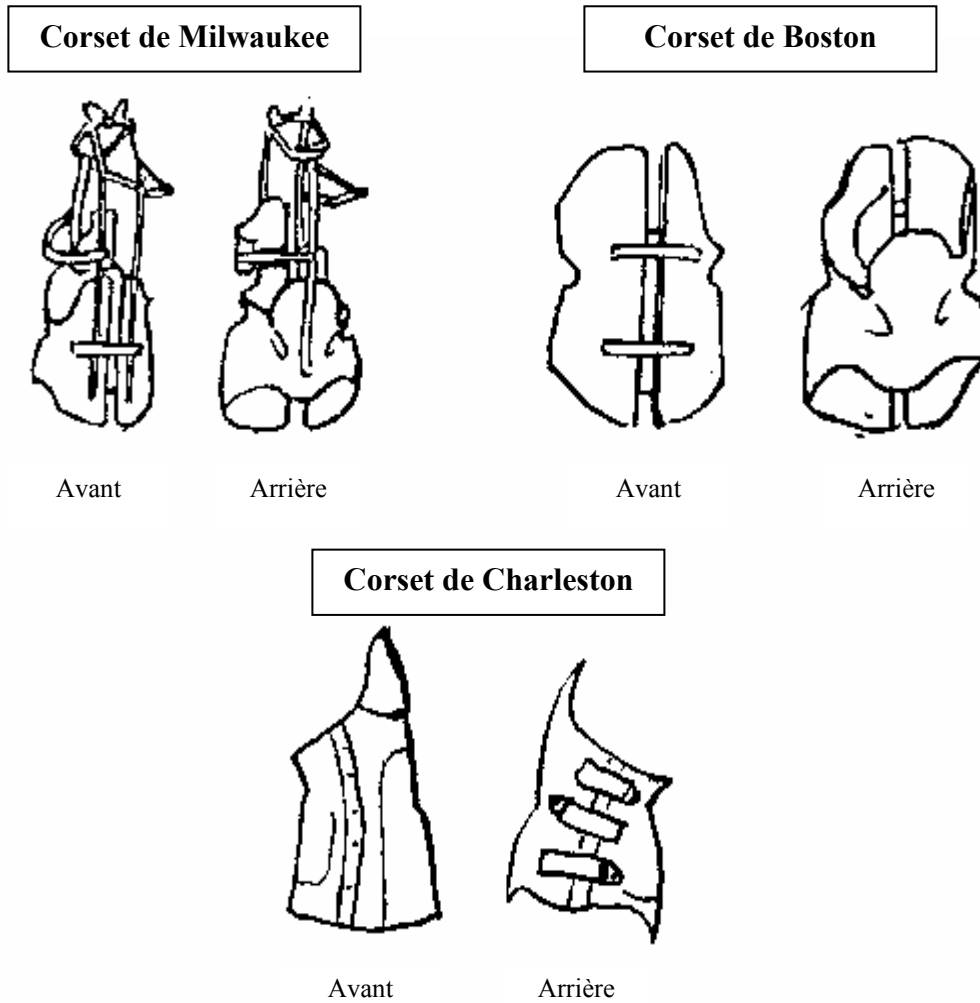
Il y a toutefois controverse au sujet de l'activité physique qui, associée au corset, aurait des effets importants par rapport au ralentissement de la progression de la courbe. Dernièrement, plusieurs patients ont été encouragés à participer à des activités athlétiques même s'ils portaient le corset. Lors des sports extrêmes ou des sports de contact, les corsets sont enlevés pour offrir au patient le maximum des bénéfices physiques et psychologiques liés à ce type d'activités spécifiques. Certains chercheurs aiment promouvoir la pratique d'exercices spécifiques pour éviter l'atrophie des muscles para-spinaux et abdominaux ainsi que les contractures qui peuvent apparaître suite à l'utilisation prolongée du corset (Bunnell, MacEwen et al. 1980; Emans, Kaelin et al. 1986).

L'histoire moderne du traitement orthotique de la scoliose idiopathique de l'adolescent a débuté dans les années 1940, alors que la stabilisation postopératoire des déformations spinales était effectuée à l'aide de dispositifs externes. C'est en 1946 que



Blount et Schmidt ont introduit le corset Milwaukee. Celui-ci fut la toute première orthèse utilisée dans le traitement de la scoliose idiopathique de l'adolescent (Blount, Schmidt et al. 1958).

Les corsets utilisés pour le traitement de la SIA sont classifiés selon deux grandes catégories : le corset rigide et le corset dynamique. Le corset rigide, tel que le Milwaukee, consiste en une orthèse qui immobilise la colonne cervico-thoraco-lombo-sacrée (OCTLS). Quant aux corsets qui n'immobilisent pas la colonne cervicale, ils sont considérés comme des orthèses thoraco-lombo-sacrées (OTLS). À titre d'exemples d'OTLS, on retrouve le corset de Boston, le corset de Wilmington et le corset de Miami. Le corset de Charleston est techniquement une OTLS. Il a été conçu pour corriger les courbes structurales et doit être porté uniquement durant la nuit. En théorie, les corsets fonctionnent en appliquant des forces externes au tronc, qui transmet ensuite une force correctrice à la colonne vertébrale. Les forces ainsi créées donnent lieu à une traction longitudinale et une pression latérale. Plusieurs types de corsets rigides sont montrés dans la figure 5.



**Figure 5 : Plusieurs types de corsets rigides.** Vues avant et arrière (adapté de [www.scoliosis.org](http://www.scoliosis.org))

Le traitement SpineCor® a été développé au début des années 1990 en utilisant un Corset Dynamique de Correction (CDC), associé à une toute nouvelle approche de traitement qui requiert un logiciel diagnostique, auxiliaire clinique afin de permettre une pose de corset optimale et d'assurer le suivi du traitement (Griffet, Leroux et al. 2000).



**Figure 6: Patient montrant le mouvement correcteur et le corset SpineCor®** (Image reproduite avec l'accord du Dr CH Rivard – CHU Sainte-Justine)

L'approche unique du traitement SpineCor® offre une réelle amélioration engendrée par sa totale action dynamique, comparativement aux corsets traditionnels qui sont essentiellement statiques ou qui permettent des mouvements minimums (Coillard,

Leroux et al. 2003; Coillard, Vachon et al. 2007). L'expérience clinique montre jusqu'ici une meilleure assiduité et des résultats cosmétiques très intéressants.

### **1.6.2 Le traitement chirurgical de la scoliose idiopathique de l'adolescent**

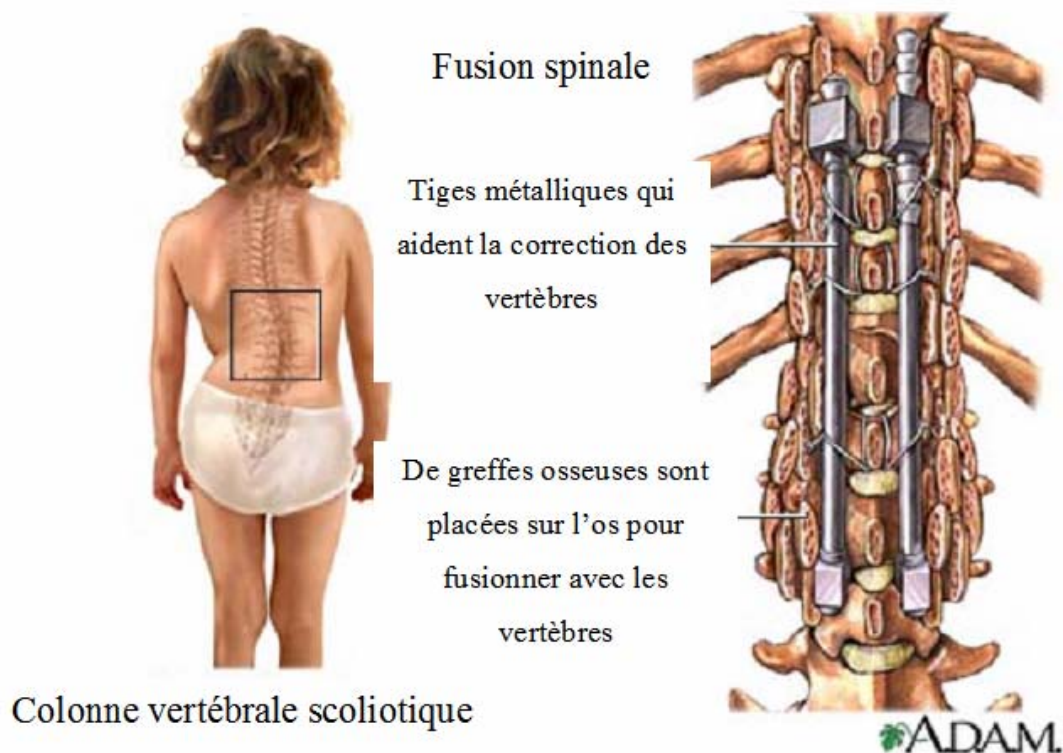
Les objectifs du traitement chirurgical visent la stabilisation de la courbe et la correction partielle avec réduction de la déformation par la restauration de la colonne vertébrale dans le plan sagittal et coronal.

Le traitement chirurgical de la scoliose idiopathique de l'adolescent continue à évoluer. Dans les années 1960, Harrington a introduit l'instrumentation (Harrington 1962; Lovallo, Banta et al. 1986; Dickson, Erwin et al. 1990). Dans les années 1970, les fils sous-laminaires (l'instrumentation de Luque) et les fils intraspineux Wisconsin ont été introduits (Luque ; Jeng, Sponseller et al. 1993; Jarvis and Greene 1996). Pendant les années 1980, les configurations des deux tiges et des crochets multiples ont été introduits (Dubousset and Cotrel 1991) (Sawatzky, Jang et al. 1998). Ensuite, les vis pédiculaires se sont ajoutées, qui sont plutôt utilisées au niveau de la jonction thoraco-lombaire et lombaire (Barr, Schuette et al. 1997; Hamill and Simmons 1997; Brown, Lenke et al. 1998).

Le but du traitement chirurgical de la scoliose idiopathique de l'adolescent est d'obtenir une fusion solide et d'avoir le haut et le bas de la fusion balancés à l'intérieur de la zone stable (King, Moe et al. 1983)( Figure 7). L'os autogène est une excellente source

pour une greffe osseuse (Bridwell, McAllister et al. 1991). Plusieurs chercheurs l'ont d'ailleurs suggéré (Blanco and Sears 1997).

Les indications pour le traitement chirurgical de la scoliose idiopathique de l'adolescent sont relatives. Un angle de Cobb de cinquante (50) degrés ou plus est une indication de traitement chirurgical, car la progression de la courbe est alors plus probable et les déformations sont habituellement observables du point de vue cosmétique. En d'autres termes, cela signifie simplement qu'une intervention chirurgicale peut être considérée, mais qu'elle n'est pas absolue (Weinstein 2001).



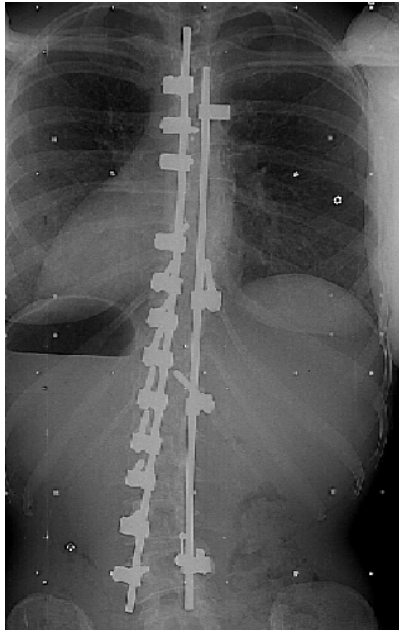
**Figure 7: La fusion spinale** ( adapté de A.D.A.M; <http://www.adam.com>).

Si le traitement conservateur ou le corset actif ne donnent pas de résultats significatifs et que la courbe dépasse les quarante (40) degrés, et qu'il persiste un potentiel de croissance important une recommandation pour le traitement chirurgical peut être appropriée (Bridwell, McAllister et al. 1991).

Le patron de la courbe est aussi un facteur à considérer. Les courbes doubles majeures demandent de longues fusions. Les chirurgiens se demandent alors s'ils doivent fusionner les deux courbes, thoracique et lombaire, selon si la déformation lombaire est compensatrice ou déjà structurale (La Grone 1988; Bridwell 1998).

### **La fusion postérieure**

La technique de la fusion postérieure consiste à la décortication à partir du processus épineux vers le processus transverse (Figure 8). L'excision des facettes et la décortication font partie de la procédure standard. Si l'instrumentation segmentaire est utilisée postérieurement, les points de fixation doivent être préservés. Le standard est d'utiliser une greffe autogène, soit iliaque soit des côtes, cette dernière étant générée de façon concomitante avec une thoracoplastie (Blanco and Sears 1997). On suggère un suivi des chirurgies pour une période de trois (3) à cinq (5) ans afin de s'assurer que la fusion vertébrale se produit réellement.

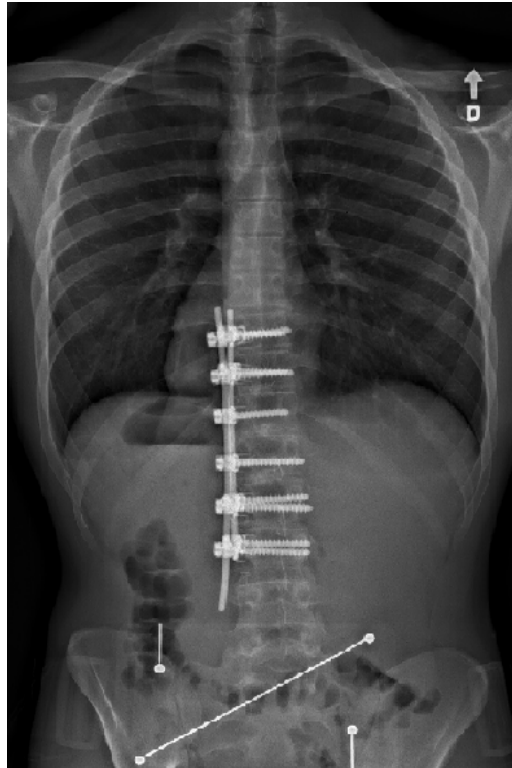


**Figure 8 : La fusion vertébrale postérieure** (Reproduite avec l'accord de Dr CH Rivard – CHU Sainte-Justine)

### **La fusion antérieure**

La technique de la fusion antérieure est standard et consiste à l'excision complète du disque vertébral et de toutes ses composantes cartilagineuses. Des morceaux de côtes autogènes, habituellement récoltés lors de l'approche antérieure, sont utilisés pour faciliter la fusion de la greffe dans l'espace intervertébral ( Figure 9).

L'os de la côte n'est pas le meilleur choix pour une greffe structurale idéale. Les meilleures solutions sont les autogreffes tricorticales de l'os iliaque, les morceaux de péroné autogène et les cages en titane remplies d'os autogène (Sweet, Lenke et al. 1999).



**Figure 9 : La fusion vertébrale antérieure** (Reproduite avec l'accord de Dr CH Rivard – CHU Sainte-Justine)

### **La thoracoplastie**

La technique consiste en la résection de côtes proéminentes pour donner de meilleurs résultats cosmétiques. L'accès peut s'effectuer lors d'une chirurgie antérieure (ouverte ou endoscopique) ou postérieurement, par une incision médiane alors que de larges sections des côtes peuvent être enlevées à partir de l'apex de la déformation de la côte vers le processus transverse. Une autre option est de couper les côtes situées à



proximité de leurs attachements vertébraux et de les suturer au processus concave ou à une tige. Cette intervention fournit une stabilité immédiate de la cage thoracique ainsi que la satisfaction non négligeable du patient (Suk, Lee et al. 1995). Cependant, il existe des inconvénients comme la réduction temporaire de la fonction pulmonaire. On doit donc utiliser cette méthode uniquement chez les patients qui possèdent une excellente fonction pulmonaire (Lenke, Bridwell et al. 1995; Vedantam, Lenke et al. 2000).

### **La fusion vertébrale**

La technique de fusion vertébrale consiste à l'union d'au moins deux vertèbres. Pendant la fusion vertébrale chirurgicale, l'effort est dirigé vers la stimulation de la croissance osseuse entre les vertèbres, ce qui favorise la fusion. Dès que l'os nouveau est formé, les vertèbres seront unies. Il ne doit plus exister de mouvements entre les segments fusionnés.

La partie la plus difficile de la chirurgie de la fusion vertébrale est qu'il est difficile d'avoir une croissance adéquate du nouvel os. Il existe néanmoins des moyens pour stimuler la croissance osseuse en utilisant des greffes autogènes provenant des côtes et du bassin, des petits fragments d'os ou des substituts artificiels d'os. L'habilité de l'os à guérir et à fusionner est basée sur trois concepts de base : l'ostéogénèse, l'ostéoinduction et l'ostéoconduction. L'ostéogénèse est définie comme l'habilité à produire de l'os nouveau et

elle se détermine par la présence de cellules ostéoprogénitrices et de cellules ostéogéniques dans l'aire de la fracture (Helm, Dayoub et al. 2001). Les propriétés ostéoconductive sont déterminées par la présence d'un support qui permet la migration vasculaire, la migration cellulaire, l'attachement et la distribution des cellules et la présence de facteurs de croissance nécessaires à l'ostéogénèse (Helm, Dayoub et al. 2001). L'ostéoconduction se réalise en utilisant des greffes autogènes, des allogreffes, des matrices osseuses déminéralisées, de l'hydroxyapatite et du collagène. Les propriétés ostéoconductive peuvent être influencées par la structure, les dimensions des pores et la porosité du support (Helm, Dayoub et al. 2001). L'ostéoinduction est définie aussi comme l'habilité des cellules souches à se différencier en cellules matures par la stimulation de facteurs de croissance locaux (Subach, Haid et al. 2001).

Deux types de greffes sont fréquemment utilisés dans la fusion vertébrale : la greffe autogène et la greffe d'os artificiel. La greffe autogène consiste à la transplantation d'une partie à une autre d'un corps d'un même individu tandis que l'os artificiel peut être acheté (DePalma, Rothman et al. 1972; Whitecloud and Butler 1988).

La greffe osseuse idéale devra être:

- 1) Ostéoconductive et ostéoinductive
- 2) Stable biochimiquement
- 3) Sans maladies
- 4) Contenir un minimum des facteurs antigéniques

Ces caractéristiques sont toutes présentes dans la greffe autogène. Cependant, on compte parmi les désavantages de ce type de greffe la nécessité d'une deuxième incision pour récolter la greffe, une perte accrue de sang, un temps opératoire plus long, des complications au niveau du site de la greffe et une quantité insuffisante de greffe (Friedlaender and Mankin 1984; Herron and Trippi 1989).

Plus récemment, des substituts de greffes ont retenu l'attention des chercheurs comme la céramique, la coralline, les polymères composés d'une protéine morphogénique d'os humain (rhBMP-2) et la matrice osseuse déminéralisée (Cook, Dalton et al. 1995; Sandhu, Gorczynski et al. 1995; Boden, Martin et al. 1999; Bozic, Glazer et al. 1999; Thalgott, Fritts et al. 1999).

Les cellules des greffes autologues fraîches peuvent être utilisées lors de la fusion pour induire l'ostéogénèse. Les cellules de la moelle osseuse sont aussi ostéoinductives et ostéoconductives car elles ont des récepteurs pour les facteurs de croissance et les molécules d'adhésion cellulaire (Bruder and Fox 1999). L'utilisation des cellules souches dérivées de la moelle osseuse a été tentée sur des modèles animaux avec succès, mais les réactions immunes restent problématiques (Helm, Dayoub et al. 2001).

**Chapitre 2.**

## 2. L'os

L'os est un organe vivant qui subit des transformations tout au long de sa vie. Ces transformations résultent de l'action des cellules qui forment l'os, les ostéoblastes, et les cellules qui résorbent l'os, les ostéoclastes. Les ostéoblastes produisent une matrice extracellulaire qui se compose principalement de collagène de type 1 et de protéines non-collagéniques. Cette matrice est calcifiée par des ostéoblastes et pendant ce processus, les cellules s'enrobent en lacunes dans le matériel calcifié pour devenir des ostéocytes, cellules qui aident à maintenir la structure de l'os.

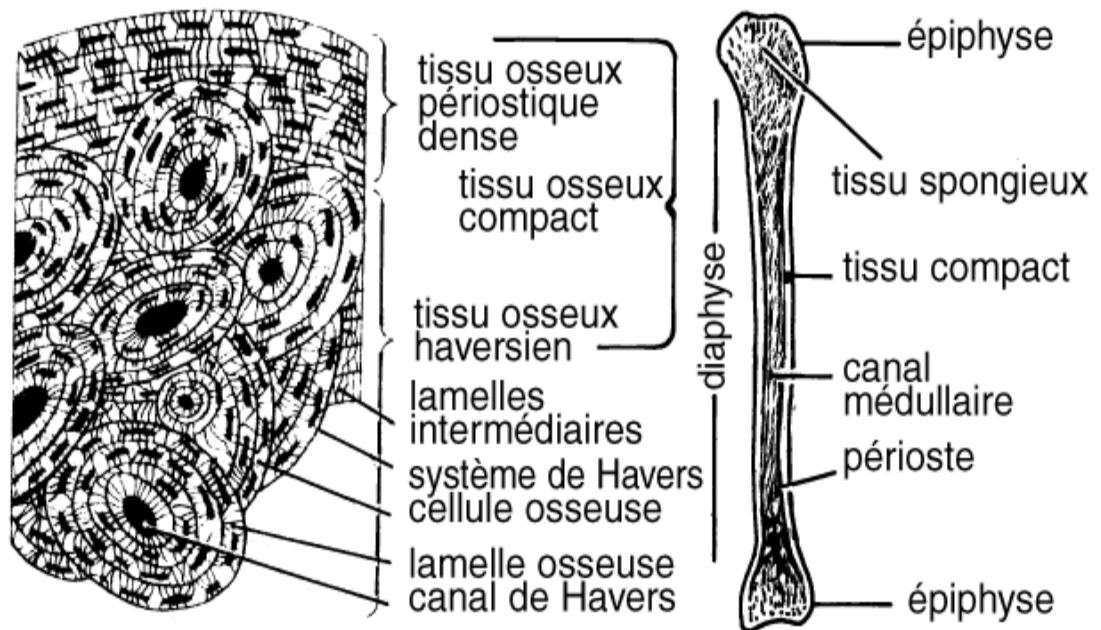
Le renouvellement de la population d'ostéoblastes résulte de la différenciation des cellules osseuses ostéoprogénitrices qui résident dans la moelle. Les défauts, comme les micro-fissures, sont réparés par l'action couplée des ostéoclastes et des ostéoblastes. L'intégrité globale de l'os semble être commandée par des hormones, telles que les œstrogènes et la testostérone, ainsi que par plusieurs autres protéines sécrétées par les cellules hématopoïétiques de la moelle et les cellules osseuses. Ces protéines, appelées cytokines, agissent comme facteurs de croissance, affectent les ostéoblastes et les ostéoclastes, et leurs sécrétions peuvent être sous le contrôle hormonal. Parmi celles-ci, on retrouve les interleukines (interleukine-1, interleukine-6, et interleukine-11), le facteur- $\beta$  de transformation de croissance (TGF- $\beta$ ) et le facteur de nécrose tumorale (TNF), qui jouent un rôle significatif en contrôlant les activités des

ostéoblastes et des ostéoclastes. Après la ménopause, les femmes souffrent d'une perte accélérée d'os, qui peut mener à l'ostéoporose, une maladie débilitante qui affecte 20 millions de femmes seulement aux États-Unis. Cette perte accélérée d'os coïncide avec la diminution des œstrogènes et une augmentation apparente de la sécrétion des cytokines, ce qui accélère l'activité des ostéoclastes. Bien que cette plus grande résorption de l'os soit couplée à un plus grand taux de formation d'os, cette dernière demeure inférieure à celui de la résorption. Par conséquent, les résultats sont la perte d'os et l'affaiblissement trabéculaire de la structure osseuse. La perte continue d'os conduit à un risque élevé de fractures des vertèbres et de la hanche. Par la suite, le « turnover » rapide de l'os cesse, laissant peu d'ostéoblastes pour former un os nouveau. La perte d'ostéoblastes peut être liée à un déclin du nombre de cellules ostéoprogénitrices et est souvent associée au vieillissement (Rifas 1999).

## 2.1. Structure de l'os

### 2.1.1. Définition

L'os est une substance présentant une structure complexe. Le système haversien est une unité de base, constituée d'une cavité et d'une tige stratifiée de phosphate de calcium : le noyau creux forme un canal nutritif, le canal Haversien. Dans l'axe d'un os long, plusieurs des systèmes haversiens sont unis en parallèle, formant ainsi un genre appelé **l'os compact**, optimisé pour résister aux forces compressives et de flexion. Près des extrémités osseuses, où le stress devient plus intense, les systèmes haversiens s'évasent et s'embranchent pour former une couche d'**os spongieux**.



**Figure 10 : La structure de l'os** (adapté de *CliffsNotes.com. Bone Structure. 16 Oct 2008*  
<<http://www.cliffsnotes.com/WileyCDA/CliffsReviewTopic/topicArticleId-22032,articleId-21902.html>>.

### Os compact

L'os compact se compose d'ostéons étroitement couplés ou de systèmes haversiens. L'ostéon se compose d'un canal central appelé le canal haversien, qui est entouré par des anneaux concentriques (lamelles) de la matrice. Entre les anneaux de la matrice, les cellules osseuses (ostéocytes) sont placées dans des espaces appelés lacunes. Les petits canaux s'étendent jusqu'au canal haversien pour permettre des passages parmi la matrice dure. Dans l'os compact, les systèmes haversiens sont étroitement liés entre eux pour former ce



qui semble être une masse pleine. Les canaux haversiens contiennent les vaisseaux sanguins qui sont parallèles à l'axe long de l'os.

### **Os spongieux**

L'os spongieux est plus léger et moins dense que l'os compact. Il se compose de trabécules et de barres d'os situées à côté de petites cavités irrégulières qui contiennent la moelle rouge. Les canaliculés se relient aux cavités adjacentes, au lieu de rejoindre le canal haversien central, pour recevoir leurs approvisionnements en sang. Il peut sembler évident que les trabécules sont positionnés de façon aléatoire, mais elles sont en fait organisées afin de fournir une force maximale. Les trabécules de l'os spongieux suivent les lignes de stress et peuvent se réaligner si la direction de ce stress change.

## **2.1.2. Structure osseuse**

### **2.1.2.1 La Matrice osseuse**

La matrice osseuse se compose de :

#### **Matière organique**

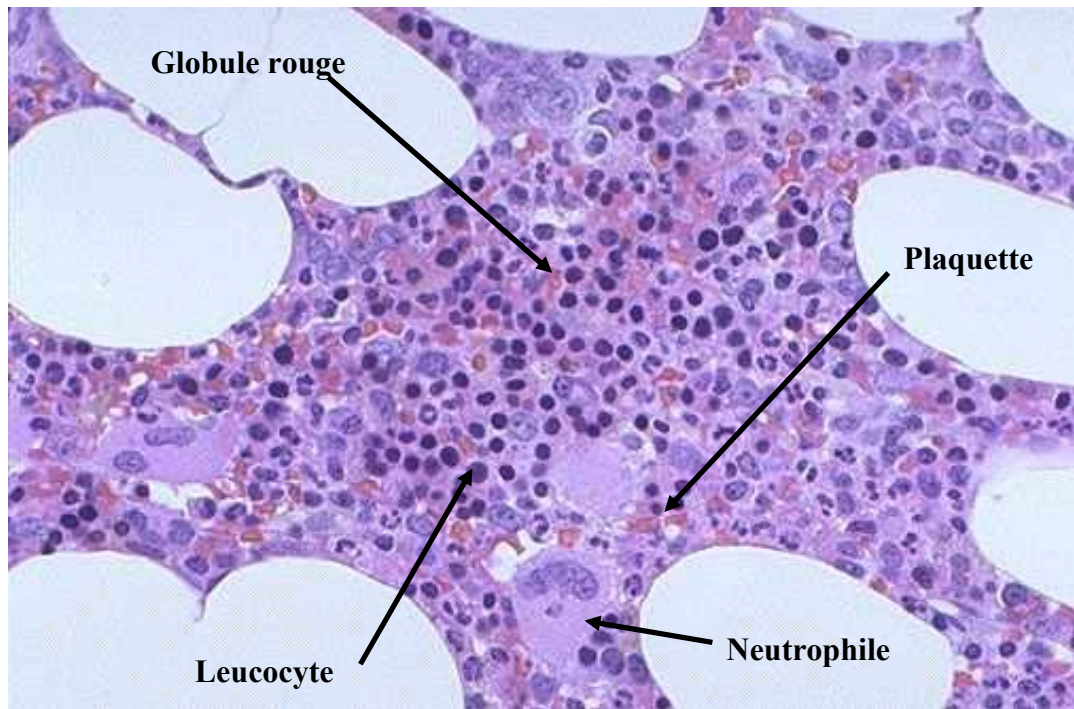
Composée de **fibres de collagène type 1** incorporées à la substance basale contenant des protéoglycans et des glycoprotéines. Les fibres de collagène se composent de paquets de fibrilles pour résister aux forces.

#### **Matière inorganique**

Composée de substances pour résister aux forces de flexion et de compression. Le minéral osseux est un analogue de cristaux de phosphate de calcium – l'hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , une substance qui peut seulement être vue sous un microscope électronique. C'est l'association entre l'hydroxyapatite et les fibres de collagène qui est responsable de la dureté de l'os (Nather 1999).

### **2.1.2.2. Moelle osseuse**

Ce tissu remplit les cavités cylindriques des os longs et occupe l'espace des os spongieux. Dans les os longs, la moelle osseuse est de couleur jaune et consiste principalement en des cellules graisseuses et quelques cellules de la moelle osseuse. Cependant, la moelle osseuse, dans les os plats et courts, est de couleur rouge et contient le tissu connectif, les vaisseaux sanguins, de nombreux myélocytes « cellules de moelle osseuse », des érythroblastes, des cellules géantes et quelques cellules graisseuses (Figure 11). La moelle osseuse est l'organe de l'hématopoïèse. Ce processus se produit dans tous les os dès la naissance. Avec la maturation, l'hématopoïèse est confinée à la colonne vertébrale, aux os de la ceinture pelvienne, aux côtes, au crâne et à l'extrémité proximale des os longs.



**Figure 11 : Les cellules de la moelle dans le canal médullaire des os longs.** Les vacuoles vides indiquent les espaces précédemment occupés par les cellules graisseuses (Adapté de <http://commons.wikimedia.org>).

### 2.1.2.3. Les composants cellulaires

L'os est un type très spécialisé de tissu conjonctif qui est composé de cellules et d'une matrice intercellulaire. Il y a trois types de cellules :

## **Ostéoblastes**

Ce sont les cellules qui forment l'os, situées en surface de celui-ci, alignées côte à côte comme un épithélium cuboidal simple. Ces cellules sont responsables de la synthèse des composants organiques de la matrice osseuse. Pendant leurs activités, elles démontrent une concentration élevée de phosphatase alcaline. Les ostéoblastes synthétisent et règlent le dépôt et la minéralisation de la matrice extracellulaire de l'os. Les hormones systémiques et localement actives, les facteurs de croissance, les ions, les métabolites lipidiques et les stéroïdes sont des régulateurs d'activité ostéoblastique et/ou de différenciation. La cascade de signalisation moléculaire a été définie pour chacun des types de cellules osseuses.

Les membres de la famille des « transforming growth factor bêta » (TGF- $\beta$ ), et les « bone morphogenic protein » (BMPs) sont importants pour l'homéostasie de l'os. Ces facteurs modulent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes.

Considérant que les effets de chaque facteur peuvent être semblables ou bien différents, dépendamment de la ligne cellulaire et de la réponse des cellules, quelques concepts communs sont évidents en ce qui concerne la signalisation intracellulaire utilisée par les membres d'une même famille. Pour la transmission du signal, les membres de la superfamille des TGF- $\beta$  sont liés à une combinaison particulière de deux sérines/récepteurs kinase de thréonine, de type I et de type II. Les deux récepteurs sont aussi nécessaires pour la transmission de ce signal.

## **Ostéocytes**

Les ostéocytes sont des cellules semblables aux ostéoblastes qui occupent les lacunes dans la matrice osseuse. Ils sont donc des ostéoblastes différenciés (le micro-environnement de la matrice inorganique/organique de l'os rend nécessaire une spécialisation). De plus, ils possèdent des processus cytoplasmiques longs et minces - le **filopodia** situé dans les espaces ou dans les canaux cylindriques minces de la matrice osseuse - **les canaliculés**.

Les ostéocytes sont des cellules très différenciées qui produisent la phosphatase alcaline, récepteur de PTH, en plus d'avoir une fonction de cellules mécanosensorielles. Les stimuli mécaniques peuvent induire des changements de structure et de masse osseuse. Les ostéocytes ont la capacité de synthétiser la matrice aussi bien que de la résorber, en la décomposant par ostéolyse ostéocytaire afin de libérer le calcium dans son processus d'homéostasie.

## **Ostéoclastes**

Les ostéoclastes sont de grandes cellules multi-nuclées d'origine hématopoïétique dont la fonction est la résorption osseuse. Une fois activé, l'ostéoclaste se pose directement

sur la surface de l'os où la résorption doit avoir lieu. Suite à son activité, un compartiment peu profond, appelée la lacune d'Howship ou simplement le compartiment de résorption, est formé dans l'os directement sous l'ostéoclaste. L'unité complexe qui se développe ainsi entre l'ostéoclaste et la surface de dissolution de l'os est produite par la fusion des vésicules d'acidification intra-cytoplasmiques avec la membrane plasmatique. La frontière délimitée semble essentielle pour la résorption mais pourtant, le mécanisme qui permet sa formation n'est pas encore bien défini.

### **2.1.3. Formation osseuse**

Les termes ostéogénèse et ossification sont employés souvent comme synonymes pour indiquer le processus de la formation de l'os. Les parties du squelette se forment durant les premières semaines suivantes la conception de l'enfant.

Vers la fin de la huitième semaine de gestation, le modèle squelettique du cartilage, des membranes et du tissu connectif est formé, ce qui permet à l'ossification de débiter. Le remodelage de l'os se poursuit durant tout l'âge adulte. Même après que le statut d'adulte soit atteint, le remodelage de l'os continue pour permettre la réparation des fractures et pour s'adapter à des styles de vie évolutifs. On retrouve deux types d'ossification : l'intra-membraneuse et l'endochondrale.

#### **2.1.3.1. Ossification Intra-membraneuse**

L'ossification intra-membraneuse implique le remplacement des membranes composées de tissu connectif avec du tissu osseux. Les os formés de cette manière se nomment les os intra-membraneux. Ils incluent certains os plats du crâne ainsi que certains os irréguliers. Les futurs os sont d'abord formés en tant que membranes de tissu



connectif. Les ostéoblastes migrent ensuite sur les membranes et déposent la matrice osseuse autour d'eux-mêmes.

### **2.1.3.2. Ossification Endochondrale**

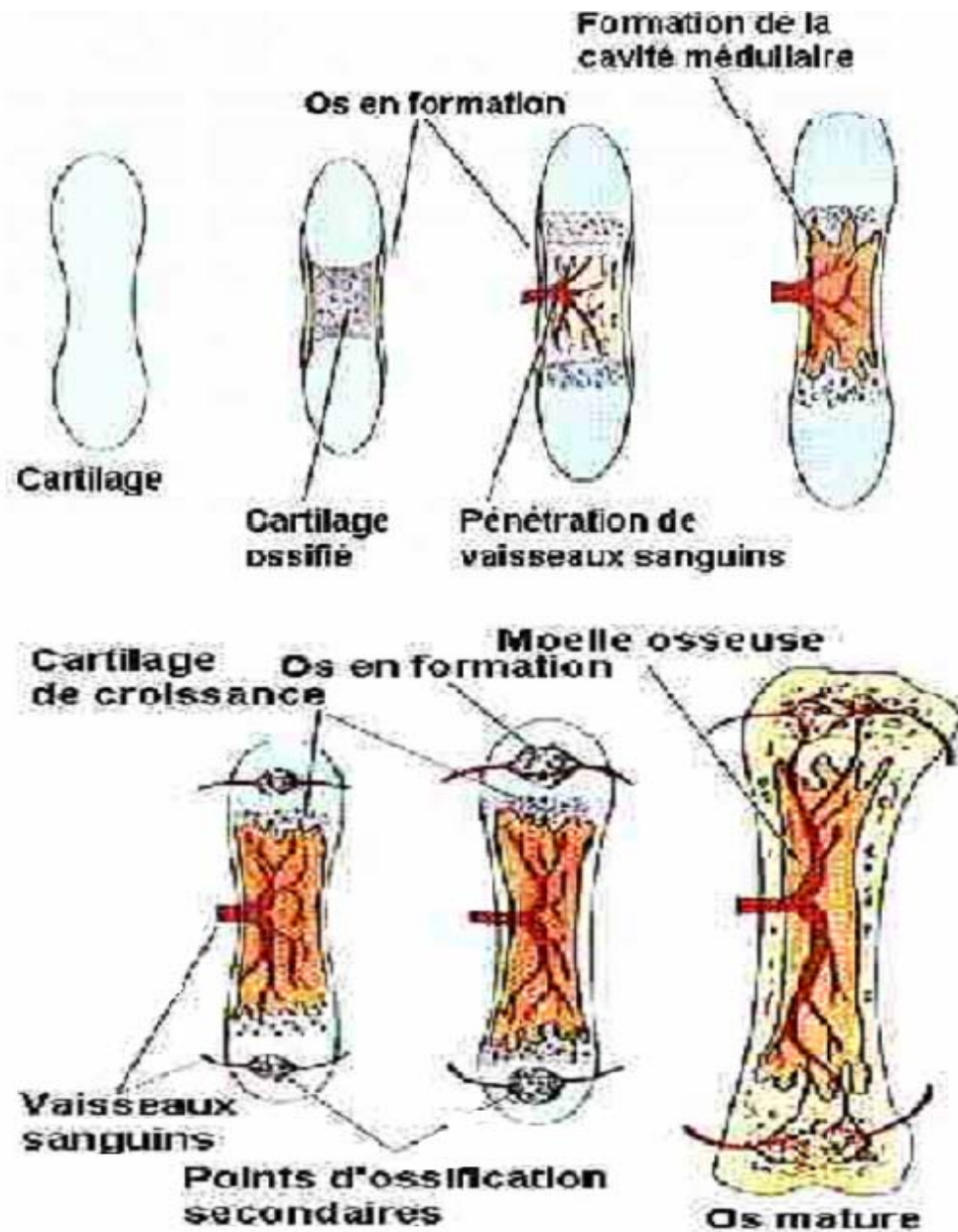
L'ossification endochondrale implique le remplacement du cartilage hyalin par du tissu osseux. La plupart des os du squelette sont formés de cette manière et se nomment les os endochondraux. Durant le processus, les futurs os sont d'abord formés en tant que modèles de cartilage hyalin. Pendant le troisième mois suivant la conception, le perichondrium qui entoure le cartilage hyalin est infiltré de vaisseaux sanguins et d'ostéoblastes et se change en périoste. Les ostéoblastes forment ainsi un manchon (collier) d'os compacts autour de la diaphyse. Au même moment, le cartilage situé au centre de la diaphyse commence à se désagréger. Les ostéoblastes pénètrent alors le cartilage en désintégration et le remplacent par de l'os spongieux. Ceci forme un centre primaire d'ossification. L'ossification se poursuit ensuite de ce centre vers les extrémités des os. Suite à la formation de l'os spongieux dans la diaphyse, les ostéoclastes lysent l'os récemment formé pour ouvrir la cavité médullaire. Plus tard, généralement après la naissance, l'ossification secondaire est centrée dans les épiphyses. Celle-ci est semblable à l'ossification qui se produit dans la diaphyse, à l'exception de l'os spongieux qui est maintenu en place au lieu d'être décomposé pour former la cavité médullaire. Lorsque l'ossification secondaire est complète, le cartilage hyalin est

entièrement remplacé par l'os, à l'exception de deux secteurs : une région de cartilage hyalin demeure au-dessus de la surface de l'épiphyse en tant que cartilage articulaire et une autre demeure entre l'épiphyse et la diaphyse, soit la région de la plaque épiphysaire ou du cartilage de croissance.

### **2.1.5. Croissance osseuse**

Les os se développent dans le sens de la longueur, au niveau épiphysaire, par un processus qui est semblable à l'ossification endochondrale. Le cartilage dans la région épiphysaire, située à côté de l'épiphyse, continue à se développer par la mitose. Les chondrocytes, que l'on retrouve dans la région adjacente à la diaphyse, vieillissent et se dégénèrent.

Les ostéoblastes se déplacent à l'intérieur et ossifient la matrice pour former l'os. Ce processus se poursuit tout au long de l'enfance et de l'adolescence jusqu'à ce que la croissance du cartilage ralentisse et s'arrête. Lorsque la croissance du cartilage cesse, généralement près de l'âge de vingt (20) ans, le cartilage épiphysaire s'ossifie complètement de sorte que seulement une mince ligne épiphysaire demeure et que les os ne se développent plus dans le sens de la longueur (Figure 12). La croissance des os est sous l'influence de l'hormone de croissance, de la glande pituitaire antérieure et des hormones du sexe, qui proviennent des ovaires ou des testicules selon le cas.



**Figure 12 : La croissance de l'os** (adapté de Bone development ; JR. Hassell)

Bien que les os cessent de croître en longueur tôt à l'âge adulte, ils peuvent continuer d'augmenter en épaisseur (ou diamètre) durant toute la durée de la vie, selon

le facteur stress, lié au poids. On appelle cette augmentation la croissance appositionnelle. Les ostéoblastes, dans le périoste, forment un os compact autour de la surface externe de l'os. Parallèlement, les ostéoclastes dans l'endosteum décomposent l'os sur la surface interne de celui-ci, tout autour de la cavité médullaire. Ces deux processus mis ensemble augmentent le diamètre et, par le fait même, empêchent l'os de devenir excessivement lourd et gros.

### **2.1.6. La minéralisation de l'os**

Nous savons maintenant que le degré de minéralisation du tissu osseux influence fortement la résistance mécanique des os et leurs densités minérales. Chez les adultes, le modèle est basé sur l'impact des changements du taux de transformation de l'os sur le degré de minéralisation du tissu osseux (Boivin and Meunier 2003). Cette minéralisation se produit dans la matrice cellulaire supplémentaire de l'os et du cartilage, ainsi que dans la dentine, l'émail et le ciment des dents.

## 2.2. Fracture et réparation de l'os

La réponse initiale à une fracture est semblable à la réponse de tout dommage associé à la destruction et à l'hémorragie d'un tissu. Les neutrophiles sont les premières cellules à arriver sur la scène, suivies des macrophages qui ont comme fonction de nettoyer le site de la lésion. Les fibroblastes et les capillaires prolifèrent alors et se développent au niveau de cette lésion. Le nouveau tissu connectif, que l'on nomme **tissu de granulation**, est formé et c'est lorsque celui-ci prend en densité que le cartilage débute sa formation. Les fibroblastes et les cellules périostées participent aussi à cette phase du processus de guérison. Le tissu connectif dense et le cartilage récemment formé se développent, couvrant l'os au niveau de la fracture et produisant ce qui est connu comme le **calus**. Un calus se formera si les parties rompues de l'os sont en apposition entre elles, ce qui par conséquent suppose qu'elles n'aient pas été déplacées ou qu'elles aient été rapprochées grâce à une aide externe (médecin). Les calus aident à stabiliser et à lier ensemble les os rompus. Au moment où le calus se forme, les cellules ostéoprogénitrices du périoste se divisent et se différencient en ostéoblastes. Les ostéoblastes récemment formés commencent à déposer le nouvel os sur la surface externe de l'os existant à une certaine distance de la fracture. Cette nouvelle formation d'os progresse vers le site de la fracture jusqu'à ce que le nouvel os forme une gaine osseuse au-dessus du calus fibrocartilagineux. Les bourgeons ostéogéniques du nouvel os envahissent ensuite le calus et commencent à déposer de l'os graduellement, remplaçant ainsi le calus fibreux et cartilagineux original avec un calus

osseux. Le cartilage du calus original se calcifie et est remplacé par l'os comme dans l'ossification endochondrale.

La prolifération et la différenciation endostéales se produisent également dans la cavité de la moelle, et l'os médullaire se développe des deux cotés de la fracture vers le centre. Quand cet os se complète, l'union osseuse est produite par les ostéoblastes dérivés du périoste et l'endostéum, en formant de l'os spongieux. Comme dans une formation normale, l'os spongieux est graduellement remplacé par l'os compact. Alors que cela se produit, le calus osseux est enlevé par l'action des ostéoclastes et l'os ainsi remodelé reprend graduellement sa forme originale.

Chez les individus en bonne santé, ce processus prend habituellement de six (6) à douze (12) semaines, dépendamment de la sévérité de la fracture et du type d'os en cause. Le processus de guérison peut être accéléré si des fixations internes sont utilisées (vis, clous...), ce qui a souvent comme conséquences positives une restauration structurale et une fonctionnalité supérieures.

### **2.2.1 La régulation de la masse osseuse**

La masse osseuse est maintenue constante grâce à un équilibre précis entre l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes. Les ostéoclastes sont des cellules dérivées de monocytes, une lignée de macrophages qui joue un rôle important dans le modelage

de l'os tout au long de la croissance squelettique et qui permet la transformation de l'os pendant la vie adulte (Teitelbaum). L'activité augmentée des ostéoclastes ou le découplage de la résorption osseuse ostéoclastique a comme conséquence la perte focale ou généralisée de l'os, en plus d'être un signe annonciateur de maladies telles que l'ostéoporose, la maladie de Paget, et les maladies des os associées au cancer (Helfrich).

L'importance de la résorption ostéoclastique de l'os dans la pathogénie de ces maladies est reflétée par le fait que les traitements médicamenteux les plus réussis fonctionnent en empêchant la résorption osseuse (Rodan and Martin).

La résorption ostéoclastique est réglée par un effet complexe qui se produit entre les hormones circulantes calciotropiques comme la parathormone, le calcitriol et les hormones sexuelles, les régulateurs locaux de l'activité des cellules osseuses, le récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B ligand (RANKL), le facteur stimulant de colonie de macrophages (M-CSF) et l'ostéoprotégérine (Rodan and Martin). Les travaux récents ont prouvé que les voies neuroendocriniennes et les neurotransmetteurs jouent également des rôles importants dans la régulation de la modulation osseuse (Baldock, Sainsbury et al. ; Takeda, Eleftheriou et al.).

L'existence d'un contrôle hormonal de l'activité ostéoblastique a été spéculée depuis des années par analogie avec la régulation hormonale des ostéoclastes. Au cours de la recherche d'un signal hormonal régulant la formation osseuse, la leptine

a été identifiée comme étant un puissant inhibiteur de la formation osseuse. De plus, l'infusion intracérébroventriculaire de leptine a démontré que cette hormone agit par l'intermédiaire d'un relais hypothalamique. Des études ultérieures ont conduit à l'identification de neurones hypothalamiques impliqués dans la fonction anti-ostéogénique de la leptine.

### **2.2.2. Ostéogénèse**

L'Ostéogénèse est un processus qui produit du matériel osseux par des ostéoblastes. Pour ce processus, les ostéoblastes doivent proliférer et se différencier. Chez l'adulte, la formation d'os et la résorption continues sont fortement réglées pour permettre à l'os d'exercer ses fonctions principales, soit l'appui mécanique et l'homéostasie des minéraux.



### **2.2.2.1. Différenciation et prolifération d'ostéoblaste**

La différenciation est un processus multiple par lequel les cellules acquièrent des propriétés structurales et fonctionnelles uniques, caractéristiques des tissus, et sont atténuées par une expression sélective d'une cascade génique en réponse à une série interdépendante de mécanismes de signalisation intercellulaires et intracellulaires.

La différenciation commence peu après les premières divisions de cellules qui suivent la fertilisation. Durant tout le développement, et dans tous les organismes adultes, la capacité d'une cellule à proliférer est intimement liée à son état de différenciation. Les tissus adultes expriment généralement une variété de facteurs qui agissent pour maintenir la prolifération et le statut de différenciation des cellules. Ceux-ci incluent les molécules sécrétées, les récepteurs transmembranaires, les molécules de signalisation intracellulaires, et les facteurs de transcription. Tôt dans les embryons, on remarque que la prolifération de cellules est le moyen primaire par lequel la masse de cellules augmente. Cependant, lorsque l'organisme se développe, la prolifération se restreint : quelques cellules différenciées continuent à proliférer, mais d'autres perdent irréversiblement cette capacité.

Dans la perspective de l'évolution biologique, il est évident que les cellules, dans un organisme multicellulaire comme les humains, ont un potentiel de prolifération intrinsèque qui doit répondre aux exigences de la croissance et du développement normal. Le taux de prolifération des cellules dans toute population de cellules dépend de trois paramètres :

- (a) Le taux de division des cellules;
- (b) La fraction des cellules chez la population qui subit la division cellulaire (fraction de croissance);
- (c) Le taux de perte de cellules de la population dû à la mort cellulaire.

D'une perspective historique, les hormones stéroïdiennes et les polypeptides ont été initialement reconnus comme des régulateurs physiologiques pour signaler les voies qui influencent la différenciation et la prolifération des cellules.

Récemment, il est devenu de plus en plus évident que plusieurs autres facteurs de croissance jouent un rôle important en réglant et en contrôlant la prolifération et différenciation des ostéoblastes.

# Chapitre 3

### 3. Facteurs de croissance

L'ostéogénèse est un processus complexe réglé par des hormones, des facteurs de croissance systémiques et des facteurs locaux. L'effet des hormones sur la génèse osseuse a amplement été étudié (Canalis 1983) mais plus récemment, les chercheurs ont commencé à étudier la modulation de l'ostéogénèse par des facteurs de croissance systémiques et locaux. (Centrella and Canalis 1985).

Contrairement aux effets des hormones systémiques, l'effet des facteurs de croissance sur la croissance squelettique et nonsquelettique n'a pas été bien caractérisé, en partie dû au fait que la découverte des facteurs de croissance est récente, qu'il n'existe qu'une faible quantité de matériel disponible pour soutenir l'étude et que beaucoup de facteurs de croissance ont des structures chimiques peu connues. Par conséquent, la plupart des études ont été réalisées *in vitro*. Il n'y a donc presque aucune information sur les *effets in vivo* des facteurs de croissance (Canalis 1985).

L'effet des facteurs de croissance sur l'ostéogénèse a été examiné par différents modèles et systèmes *in vitro*. Les modulateurs locaux de la croissance squelettique sont des facteurs synthétisés et libérés par l'os ou par les cellules connexes du tissu osseux. Ces facteurs affectent directement la croissance squelettique, sans l'implication du système circulatoire. Des facteurs de croissance ont été isolés dans des cultures osseuses et dans la matrice osseuse et il est probable qu'un certain nombre de ceux-ci soient synthétisés par l'os

ou par les cellules connexes et qu'ils agissent comme régulateurs de croissance squelettique autocrine ou paracrine (Seyedin, Thompson et al. 1986). Les facteurs locaux de croissance jouent un rôle essentiel dans la modulation de la croissance du tissu osseux et ce rôle peut être aussi important que celui joué par les hormones systémiques (Nilsson, Isgaard et al. 1986). De plus, certains des effets hormonaux systémiques sur la fonction du squelette et du tissu non-squelettique sont probablement produits par des facteurs locaux. Les hormones pourraient aussi agir en modifiant la synthèse ou les effets de certains facteurs locaux de croissance.

### **3.1. Classification**

Les facteurs de croissance sont les protéines qui se lient aux récepteurs sur la surface des cellules, ayant comme résultat primaire l'activation de la prolifération et/ou la différenciation cellulaire. Par ailleurs, certains facteurs de croissance stimulent la division cellulaire de plusieurs types de cellules différentes, tandis que d'autres sont spécifiques à un type particulier de cellule (Tableau 3).

Les tableaux suivants donnent la description de plusieurs facteurs de croissance ainsi que leurs actions principales.

**Tableau no. 3 : Facteurs de croissance avec leurs activités**

<b>Facteur</b>	<b>Source Principale</b>	<b>Activité Primaire</b>	<b>Commentaires</b>
PDGF	Plaquettes, cellules endothéliales, placenta	Favorise la prolifération des cellules conjonctives du tissu glial et des muscles lisses	Deux chaînes différentes de protéines forment trois formes distinctes de dimère ; AA, AB et BB
EGF	Glande sous maxillaire, glande de Brunners	Favorise la prolifération des cellules mésenchymateuses du tissu glial et des cellules épithéliales	
TGF- $\beta$	Commune dans la cellule transformée	Important pour une guérison normale	Lié aux EGFs
FGF	Éventail de cellules ; la protéine est associée à la matrice extracellulaire	Favorise la prolifération de plusieurs cellules; inhibe quelques cellules souches; induit la formation du mésoderme chez l'embryon	Au moins 19 familles de membres, 4 récepteurs distincts
Érythropoïétin	Rein	Favorise la prolifération et la différenciation des érythrocytes	
TGF- $\beta$	Cellule TH <sub>1</sub> activée (T-helper) et cellule NK (natural killer)	Anti-inflammatoires (supprime la production des cytokines et l'expression de class II MHC); favorise la guérison de la plaie; inhibe la prolifération des macrophages et lymphocytes	Au moins 100 membres différents d'une famille
IGF-I	Foie	Favorise la prolifération de plusieurs types cellulaires	Liée à l'IGF-II et proinsulin, nommée Somatomedin C
IGF-II	Variété de cellules	Favorise la prolifération de plusieurs types cellulaires, spécialement d'origine fœtale	Liée à l'IGF-I et proinsulin

Les cytokines forment une famille unique de facteurs de croissance. Elles sont principalement sécrétées par les leucocytes et stimulent les réactions immunes, humorales, cellulaires ainsi que l'activation des cellules phagocytaires. Les cytokines sécrétées par les lymphocytes s'appellent des lymphokines, tandis que celles sécrétées par les monocytes ou les macrophages se nomment monokines. Plusieurs des lymphokines sont également connues comme interleukines (ILs), car elles sont sécrétées par des leucocytes et également capables d'influencer les réponses cellulaires des leucocytes. (Tableau 5) Les interleukines sont des facteurs de croissance qui visent les cellules d'origine hématopoïétique.

**Tableau 4 : Les interférons et leurs activités**

<b>Interférons</b>	<b>Source Principale</b>	<b>Activité</b>
<b>INF-<math>\alpha</math> et -<math>\beta</math></b>	Macrophages, neutrophiles et quelques cellules somatiques	Effets antiviraux; Induction de classe I MHC sur toutes les cellules somatiques; Activation des cellules NK et des macrophages
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Cellule TH <sub>1</sub> activée et cellule NK	Induit la classe I MHC sur toutes les cellules somatiques, induit la classe II MHC sur APCs et les cellules somatiques; Active les macrophages, neutrophiles, cellules NK; Favorise l'immunité à médiation cellulaire; Effets antiviraux

**Tableau 5 : Les Interleukines et leurs activités.**

<b>Interleukines</b>	<b>Source Principale</b>	<b>Activité</b>
<b>IL1-<math>\alpha</math> et -<math>\beta</math></b>	Macrophages et autres antigènes cellulaires (APCs)	Stimulation des cellules d'APCs et de T, inflammation et fièvre, réponse de phase aiguë, hématopoïèse.
<b>IL-2</b>	Cellule TH <sub>1</sub> activée et cellule NK	Prolifération de cellules B et de cellules T activées, fonction NK
<b>IL-3</b>	Cellules T activées	Croissance des cellules hématopoïétiques
<b>IL-4</b>	TH <sub>2</sub> et mastocytes	Prolifération de cellules B, croissance et fonction des éosinophiles et de mastocyte, IgE et expression de la classe II MHC sur des cellules B, inhibition de la production de monokine
<b>IL-5</b>	TH <sub>2</sub> et mastocyte	Croissance et fonction d'éosinophilie
<b>IL-6</b>	Cellule TH <sub>2</sub> activée, APCs, autre cellule somatique	Réponse de phase aiguë prolifération de cellules B, thrombopoïèse, synergiste avec IL-1 et TNF sur les cellules T
<b>IL-7</b>	Cellules de thymus et cellules somatiques	Lymphopoïèse de cellules T et B
<b>IL-8</b>	Macrophages, autre cellule somatique	Chémoattractif pour neutrophiles et cellules T
<b>IL-9</b>	Cellules T	Effets hématopoïétiques et thymopoïétiques
<b>IL-10</b>	Cellule TH <sub>2</sub> activée, CD8 <sup>+</sup> T et B, macrophages	empêche la production de cytokine, favorise la prolifération de cellules B et la production d'anticorps, supprime l'immunité cellulaire, croissance de mastocytes
<b>IL-11</b>	Cellules somatiques	Effets synergiques hématopoïétiques et thrombopoïétiques
<b>IL-12</b>	Cellule B, macrophages	La prolifération des cellules NK, la production INF- $\gamma$ , favorise les fonctions d'immunité à médiation cellulaire
<b>IL-13</b>	Cellule TH <sub>2</sub>	Activités IL-4 'like'



### **Bone morphogenic proteins (BMP)**

Bien qu'il soit connu que des petits morceaux d'os sains peuvent stimuler la guérison de fractures (accélération de la formation du calus), la nature du mécanisme régénérateur est demeurée un mystère jusqu'en 1965, année au cours de laquelle le Dr. Marshall Urist implanta un os déminéralisé et pulvérisé dans un muscle de lapin. L'os s'est ensuite formé au site d'implantation. Le Dr. Urist a nommé la protéine responsable de ce phénomène la «bone morphogenic protein» (BMP). Les BMPs sont des facteurs régulateurs de croissance des os membres de la grande famille des TGF -  $\beta$ . Ils sont synthétisés sous la forme d'une grande molécule annonciatrice, qui est ensuite activée par clivage protéolytique. La forme active peut être soit un dimère composé de deux protéines identiques, soit un hétérodimère composé de deux BMPs connexes. Ces protéines ont un rôle important à jouer durant le développement embryonnaire et la formation squelettique car la perturbation de la signalisation des BMPs peut affecter le développement de l'embryon.

Les membres de la famille des BMPs sont potentiellement utiles comme adjuvants thérapeutiques dans des secteurs comme la fusion spinale. Au niveau clinique, l'utilité de BMP-2 et de BMP-7 a été démontrée par des études cliniques, à l'aide de traitements liés à une série de conditions associées à l'os qui comptent parmi elles : l'union retardée et les

fractures de type non-union. Les BMP-2 et les BMP-7 ont d'ailleurs reçu l'approbation de la "Food and Drug Administration" (FDA) pour leur utilisation clinique.

### **Epidermal Growth Factor (EGF)**

Le facteur EGF, comme tous les facteurs de croissance, s'attache à des récepteurs qui possèdent une haute affinité spécifique, présents à la surface des cellules répondantes. La qualité intrinsèque du récepteur d'EGF correspond à une activité de la tyrosine kinase, qui est activée au moment où l'EGF est attaché.

L'activité de la tyrosine kinase d'EGF, aussi bien que celle d'autres protéines, entraîne la phosphorylation du récepteur d'EGF (auto-phosphorylation), dans une cascade des signaux de transduction qui s'associent au récepteur après son activation. L'EGF a des effets prolifératifs sur les cellules d'origine mésodermique et ectodermique, en particulier sur les kératinocytes et les fibroblastes. L'EGF montre des effets négatifs de croissance sur certaines cellules carcinomateuses ainsi que sur les cellules folliculaires des poils.

Les réponses liées à la croissance cellulaire des EGFs incluent l'induction de l'expression nucléaire des proto-oncogènes tel que le Fos, le Jun et le Myc. L'EGF a également comme effet la diminution de la sécrétion d'acide gastrique.

## **Fibroblast Growth Factors (FGFs)**

Il y a maintenant vingt-trois (23) membres distincts dans la famille des FGFs. Les deux premiers FGFs ont été identifiés par analyse biologique et se nomment FGF1 (acidique-FGF, aFGF) et FGF2 (basique-FGF, bFGF).

Les FGFs interagissent avec les récepteurs spécifiques sur la surface cellulaire. Il existe quatre types de récepteurs identifiés comme FGFR1 à FGFR4. Chacun de ces récepteurs possède une activité intrinsèque de la tyrosine kinase, comme c'est le cas des récepteurs d'EGF et de PDGF. L'auto-phosphorylation est la réponse immédiate du récepteur suite à la liaison des FGFs.

Après l'activation des récepteurs du FGF, de nombreuses protéines de transduction s'associent à ceux-ci et deviennent phosphorylées. Le récepteur FGFR1 s'est également avéré le portail d'entrée vers certaines cellules pour des virus herpétiques. Les FGFs se lient également à la surface des protéoglycans héparin-sulfatés avec une affinité relativement faible comparée à celle des récepteurs spécifiques. Le rôle de cette liaison entre les protéoglycans et le FGF n'est pas entièrement compris, mais nous savons qu'elle permet au facteur de croissance de demeurer associé à la surface extracellulaire et d'agir localement dans des conditions diverses.

Les récepteurs de FGFs sont souvent exprimés dans l'os et sont impliqués dans plusieurs maladies autosomales dominantes suite à des mutations géniques codants pour l'un des quatre FGFRs. La maladie la plus connue est l'achondroplasie (ACH). Celle-ci est caractérisée par une petite stature d'apparence disproportionnée, donnant lieu à des membres plus courts que le tronc, et à une macrocéphalie, soit l'augmentation pathologique du volume de la tête. La plupart des personnes atteintes de l'ACH présente une substitution de glycine à l'arginine dans le domaine transmembranaire du FGFR3. Cette mutation a comme conséquence l'activation ligand-indépendante du récepteur. Le FGFR3 est principalement exprimé dans les chondrocytes où il est responsable de la limitation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Chez les souris, suite à des mutations inactives dans le FGFR3, on remarque une augmentation de la croissance des os longs. De plus, les zones prolifératives de la plaque de croissance du cartilage démontrent que le FGFR3 est nécessaire pour commander le taux et la quantité de croissance des chondrocytes. Plusieurs autres désordres de croissance osseuse (p.ex. des syndromes de craniosynostosis) ont été identifiés suite à des mutations dans le FGFR1, le FGFR2 et le FGFR3.

### **Transforming Growth Factors- $\beta$ (TGFs- $\beta$ )**

Le TGF- $\beta$  fut à l'origine caractérisé comme une protéine, sécrétée par une variété de cellules tumorales, qui était capable d'induire en culture la transformation de cellules non-

néoplastiques. Cet effet est toutefois réversible, comme le démontre le retour des cellules à un phénotype normal après le déplacement du TGF- $\beta$ . Par la suite, plusieurs protéines homologues au TGF- $\beta$  ont été identifiées. Les quatre qui lui ressemblent le plus sont le TGF- $\beta$  -1 (le TGF- $\beta$  original), allant jusqu'au TGF- $\beta$  -5 (TGF- $\beta$  -1 = TGF- $\beta$  -4). Chacune de ces protéines partage des régions similaires dans leurs chaînes d'acides aminés.

La famille des TGF- $\beta$  inclut les protéines d'Activin et d'Inhibin. Il y a l'Activin A, l'Activin B et aussi les protéines AB, soit les protéines d'Inhibin A et d'Inhibin B. La « Mullerian inhibiting substance » (MIS) est également une protéine apparentée au TGF- $\beta$ , de même qu'avec les membres de la famille des BMPs. Il existe plusieurs classes de récepteurs de surface cellulaire qui lient différents TGFs- $\beta$  à des affinités différentes. On trouve également des différences spécifiques dans les sous-types de récepteurs. Tous les membres de la famille TGF -  $\beta$  ont des récepteurs d'activité intrinsèque de sérine/thréonine-kinase et induisent, par conséquent, des cascades distinctes de signaux de transduction.

Le TGF- $\beta$  a des effets prolifératifs sur beaucoup de types de cellules mésenchymateuses et épithéliales. Selon certaines conditions, les TGFs- $\beta$  peuvent démontrer des effets anti-prolifératifs sur des cellules endothéliales, des macrophages, et des lymphocytes T et B.

De tels effets incluent la diminution de la sécrétion de l'immunoglobuline et la suppression de l'hématopoïèse, de la myogénèse, de l'adipogénèse et de la genèse d'hormones stéroïdiennes adrénaliennes. Plusieurs membres de la famille des TGFs- $\beta$  sont

des inducteurs efficaces de la différenciation mésodermique embryonnaire, en particulier le TGF- $\beta$  et l'Activin A.

### **Transforming Growth Factor- $\alpha$ (TGF- $\alpha$ )**

Le TGF- $\alpha$ , a été identifié pour la première fois comme une substance sécrétée par certaines cellules tumorales qui, de même façon que le TGF- $\beta$  -1, pourrait réversiblement transformer en culture certains types de cellules normales. Le TGF- $\alpha$  s'attache à des récepteurs d'EGF aussi bien qu'à son propre récepteur distinct, et cette interaction semble être responsable de l'effet de ce facteur de croissance. Les sources prédominantes de TGF- $\alpha$  sont les carcinomes, mais les macrophages activés et les kératinocytes (et probablement d'autres cellules épithéliales) sécrètent également du TGF- $\alpha$ . Dans les populations normales de cellules, le TGF- $\alpha$  est un facteur efficace de croissance pour les kératinocytes.

### **Erythropoietin (Epo)**

L'EPO est synthétisé par le rein et est le régulateur principal de l'érythropoïèse. Il stimule également la prolifération et la différenciation des érythrocytes immatures et la croissance des cellules souches d'érythroïde (p.ex : Des érythrocytes « burst-forming » et des érythrocytes qui forment des colonies) et induit la différenciation des érythrocytes qui forment des colonies dans les proérythroblasts. Son action s'effectue sur les cellules

érythroblastiques de la moelle osseuse par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Quand des patients souffrent d'anémie, l'érythropoïétine vient stimuler la prolifération des cellules souches précurseurs des hématies au niveau de la moelle osseuse. L'injection d'EPO, augmente aussi rapidement le nombre de globules rouges.

### **Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I)**

L'IGF-I (originellement appelé la somatomedin C) est un facteur de croissance structurellement lié à l'insuline. Il est la protéine primaire impliquée dans les réponses des cellules à l'hormone de croissance (GH). Ainsi, l'IGF-I est produit en réponse au GH et est induit lors des activités cellulaires, en particulier lors de la croissance osseuse. C'est l'activité d'IGF-I en réponse au GH qui a donné le nom de somatomedin. Cependant, quelques études ont démontré que l'IGF-I a des activités autocrines et paracrines en plus d'activités endocriniennes, observées au tout début sur le tissu osseux.

En raison de leurs similitudes structurales, les IGFs-I peuvent s'attacher au récepteur d'insuline, avec toutefois une affinité moindre que l'insuline.

### **Insulin-Like Growth Factor-II (IGF-II)**

L'IGF-II est presque exclusivement exprimé par les tissus embryonnaires et néonataux. Après la naissance, le niveau de la protéine discernable d'IGF-II chute de manière significative. Pour cette raison, l'IGF-II est reconnu comme un facteur foetal de croissance. Le récepteur d'IGF-II est identique au récepteur de mannose-6-phosphate, qui est responsable de l'intégration des enzymes lysosomaux (qui contiennent des résidus de mannose-6-phosphate) aux lysosomes.

### **Interleukin-1 (IL-1)**

L'IL-1 est une interleukine de modification de réaction immunologique. La fonction principale de l'IL-1 est d'augmenter l'activation des cellules T en réponse à l'antigène. Cette activation mène à une plus grande production de cellules T d'IL-2 et du récepteur IL-2, ce qui augmente alternativement l'activation des cellules T dans une boucle autocrine. Des taux de formation d'os plus élevé chez les sujets ostéoporotiques avec une IL-1 élevée suggère que les IL peuvent être responsables, du moins en partie, du « turn-over » osseux accéléré.



L'IL-1 induit également l'expression d'interférons  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) par des cellules T. Cet effet d'activation des cellules T par IL-1 est imité par TNF- $\alpha$ , une autre cytokine sécrétée par les macrophages activés. On distingue deux types d'IL-1, l'IL-1- $\alpha$  et l'IL-1  $\beta$ , qui sont à 26% homologues au niveau des acides aminés.

Les IL-1s sont sécrétées principalement par les macrophages, mais également par les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules gliales, les astrocytes, les cellules T et B, les fibroblastes et les kératinocytes. La production d'IL-1 par ces différents types de cellules survient seulement en réponse à la stimulation cellulaire. En plus de ses effets sur les cellules T, l'IL-1 peut induire la prolifération des cellules non lymphoïdes.

### **Interleukin-2 (IL-2)**

L'IL-2, produite et sécrétée par les cellules T activées, est l'interleukine principalement responsable de la prolifération clonale des cellules T. L'IL-2 exerce également des effets sur les cellules B, les macrophages et les cellules « natural killer » (NK). La production d'IL-2 est effectuée principalement par des cellules T-helper CD4+. Comme indiqué ci-dessus, l'expression d'IL-2 et du récepteur IL-2 par des cellules T est induite par l'IL-1. En effet, le récepteur IL-2 n'est pas exprimé sur la surface des cellules T de repos (resting t cells) et il est seulement présent de façon transitoire sur la surface des cellules T, disparaissant dans les 6 à 10 jours de la présentation antigénique. Contrairement

aux cellules T-helper, les NKs expriment les récepteurs ILs-2 en sécrétant des TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et GM-CSF, en réponse à l'IL-2, qui activent à leur tour les macrophages. Les ILs-2 (comme les ILs-1) ont été étudiées pour leur rôle de stimulateur de la résorption osseuse *in vitro*.

### **Interleukin-6 (IL-6)**

L'IL-6 est produit par des macrophages, des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules activées T-helper. Même si son rôle dans l'absorption osseuse n'est pas bien défini, il a été démontré que l'IL-6 est impliqué dans la pathogenèse de plusieurs maladies osseuses caractérisées par un déséquilibre dans la formation de l'os. L'IL-6 agit par ailleurs synergiquement avec l'IL-1 et le TNF dans plusieurs réactions immunologiques, y compris l'activation de cellules T. Plus spécifiquement, l'IL-6 est l'inducteur primaire de la réponse de la phase aiguë dans le foie. Il augmente également la différenciation des cellules B et leur production d'immunoglobulines. La synthèse des glucocorticoïdes est également augmentée par celui-ci. Contrairement aux IL-1, IL-2 et TNF- $\alpha$ , l'IL-6 n'induit pas l'expression de cytokine. Il a donc pour effet d'augmenter les réponses des cellules immunisées à d'autres cytokines.

### **Platelet-derived growth factor (PDGF)**

Le PDGF est synthétisé principalement par les mégakaryocytes. Il est stocké dans les plaquettes (les granules alpha) desquelles il est libéré après l'activation plaquettaire par la thrombine.

D'autres types de cellules synthétisent également le PDGF dont les macrophages, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules gliales, les astrocytes, les myoblasts, les cellules musculaires lisses, et un certain nombre de cellules tumorales. Il se compose de plus de deux chaînes distinctes de polypeptides, A et B, qui forment des homodimères (AA 10% ou BB 20%) ou des hétérodimères (AB 70%). Le proto-oncogène c-Sis s'est avéré homologue à la chaîne de PDGF A. Il n'y a que les formes dimériques de PDGF qui agissent sur le récepteur de PDGF. Deux classes distinctes de ces récepteurs ont été clonées : une classe spécifique pour les homodimères AA et une autre qui lie les dimères BB et AB. Suite à l'autophosphorylation du récepteur PDGF, de nombreuses protéines de transduction s'associent au récepteur et sont plus tard phosphorylées par la tyrosine. Des réponses de prolifération à l'action du PDGF sont exercées sur beaucoup de cellules de types mésenchymateuses. De plus, comme l'EGF, le PDGF induit l'expression d'un certain nombre de proto-oncogènes ayant une localisation nucléaire, tels que les Fos, Myc et Jun.

Les effets primaires de TGF- $\beta$  sont dus à l'induction par TGF- $\beta$  de l'expression de PDGF. IL1, IL6, TNF-alpha, TGF- $\beta$  et EGF peuvent induire la synthèse de PDGF.

Contrairement à beaucoup d'autres cytokines, PDGF n'est pas envoyé dans la circulation.

La demi-vie biologique du PDGF est moins de deux minutes après l'administration intraveineuse. Plusieurs études ont montré que le PDGF s'attache à des récepteurs spécifiques au niveau des ostéoblastes aidant à la prolifération cellulaire.

Le PDGF s'attache à plusieurs protéines plasmatiques et également aux protéines de la matrice cellulaire, ce qui facilite la concentration locale du facteur. Ce facteur fonctionne comme un facteur local de croissance autocrine et paracrine. Dans l'organisme adulte, le PDGF est impliqué dans des processus de guérison de la plaie. On observe l'expression anormale de PDGF avec les maladies prolifératives vasculaires telles que l'athérosclérose.

Le PDGF et le PDGF-like sont des facteurs de croissance autocrine pour des méningiomes.

### **Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  (également appelé le cachectin), comme IL-1 produit une réaction immunologique importante : la modification des cytokines produite principalement par les macrophages activés. Comme IL-1, TNF- $\alpha$  induit l'expression autocrine d'autres facteurs de croissance, il augmente la réponse cellulaire des facteurs de croissance et il induit les voies de la signalisation (signaling pathways) qui mènent à la prolifération cellulaire, y compris la prolifération des ostéoblastes. TNF- $\alpha$  agit en synergie avec EGF et PDGF sur quelques types de cellules. Comme d'autres facteurs de croissance, TNF- $\alpha$  induit

l'expression d'un certain nombre de proto-oncogènes nucléaires et de plusieurs interleukines.

### **Tumor Necrosis Factor- $\beta$ (TNF- $\beta$ )**

TNF- $\beta$  (également appelé le lymphotoxin) est caractérisé par sa capacité de détruire (tuer) différents types de cellules, en ayant aussi la capacité d'induire la différenciation terminale de certaines autres. Une réponse non-proliférative significative à TNF- $\beta$  est une inhibition de la lipase de la lipoprotéine présente sur la surface des cellules endothéliales vasculaires. L'emplacement prédominant de la synthèse de TNF- $\beta$  est dans les lymphocytes T, en particulier la classe spéciale des cellules T appelées les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). L'induction de l'expression de TNF- $\beta$  résulte de l'augmentation de la concentration de IL-2 et de l'interaction de l'antigène avec les récepteurs des cellules T.

### **Vascular endothelial growth factor (VEGF)**

VEGF est un facteur mitogénique fortement spécifique pour les cellules endothéliales vasculaires. Les différentes iso-formes de VEGF ont différentes propriétés *in vitro* et ceci peut s'appliquer également à leurs fonctions *in vivo*. VEGF influence de manière significative la perméabilité vasculaire et est une protéine angiogénique forte dans

plusieurs essais biologiques. Elle joue aussi probablement un rôle dans la néo-vascularisation physiologique. Il existe un synergisme efficace entre VEGF et  $\beta$ -FGF dans l'induction de l'angiogénèse. Certaines études ont suggéré que le VEGF, libéré des cellules musculaires lisses et des macrophages, puisse jouer un rôle dans le développement des maladies artériosclérotiques.

### **3.2. Plasma riche en plaquettes (PRP)**

Les chirurgiens recherchent continuellement des manières d'améliorer le succès de la greffe osseuse avec l'os autogène ou d'autres produits de remplacement. Le processus curatif de la blessure est un mécanisme complexe caractérisé par quatre phases distinctes: hémostase, inflammation, prolifération et transformation du tissu (remodelage) (Diegelmann and Evans 2004). La phase proliférative inclut la formation de vaisseaux sanguins par les cellules endothéliales et la synthèse osseuse par les ostéoblastes. Tous ces événements sont coordonnés par des interactions de type cellule-cellule et par des facteurs de croissance solubles libérés par de divers types de cellules.

Le plasma riche en plaquettes (PRP) a été présenté pour la première fois à la communauté de chirurgie orale, en 1997 par Whitman et al, avec leur article « Platelet Gel: An Autologous Alternative to Fibrin Glue With Applications in Oral and Maxillofacial Surgery.» Les auteurs pensent que « par l'activation des plaquettes dans le gel et le dégagement résultant des facteurs de croissance, la guérison de la blessure devrait être prévue ». Le PRP a bénéficié d'une grande augmentation de popularité dans la communauté de chirurgiens buco-maxillo-faciaux, après la publication d'un article par Marx et al, en 1998. L'étude de Marx et al a montré que la combinaison de PRP avec la greffe osseuse autogène, dans des défauts mandibulaires de continuité, a eu comme conséquence une maturation radiographique sensiblement plus rapide et une régénération

histomorphométrique plus dense de l'os. Un moyen de fournir des quantités concentrées de facteur de croissance au niveau de la blessure est par l'utilisation du plasma riche en plaquettes (PRP).

Le plasma riche en plaquettes (PRP) est une concentration augmentée, autologue de plaquettes humaines dans un petit volume de plasma. Par conséquent, le terme PRP est préféré aux termes : gel autologue de plaquette, facteurs de croissance riches plasmatiques (plasma-rich growth factors – PRGFs) ou concentré de plaquette autologue. Puisque c'est une concentration de plaquettes, le PRP contient également une concentration des sept facteurs fondamentaux de croissance (protéines) avérés être activement sécrétés par des plaquettes pour lancer le travail de guérison. En addition à l'hémostase et à l'inflammation, des plaquettes sont impliquées dans le processus de guérison et de réparation des tissus minéralisés (Gentry). En concentrant les plaquettes et en les livrant localement, on pourrait atteindre un niveau accru de facteurs de croissance permettant de stimuler le processus curatif de l'os d'une manière physiologique plutôt que la livraison d'un simple facteur de croissance (Marx, Carlson et al. ; Kim, Chung et al.)

Les résultats cliniques et histologiques récents suggèrent que l'utilisation des concentrats plaquettaires a des avantages techniques et pourrait augmenter la régénération osseuse une fois utilisée en même temps que les greffes osseuses autologues, les allogreffes osseuses sèches congelées ou la substance de substitution osseuse alloplastique. Les PRPs ont été appliqués et bien étudiés dans les domaines : orthopédique; chirurgie



plastique, chirurgie maxillo-faciale et chirurgie d'implant oral. Récemment, ils ont été utilisés dans le domaine de la chirurgie périodontique afin de faciliter la régénération du tissu périodontique.

La thrombine représente un inducteur d'activation de plaquettes menant au dégagement des facteurs de croissance (Furman, Liu et al.). Ils ont des données qui montrent également que les greffes, une fois combinées avec calcium et le PRP traité à la thrombine, possèdent des caractéristiques de manipulation et un contenu plus élevé de facteurs de croissance (Tayapongsak, O'Brien et al. ; Marx, Carlson et al. ; Froum, Wallace et al. ; Weibrich, Kleis et al.). Les concentrations de PRP optimales pour favoriser la guérison et la régénération des tissus demeurent empiriques et méconnues. On suppose que le PRP agirait d'une façon semblable à différents facteurs de croissance et que les préparations contenant la concentration maximale de facteurs de croissance sont idéales. La théorie qui soutient l'utilisation de PRP est incontestable. Il est maintenant bien connu que les plaquettes aient beaucoup de fonctions au-delà de la simple hémostasie. Les plaquettes contiennent les facteurs importants de croissance qui, une fois sécrétés, sont responsables d'augmenter la mitose cellulaire, la production de collagène et le recrutement d'autres cellules au niveau de la blessure, en initiant la croissance vasculaire, et en induisant la différenciation cellulaire. Ce sont toutes des étapes cruciales dans le début du processus curatif. L'augmentation de la concentration des plaquettes lors d'une blessure peut favoriser plus rapidement et mieux le processus curatif. Il semble très logique que l'augmentation de la concentration des plaquettes dans une greffe osseuse, donc l'augmentation de la

concentration des facteurs de croissance, puisse conduire à une régénération osseuse plus rapide et plus dense.

PRP fonctionne par l'intermédiaire de la dégranulation des granules  $\alpha$  plaquettaires, qui contiennent les facteurs synthétisés et préemballés de croissance. La sécrétion active de ces facteurs de croissance est lancée par le processus de coagulation du sang et commence dans un délai de 10 minutes après la coagulation. Plus de 95% des facteurs de croissance pré-synthétisés sont sécrétés dans un délai d'une heure. Par conséquent, PRP doit être amené dans l'état anticoagulé et devrait être employé sur la greffe ou la blessure, dans un délai de 10 minutes après le déclenchement de la coagulation.

Quand le processus de coagulation active les plaquettes, les facteurs de croissance sont sécrétés en dehors de la cellule par la membrane cellulaire. Les facteurs de croissance sécrétés se lient immédiatement sur la surface externe des membranes cellulaires par l'intermédiaire des récepteurs transmembranaires. Les ostéoblastes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épidermiques expriment les récepteurs membranaires cellulaires aux facteurs de croissance dans les PRP. Ces récepteurs transmembranaires induisent une activation d'une protéine interne endogène, qui cause l'expression d'une séquence normale génétique de la cellule, telle que la prolifération, la formation de matrice, la production d'ostéoïde ou la synthèse de collagène, etc.

### 3.3 Insulin growth factor (IGF)

L'axe de l'hormone de croissance (GH) /insulin-like growth factor (IGF-I et IGF-II) est important dans le règlement de la croissance et du développement. IGF-I et IGF-II sont les facteurs de croissance les plus abondants produits par des ostéoblastes, et exercent des effets importants sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose des ostéoblastes. En conséquence, les souris qui manquent d'IGF-I fonctionnel montrent une insuffisance grave dans l'ostéogénèse et un déficit de 60% dans la densité minérale maximale osseuse (BMD - bone mineral density) (Mohan, Richman et al.).

De plus, les patients présentant un désordre du gène d'IGF-I exhibent une diminution de leur densité osseuse variant de cinq à six écarts type plus bas que les sujets normaux d'âge comparable (Woods, Camacho-Hubner et al.). Les mécanismes par lesquels les actions d'IGF sont réglées dans l'os et d'autres tissus, suggèrent que le système d'IGF est pléiotrophique et conçu par de multiples composants, qui incluent le GH, IGF-I, IGF-II, le type I et II de récepteurs d'IGF, six protéines attachants à haute affinité pour IGF (IGFBPs – IGF binding proteins), la protéase d'IGFBP et des protéases d'inhibition et d'activation d'IGFBP (Mohan, Baylink et al.).

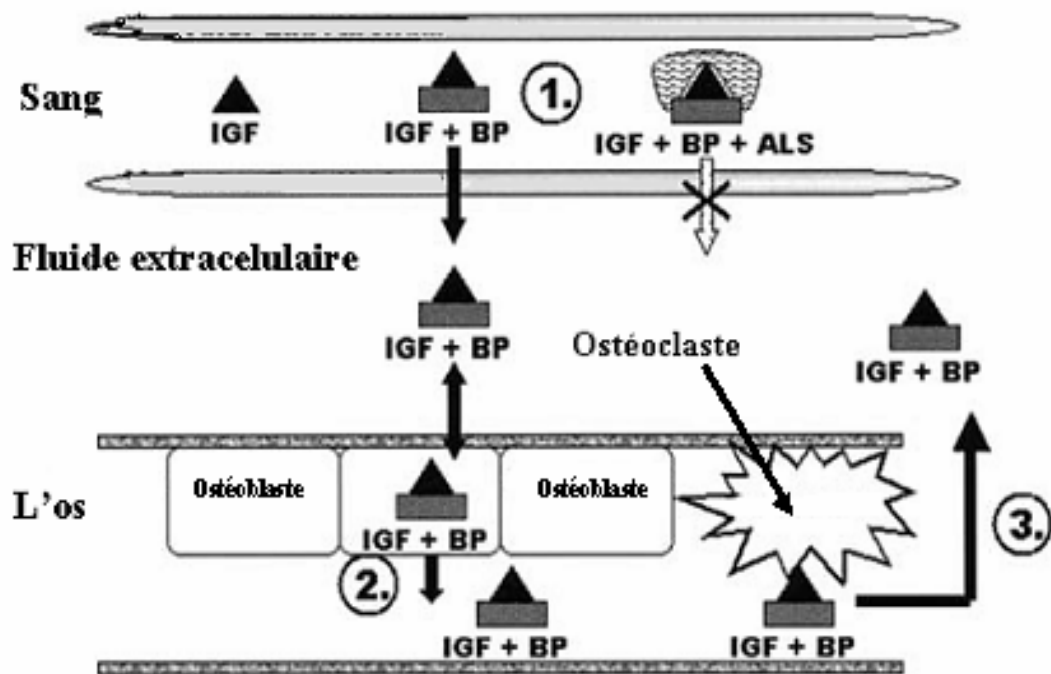
Généralement le GH stimule le dégagement de IGF du foie, et les IGFs ont des effets endocriniens. Cependant, beaucoup de tissus, tels que l'os, le muscle, et la graisse,

sécrètent de l'IGF. Jusqu'à récemment, on a cru que IGF-I sécrété par le foie était nécessaire pour la croissance normale pré et postnatale, puisque l'inactivation générique de l'IGF 1 chez la souris diminue la croissance et le développement des os et que beaucoup d'entre elles décédaient tôt après la naissance (Baker, Liu et al.). L'IGFs (IGF-I et - II) sont les facteurs de croissance les plus abondants stockés dans l'os et produits par les ostéoblastes (Mohan and Baylink).

L'IGFs sont également produits par les ostéoclastes et agissent d'une façon autocrine/paracrine pour régler la résorption et/ou l'ostéogénèse. Peu d'expériences ont examiné le rôle d'IGF-I dans la résorption osseuse. Pendant des périodes de croissance, telles que la puberté ou après les traitements avec GH, des concentrations sériques d'IGF-I sont directement corrélées avec des marqueurs d'ostéogénèse, tel que l'ostéocalcin et la phosphatase alcaline (ALPES) (Boonen, Mohan et al.). La formation osseuse est augmentée par les IGFs en réglant la prolifération, la différenciation et l'apoptose des ostéoblastes (Amaar, Thompson et al.).

Au niveau osseux, la première action de l'IGF est de s'attacher au récepteur de type I. Les IGFBPs règlent l'IGFs en empêchant leur attachement au récepteur et/ou en réglant la quantité d'IGF dans la circulation tissulaire locale. Les IGFs ne peuvent pas agir quand ils sont attachés aux IGFBPs et aussi les IGFBPs doivent également être régulés. Les IGFBPs sont régulés par des protéases spécifiques qui clivent les IGFBPs, (Figure 13) ce qui a pour effet de réduire nettement leur affinité pour les IGFs. L'IGF est alors libéré et peut

s'attacher à son récepteur. Ainsi, la nature pléiotrophique du système d'IGF permet à l'organisme de régler exactement les actions de l'IGF selon les besoins systémiques et locaux.



**Figure 13 : Modèle des actions systémiques et locales de IGF-BPs dans l'os.** Des cellules osseuses sont exposées aux composants du système d'IGF (1) composants du système d'IGF du sang, qui représente une source systémique ; (2) composants du système d'IGF des ostéoblastes, qui représente une source locale ; et (3) IGFs et IGF-BPs libérés par l'os pendant la résorption par l'ostéoclaste, qui représente également une source locale (Govoni, Baylink et al.).

Les IGF-1 et IGF-2 sont les deux facteurs de croissance les plus abondants dans la matrice osseuse. Les deux facteurs de croissance stimulent la formation osseuse et la différenciation d'adipocytes, la possibilité que les effets des glucocorticoïdes sur l'os et la différenciation d'adipocytes dans les populations de cellules osseuses – dérivées (bone-derived cells) pourraient être médiées, au moins en partie, par des effets du système d'IGF. (Jia and Heersche)

Les IGF-1 et IGF-2 stimulent la prolifération de cellules et la synthèse de protéines matricielles dans les ostéoblastes du rat cultivé et dans les cellules humaines d'ostéosarcome et ont stimulé l'ostéogénèse *in vivo* chez les rats et les humains. IGFs stimulent également la différenciation des adipocytes : IGF-1 induit la différenciation des cellules 3T3-F442A dans des adipocytes, (Christoffersen, Tornqvist et al. 1998). Les effets des glucocorticoids sur l'expression d'IGF-1 et IGF-2, le type 1 et 2 récepteurs d'IGF (IGF-1R et IGF-2R) et les protéines d'attachement des IGF (IGFBPs) ont été étudiés dans une variété de systèmes. Par exemple, des glucocorticoïdes ont été montrés pour stimuler l'activité du promoteur (promoteractivity) du gène IGF-2 dans les cultures de fibroblastes embryonnaires de la souris (Dell, Ward et al. 1997) et pour stimuler l'accumulation du IGF-2 mRNA dans les cellules myogènes C2C12 de la souris. Par contre, l'inhibition par le cortisol de la production IGF-1 a été trouvée en cultures de granulocytes porcins et l'inhibition de la production d'IGF-1 et d'IGF-2 a été trouvée dans le tissu du poumon des rats nouveau-nés traités avec le dexaméthasone (Dex) pendant la gestation. (Oue, Taira et al. 1999).

Les glucocorticoïdes stimulent également la transcription d'IGF-1R dans les cultures de granulocytes porcins et dans le foie de fœtus de rats. En outre, les glucocorticoïdes empêchent la transcription IGFBP-5 et stimulent l'expression de protéin 1 connexe à IGFBP (IGFPB-related protein 1) - dans les cultures de cellules du calvaria de fœtus de rat et diminuent les niveaux du IGFBP-6 mRNA et du niveau des protéines en cellules de phéochromocytome de rat. (Pereira and Canalis 1999).

L'axe GH-IGF1 joue un rôle essentiel dans la croissance squelettique. L'hormone de croissance (GH) a une sécrétion augmentée pendant la puberté. Le GH, en plus d'IGF-1, a également des effets directs sur différents types de cellules osseuses, en stimulant autant la croissance osseuse que la masse osseuse. Le premier événement de l'action de GH lié au GHR (récepteur) mène à l'activation de la voie de JAK-STAT et à la transcription suivante du gène IGF1 et d'autres gènes GH-dépendants. Les mutations du gène de GHR causent une insensibilité de GH appelé syndrome de nanisme de type Laron, qui est caractérisé par une petite stature, un aspect facial spécifique, des niveaux élevés de GH sérique et des niveaux diminués d'IGF1. (Savage, Camacho-Hubner et al.) En outre, une baisse BMD a été aussi rapportée dans le nanisme de type Laron.

### **3.4. Vascular endothelial growth factor (VEGF)**

Le VEGF est une protéine de signalisation importante impliquée dans la vasculogénèse (la formation de novo du système circulatoire embryonnaire) et l'angiogénèse (la croissance des vaisseaux sanguins dans la vascularisation préexistante). Comme son nom l'indique, l'activité de VEGF a été la plupart du temps étudiée sur des cellules de l'endothélium vasculaire, bien qu'elle ait des effets sur un certain nombre d'autres types de cellules (par exemple sur la stimulation/migration des monocytes, macrophages, neurones, cellules cancérigènes, cellules épithéliales du rein). In vitro, VEGF stimule la mitogenèse et la migration de cellules endothéliales. Le VEGF est également un vasodilatateur et augmente la perméabilité micro-vasculaire. Pour cette raison il a été désigné à l'origine sous le nom de facteur vasculaire de perméabilité. L'angiogénèse, le développement d'un réseau micro-vasculaire pour l'approvisionnement de sang, est critique pour le développement, la régulation et pour le processus curatif (Folkman and Shing 1992) de tous les tissus cellulaires incluant le tissu osseux (Streeten and Brandi 1990) Dans la formation endochondrale osseuse, le cartilage avasculaire, qui précède l'os, peut produire des facteurs antiangiogéniques, alors que l'apparition des ostéoblastes coïncide avec l'invasion des vaisseaux sanguins (Carrington and Reddi 1991). En outre, des greffes osseuses vasculaires chirurgicales sont mieux intégrées que les tissus non vascularisés. Une réduction du débit sanguin dans le tissu osseux et des micro-



défauts vasculaires dans les compartiments sinusoïdaux ont été rapportés dans l'os ostéoporotique aussi bien que dans l'anémie aplastique. D'ailleurs, l'affaiblissement de l'approvisionnement vasculaire a comme conséquence la nécrose avasculaire de l'os (Cruess 1986) indiquant l'importance de l'angiogénèse pour le développement et l'entretien du tissu osseux.

Pendant la formation endochondrale osseuse, les cellules mésenchymateuses se différencient en chondrocytes, qui sécrètent un modèle de cartilage. Les chondrocytes aux centres de ces modèles de cartilage deviennent hypertrophiques et produisent le VEGF qui stimule l'invasion vasculaire du centre du cartilage. Pendant ce processus, les chondrocytes hypertrophiques meurent par apoptose et sont remplacés par des ostéoblastes (Wagner and Karsenty 2001).

Le VEGF est un dimère de glycoprotéine qui attache l'héparine et qui induit la prolifération de cellules endothéliales, l'angiogénèse, et la perméabilité capillaire (Leung, Cachianes et al. 1989). Le clonage des VEGF cDNA de plusieurs sources a démontré que quatre espèces moléculaires différents de VEGF sont produits par le couplage alternatif de mRNA (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, et VEGF<sub>206</sub>). VEGF est différent d'autres mitogènes endothéliaux identifiés par ses facteurs de croissance de fibroblaste (FGF), du fait que VEGF est une protéine mitogénique spécifique pour les cellules endothéliales in vitro et c'est le seul facteur connu de croissance dont l'activité induise la perméabilité vasculaire (Houck, Ferrara et al. 1991).

Le VEGF mRNA est exprimé dans une variété de tissus fortement vascularisés tels que la glande pituitaire, le cerveau, le poumon, le coeur et le rein. Dans le neuro-ectoderme ventriculaire de l'embryon de souris et dans l'ovaire de rat, l'expression de VEGF mRNA est liée au développement des capillaires, suggérant que VEGF soit un médiateur physiologique d'angiogénèse. (Phillips, Hains et al. 1990). En outre, les résultats récents dans le système reproducteur féminin de rat suggèrent que l'expression de VEGF mRNA soit réglée de façon hormonale par la production de stéroïde et de cellules stéroïde-sensibles.

L'angiogénèse est une partie cruciale de l'ostéogénèse et du processus de guérison de fractures (Collin-Osdoby 1994). Dans le squelette développant le modèle endochondral, le cartilage est remplacé par un tissu osseux intensément vascularisé (Carlevaro, Cermelli et al. 2000; Engsig, Chen et al. 2000). Les études récentes ont suggéré que le VEGF, un stimulateur angiogénique efficace, puisse jouer un rôle important pendant la formation endochondrale osseuse. En culture de cellules VEGF-A et VEGFR s'expriment dans des cellules humaines mésenchymateuses (hMSC) (Furumatsu, Shen et al. 2003). Au cours de l'embryogénèse, les vaisseaux sanguins se forment par deux processus, vasculogénèse et angiogénèse. La vasculogénèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins impliquant la différenciation de novo des cellules endothéliales dérivées de cellules précurseurs mésodermiques (angioblastes). Par contre, l'angiogénèse, appelée néovascularisation, est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant, avec le développement d'un arbre vasculaire en réponse à une

augmentation de la masse tissulaire (Risau 1997; Carmeliet 2005). Presque tous les tissus fonctionnels développent un système circulatoire par angiogénèse de germination ou non-germination pour former un plexus primaire de capillaires.

De plus, VEGF-A s'est avéré un chémo-attractant pour les cellules endothéliales (Streeten and Brandi 1990; Gerber, Vu et al.) et pour des ostéoclastes in vivo, envahissant les os longs pendant leur développement. (Engsig, Chen et al. 2000; Nakagawa, Kaneda et al. 2000). L'importance de l'angiogénèse est également reflétée dans les processus de la réparation osseuse, qui n'a pas été, cependant, étudiée en détail. Après des dommages osseux, une zone hypoxique est formée et l'on pense que l'angiogénèse est stimulée pour reconstituer l'apport de sang à l'emplacement de rupture lançant de ce fait le processus de réparation osseuse (Glowacki 1998; Ferguson, Alpern et al. 1999). Quelques études ont démontré en culture de cellules, que l'expression de VEGF-A est spécifiquement réglée sur l'ostéogénèse par l'hypoxie et aussi par un certain nombre de cytokines inflammatoires (Steinbrech, Mehrara et al. 2000; Akeno, Czyzyk-Krzeska et al. 2001). Une évidence plus directe pour le rôle physiologique de VEGF a été trouvée récemment, car l'administration de VEGF stimule la réparation osseuse et l'antagoniste sFLT-1 supprime la réparation osseuse, de ce fait il touche l'angiogénèse (Maes, Carmeliet et al. 2002; Street, Bao et al. 2002)

La néovascularisation est critique pour le transplant du tissu osseux puisque l'implantation des greffes volumineuses sans vaisseau suffisant, a comme conséquence la

mort hypoxique de cellules des tissus greffés et du cartilage. En conséquence, les stratégies qui augmentent l'angiogénèse devraient avoir des effets positifs.

Le rôle critique de l'angiogénèse pour l'ostéogénèse pendant l'ossification endochondrale et la réparation de la fracture, est bien documenté. Mayr-Wohlfart et al. ont étudié, en 2002, l'effet sur les ostéoblastes humains. Ils ont conclu que VEGF-A peut induire non seulement l'angiogénèse pour faciliter la formation osseuse, mais peut également stimuler ce processus d'une façon directe par induction de la prolifération et de la migration des ostéoblastes.

Le VEGF est un mitogène efficace pour les cellules endothéliales, et joue un rôle principal dans l'angiogénèse normale et pathologique. VEGF est sécrété par beaucoup de types de cellules, y compris des ostéoblastes et des cellules ostéoblast-like. De plus, son expression est réglée par plusieurs facteurs, hormones et cytokines de croissance ( IGF-1, prostaglandine E1 [PGE1], PGE2, - dihydroxyvitamin D3, hormone parathyroïde [PTH], et TGF- $\beta$ 1. ). En addition de ses effets rapportés sur les cellules endothéliales, VEGF induit indirectement la prolifération et la différenciation des ostéoblastes en stimulant les cellules endothéliales pour produire des facteurs ostéo-anaboliques de croissance. Un effet direct de VEGF sur la différenciation fœtale d'ostéoblaste bovin a été démontré (Midy and Plouet 1994).

Le VEGF mRNA est présent dans les chondrocytes hypertrophiques de la plaque épiphysaire de croissance des souris, où l'invasion VEGF semble être essentielle pour la résorption du cartilage (Gerber, Vu et al. 1999). Horner et al. (1999) ont décrit l'expression de VEGF par les chondrocytes dans la région inférieure du cartilage néonatal humain hypertrophique et minéralisé de plaque de croissance. Garcia-Ramirez et col. ont observé une expression plus répandue dans le cartilage de plaque de croissance fœtale qui a été maintenu dans la culture primaire des chondrocytes épiphysaires fœtaux. (Garcia-Ramirez, Toran et al. 2000).

La migration chimiotactile des cellules osseuses est un événement physiologique important pendant la formation d'os, le remodelage osseux et la guérison des fractures. En conséquence, la réponse chimiotactile des ostéoblastes et des cellules d'ostéosarcome a été étudiée en utilisant différents facteurs de croissance, tels que TGF- $\beta$ , PDGF, bFGF, BMPs. Certains de ces facteurs stimulent efficacement la chimiotaxie des cellules ostéoblastiques. Cependant, un effet direct de VEGF sur les ostéoblastes humains primaires n'a pas été bien décrit jusqu'ici.

### 3.5. L'influence de la mélatonine sur l'ostéoblaste scoliotique

La mélatonine, la substance principale sécrétée par la glande pinéale, a des rôles dans la régulation des rythmes circadiens et du sommeil, la croissance tumorale et la reproduction. Elle peut aussi affecter la physiologie osseuse. Les niveaux de mélatonine diminuent avec l'âge. Quelques études démontrent que chez les personnes âgées les niveaux de mélatonine sont une fraction des celles chez les jeunes. (Iguchi H et al. 1982) Ces études suggèrent le lien entre la mélatonine et les troubles liés à l'âge avancé, tels que l'ostéoporose post-ménopause et la sénescence.

À présent, il n'y a pas de modèle général accepté pour la pathogénèse de la SIA. Néanmoins, l'hypothèse de la déficience de mélatonine a attiré beaucoup d'attention, spécialement à cause de similarités des déformations du rachis chez les modèles animaux pinéalectomisés. Toutefois, le rôle de la mélatonine reste controversé en raison de l'accumulation des rapports contradictoires obtenus chez les patients avec SIA ou chez des modèles animaux (Moreau A et al. 2004).

L'activité *in vitro* de la mélatonine osseuse :

L'étude de Conti et al. 2000, démontre que les cellules de la moelle hématopoïétique ont des concentrations élevées de mélatonine et de sérotonine-N-acétyltransférase et qu'elles expriment le dernier enzyme dans la synthèse de mélatonine le « mRNA encoding hydroxy-O-methyltransferase ». De plus, les cellules de la moelle

hématopoïétique, mises en culture pour une période prolongée, ont montré des niveaux élevés de mélatonine. En effet, une réaction positive intracellulaire a été détectée dans des cellules de la moelle hématopoïétique. Cette évidence est ferme avec des actions directes de la mélatonine sur les os, surtout dans les os qui contiennent de la moelle hématopoïétique.

Des études plus récentes ont montré qu'une telle activité directe de la mélatonine est détectable dans le pré-ostéoblast et dans les lignes cellulaires d'ostéosarcome ostéoblastique du rat (Roth et al. 1999). Les cellules pré-ostéoblastiques en présence de 50nM de mélatonine se sont différenciées prématurément. Les deux lignes cellulaires en présence de concentrations nanomolaires de mélatonine ont augmenté l'expression des gènes de sialoprotéines osseuses et des protéines marquer osseux : phosphatase alcaline, ostéopontine et ostéocalcine. L'effet de la mélatonine a été inhibé par un antagoniste du récepteur de la mélatonine luzindole et par la toxine pertussis, suggérant l'implication des récepteurs de la mélatonine. Une autre étude qui a utilisé des cellules osseuses humaines normales et des lignes cellulaires ostéoblastiques humaines, a montré que la mélatonine a augmenté significativement (a doublé) et dépendamment de la dose, la prolifération cellulaire avec un effet maximal à une concentration de 50µM. Dans cette étude, la mélatonine a augmenté la production du procollagène de type I peptide-c (une mesure de la synthèse de collagène type I) mais n'a pas influencé l'activité de la phosphatase alcaline ou de la sécrétion d'ostéocalcine (Cardinali et al 2003).

La mélatonine a augmenté l'aire osseuse, correspondant au rachis et au contenu minéral osseux du squelette et du tibia. Les valeurs les plus augmentées ont été observées chez les rats traités conjointement avec de la mélatonine et de l'oestradiol (Ladizesky et al. 2002).



## **Chapitre 4.**

## 4. Objectifs

Des connaissances plus exactes des facteurs impliqués dans l'ostéogénèse et la formation de l'os peuvent raccourcir le processus de guérison et peuvent permettre aux patients de réintégrer leurs activités dans un temps plus court (les plaquettes peuvent jouer un rôle important dans la première étape de la guérison des greffes vertébrales; ils sont une source autologue de plusieurs facteurs de croissance qui soutiennent la prolifération et la différenciation des ostéoblastes en vivo et en vitro).

Au cours des dernières années, nous pouvons remarquer que des efforts sont faits pour trouver des traitements adjuvants pour :

- Raccourcir le temps relativement long de guérison des fractures
- Diminuer le temps de convalescence pour les patients portant des prothèses
- Corriger plus facilement plusieurs maladies congénitales
- Accélérer la fusion vertébrale
- Développer de nouvelles approches thérapeutiques, notamment au niveau des processus régularisant le remodelage osseux et la régénération des tissus osseux.

La Scoliose Idiopathique d'Adolescent (SIA) est une condition débilante qui a souvent comme résultat des douleurs importantes, une altération du fonctionnement quotidien et une détérioration de la qualité de vie. La fusion vertébrale, en utilisant des greffes osseuses, est

devenue un traitement de choix pour stabiliser la colonne, pour les patients qui ne répondent pas au traitement conservateur.

Dans le cadre de la présente étude, j'ai tenté de trouver si le facteur de croissance de l'insuline (IGF) et le facteur vasculaire endothélial de croissance (VEGF), ont une influence sur l'ostéoblaste scoliotique et non scoliotique dans des cultures cellulaires *in vitro*.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- D'obtenir une lignée cellulaire d'ostéoblastes scoliotiques;
- De vérifier l'influence de l'IGF et du VEGF auprès de ces cellules et d'évaluer les modes d'activation sur la prolifération et différenciation cellulaire *in vitro* des ostéoblastes scoliotiques afin d'obtenir une meilleure compréhension du rôle physiologique de ces facteurs sur l'angiogénèse et l'ostéogénèse.
- De vérifier l'influence de l'IGF et du VEGF auprès de ces cellules et de comparer les résultats avec celles obtenues après le traitement avec la mélatonine.

## **Chapitre 5.**

## **5. Matériel et méthodes**

Tous les explants humains dans la présente étude ont été utilisés après le consentement éclairé des donateurs selon un protocole approuvé par le comité d'éthique de la recherche du CHU Sainte-Justine.

Les spécimens osseux utilisés ont été obtenus durant des chirurgies de la colonne vertébrale de patients atteints de SIA. L'évaluation de l'IGF et de VEGF a été réalisée dans des cultures de cellules ostéoblastiques primaires, issus de patients atteints de SIA et comparés avec des ostéoblastes dérivés de sujets non scoliotiques (trauma).

### **5.1. Cultures cellulaires**

Dans tous les cas, les spécimens d'os ont été obtenus de vertèbres (conformément à la procédure chirurgicale effectuée) sauf pour le sujet témoin (origine variable selon la nature du trauma). Après le prélèvement, l'explant a été mis dans un tube avec de DMEM et mis à 4° jusqu'au lendemain. Nous utilisons le Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) comme support pour les cellules. DMEM diffère de l'original MEM, dans la mesure où il contient environ 4 fois plus de vitamines et d'acides aminés que dans la formule initiale et certaines (2 à 4 fois) plus de glucose. Il contient également du fer. Les

fragments d'os ont été réduits à de petits morceaux de 1 à 2 mm<sup>2</sup> à l'aide d'une pince et d'un scalpel (stériles) dans des conditions de stérilité. Les fragments d'os ont été ensuite traités par la collagénase P (1,2 mg / ml en Dulbecco MEM,) pendant 2 h à 37 ° C pour digérer la matrice et pour supprimer les cellules de la surface osseuse. Le milieu contenant des composants extra-cellulaires a été écarté, les éclats d'os ont été lavés au PBS. Les fragments ont été incubés à 37 ° C à 5% de CO<sub>2</sub> en 100 mm de culture en présence de DMEM contenant 10% de sérum fœtal de veau (FBS certifiés; Invitrogen, Burlington, ON, Canada), et 1% de Pénicilline et Streptomycine (Invitrogen). Après sept jours en culture, des cellules ont été observées en dehors des fragments d'os. Le milieu de culture a été changé tous les 4 jours et les cellules ont conflué dans les quatre à cinq semaines suivantes. De façon régulière, les grands fragments d'os ont été enlevés avec une pince stérile pour prévenir les foyers de contamination. Après avoir atteint la confluence, les cellules ont été décollées par trypsinisation et ensuite lavées. La viabilité cellulaire a toujours été supérieure à 95% (évaluation au bleu de trypan). Environ la moitié des cellules a été utilisée pour un second passage. Tandis que les autres cellules ont été congelées. Les techniques susmentionnées sont couramment utilisées pour la récolte principale d'ostéoblastes humains. Les cellules ostéoblastiques et leur phénotype sont maintenus pendant cinq passages (Gartland, Buckley et al. 2005).

Les cellules obtenues par cette technique conservent le phénotype ostéoblastique, tel que démontré par leur capacité à synthétiser l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline [de Brum-Fernandes et al, 1994].

Pour s'assurer qu'il y a de la minéralisation dans nos cultures et pour représenter la quantité de calcification, la méthode de coloration Von Kossa a été utilisée. La coloration de Von Kossa est utilisée avec une plus grande fréquence, comme indicateur quantitatif de mesure de la minéralisation des ostéoblastes primaires et des cellules ostéoblastiques. (Ueno, Katayama et al. 1992; Breen, Ignatz et al. 1994). La procédure de coloration détecte le phosphate. On l'utilise couramment pour la détermination de la calcification et la quantification de minéralisation par la formation in vitro de cellules. La présence de phosphate n'implique pas nécessairement la présence de calcium ou d'hydroxyapatite dans les phases minérales de l'os. Selon la méthode de Von Kossa, les cellules ont été traitées avec une solution 1% de nitrate d'argent, incubées sous une lumière ultraviolette pendant 20 minutes et ensuite colorées avec le « nuclear fast red » pour 5 minutes. Les résultats montrent les sels de calcium en noir ou marron-noir, les nucleus en rouge et le cytoplasme en rose.

## 5.2. Traitement des cellules

Après la décongélation, pour chaque patient, deux échantillons des cellules ont étéensemencés dans deux boîtes de pétri, avec 10 ml de milieu de culture, en utilisant le même protocole décrit antérieurement. Le milieu a été changé tous les 3-4 jours jusqu'à la confluence des cellules. Une fois la confluence obtenue, les cellules sont divisées de la façon décrite. Elles ont ensuite été transférées à nouveau dans six boîtes de pétri et cultivées jusqu'à la confluence. Après le milieu a été changé avec DMEM enrichi de 1% FBS et 1% antibiotique pour 24 heures.

Après les 24 heures les ostéoblastes ont été traités de la façon suivante : deux plaques ont été gardées comme contrôle (DMEM + 10% FBS + 1% antibiotique pour 2 heures) et deux plaques ont été traitées avec de la mélatonine (DMEM + 10% FBS + 1% antibiotique + mélatonine  $10^{-7}$  M pour 2 heures). Après 2 heures de stimulation on a retiré le milieu de culture et on a fait l'extraction de l'ARN.

Toutes les expériences ont été répétées au moins deux fois.



## **5.3. RT-PCR**

### **5.3.1. Extraction de l'ARN**

Après les différentes stimulations, le milieu de culture a été retiré. Par boîte de pétri de 100 mm<sup>2</sup>, 1 ml de GTC buffer a été ajouté et étendu jusqu'à ce qu'il recouvre le fond de la boîte uniformément. Le GTC buffer (1ml) est préparé de la façon suivante : 500 µl 4M Guanidine Thiocyanate (GTC) solution, 3.6 µl β-mercaptoéthanol, 50 µl 2M acétate de sodium et 500 µl Phénol saturé avec DEPC ddH<sub>2</sub>O.

Après 5 minutes à la température de la pièce, le lysat cellulaire est homogénéisé et passé dix fois dans une pipette ( pour des volumes de 1 ml) ou dans une seringue de 5 ml avec une aiguille 18 de gauge. Cette opération est importante pour fragmenter les cellules et l'ADN chromosomique. Ensuite, le lysat est transféré dans des tubes de micro-centrifugation de 1.5 ml et on ajoute du C:IAA a un volume de 1/5 de GTC buffer ( par exemple : pour 1ml de GTC buffer, on ajoute 0.2 ml de C:IAA). Les tubes sont alors secoués pendant 30 secondes. Les échantillons sont incubés pendant 15 minutes sur la glace et centrifugés à 10000 x g pendant 10 minutes, à 4°C. Après la centrifugation, la phase aqueuse est recueillie (la phase supérieure) et elle est transférée dans un nouveau tube, auquel on ajoute un volume égal d'éthanol 100%. Les deux solutions sont mélangées en renversant les tubes plusieurs fois et les échantillons sont incubés pendant 2 heures ou pendant la nuit à 20°C. Le lendemain les échantillons sont centrifugés de nouveau à 10000

x g pour 10 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot contenant l'ARN est lavé deux fois avec de l'éthanol et séché pendant 5 minutes. L'ARN est suspendu à nouveau dans 30-50 µl DEPC ddH<sub>2</sub>O. Les échantillons sont conservés à -80°C.

### **5.3.2. Dosage de l'ARN et évaluation de sa pureté**

Le dosage et la pureté de l'ARN ont été fait par spectrométrie. La densité optique est mesurée à 260 nm et à 280 nm. La concentration de l'ARN dans l'échantillon est déterminée par dosage spectrométrique à la longueur d'onde 260 nm où une unité de densité optique équivaut à 40 mg d'ARN par ml. La pureté de l'échantillon est obtenue en faisant le rapport de la D.O 260 nm sur la D.O 280 nm.

### **5.3.3. Réaction de reverse transcription (RT)**

L'ARN extrait des ostéoblastes humains a été transformé en ADN complémentaire (ADNc). L'ARN total (2 µg) avec le primer (Oligo dT 1µl) et du DEPC ddH<sub>2</sub>O (7 µl) a été incubé à 65 ° pour 5 minutes (dénaturation d'ARN). Ensuite, il a été mis sur la glace et 10 µl de mélange de synthèse a été ajouté à 10 µl d'ARN dénaturé (préparé en conformité des recommandations du producteur – Invitrogen Corporation). Les tubes ont été mis au thermocycler(Biometra) et incubés pendant une heure à 50°C, ensuite pendant 5 minutes à 85° C et remise à 4° C.

### 5.3.4. Réaction en chaîne de la polymérase (PCR)

Pour chaque échantillon, on a effectué plusieurs RT-PCR. Pour chaque réaction, on a utilisé l'amorce spécifique pour chaque protéine cherchée :

**Tableau 6: Séquence des primeurs pour la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), les bandes attendues et l'amorce utilisée.**

<b>β-actine</b>	Sens	5'- GGA AAT CGT GCG TGA CAT -3'	233 bp	Taq
	Antisens	5'- TCA TGA TGG AGT TGA ATG TAG TT_3'		
<b>VEGF A</b>	Sens	5'-TCT TGG GTG CAT TGG AGC CTC-3'	349 bp	Pfx
	Antisens	5'-AGC TCA TCT CTC CTA TGT GC-3'		
<b>VEGF R1</b>	Sens	5'- CGA ACG AGA GGA CGG ACT-3'	546 bp	Pfx
	Antisens	5'- GAGA CTC CCT TCC TTC AGT CA-3'		
<b>VEGF R2 (KDR)</b>	Sens	5'-TAT AGA TGG TGT AAC CCG GA-3'	555 bp	Pfx
	Antisens	5'-TTT GTC ACT GAG ACA GCT TGG-3'		
<b>VEGF R3</b>	Sens	5'-GAG ACA AGG ACA GCG AGG AC-3'	669 bp	Pfx
	Antisens	5'-TGC TGG AGA GTT ATG TGT GG-3'		
<b>IGF 1</b>	Sens	5'- CAG CAG TCT TCC AAC CCA AT -3'	513 bp	HiFi
	Antisens	5'- ACT CGT GCA GAG CAA AGG AT-3'		
<b>IGF 1R</b>	Sens	5'-AAA GGA ATG AAG TCT GGC TCC-3'	789 bp	Pfx
	Antisens	5'-CAC ACA GAC ACC GGC ATA GTA-3'		

Toutes les réactions de PCR ont été faites sur un appareil de type T3 Thermocycler, (Biometra) dont les conditions d'amplification, (32 cycles) pour le Platinum Taq DNA polymérase, (Invitrogen Corporation) sont de 5 minutes à 95° C, 45 secondes à 94°C (dénaturation), 45 secondes à 55 °C (hybridation des amorces) suivi d'une minute et 20 secondes à 72° C (élongation) et suivi de 20 minutes à 4° C. Pour le Platinum Pfx DNA polymérase et le HiFi DNA polymérase (Invitrogen Corporation), 10 minutes à 95°C suivi de 45 secondes à 94 °C (dénaturation), 45 secondes à 60°C pour Pfx respectivement 65° C pour HiFi (hybridation des amorces), 35 cycles de 60 secondes à 68°C (élongation), deux minutes à 68°C et le tout suivi d'une incubation de 20 minutes à 4°C.

Les produits PCR ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1% puis visualisés après coloration au bromure d'ethidium. La migration a été effectuée à 70 V pendant 30 minutes.

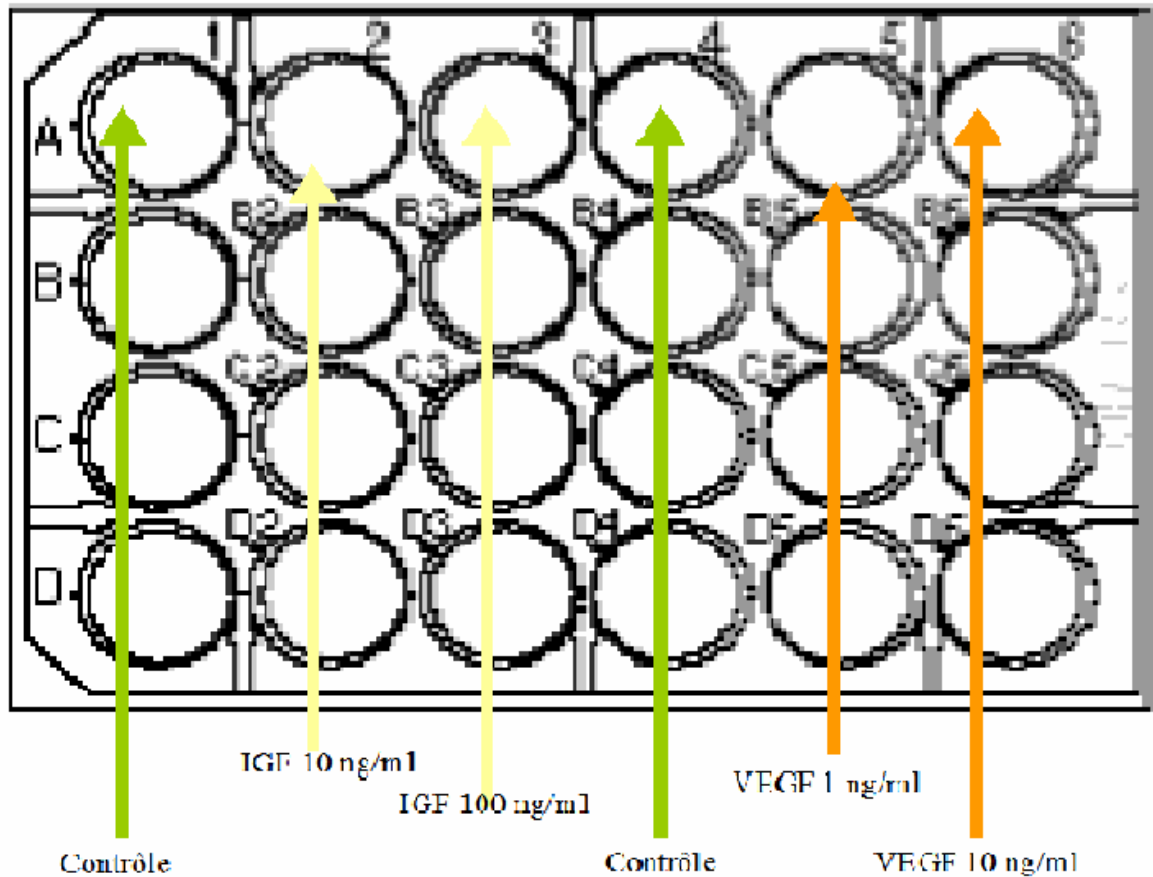
#### **5.4. Mesure de la prolifération cellulaire**

Une mesure relative de la croissance des cellules ostéoblastiques a été obtenue par l'incorporation de la 3H-thymidine dans les cultures primaires d'ostéoblastes. Après la décongélation, pour chacun des patients, deux échantillons des cellules ont étéensemencés dans deux boîtes de pétri avec de 10 ml de milieu de culture. En utilisant le même protocole décrit antérieurement, pour chaque patient, on a mis en culture deux plaques. Le milieu a été changé tous les 3-4 jours jusqu'à la confluence des cellules. Une fois la confluence

obtenue, les cellules sont passées de la façon décrite et elles ont été transférées à nouveau, dans des boîtes à 24 plats en concentration de 15000 cellules par plaque. Cinq heures avant la collecte des cellules, la thymidine marquée a été ajoutée à une concentration finale de 2  $\mu$  Ci [ $^3$ H] dans 100  $\mu$ l BSA 0.2%. Les cellules ont été incubées pendant 5 heures à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Pour chaque patient, on a mis en culture 4 boîtes et le milieu a été changé toutes les 24 heures. Parallèlement les cellules ont été traitées avec le IGF ( 100 ng/ml et 10 ng/ml) et VEGF A ( 10 ng/ml et 1 ng/ml) de façon démontré dans la figure 14.

Après cinq heures de traitement le milieu a été aspiré, les cellules ont été lavé deux fois avec de PBS 1X et ensuite deux fois avec de TCA 5%. Les puits ont été séchés et ensuite les cellules ont été solubilisées en ajoutant 0,5 ml de NaOH 1N dans chaque puits. Elles ont été gardées ainsi pendant la nuit à la température ambiante. Le lendemain 0.5 ml d'HCl 1M a été ajouté dans chaque puits et la solution a été homogénéisée. Les ions de thymidine trouvés dans 0.5 ml de suspension ont été comptés à l'aide d'un compteur à scintillation.

Le même protocole a été répété au moins deux fois pour deux patients avec SIA , pour deux contrôles et pendant 4 jours consécutifs.



**Figure 14 : Traitement des cellules**

Tout au long de l'étude, après avoir choisi la source de cellules ostéoblastiques, il est très important de déterminer les conditions essentielles pour l'utilisation de ces facteurs (IGF et VEGF) Les deux paramètres importants sont le temps et la concentration de stimulation de la culture primaire d'ostéoblastes humains nécessaires pour obtenir l'induction maximale de l'ARN total.

D'après les résultats obtenus, en stimulant les ostéoblastes humains en culture, le temps nécessaire pour obtenir le niveau désiré d'ARN, se situe entre 6 et 48 heures de stimulation avec une concentration de 100 ng/ml d'IGF et respectivement 10 ng/ml de VEGF. Selon la littérature, la stabilité de l'IGF dépend de la présence des protéines de liaison IGFBP et peut varier entre 15 à 22 heures (Heemskerk, Daemen et al. 1999; Longo, Singh et al. 2001). Dans le contexte *in vitro* de notre étude, les facteurs de croissance semblent s'être dégradés plus lentement, peut-être en raison de l'absence du système immunitaire *in vivo*. Nous avons donc décidé d'utiliser un temps intermédiaire de 24 heures pour la stimulation. Il est à noter que ce temps de stimulation ne correspond pas à la réponse trouvée suite à la stimulation des ostéoblastes humains avec des cytokines telles que l'IL ou le TNF (de Brum-Fernandes, 1994).

Le deuxième paramètre important à déterminer est la concentration du facteur de croissance qu'on doit utiliser pour avoir une concentration optimale d'ARN. Plusieurs auteurs ont rapportés différentes concentrations de IGF situées entre 45-230 ng/ml (Longo, Singh et al. 2001) et allant jusqu'à 280 ng/ml (Lee, Udipi et al. 1999). Nous avons donc décidé d'utiliser une valeur intermédiaire de 100 ng/ml IGF (Sigma Aldrich, USA) pour la stimulation. En ce qui concerne le VEGF (Sigma Aldrich, USA), nous avons décidé d'utiliser pour la stimulation une concentration de 10 ng/ml (Mayr-Wohlfart, Waltenberger et al. 2002). On a stimulé les cellules avec une concentration beaucoup plus petite pour chacun des facteurs (10% - soit 10 ng/ml pour l'IGF et 1 ng/ml pour le VEGF).

## **Chapitre 6.**



## 6. Résultats

Le but de ce projet a été de mieux comprendre et d'optimiser le processus de guérison tissulaire à l'aide de différents facteurs de croissance, dans ce cas l'IGF et le VEGF, en vue d'améliorer les résultats de nombreuses procédures chirurgicales liées à la Scoliose Idiopathique de l'Adolescent. Les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- D'obtenir des ostéoblastes provenant de patients scoliotiques
- De vérifier l'influence de l'IGF et du VEGF auprès des cellules et d'évaluer leur mode d'action sur la prolifération et la différenciation cellulaire *in vitro* des ostéoblastes scoliotiques et normaux afin d'obtenir une meilleure compréhension du rôle physiologique de ces facteurs sur l'ostéogénèse.
- De vérifier l'influence de l'IGF et du VEGF auprès de ces cellules et de comparer les résultats avec celles traitées en présence de la mélatonine.

### 6.1. Culture cellulaire

La première étape, qui a des répercussions tout au long de cette étude, est le choix de la source des cellules ostéoblastiques. Nous avons choisi de travailler avec la culture primaire d'ostéoblastes humains scoliotiques. Ce choix se justifie par le fait que ces cellules sont beaucoup plus près de la réalité (même si on travaille *in vitro*) que les cellules

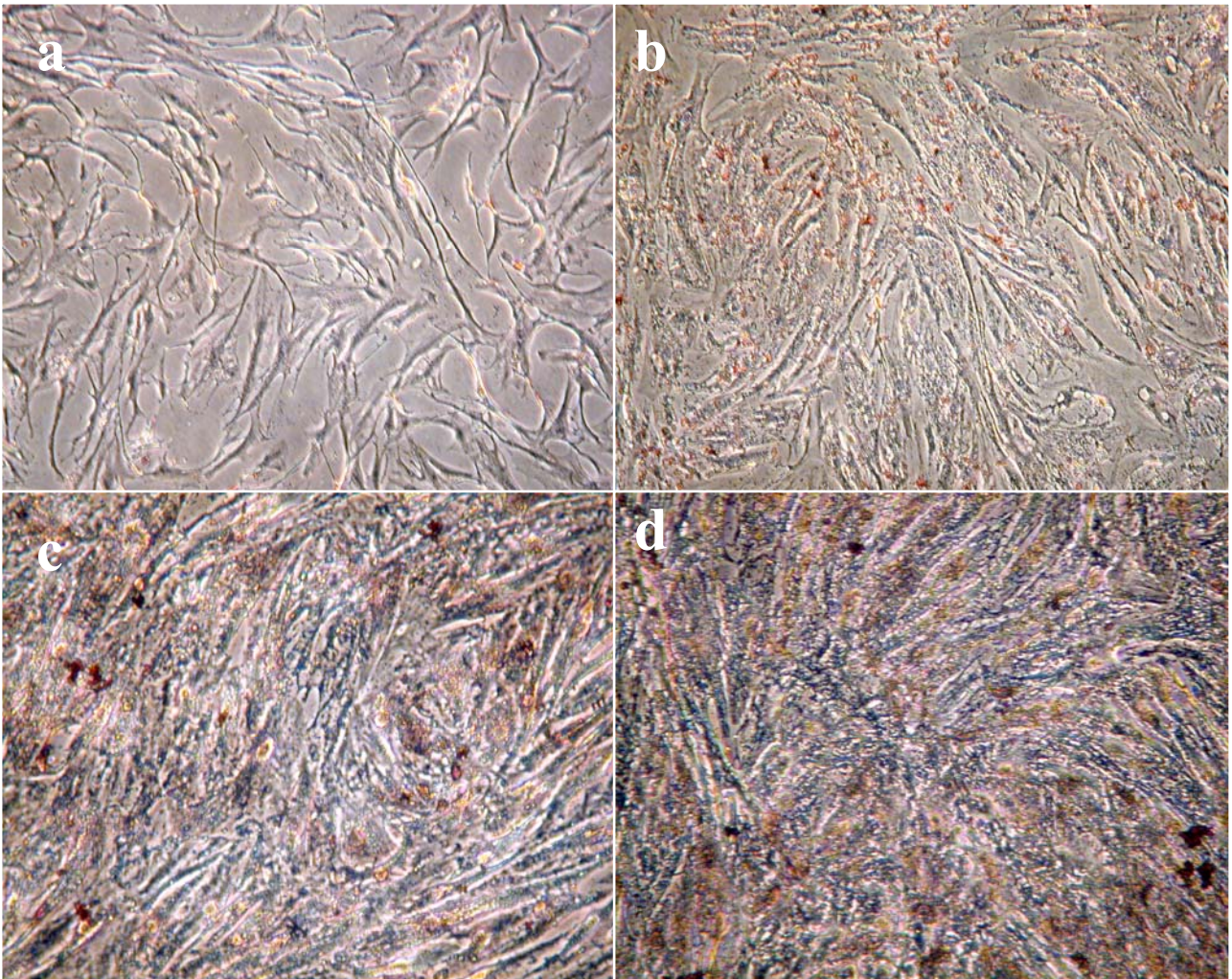
immortalisées et les cellules isolées d'autres espèces. Par contre, il y a des désavantages à la culture primaire des ostéoblastes humains, dont la première étant la disponibilité réduite des sources de cellules. Les cellules que nous utilisons sont dérivées d'explants de corps vertébraux et/ou d'apophyses, prélevées lors de chirurgies de fusion de la colonne vertébrale. L'approvisionnement dépend directement de la fréquence des chirurgies, ce qui peut être très variable. Le deuxième désavantage lié à l'utilisation de culture cellulaire primaire est la durée assez longue pour les cellules avant d'arriver à la confluence, ce qui augmente les chances de contamination. Le temps avant d'arriver à la confluence varie entre 4 et 6 semaines comparativement à 6-10 jours pour les lignées ostéoblastiques immortalisées telles que les SaOS, des cellules d'ostéosarcome osseux. Un autre inconvénient d'utiliser la culture primaire est de savoir si la population cellulaire résultante de ce type de culture est homogène. Si la culture cellulaire était mixte ou hétérogène, il serait difficile de réaliser notre étude. Bien qu'il y ait des désavantages à utiliser la culture primaire des ostéoblastes scoliotiques humains en culture, nous croyons que cette culture demeure le premier choix pour étudier les réponses des ostéoblastes scoliotiques à la stimulation par l'IGF et le VEGF.

Pour s'assurer qu'il y aura de la minéralisation dans nos cultures et pour représenter la quantité de calcification, la méthode de coloration Von Kossa a été utilisée. Un certain nombre de techniques ont été utilisées pour étudier la minéralisation *in vitro*. Il s'agit notamment de la quantification des phosphates inorganiques et de minéraux de calcium, par la microsonde électronique et l'analyse par diffraction d'électron (Gerstenfeld, Chipman et

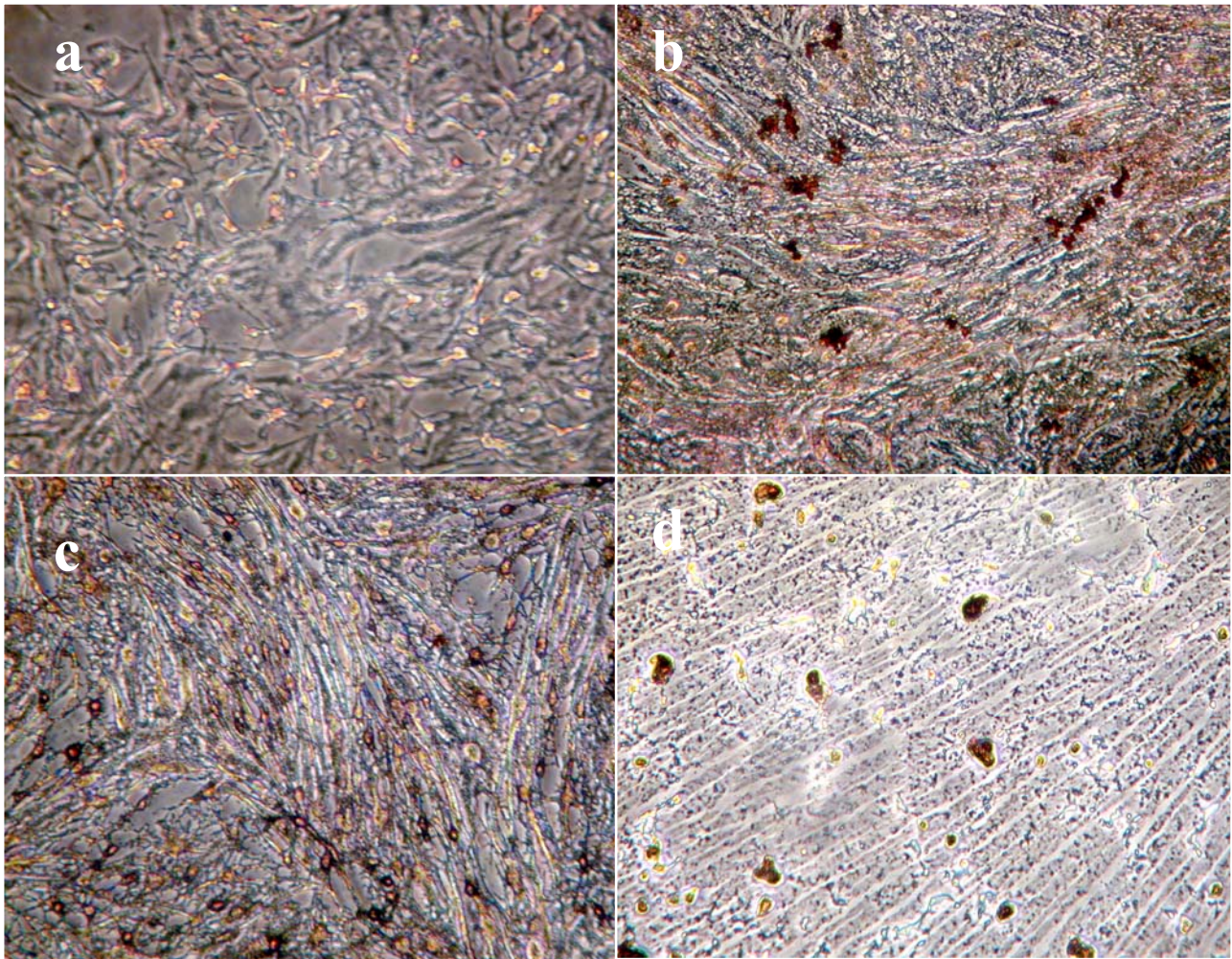
al. 1987), la microscopie électronique à balayage (Bhargava, Bar-Lev et al. 1988), la diffraction de rayons X (Bellows, Aubin et al. 1987), l'infrarouge (IR), la spectroscopie et la microspectroscopie (Bunnell 1986; Bunnell 1986; Iwamoto, Shibano et al. 1993). Alors que la plupart de ces techniques sont acceptables pour l'examen de la formation minérale, de nombreux chercheurs n'ont pas accès à ces types d'instruments. Par contre la coloration de Von Kossa a été utilisée fréquemment pour examiner la minéralisation *in vitro*, elle est peu coûteuse et ne nécessite pas d'instrumentation spéciale.

La coloration de Von Kossa est utilisée comme un indicateur quantitatif de la minéralisation des ostéoblastes primaires et de cellules ostéoblastiques (Ueno, Katayama et al. 1992; Breen, Ignatz et al. 1994). Il semble donc que la procédure de coloration détecte effectivement, le phosphate et qu'on l'utilise couramment pour la détermination *in vitro* de la calcification et la quantification de minéralisation, même si la présence de phosphate n'implique pas nécessairement la présence de calcium ou d'hydroxyapatite dans les phases minérales de l'os. En plus, la composante 'fast red' de Von Kossa est utilisée comme une méthode colorimétrique pour la détection de la phosphatase alcaline.

Les résultats obtenus montrent que les ostéoblastes scoliotiques ainsi que les ostéoblastes non scoliotiques forment *in vitro* une matrice minéralisée. Si on compare les *figures 15 et 16* (les ostéoblastes non scoliotiques et scoliotiques) on observe que les ostéoblastes scoliotiques ont proliféré et se sont différenciés plus vite que les ostéoblastes des sujets témoins. En effet, après quatre semaines, on ne voit plus les ostéoblastes mais, que de la matrice minéralisée chez les ostéoblastes dérivés de patients scoliotiques.



**Figure 15: Culture cellulaire primaire des ostéoblastes non scoliotiques colorés avec Von Kossa.** Selon la méthode de Von Kossa, les cellules ont été traitées avec une solution 1% de nitrate d'argent et ensuite colorées avec le « nuclear fast red ». Les résultats montrent : les sels de calcium – noir ou marron-noir ; les noyaux – rouge; le cytoplasme – rose. (a) une semaine après l'ensemencement les cellules sont confluentes en proportion de 80-90%. (b), (c), et (d) une, deux et respectivement trois semaines après la confluence des cellules. On peut noter les sels de calcium qui sont de plus en plus visibles avec le temps.



**Figure 16 : Culture cellulaire primaire des ostéoblastes scoliotiques colorés avec Von Kossa.** Selon la méthode de Von Kossa, les cellules ont été traitées avec une solution 1% de nitrate d'argent et ensuite colorées avec le « nuclear fast red ». Les résultats montrent : les sels de calcium – noir ou marron-noir ; les noyaux – rouge; le cytoplasme – rose.

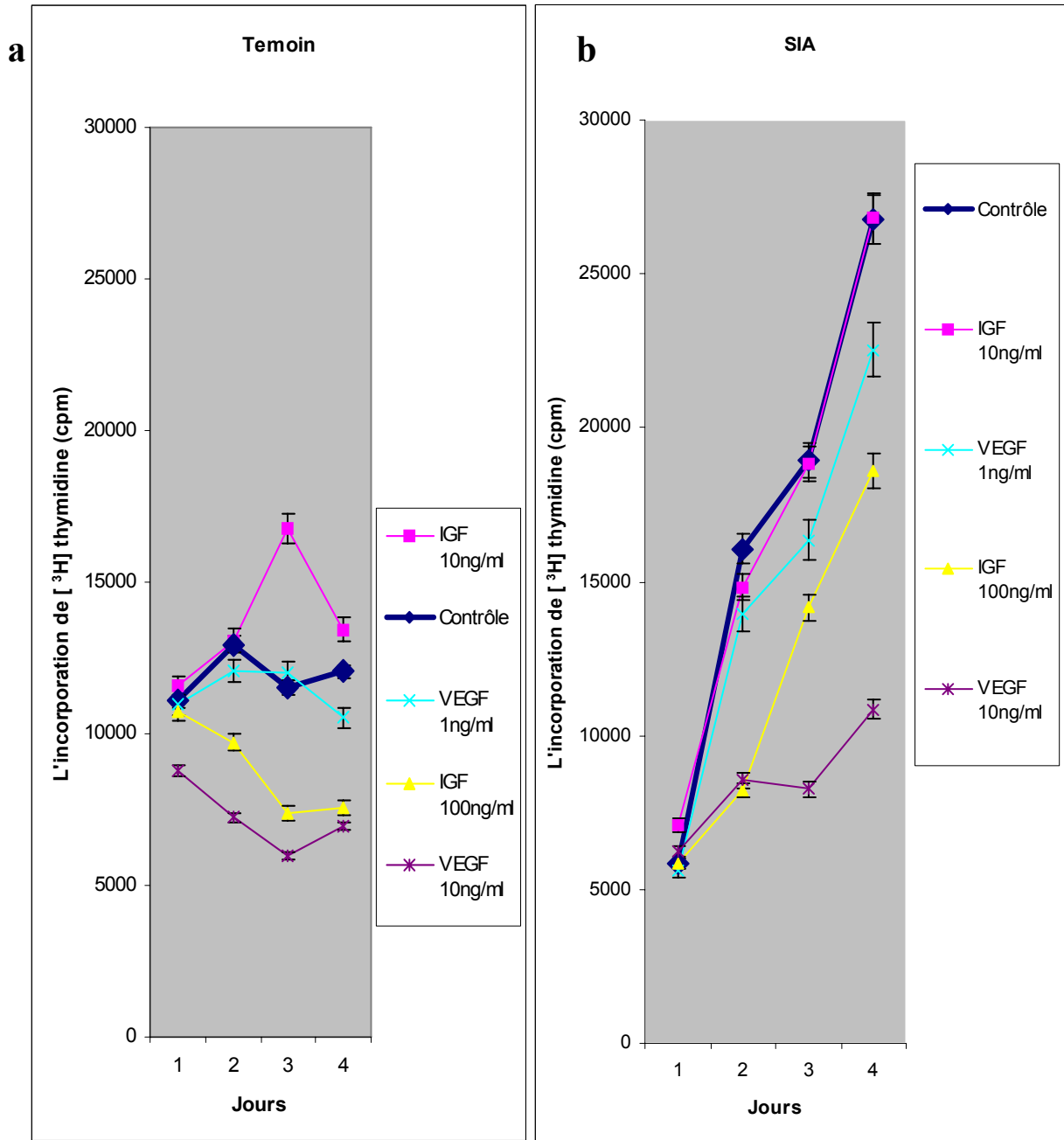
(a) Une semaine après l'ensemencement les cellules sont confluentes en proportion de 90-95% et on trouve déjà des traces de sels de calcium.

(b), (c) Les sels de calcium qui sont de plus en plus visibles, avec le temps, dans la première et deuxième semaine après la confluence des cellules. A noter que dans la deuxième semaine après la confluence, les ostéoblastes commencent à se différencier ou à mourir. (d) Trois semaines après la confluence des cellules on ne trouve que de la matrice calcifiée et une quantité très faible d'ostéoblastes.

## **6.2. Vérification de l'influence de l'IGF et du VEGF sur la prolifération cellulaire *in vitro* des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.**

Le même protocole a été répété à au moins deux reprises pour deux patients avec SIA et pour deux sujets sains donnant des résultats semblables. Pour cette raison, nous allons présenter les résultats pour seulement un contrôle et un patient SIA (toujours le même). Les deux patients présentés ici sont des filles de 14 ans (contrôle ainsi que le SIA).

La *Figure 17* montre les résultats de la prolifération des ostéoblastes scoliotiques en culture primaire pour tous les cinq groupes étudiés (ostéoblastes non traités et traités avec l'IGF 1 en concentration de 10 et 100 ng/ml et le VEGF A en concentration de 1 et respectivement 10 ng/ml). On peut voir que les concentrations faibles de facteurs de croissance semblent avoir peu ou aucune influence sur la prolifération si on compare avec les cellules contrôles. De plus, l'influence semble plus importante après au moins deux jours de traitement. Les ostéoblastes scoliotiques semblent avoir un taux de prolifération plus prononcé au départ que les ostéoblastes témoins. On remarque que la réponse envers le VEGF A et l'IGF 1 est différente chez les cellules normales et que leur prolifération est positivement influencée par le IGF à faible concentration (10 ng/ml). Par contre en présence des concentrations plus élevées, les deux facteurs de croissance ont un effet d'inhibition sur la prolifération des ostéoblastes normaux, contrastant avec les ostéoblastes dérivées des patients SIA dont l'effet est moins prononcé.

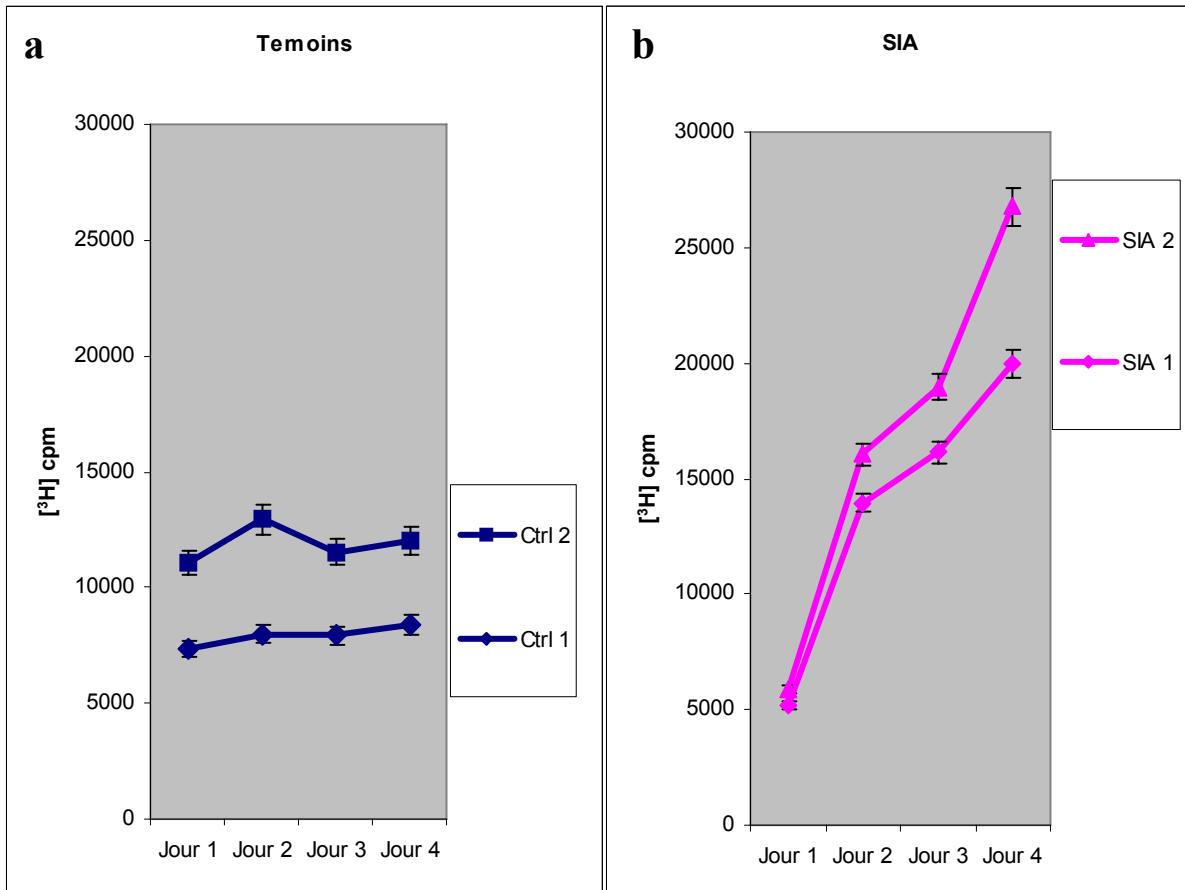


**Figure 17 : La prolifération d'ostéoblastes normaux (a) et dérivés de patients scoliotiques (b) pour chaque échantillon traité et l'évolution par jour. Les cellules ont**



étéensemencées dans des boîtes à 24 plats en concentration de 15000 cellules par plaque. « Jour 1 » représente le premier jour après la confluence des cellules. Cinq heures avant la collecte des cellules on ajoute de la thymidine marquée de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes*. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD (écart type) d'incorporation de la [<sup>3</sup>H] thymidine pour quatre échantillons. À remarquer le taux ascendant de prolifération chez les scoliotiques (b) contrastant avec les ostéoblastes provenant de sujet sain (a) ou le taux de prolifération est en général constant ou bien inhibé (pour les échantillons traités avec 10 ng/ml VEGF A et 100 ng/ml IGF 1).

Sur la *Figure 18* on remarque qu'au début de la prolifération (90% confluence : Jour 1) les ostéoblastes provenant de patients SIA (b) ont un taux d'incorporation de la [<sup>3</sup>H] thymidine plus faible (de 50%) que les ostéoblastes dérivés de sujet normaux (a) (~5000 cpm chez scoliotique versus 7500-10000 cpm chez le non scoliotique). Ce rapport est changé radicalement au quatrième jour de culture quand on mesure un taux d'incorporation de la [<sup>3</sup>H] thymidine beaucoup plus élevé chez les ostéoblastes SIA que les sujets témoins ( 2-3 fois plus que chez les ostéoblastes sains;  $p < 0.05$ ).

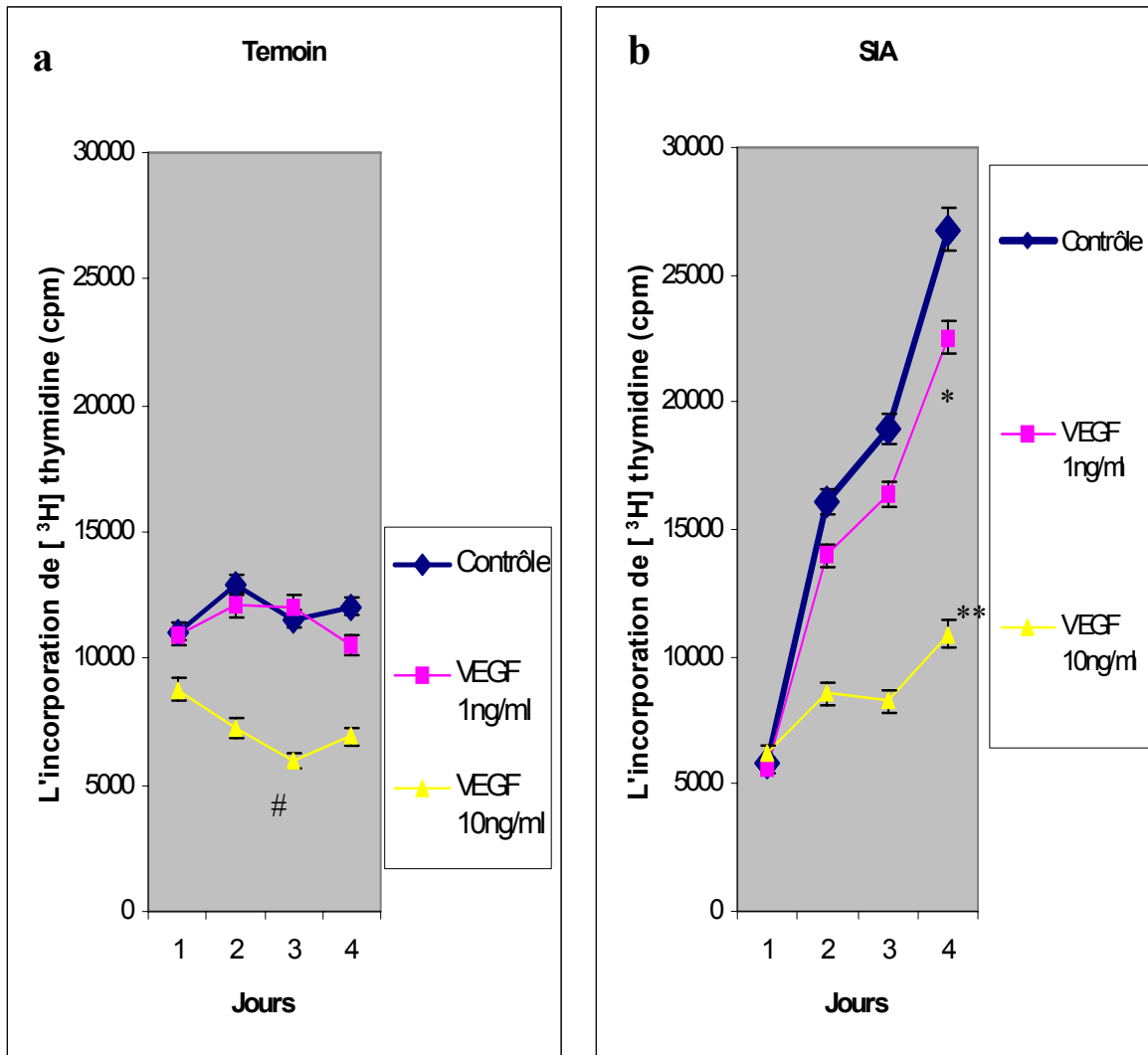


**Figure 18 : La prolifération d'ostéoblastes provenant de sujets sains (a) et scoliotiques (b) non traités.** Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes à 24 plats en concentration de 15000 cellules par plaque. « Jour 1 » représente le premier jour après la confluence des cellules. Cinq heures avant la collecte des cellules on ajoute de la thymidine marquée de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes*. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD (écart type) d'incorporation de la  $[^3\text{H}]$  thymidine pour quatre échantillons. A noter que dans les mêmes conditions de culture les ostéoblastes scoliotiques (b) démontrent une prolifération plus importante que chez les ostéoblastes provenant de sujets sains (a).

### **L'influence du VEGF A sur la prolifération cellulaire *in vitro* des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.**

On remarque pour tous les ostéoblastes scoliotiques (*Figure 19, b*), que la prolifération est inhibée lorsqu'on augmente la concentration de VEGF (1ng/ml vs. 10 ng/ml). Toutefois il semble que les faibles concentrations de ce facteur n'ont pas ou peu d'influence sur la prolifération cellulaire tandis que les concentrations plus élevées inhibent la prolifération. L'expression de [<sup>3</sup>H] thymidine (cpm) est diminuée de 15% pour les cellules cultivées en présence de 1 ng/ml de VEGF et de 60% pour celles traitées avec 10 ng/ml VEGF si on compare avec l'échantillon non traité.

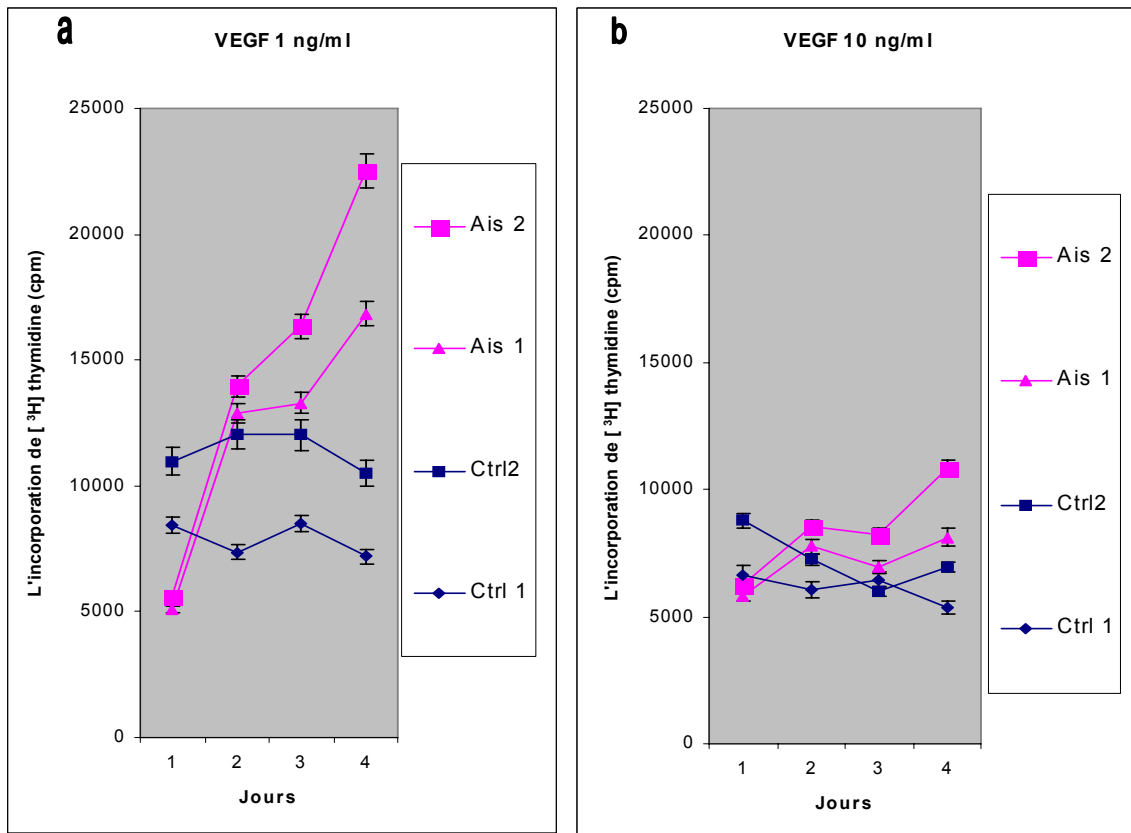
Dans le cas des ostéoblastes non scoliotiques, (*Figure 19, a*) on observe une réponse plus marquée en présence de 10 ng/ml de VEGF A tandis qu'à faible concentration, il n'y a pas de différence significative entre l'échantillon traité et l'échantillon témoin. Comme pour les ostéoblastes scoliotiques, une concentration élevée de VEGF A produit une diminution de 50% (vs non traité) du taux de prolifération cellulaire. Toutefois la réponse chez les cellules témoins est plus prononcée si on compare avec les ostéoblastes scoliotiques. Les résultats obtenus tendent à démontrer (*Figure 20*) que les ostéoblastes scoliotiques ont un taux de prolifération plus élevé que les non scoliotiques et il semble qu'une concentration plus élevée de VEGF A (10 ng/ml) a un effet inhibitif sur la prolifération cellulaire pour les deux groupes. Donc, en présence de 10 ng/ml de VEGF, il n'y a plus de différence entre la prolifération des ostéoblastes scoliotiques et sains (*Figure 20, (b)*).



**Figure 19: La prolifération d'ostéoblastes non scoliotiques (a) et scoliotiques (b)**

**traités avec VEGF A.** Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes à 24 plats en concentration de 15000 cellules par plaque. « Jour 1 » représente le premier jour après la confluence des cellules. Cinq heures avant la collecte des cellules on ajoute de la thymidine marquée de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes*. Les résultats représentent la

moyenne  $\pm$  SD (écart type) d'incorporation de la [ $^3$ H] thymidine pour quatre échantillons et démontre l'influence de la concentration du facteur, représenté pour chaque jour, sur la prolifération cellulaire. (#) Chez les ostéoblastes provenant d'un sujet sain, on trouve une différence significative avec les non traités, seulement pour les cellules traitées avec 10 ng/ml de VEGF A ( $p < 0.05$  vs. non traités). Chez le SIA la différence est encore plus significative pour les cellules traitées avec 10 ng/ml (\*\*  $p < 0.05$  vs non traité et \*  $p < 0.05$  vs. traité avec 1ng/ml) et on note aussi une différence entre l'échantillon traité en présence de 1 ng/ml et l'échantillon témoin mais cette différence n'est pas significative ( $p > 0.05$ ).



**Figure 20: L'influence de la concentration de VEGF A sur la prolifération d'ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.** En présence d'une faible concentration (1ng/ml) de VEGF A (a) les ostéoblastes scoliotiques expriment une prolifération jusqu'à 2.5 fois plus marquée que chez les ostéoblastes provenant d'un sujet sain, tandis qu'en présence d'une concentration de 10 ng/ml de VEGF A (b) la différence entre ces deux groupes n'est plus significative.

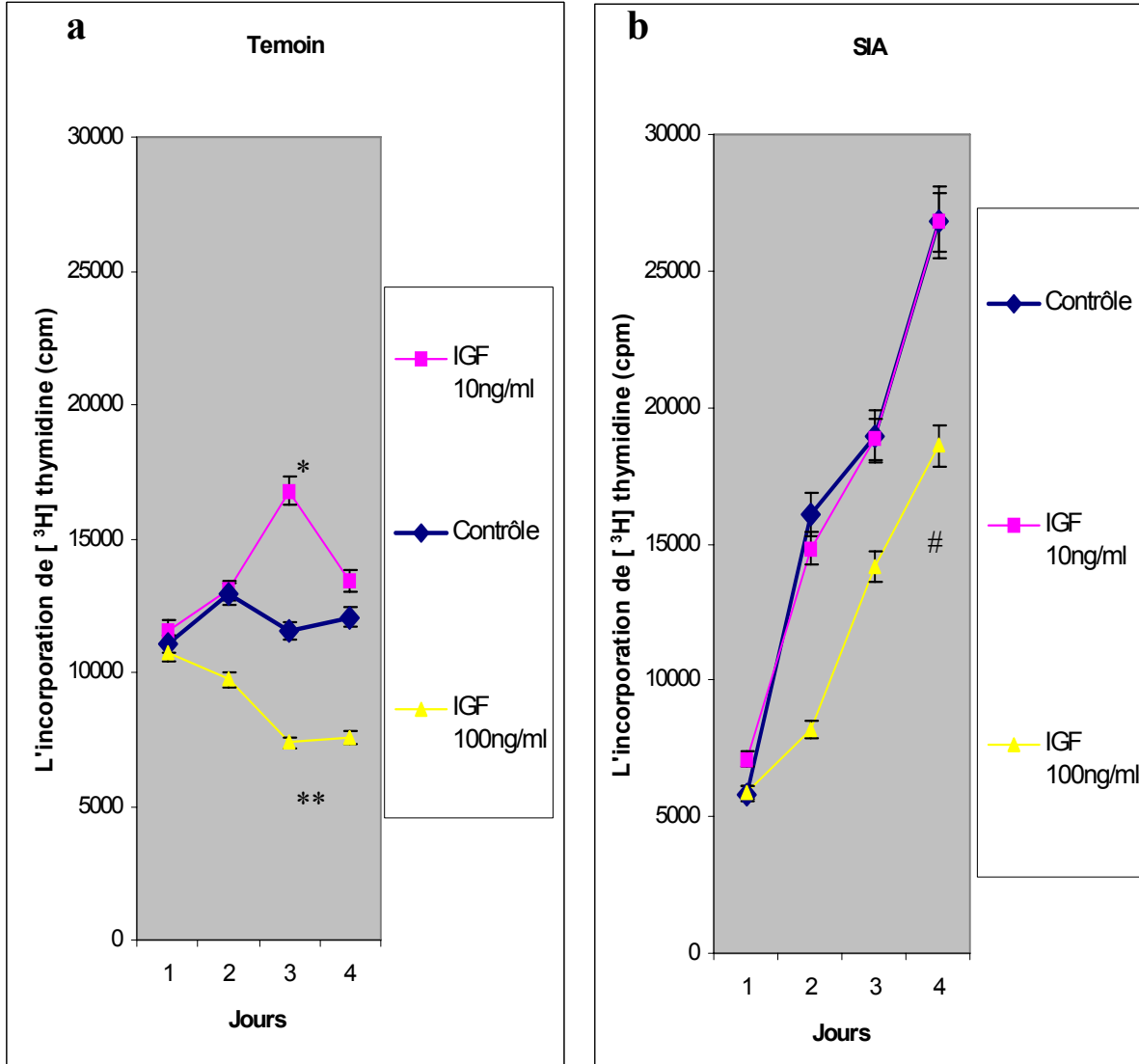
## **L'influence de l'IGF 1 sur la prolifération cellulaire *in vitro* des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.**

Comme on peut le remarquer dans la *figure 21* (b) la tendance ascendante du graphique représentant la prolifération cellulaire pour tous les ostéoblastes scoliotiques, traités ou non traités, reste semblable peu importe la concentration d'IGF. Toutefois l'augmentation de la concentration du facteur tend à diminuer la prolifération cellulaire en comparant avec les cellules non traitées. Il semble qu'une concentration réduite d'IGF 1 ne produit aucune ou une très faible réponse car il n'existe pas une différence significative entre les échantillons traités et non traités. Lorsqu'on compare les ostéoblastes scoliotiques cultivés en présence de 100 ng/ml d'IGF 1 par rapport aux cellules non traitées, on remarque une inhibition de la prolifération de 50% ( $p < 0.05$ ).

Chez les ostéoblastes non scoliotiques, (*Figure 21* (a)) par contre, on trouve une différence dans les taux de prolifération liés à la concentration d'IGF. Une faible concentration de ce facteur (10 ng/ml) a comme résultat une augmentation de 100% de la prolifération au 3<sup>e</sup> jour de culture lorsqu'on compare avec les ostéoblastes non traités. Cependant, une concentration élevée d'IGF 1 (100 ng/ml) produit une inhibition de 50% sur la prolifération cellulaire (vs. ostéoblastes non traités).

Les taux de prolifération les plus élevés (*Figure 22*) sont observés chez les ostéoblastes scoliotiques si comparés aux non scoliotiques. Il semble que la concentration plus élevée d'IGF 1 a comme résultat une diminution des taux de prolifération comparés aux témoins non traités aussi qu'aux échantillons traités avec 10 ng/ml.





**Figure 21: La prolifération d'ostéoblastes non scoliotiques (a) et scoliotiques (b)**

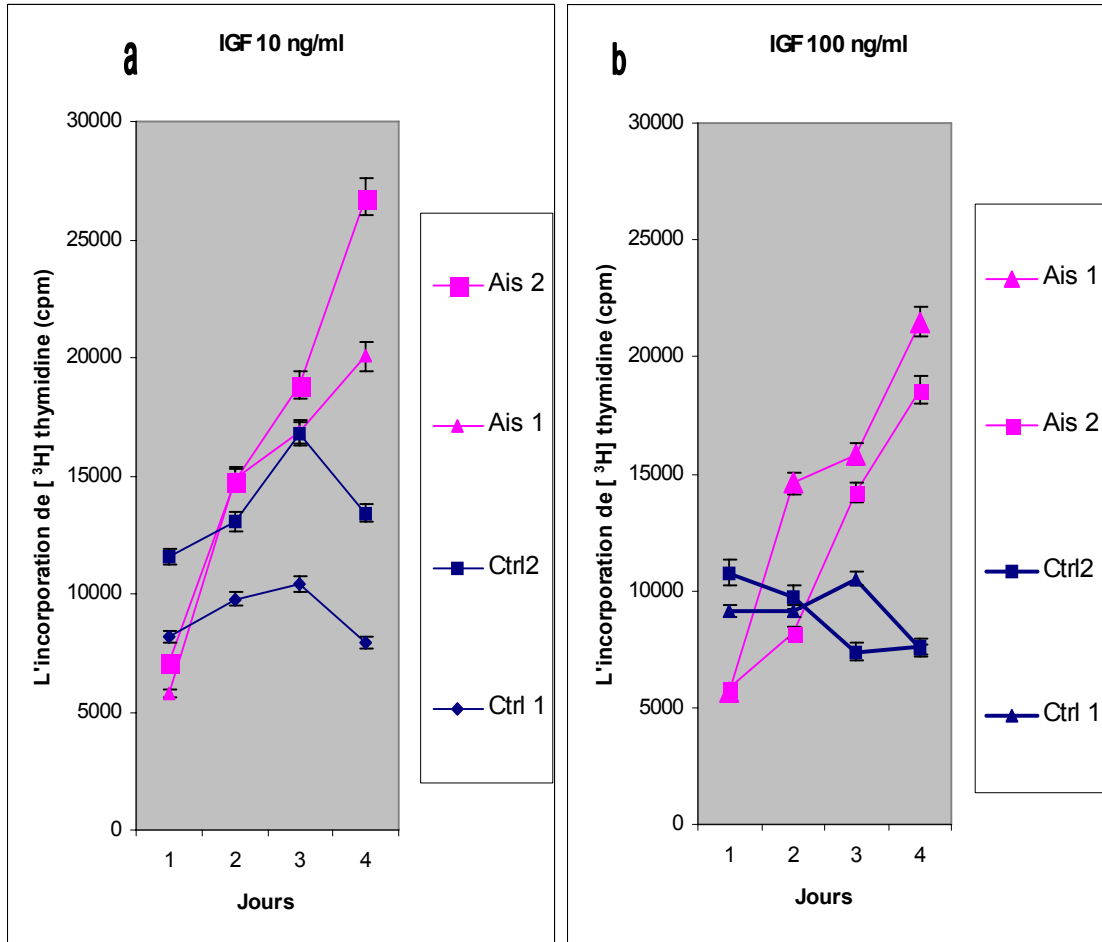
**traités avec d'IGF 1.** Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes à 24 plats en

concentration de 15000 cellules par plaque. « Jour 1 » représente le premier jour après la

confluence des cellules. Cinq heures avant la collecte des cellules on ajoute de la thymidine

marquée de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes*. Les résultats représentent la

moyenne  $\pm$  SD (écart type) d'incorporation de la [ $^3\text{H}$ ] thymidine pour quatre échantillons et démontrent l'influence de la concentration du facteur, représentée pour chaque jour, sur la prolifération cellulaire. Une différence significative a été trouvée pour les deux échantillons traités en présence d'IGF 1 chez les ostéoblastes dérivés d'un sujet sain (\*, \*\*  $p < 0.05$  vs le groupe non traité) tandis que chez le scoliotique seul une concentration élevée de facteur produit une différence significative (#  $p < 0.05$  pour le group 100 ng/ml vs. non traités).



**Figure 22: L'influence de la concentration d'IGF 1 sur la prolifération d'ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.** En présence d'une faible concentration (10ng/ml) d'IGF 1 (a) les ostéoblastes scoliotiques expriment une prolifération jusqu'à 3 fois plus marquée que les ostéoblastes provenant d'un sujet sain. (b) Par contre en présence d'une concentration élevée (100 ng/ml) d'IGF 1, les ostéoblastes non scoliotiques démontrent une inhibition de la prolifération cellulaire contrastant avec celle provenant d'un patient AIS dont la prolifération n'est que diminuée.

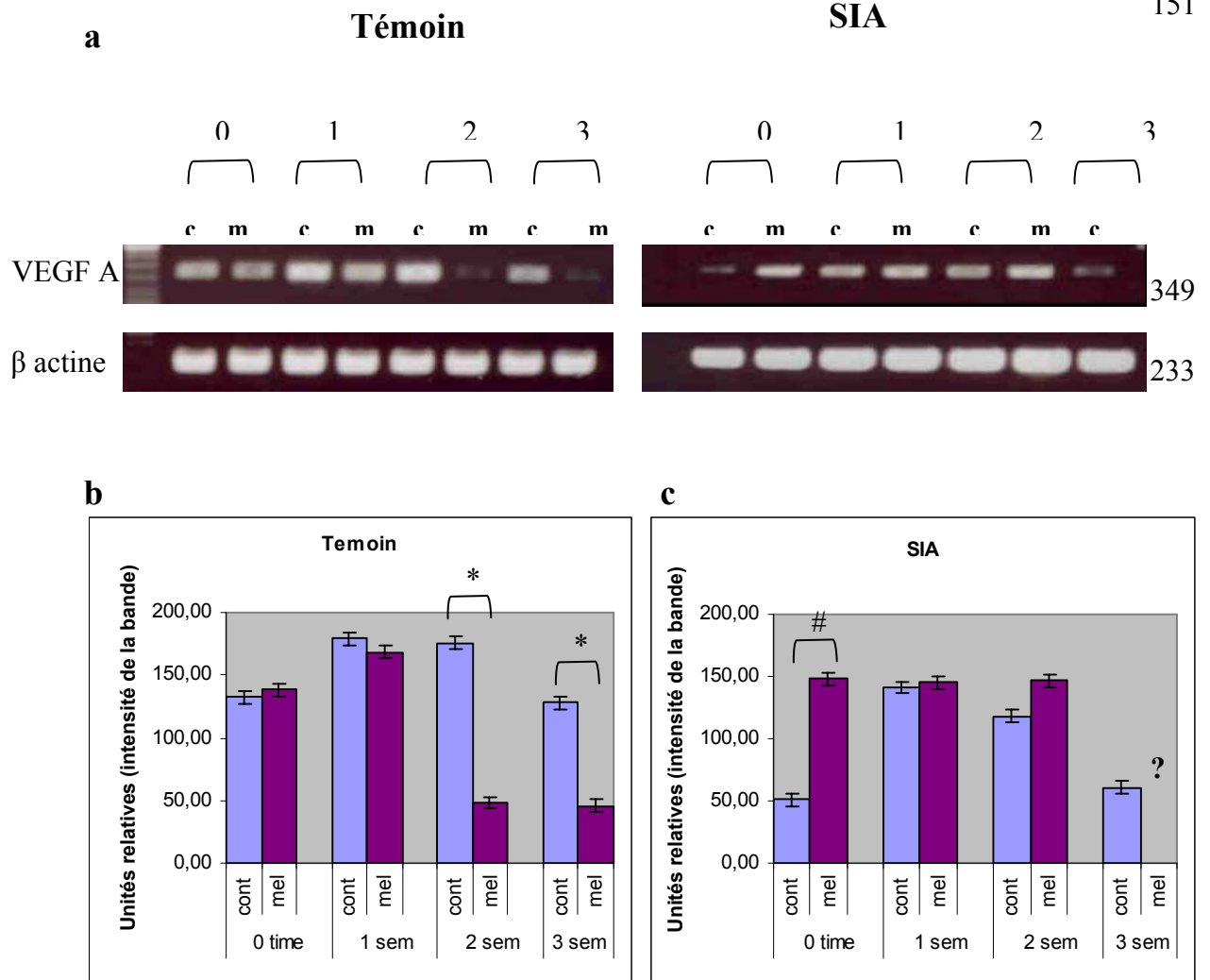
### **6.3. Analyse de l'expression de l'IGF 1, du VEGF A et de leurs récepteurs et l'influence sur la différenciation cellulaire des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.**

Afin de vérifier comment la différenciation des ostéoblastes est régulée chez les sujets sains aussi que chez les scoliotiques, l'expression de certains gènes connus pour avoir un rôle dans l'ostéogénèse a été déterminée. Dans un premier temps, l'expression génique d'IGF, VEGF ainsi que de leurs récepteurs respectifs ont été analysés par RT-PCR. L'expression de tous ces gènes a été vérifiée pour les ostéoblastes scoliotiques, non scoliotiques et comparée entre elles. En 2004 Moreau et al. ont démontré que chez les patients scoliotiques il existe un défaut de signalisation de la mélatonine et que la cause de ce défaut est un déficit dans la fonction des protéines Gi. Pour vérifier si ce défaut de signalisation de la mélatonine a une influence sur le VEGF A, IGF 1 et leur récepteurs, l'expression génique a été comparée, pour les deux groupes (SIA et sujets sains), traités pendant deux heures avec la mélatonine. Le même protocole a été répété au moins deux fois pour deux patients avec SIA et aussi pour deux témoins sains avec des résultats semblables. Pour cette raison, nous ne présentons que les résultats d'un contrôle et d'un patient SIA (toujours le même). Les deux patients présentés ici sont des filles de 14 ans (contrôle ainsi que le SIA).

Les prochaines figures montrent l'expression génique des ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques dans la culture cellulaire primaire et des échantillons provenant du même patient, traités avec de la mélatonine. Les ostéoblastes, après l'ensemencement, prolifèrent jusqu'à la confluence. C'est à ce moment que la différenciation cellulaire commence et est ensuite suivie par la minéralisation. Pour cette raison, dans toutes les figures représentant l'expression génique, on a considéré comme temps 0 (*0 time*) le moment où les cellules atteignent un niveau de confluence d'approximativement 90% ou plus et ce temps correspond à une première semaine en culture. Les deux semaines suivantes en culture (noté *1 sem* et *2 sem* dans les figures) représentent la période de différenciation cellulaire tandis que dans la dernière semaine de culture, on a la fin de la différenciation et de début de la minéralisation. Ce fait a été aussi démontré par la coloration des cellules.

### **L'expression génique de VEGF A et de VEGF R2, R3 chez les ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.**

Tel qu'illustré dans la *figure 23*, dans les deux groupes, pour les échantillons non traités, on observe un maximum d'expression génique de VEGF A pendant la première et la 2<sup>e</sup> semaine de culture après la confluence des cellules. Les résultats montrent que les patrons d'expression restent semblables pour les ostéoblastes scoliotiques tant que pour celles provenant d'un sujet sain. Chez le SIA on remarque que l'expression de VEGF A est diminuée versus les ostéoblastes non scoliotiques. Chez le témoin non scoliotique, la mélatonine semble avoir un effet de répression sur l'expression génique et une différence significative (\*  $p < 0.05$ ) a été noté pendant les dernières deux semaines; l'expression génique de VEGF A a été diminuée à 30% (comparée à l'expression génique provenant des ostéoblastes non traités). Contrairement aux sujets sains, chez les patients scoliotiques l'expression génique est augmentée pour les échantillons traités avec la mélatonine et il n'y a pas de différence significative en relation avec le temps. L'expression génique semble rester constante pendant les premières trois semaines de culture. Une différence significative a été trouvée pendant la première semaine de culture; l'expression génique de VEGF A a été augmentée de 300% pour les échantillons traités avec la mélatonine vs. non traités.

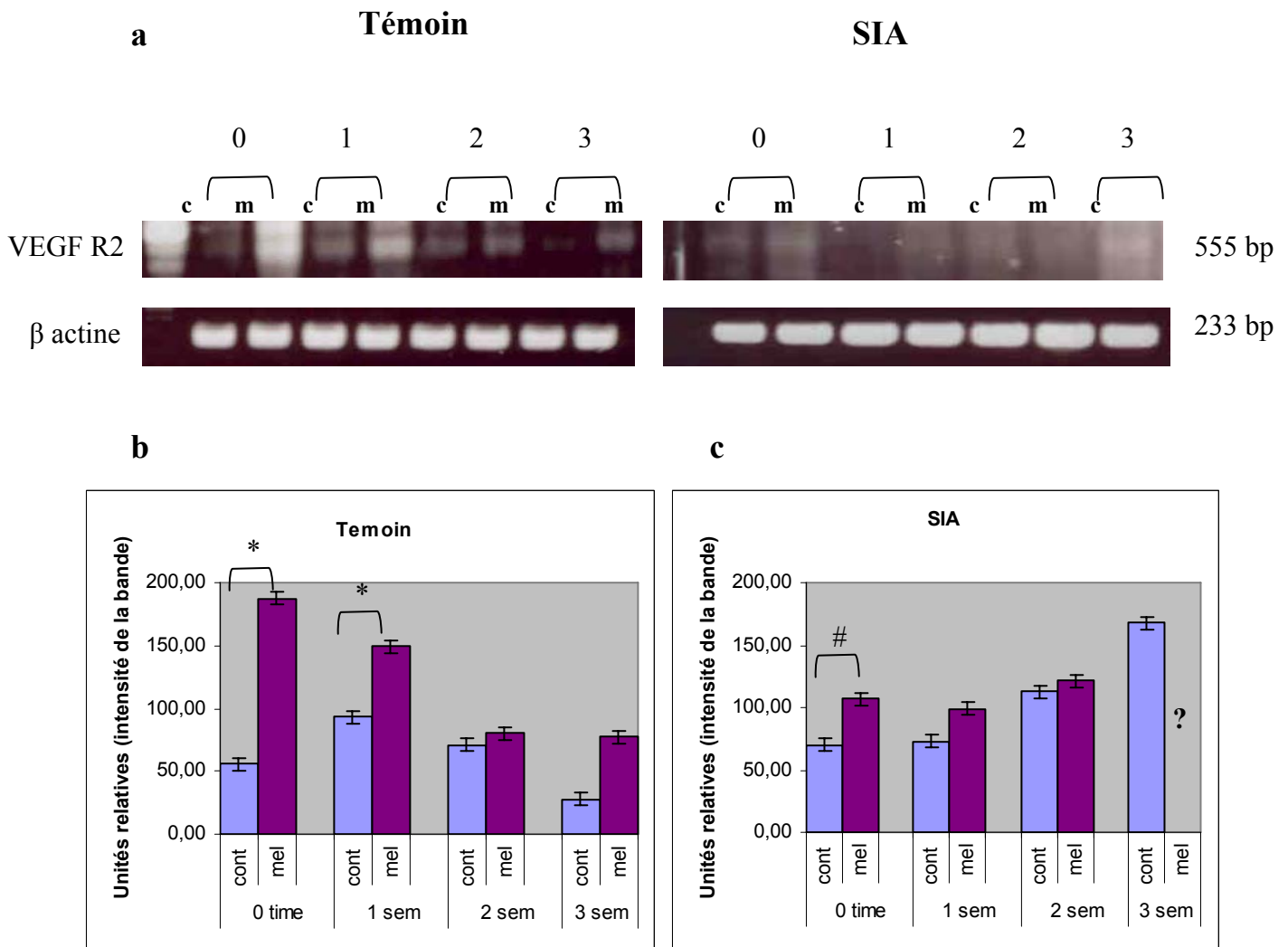


**Figure 23 : L'expression génique de VEGF A – comparaison entre les ostéoblastes scoliotiques versus les ostéoblastes témoins sains.** Pour les deux groupes, on compare la détection génique de VEGF A aux différents stades de différenciation cellulaire pour les ostéoblastes stimulés avec une concentration de  $10^{-7}$  de mélatonine de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes* et ceux non traités. <0 time> représente le moment où les cellules deviennent confluentes. Les résultats sont représentés par des graphiques en unités relatives obtenues par la quantification de l'intensité de la bande et normalisés avec la

bande obtenue pour la  $\beta$  actine (moyenne  $\pm$  SD (écart type)). (a) Les bandes obtenues pour l'expression de VEGF A chez le témoin et chez le SIA avec leur poids moléculaire. (b) La représentation graphique de l'expression génique pour les ostéoblastes dérivés d'un sujet sain et (c) pour les ostéoblastes SIA. (\*) et (#) indique une  $p < 0.05$ ; (?) Échantillon contaminé. A noter l'expression en plateau de VEGF A en présence de la mélatonine chez les ostéoblastes SIA tout au long de la période de différenciation cellulaire.

L'expression génique de VEGF R2 (*Figure 24*) semble suivre le même type de courbe que la VEGF A chez les non scoliotiques mais chez les ostéoblastes scoliotiques la tendance est plutôt ascendante vers la fin de la différenciation. La stimulation des cellules dérivées de témoins sains avec de la mélatonine augmente de façon significative l'expression génique et il y a une différence dépendamment du temps. Le pic d'expression se trouve plutôt dans la première et deuxième semaine de culture avec une pente descendante vers la quatrième semaine. La mélatonine augmente l'expression de VEGF R2 de 300% au début de la différenciation, cette dernière diminuant vers la fin. Contrairement aux ostéoblastes scoliotiques qui, stimulés par la mélatonine, démontrent une expression de VEGF R2 qui semble demeuré stable pendant les premières trois semaines de culture. Il y a une augmentation de 1.5 fois dans la première semaine si on compare avec les cellules non traités ( $p < 0.05$ ).



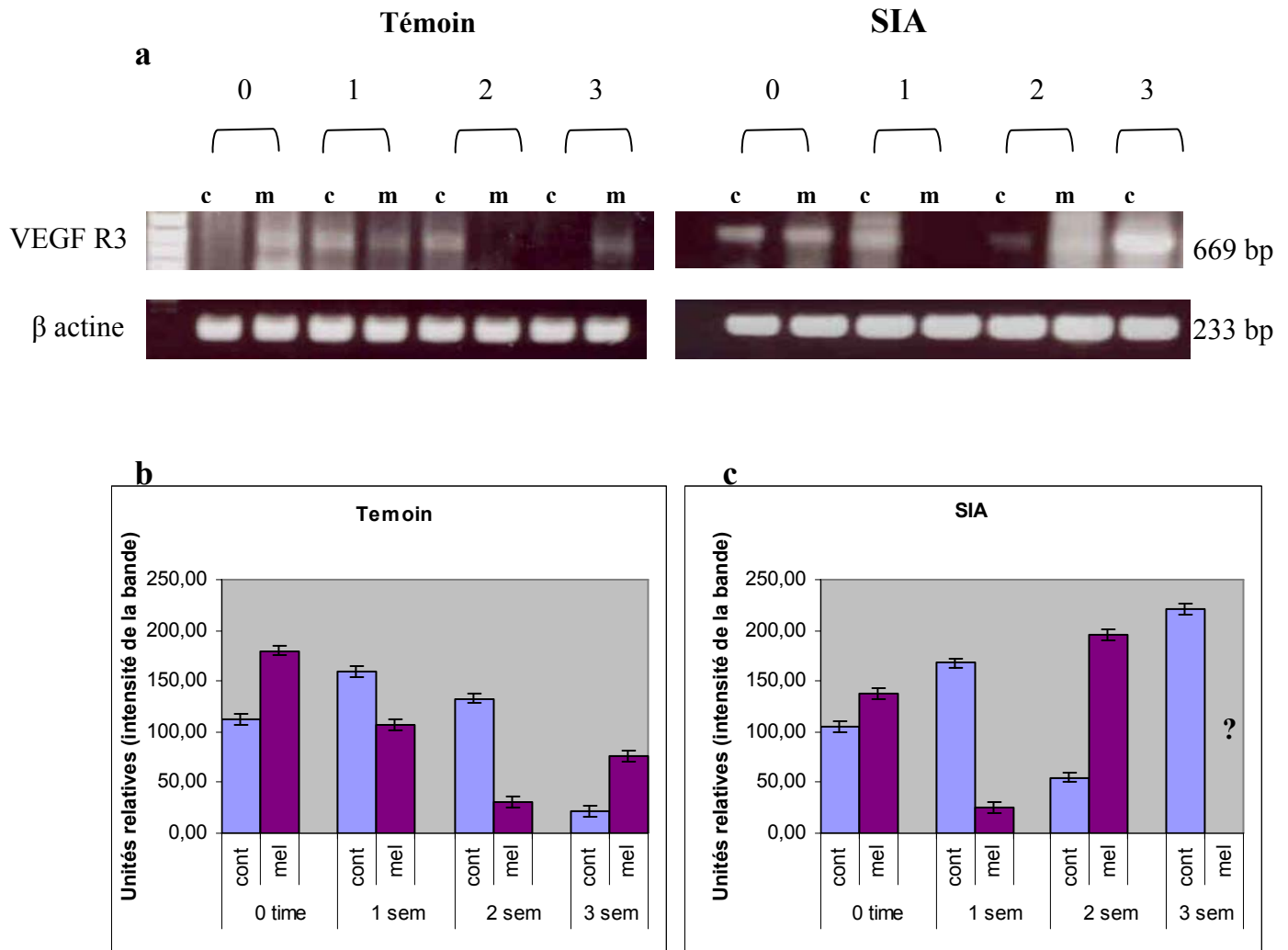


**Figure 24 : L'expression génique de VEGF R2** – Comparaison entre les ostéoblastes scoliotiques versus les ostéoblastes témoins sains. Pour les deux groupes, on compare la détection génique de VEGF R2 aux différents stades de différenciation cellulaire pour les ostéoblastes stimulés avec une concentration de  $10^{-7}$  de mélatonine de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes* et ceux non traités. <0 time> représente le moment où les cellules deviennent confluentes. Les résultats sont représentés par des graphiques en unités relatives obtenues par la quantification de l'intensité de la bande et normalisés avec la

bande obtenue pour la  $\beta$  actine (moyenne  $\pm$  SD (écart type)). (a) Les bandes obtenues pour l'expression de VEGF R2 chez le témoin et chez le SIA avec leur poids moléculaire. (b) La représentation graphique de l'expression génique pour les ostéoblastes dérivés d'un sujet sain et (c) pour les ostéoblastes SIA. (\*) et (#) indique une  $p < 0.05$ ; (?) Échantillon contaminé.

L'expression génique de VEGF R3 (*Figure 25*) chez le non scoliotique suit la même tendance que pour le VEGF R2 avec une augmentation de l'expression de VEGF R3 pendant la première semaine de culture, après la confluence des cellules, mais cette dernière diminue vers la fin. En présence de la mélatonine une augmentation de l'expression génique de 150% par rapport aux ostéoblastes non stimulés a été observée au début de la différenciation (première semaine de culture) suivie ensuite d'une régression pour les prochaines deux semaines.

En ce qui concerne les ostéoblastes scoliotiques l'expression de VEGF R3 suit un patron différent. On peut noter que l'expression génique augmente pendant les premières deux semaines mais diminue rapidement pendant la troisième semaine de culture et ensuite suivie d'une nouvelle augmentation dans l'expression génique pendant la dernière semaine. En présence de la mélatonine on observe le même patron d'expression d'ARN mais déplacé vers la gauche, c'est à dire avec un minimum pendant la deuxième semaine et un maximum d'expression génique de VEGF R3 pendant la troisième semaine.



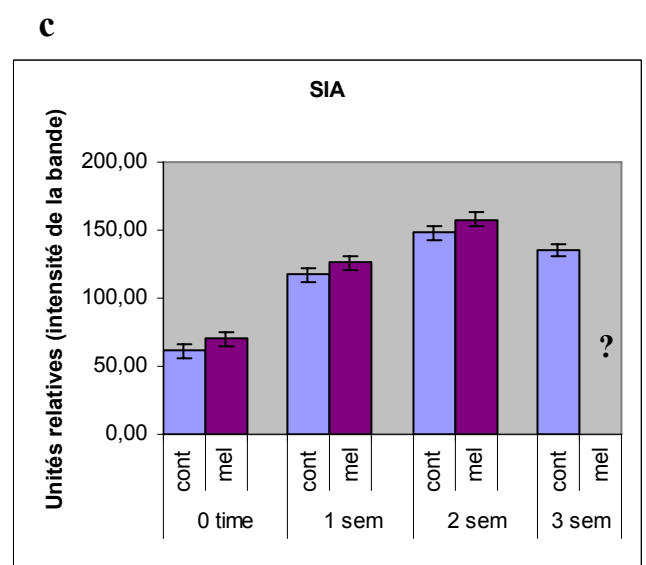
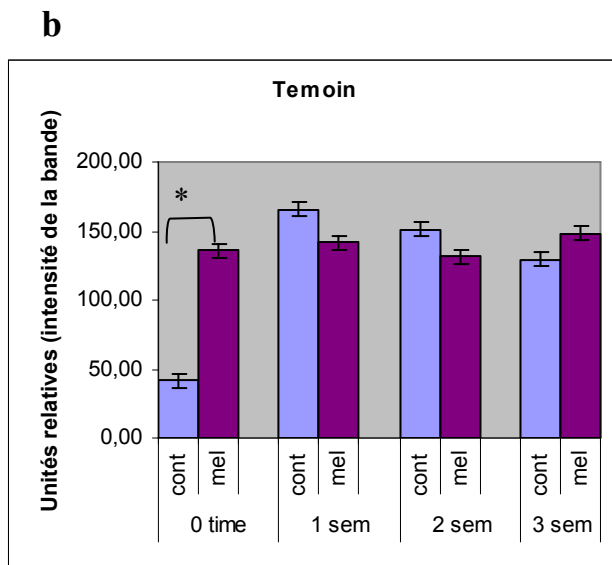
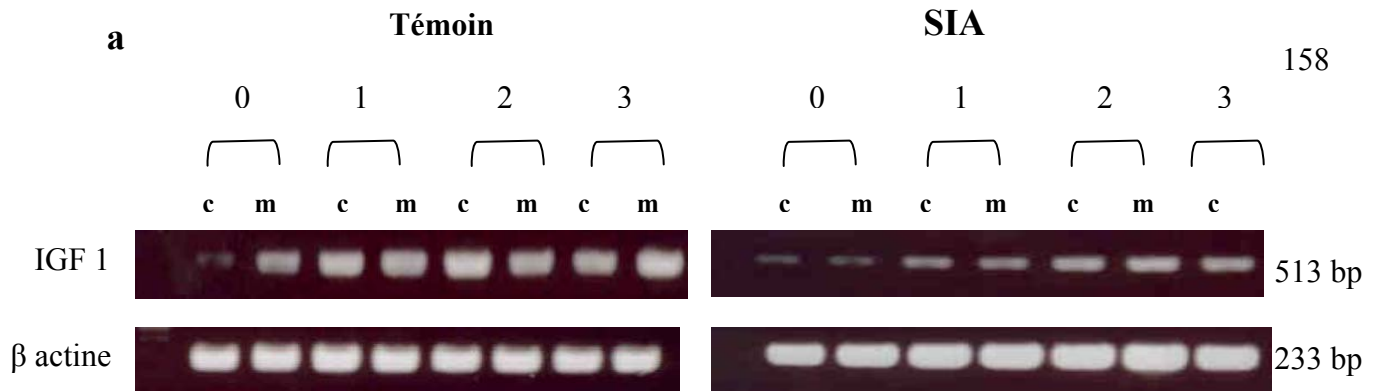
**Figure 25 : L'expression génique de VEGF R3** – Comparaison entre les ostéoblastes scoliotiques versus les ostéoblastes témoins sains. Pour les deux groupes, on compare la détection génique de VEGF R3 aux différents stades de différenciation cellulaire pour les ostéoblastes stimulés avec une concentration de  $10^{-7}$  de mélatonine de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes* et ceux non traités. <0 time> représente le moment où les cellules deviennent confluentes. Les résultats sont représentés par des graphiques en unités relatives obtenues par la quantification de l'intensité de la bande et normalisés avec la

bande obtenue pour la  $\beta$  actine (moyenne  $\pm$  SD (écart type)). (a) Les bandes obtenues pour l'expression de VEGF R3 chez le témoin et chez le SIA avec leur poids moléculaire. (b) La représentation graphique de l'expression génique pour les ostéoblastes dérivés d'un sujet sain et (c) pour les ostéoblastes SIA. (?) Échantillon contaminé. A noter la répression de l'expression de VEGF R3 pendant la deuxième semaine chez les ostéoblastes scoliotiques stimulées avec mélatonine.

## **L'expression génique d'IGF 1 et d'IGF 1R chez les ostéoblastes scoliotiques et non scoliotiques.**

Tel que démontré dans la *Figure 26*, autant pour les ostéoblastes provenant d'un sujet sain que pour les ostéoblastes scoliotiques, l'expression d'IGF 1 suit un patron classique avec une pente ascendante pendant les premières deux semaines et par la suite descendante vers la fin de la différenciation.

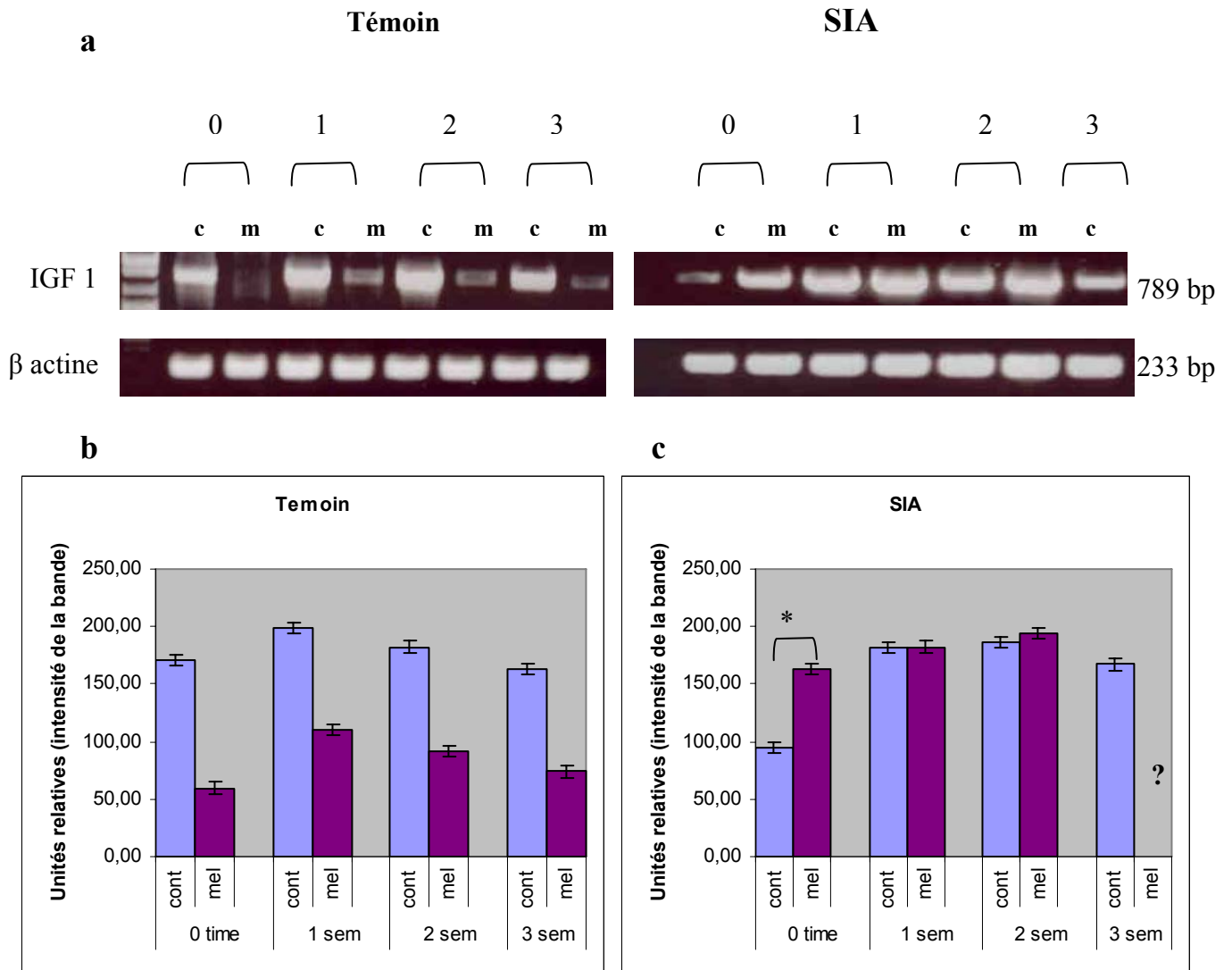
Chez les ostéoblastes dérivés de témoins sains stimulés avec mélatonine on remarque une augmentation de l'expression génique d'IGF 1 pendant la première semaine (au moment de la confluence de cellules) de plus de 300% versus le contrôle non stimulé. Pendant la deuxième et troisième semaine la mélatonine semble produire une répression de l'expression d'ARN mais d'une façon non significative et finalement pendant la dernière semaine elle est encore augmentée. Par contre l'expression génique d'IGF 1 est un peu augmentée pour les échantillons traités avec la mélatonine chez les patients scoliotiques mais il n'y a pas de différence significative en comparant avec les non traités et l'expression semble suivre le même patron.



**Figure 26 : L'expression génique de IGF 1** – Comparaison entre les ostéoblastes scoliotiques versus les ostéoblastes témoins sains. Pour les deux groupes, on compare la détection génique d'IGF 1 aux différents stades de différenciation cellulaire pour les ostéoblastes stimulés avec une concentration de  $10^{-7}$  de mélatonine de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes* et ceux non traités. <0 time> représente le moment où les cellules deviennent confluentes. Les résultats sont représentés par des graphiques en unités relatives obtenues par la quantification de l'intensité de la bande et normalisés avec la

bande obtenue pour la  $\beta$  actine (moyenne  $\pm$  SD (écart type)). (a) Les bandes obtenues pour l'expression d'IGF 1 chez le témoin et chez le SIA avec leur poids moléculaire. (b) La représentation graphique de l'expression génique pour les ostéoblastes dérivés d'un sujet sain et (c) pour les ostéoblastes SIA. (\*) indique une  $p < 0.05$ ; (?) Échantillon contaminé. A noter que pour les ostéoblastes scoliotiques il n'y a aucune différence entre les cellules stimulées avec la mélatonine et les cellules non traitées.

Chez le non scoliotique, (*Figure 27*) la mélatonine semble produire une répression de l'expression génique d'IGF 1R et il y a une différence dépendamment du temps, avec un pic d'expression pendant la première semaine de culture après la confluence cellulaire. Chez les scoliotiques, l'expression génique d'IGF 1R semble suivre le même patron que la IGF 1; l'expression génique est très peu augmentée pour les échantillons traités avec la mélatonine mais il n'y a aucune différence significative en comparant avec ceux non traités avec une exception, au moment de la confluence des cellules. Il semble qu'au début de la différenciation, les ostéoblastes scoliotiques traités avec la mélatonine expriment d'avantage l'ARN que les cellules non traitées. Cependant il n'y a aucune différence d'expression entre les scoliotiques et non scoliotiques sans l'effet de la mélatonine.



**Figure 27 : L'expression génique de IGF 1R** – Comparaison entre les ostéoblastes scoliotiques versus les ostéoblastes témoins sains. Pour les deux groupes, on compare la détection génique d'IGF 1R aux différents stades de différenciation cellulaire pour les ostéoblastes stimulés avec une concentration de  $10^{-7}$  de mélatonine de façon décrite dans la section *Matériel et méthodes* et ceux non traités. <0 time> représente le moment où les cellules deviennent confluentes. Les résultats sont représentés par des graphiques en unités



relatives obtenues par la quantification de l'intensité de la bande et normalisés avec la bande obtenue pour la  $\beta$  actine (moyenne  $\pm$  SD (écart type)).

(a) Les bandes obtenues pour l'expression d'IGF 1R chez le témoin et chez le SIA avec leur poids moléculaire. (b) La représentation graphique de l'expression génique pour les ostéoblastes dérivés d'un sujet sain et (c) pour les ostéoblastes SIA. (\*) Indique une  $p < 0.05$ ; (?) Échantillon contaminé.

## **Chapitre 7.**

## 7. Discussion

La *Scoliose Idiopathique* est une problématique à laquelle la population d'adolescents est confrontée. Tel que mentionné dans l'introduction, la SIA avec sa fréquence, ses complications et les traitements longs et coûteux qu'elle engendre, constitue un problème de santé important. Pour contrecarrer les effets néfastes de la SIA tant au point de vue de l'individu atteint, que du point de vue économique, il est très important de développer de nouvelles approches thérapeutiques, notamment au niveau des processus régularisant le remodelage osseux et la régénération des tissus osseux. En effet, une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre de mieux comprendre les effets pathophysiologiques de la SIA et d'améliorer les traitements.

Plusieurs acteurs sont impliqués dans le processus de remodelage osseux. D'un côté il y a les ostéoblastes responsables de la synthèse osseuse et les ostéoclastes qui sont responsables de la résorption osseuse et de l'autre côté il y a les facteurs de croissance toujours présents et responsables de la modulation de ce processus. Beaucoup de facteurs de croissance ont été décrits et leur présence dans le processus de remodelage osseux a déjà été démontrée. Même si un grand nombre de ces facteurs ont été identifiés chez les patients atteints par la SIA, très peu d'études ont porté sur leur activité et leur influence possible sur l'étiologie de la SIA ou bien sur l'aggravation de la déformation du rachis.

Parmi cette variété de molécules impliquées dans la formation et le remodelage osseux l'IGF 1 est devenu un des plus proéminent. L'IGF 1 est un des plus importants facteurs de croissance secrétés par les cellules et est considéré comme un facteur autocrine pour la régulation fonctionnelle des ostéoblastes (Canalis et al., 1991; Mohan et al, 1988). L'implication d'IGF 1 dans la prolifération et la différenciation des ostéoblastes aussi que dans l'apposition minérale a été bien documentée (Canalis et al., 1989; Romano, 2003; Zhang et al., 2002). Toutefois, l'implication de ce facteur dans la SIA n'a pas été décrite.

La formation osseuse est très intimement liée à la formation de vaisseaux sanguins. Plusieurs études ont montré que les ostéoblastes sont capables d'une production de VEGF et qu'ils peuvent aussi démontrer des récepteurs membranaires lors de la différenciation cellulaire (Masood et al.2001). L'expression de VEGF et l'angiogénèse conséquente, sont des processus importants tout au cours de la réparation tissulaire, tels que celui d'une greffe vertébrale. Deckers et al, montrent que la différenciation des ostéoblastes, *in vitro*, est caractérisée par une expression séquentielle de VEGF A, avec un premier pic au début de la différenciation et suivie d'un maximum d'expression pendant la période de minéralisation. Cependant, aucun auteur n'a décrit les effets de VEGF A et ses récepteurs chez les patients scoliotiques.

Ces faits nous ont porté a étudier l'IGF 1, le VEGF A et leurs récepteurs dans le contexte de la scoliose idiopathique de l'adolescent.

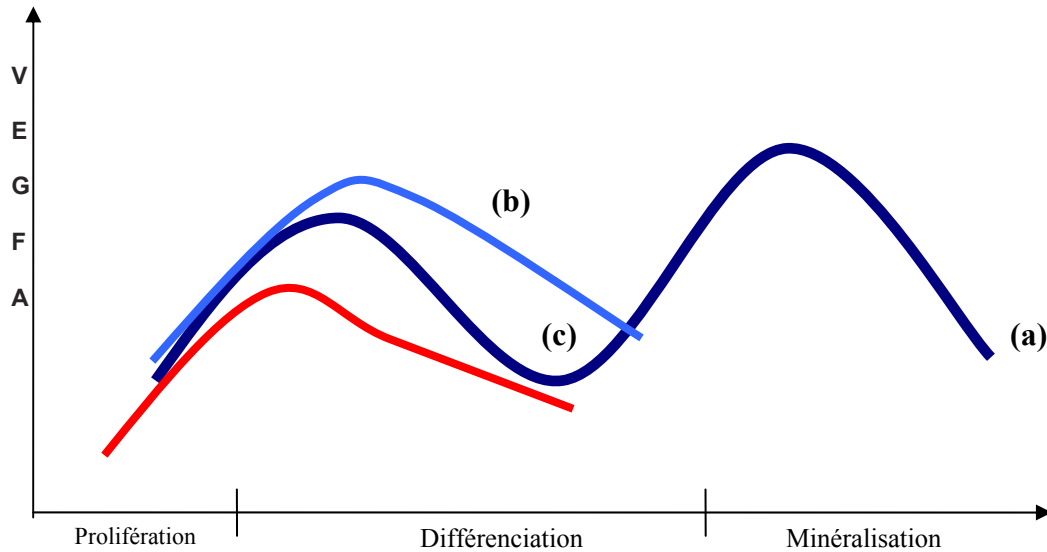
La mélatonine et les œstrogènes ont un rôle physiologique dans la différenciation de l'ostéoblaste qui apparaît critique durant la période de remodelage vertébral, au moment de la croissance pubertaire. Récemment, la dysfonction de signalisation de la mélatonine a été démontrée chez l'ostéoblaste provenant de patients avec SIA et implique plusieurs processus qui se déroulent au niveau de la fonction biologique des protéines G inhibitrices (Moreau et al. 2004). Toutefois, la dysfonction de signalisation de la voie n'a pas pu élucider pourquoi la scoliose apparaît, et progresse à la puberté, pendant la période de croissance rapide, contrôlée par les hormones. Une autre question a été posé : est-il possible que ce défaut de signalisation de la mélatonine démontré chez les scoliotiques puisse jouer un rôle dans l'action du VEGF A ou d'IGF 1 sur l'ostéoblaste scoliotique?

Les résultats présentés dans cette thèse apportent un regard nouveau sur l'étude de la prolifération et différenciation des ostéoblastes chez les patients scoliotiques. Pour une première fois, on a montré une différence d'action d'IGF 1 et de VEGF A sur les ostéoblastes provenant des patients scoliotiques versus les non scoliotiques. De façon générale les ostéoblastes provenant de patients scoliotiques ont une ostéogénèse *in vitro* plus accélérée que le sujet non scoliotique. Nous avons démontré ce fait par la coloration des cellules. En effet, de nos expériences, ressortent des résultats semblables à la littérature. Des études antérieures ont montré que les patients atteints par la SIA ont une taille plus grande et sont plus minces que les témoins sains (Archer et al, 1985; Buric et al.1982), ceci étant expliqué principalement par une formation osseuse plus accélérée et une maturation précoce. D'autres chercheurs ont trouvé que pendant la période pubertaire les patients

scoliotiques présentent un poids et un indice de masse corporelle réduits (Cheung et al. 2003). Pendant la croissance, les deux processus de formation et de modulation de l'os, sont intimement liés et sont concomitants chez les enfants et les adolescents. Le premier processus est dominant pendant l'enfance ayant comme résultat la formation de l'os tandis que la modulation prend le dessus après que le patient a atteint son pic de croissance. Cheung et al. ont démontré que chez les scoliotiques, ces deux processus sont mal couplés ayant comme résultat une augmentation de la croissance osseuse parallèlement à une réduction de la masse osseuse (Cheung et al. 2006). C'est connu que l'IGF a des effets sur le métabolisme osseux, et on sait que sa concentration sérique est très variable avec l'âge, avec un pic pendant la puberté. Une dysfonction dans l'action d'IGF peut expliquer quelques manifestations de la scoliose, tel que l'ostéopénie. Finalement, une première conclusion raisonnable, confirmée dans la littérature, a été tirée de cette étude préliminaire : une croissance accélérée et une maturation squelettique avancée sont caractéristiques chez les patients atteints par la scoliose idiopathique d'adolescent.

### **7.1. Le rôle de VEGF A sur la prolifération et différenciation des ostéoblastes scoliotiques *in vitro* comparée aux non scoliotiques.**

Bien que le mécanisme exact de la production de VEGF – A et sa sécrétion par les ostéoblastes n'ait pas encore été totalement élucidée, les VEGFs ont été impliqués dans divers aspects de la fonction des ostéoblastes. Même si on n'est pas certain comment le VEGF A est produit, on a montré que les ostéoblastes, scoliotiques ou non, expriment le facteur et les récepteurs de VEGF. De plus, on a pu montrer que l'expression est influencée par plusieurs facteurs, tel que la mélatonine. Bien que notre étude n'apporte pas d'analyse fonctionnelle du rôle de VEGF A lors de la prolifération ou de la différenciation cellulaire des ostéoblastes scoliotiques, il est possible d'établir plusieurs corrélations intéressantes avec d'autres études. Des résultats ont suggéré que la liaison du VEGF à VEGFR, conduit à une angiogénèse et à une mitogénèse induite par VEGF, et à la survie cellulaire (Neufeld, Cohen et al. 1999). Contrairement à la littérature, dans nos essais, le VEGF A tend à avoir un effet inhibiteur sur la prolifération d'ostéoblastes *in vitro*. Une concentration proche de celle physiologique de VEGF A, a un effet d'inhibition sur la prolifération d'ostéoblastes scoliotiques ainsi que chez le non scoliotique comparé à des cellules non traitées. Une explication possible serait que le VEGF A est exprimé dans les ostéoblastes d'une façon directement liée à la différenciation cellulaire tel que démontrée à la *figure 28 (a)* et que la réponse des ostéoblastes au VEGF A exogène : c'est le lancement de la différenciation.



**Figure 28 : L'expression génique de VEGF A pendant l'ostéogénèse.** (a) représentation schématique d'expression de VEGF A et son caractère temporel et séquentiel. (b) La représentation approximative de nos résultats pour les ostéoblastes dérivés de sujets sains et (c) pour les ostéoblastes scoliotiques.

La faible manifestation de l'expression de VEGF A se produit à un stade précoce, suivie d'un pic au cours de la différenciation des ostéoblastes. C'est seulement au cours de la différenciation terminale que l'expression est considérablement augmentée, et arrive à un niveau maximum pendant la période de minéralisation (Deckers, Karperien et al. 2000). On a remarqué, même si ceci n'est qu'une étude préliminaire, qu'un maximum d'expression génique de VEGF A a été enregistré pendant la première et deuxième semaine de culture, après la confluence cellulaire, chez le patient non scoliotique aussi que chez le scoliotique. Ceci démontré que les ostéoblastes dérivés d'un sujet avec SIA suivent le même patron d'expression mais avec un pic d'expression sensiblement décalé vers le début de la



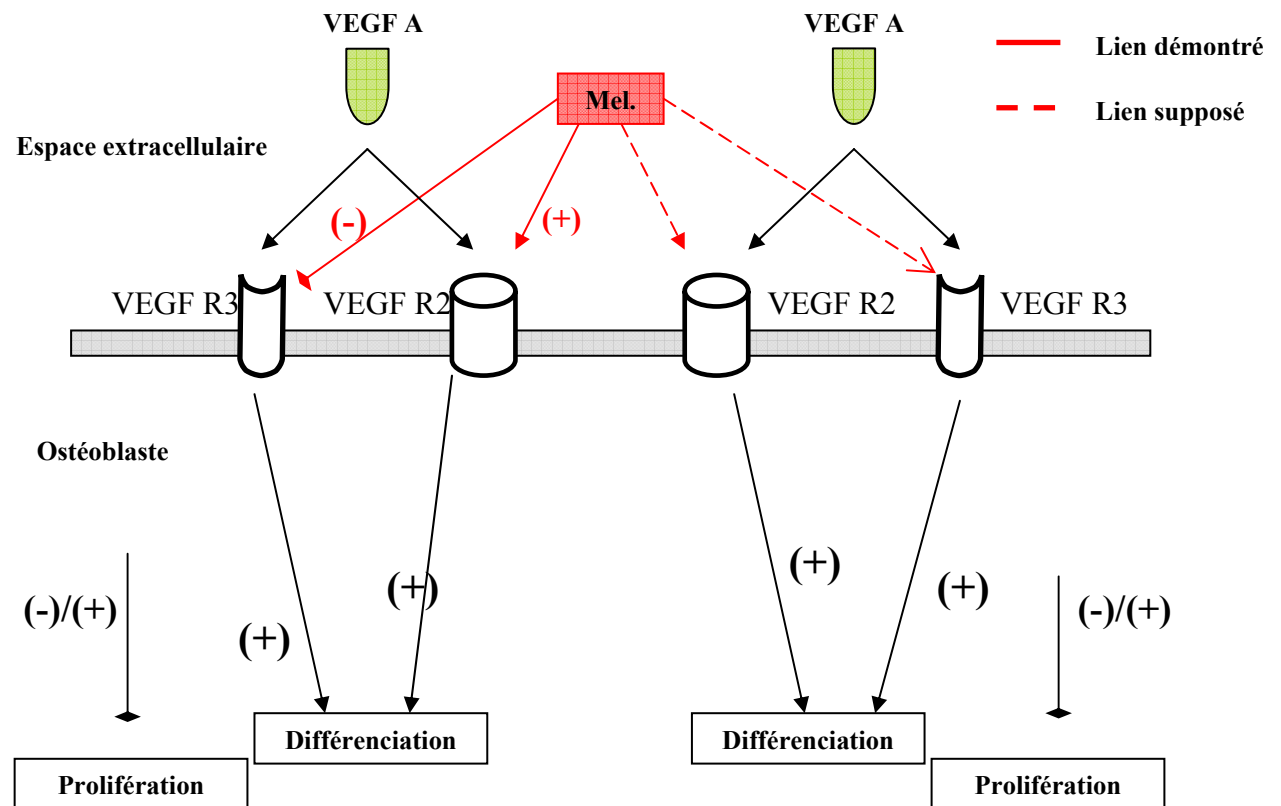
différenciation (*figure 28,(b)(c)*). Ces résultats nous confirment que les ostéoblastes scoliotiques ont une différenciation plus accélérée *in vitro* que les témoins non scoliotiques.

L'addition de VEGF A exogène a probablement comme effet un accroissement de la différenciation cellulaire, d'où l'inhibition de la prolifération. Il faut toutefois noter, qu'après le traitement avec une concentration plus élevée de VEGF A, il n'y a aucune différence entre les scoliotiques et non scoliotiques, même si normalement les ostéoblastes scoliotiques ont des taux de prolifération plus élevés si on les compare avec les non scoliotiques. Une telle observation pourrait jeter un nouveau regard sur l'action de VEGF A chez les patients SIA; il est tentant de spéculer, en se basant sur ces études, qu'une stimulation avec du VEGF devrait peut être induire une inhibition de la prolifération, cela produisant une réduction de l'évolution de la scoliose et de ses complications (p.ex. l'ostéopenia). Un traitement avec des concentrations élevées de VEGF A, pendant la période de croissance de l'adolescent, pourraient réduire le taux élevé d'ostéogénèse et contrôler la scoliose.

Les résultats cliniques et histologiques récents suggèrent que l'utilisation de concentrés plaquettaires ont des avantages techniques et pourraient augmenter la régénération osseuse lorsque utilisés en même temps que les greffes osseuses autologues, les allogreffes osseuses sèches congelées et une substance de substitution osseuse alloplastique (Marx et al, 1998). On suppose que le PRP (plasma riche en plaquettes) agirait d'une façon semblable à différents facteurs de croissance, dont l'IGF 1 et le VEGF A, et que les préparations contenant la concentration maximale de facteurs de croissance

pourraient être idéales. Toutefois, aucune étude visant l'action d'un concentré plaquettaire sur les ostéoblastes scoliotiques n'a été faite. À la lumière de nos résultats démontrant que le VEGF A inhibent *in vitro* la prolifération des ostéoblastes scoliotiques, de façon dépendante de sa concentration, il serait important de déterminer, si *in vivo*, les concentrations élevées des VEGF A contenues dans les PRP mènent à une inhibition de la prolifération, donc à un ralentissement de la formation de la greffe osseuse.

Il est connu que les membres de la famille de VEGF agissent comme facteurs de croissance paracrines par l'activation des récepteurs VEGFR. De plus, l'expression génique de ces récepteurs est dépendante des stades de la différenciation cellulaire. La seule différence significative a été trouvée au niveau de l'expression génique de VEGF R2. La plupart des études démontrent que le VEGF R2 est fréquemment exprimé par des cellules endothéliales ou par des cellules tumorales. Chez les ostéoblastes l'expression de VEGF R2 a été décrite par Deckers et al; cependant plusieurs autres études ont échouées à démontrer son implication dans la différenciation des ostéoblastes (Wang et al. 1996; Gerber et al. 1999). Un model schématique qui représente l'action de VEGF A sur ses récepteurs et son effet sur la prolifération et la différenciation cellulaire est présenté à la *figure 29*.



**Figure 29 : Model potentiel explicatif représentant l'action de VEGF A et ses récepteurs VEGF R2 et VEGF R3, sur la différenciation et la prolifération des ostéoblastes provenant des sujets sains et scoliotiques.** Chez les témoins, la mélatonine semble avoir un effet suppressif sur le VEGF R3 et elle semble stimuler le VEGF R2. Chez les ostéoblastes SIA, la mélatonine semble avoir un effet positif sur l'expression génique de VEGF et ses récepteurs. (+) représente stimulation, (-) représente inhibition. La prolifération, dans nos expériences, semble être inhibée ou stimulée en fonction de la concentration des facteurs impliqués.

En ce qui concerne l'expression génique de VEGF R2, nos résultats nous amènent à la conclusion que ce récepteur est exprimé pendant la différenciation cellulaire des ostéoblastes et le patron d'expression ressemble beaucoup à l'expression de VEGF A, avec un caractère temporel. Chez les ostéoblastes scoliotiques l'expression semble avoir un caractère progressif avec une augmentation continue jusqu'à la fin de la différenciation.

La mélatonine joue un rôle physiologique dans la différenciation de l'ostéoblaste qui apparaît critique durant la période de remodelage vertébral, au moment de la croissance pubertaire. Parmi les effets de la mélatonine, on mentionne qu'elle inhibe la différenciation de l'ostéoclaste et stimule la différenciation de l'ostéoblaste. L'expression génique de VEGF A tant que pour le VEGF R2, est augmentée pour les échantillons traités avec la mélatonine chez les patients scoliotiques mais il n'y a pas de différence significative en comparant avec les non traités. Du côté du contrôle, par contre, la mélatonine a eu un effet inhibitif pour l'expression génique avec une exception observée toujours pendant la première semaine (au moment de la confluence des cellules). Ceci peut être expliqué par le fait que la mélatonine aide les ostéoblastes à avoir une différenciation plus précoce que chez les non traités (Roth et al, 1999). Aussi, il y a une possibilité que la mélatonine stimule l'expression génique de VEGF A lors de la prolifération cellulaire.

En résumé, le VEGF A et ses récepteurs R2 et R3, sont impliqués dans la prolifération et la différenciation des ostéoblastes et il semble que la mélatonine accélère le plus le processus de différenciation et de minéralisation des ostéoblastes scoliotiques.

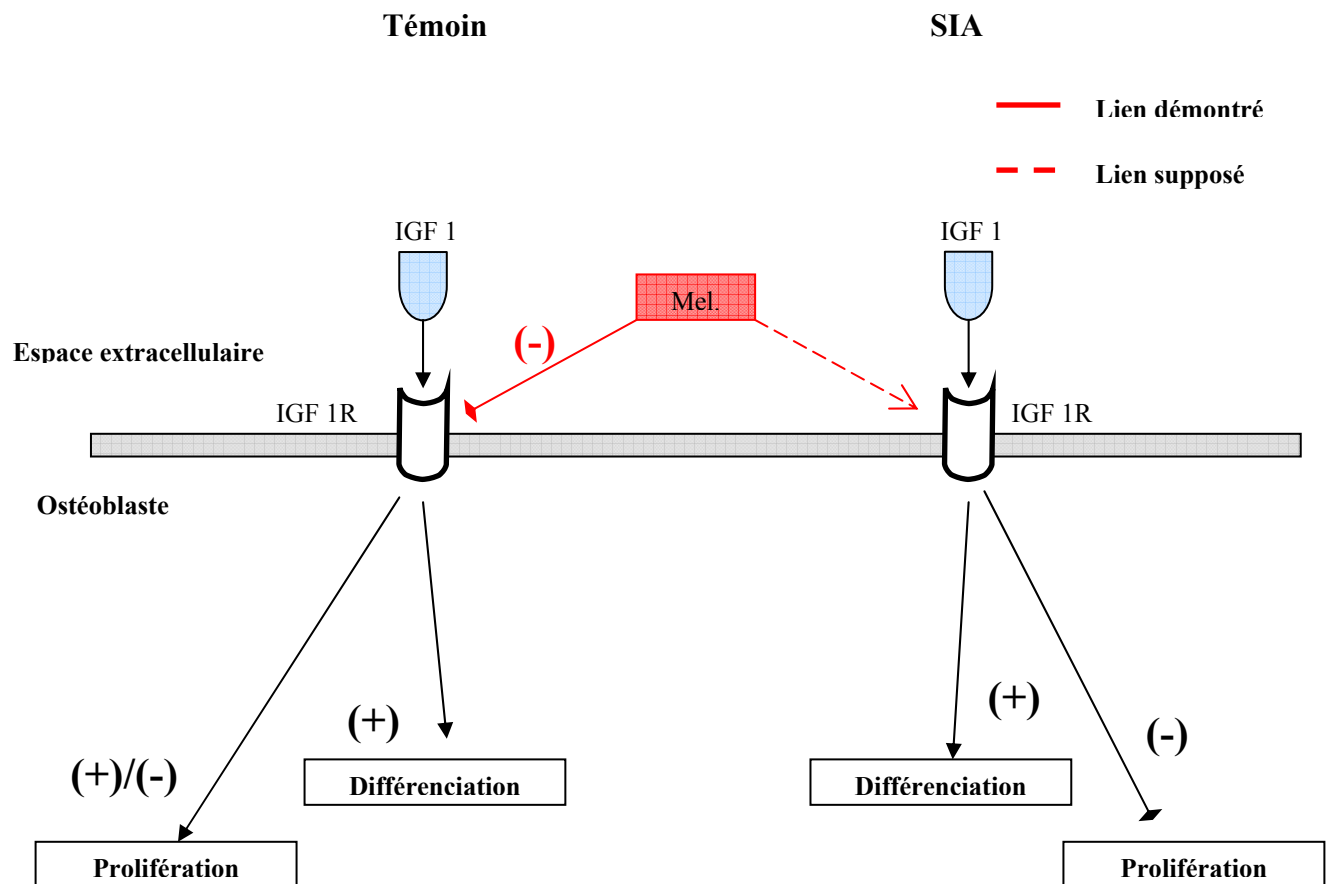
## **7.2. Le rôle d'IGF 1 sur la prolifération et différenciation des ostéoblastes scoliotiques *in vitro* comparée aux non scoliotiques.**

Quelques études ont conclu que l'action d'IGF est essentielle pour l'ostéogénèse, la croissance osseuse et pour maintenir la masse osseuse. Indépendamment de l'expression d'IGF-I dans les os, la formation osseuse nette est améliorée et par conséquent, l'action de l'IGF et de l'IGF - IR est critique pour le développement normal et pour la minéralisation de l'os. Yeung et al. (2006) ont trouvé que le polymorphisme d'IGF 1 peut affecter la courbure scoliotique même s'il n'y a aucune association avec le début de la maladie. De façon similaire à VEGF A, l'IGF 1 est un acteur potentiel dans l'histoire naturelle de la scoliose et il est très bien corrélé avec les stades pubertaires. Sanders et al. (2006) ont trouvé que l'IGF 1 est un très bon marqueur pour identifier si le patient est avant ou après son pic de croissance. De façon similaire, un enfant avec un déficit d'hormone de croissance, a une petite stature, un retard de croissance et exprime une concentration très faible d'IGF 1 et d'IGF BP3. Dans nos essais, l'IGF 1 tend à avoir un effet inhibiteur aussi qu'un effet positif sur la prolifération d'ostéoblastes provenant d'un sujet sain, effet différent en fonction de la concentration et du temps. Une concentration proche de la concentration physiologique d'IGF produit une inhibition sur la prolifération d'ostéoblastes non scoliotiques ainsi que sur les scoliotiques tandis qu'une concentration dix fois plus faible semble avoir un effet favorable seulement sur la prolifération des ostéoblastes non

scoliotiques. Dans ces cas les ostéoblastes semblent suivre la ligne générale décrite dans la littérature à savoir que les IGFs sont des facteurs de croissance fréquemment sécrétés par les cellules osseuses et sont considérés comme des régulateurs autocrines de la fonction des cellules ostéoblastiques. Le niveau de l'hormone de croissance ainsi que de la somatomedine (IGF) ont été étudiés chez les scoliotiques mais avec de résultats contradictoires. Willner et al ont trouvé que le niveau basal d'IGF chez les patients AIS est plus élevé, de façon significative, que chez le non scoliotique. Des résultats semblables ont été rapportés aussi par l'équipe d'Ascani (Willner et al.1976; Ascani et al.1983). Au contraire, Spencer et al. ont estimé aussi le niveau de somatomedine dans les patients atteints par la SIA et ils n'ont pas trouvé de différences en comparant avec des témoins semblables non scoliotiques. D'une façon similaire, Skogland et al n'étaient pas capables de trouver une différence significative (Spencer et al. 1977; Skogland et al. 1981). Les résultats de nos essais sur la prolifération cellulaire des ostéoblastes scoliotiques *in vitro* démontrent que l'IGF 1 peut stimuler selon la concentration du facteur. Une concentration faible d'IGF 1 exogène (10 ng/ml), n'a aucun effet sur la prolifération tandis qu'une concentration élevée (100 ng/ml) produit une diminution du taux de prolifération des ostéoblastes SIA, mais le taux de prolifération reste encore plus élevé que chez les ostéoblastes sains. Ces résultats diffèrent beaucoup de ceux obtenus chez les témoins non scoliotiques. Nos résultats montrent que chez les ostéoblastes provenant d'un sujet sain, une concentration faible d'IGF 1 exogène (10 ng/ml) a comme effet une stimulation significative de la prolifération cellulaire tandis qu'une concentration plus élevée (100

ng/ml) produit une inhibition de la prolifération. De plus nos résultats montrent que l'expression génique *in vitro*, d'IGF 1 et d'IGF 1R, chez les témoins sains ainsi que chez les ostéoblastes scoliotiques sont très semblables et aucune différence significative n'a été observée. Ces observations nous font penser que le niveau circulant d'IGF ne joue pas un rôle dans l'étiologie de SIA et qu'en plus son action directe sur l'ostéoblaste est différente. Cependant, un défaut du mécanisme d'action d'IGF ou de son récepteur pourrait expliquer quelques modifications trouver chez le SIA. Il est possible que le niveau circulant de somatomedine dépende plus de ce défaut que de l'action d'IGF 1 démontrée chez les scoliotiques. Une représentation schématique des effets d'IGF 1 et IGF 1R est montrée à la *figure 30*.

En suivant la même logique que pour le VEGF A, les concentrations élevées des IGF 1 contenu dans les PRP mènent à une inhibition de la prolifération; donc l'application directe sur la greffe osseuse peut mener à un ralentissement de la formation de la greffe.



**Figure 30 : Model potentiel représentant l'action d'IGF 1 et son récepteur IGF 1R sur la différenciation et la prolifération des ostéoblastes provenant des sujets sains et scoliotiques.** La mélatonine semble avoir un effet répresseur sur l'expression génique d'IGF 1 et IGF 1R chez les témoins sains, toutefois cet effet n'est pas présent chez les SIA. (+) stimulation, (-) inhibition. La mélatonine, chez les scoliotiques, semble n'avoir aucune influence sur la expression génique d'IGF 1 tandis que chez les témoins sains, elle produit une répression de l'expression.



Westendorf et al (2004) ont conclu que l'IGF 1 a une influence importante pendant le début de la différenciation et très tard dans la phase de minéralisation osseuse. Un des facteurs essentiels impliqués dans la minéralisation osseuse, est sans doute l'IGF 1. Généralement, l'expression d'IGF 1 et d'IGF 1R semble avoir un caractère temporel et séquentiel semblable à VEGF A, avec une augmentation de l'expression au début de la différenciation et un pic dans la phase de minéralisation osseuse. Son action est probablement très importante pendant la période de croissance maximale quand l'ostéogénèse est accélérée et alors un défaut du mécanisme d'action d'IGF 1R peut expliquer l'ostéopénie trouvée chez les patients atteints par la SIA.

Chez le non scoliotique, la mélatonine semble avoir un effet répressur sur l'expression d'IGF 1 aussi que d'IGF 1R et il y a une différence dépendamment du temps avec une petite augmentation vers le début de la différenciation. Cette observation est corroborée par les résultats obtenus par Suzuki et Attori, en 2002, résultats qui montrent que l'expression d'ARNm pour l'IGF 1R est inhibée par la mélatonine. Des études plus récentes ont montré qu'une telle activité directe de la mélatonine est détectable dans les pré-ostéoblastes et dans les lignes cellulaires d'ostéosarcomes ostéoblastiques du rat (Roth et al. 1999).

Toutefois les cellules pré-ostéoblastiques en présence de 50nM de mélatonine se sont différenciées plus précocement. Les deux lignes cellulaires en présence de concentrations nanomolaires de mélatonine ont augmenté l'expression génique de

sialoprotéines osseuses et des protéines osseuses marqueurs : phosphatase alcaline, ostéopontine et ostéocalcine. Cependant une autre étude qui a utilisé des cellules osseuses humaines normales et lignées cellulaires ostéoblastiques humaines, a montré que la mélatonine a augmenté significativement (le double) et dépendamment de la dose, la prolifération cellulaire avec un effet maximal à une concentration de 50 $\mu$ M. Dans cette étude la mélatonine a augmenté la production du procollagène de type I peptide-c (une mesure de la synthèse de collagène type I) mais n'a pas influencé l'activité de la phosphatase alcaline ou la sécrétion d'ostéocalcine (Cardinali et al 2003). Pour vérifier l'influence de la mélatonine sur la prolifération des cellules ostéoblastiques SIA, on doit reprendre les expériences en présence de la mélatonine.

En contraste avec l'expression génique d'IGF 1 chez les ostéoblastes normaux, chez les scoliotiques l'expression est très sensiblement augmentée pour les échantillons traités avec la mélatonine mais il n'y a aucune différence significative en comparant avec les non traités. L'expression génique d'IGF 1R semble suivre le même patron que l'IGF 1; elle est très peu augmentée pour les échantillons traités avec la mélatonine mais encore une fois, il n'y a pas de différence significative en comparant avec les non traités. Le fait que les ostéoblastes scoliotiques stimulés avec de la mélatonine n'expriment pas une répression de l'expression de IGF 1R comme attendue, peut suggérer que sûrement l'expression d'IGF 1R n'est pas influencée directement par la mélatonine mais possiblement à cause du défaut de signalisation de la mélatonine. Ce résultat tend à confirmer ceux obtenus par Moreau et al. (2004). Cependant un défaut de signalisation de la mélatonine chez les scoliotiques peut

expliquer le changement dans la concentration d'IGF circulant démontrée par Willner et al. Ils ont trouvé que le niveau basal d'IGF chez les patients AIS est plus élevé, d'une façon significative, que chez le non scoliotique.

Pour s'en assurer, on doit reprendre les expériences en présence d'antagoniste de récepteurs de la mélatonine. Toutefois, on doit reprendre les expériences avec des patients SIA faisant partie des trois groupes fonctionnels tels que décrits par Moreau et al. Ahne et al ont démontré que la mélatonine induira la phosphorylation rapide de la tyrosine et l'activation de la tyrosine kinase de l'unité  $\beta$  du récepteur d'IGF (Ahne et al. 2004). Le défaut de signalisation de la mélatonine peut agir directement sur l'effet d'inhibition d'IGF résultant dans une différenciation prolongée chez les scoliotiques.

Toutefois, la controverse demeure encore aujourd'hui à savoir si l'IGF est vraiment impliqué dans l'étiologie de la scoliose et de savoir de quelle façon il agit sur les ostéoblastes scoliotiques.

## Conclusion

Le but de cette recherche n'était pas d'affirmer que l'étude sur l'influence des facteurs de croissance sur les ostéoblastes scoliotiques *in vitro* est la clé qui mènera à la compréhension totale de SIA, mais plutôt de démontrer l'importance de la composante des facteurs de croissance sur la maturation de l'ostéoblaste scoliotique dans des cultures cellulaires. Mes travaux, conjointement à ceux d'autres équipes, visent ultimement un changement de l'approche thérapeutique de la SIA, où chaque composante de cette maladie sera considérée, tel que la composante cellulaire.

L'action de l'IGF et de VEGF est essentielle pour l'ostéogénèse, pour la prolifération ou la différenciation des ostéoblastes. Nos résultats montrent l'effet direct de ces deux facteurs sur l'ostéoblaste mais ne considèrent pas l'effet clinique de l'angiogénèse sur la formation osseuse. Les travaux décrits dans ce mémoire apportent de l'information nouvelle sur l'action de IGF et VEGF sur les ostéoblastes scoliotiques et aussi sur l'influence de la mélatonine sur ces deux facteurs chez les patients scoliotiques.

Bien que notre étude n'apporte pas d'analyse fonctionnelle du rôle de VEGF A et d'IGF 1 lors de la prolifération ou de la différenciation cellulaire des ostéoblastes scoliotiques, il est possible de tirer quelques conclusions intéressantes. Une première conclusion raisonnable, confirmé dans la littérature, peut être tirée de cette étude

préliminaire : une croissance accélérée et une maturation squelettique avancée sont caractéristiques chez les patients atteints par la scoliose idiopathique de l'adolescent.

Deuxièmement, contrairement à la littérature, le VEGF A autant que l'IGF 1, tend à avoir un effet inhibiteur sur la prolifération d'ostéoblastes scoliotiques *in vitro*. Les concentrations élevées de VEGF A et d'IGF 1 contenues dans les PRP peuvent mener à une inhibition de la prolifération. L'application directe sur la greffe osseuse peut mener à un ralentissement de l'ossification. Un traitement avec des concentrations élevées de VEGF A, pendant la période de croissance d'adolescent, pourraient réduire la taux élevé d'ostéogénèse et contrôler la scoliose.

Troisièmement, la mélatonine joue un rôle physiologique dans la différenciation de l'ostéoblaste scoliotique et elle semble produire une différenciation plus précoce que chez les non traités. Un défaut dans l'action de la mélatonine chez les scoliotiques peut expliquer l'ostéogénèse prolongée démontrée chez les patients SIA.

Finalement, on a démontré que les ostéoblastes scoliotiques expriment un défaut d'expression de l'IGF 1 et d'IGF 1R en présence de la mélatonine. Il semble que l'effet d'inhibition de la mélatonine n'est pas présent chez les scoliotiques.

À la lumière des résultats obtenus, quelques éléments demeurent sans réponse et un bon nombre de questions ont été soulevées après cette étude.

- Premièrement, existe-t-il une corrélation entre les résultats *in vitro* obtenus et la formation osseuse *in vivo*? Pour répondre à cette question une étude *in vivo* visant l'influence de ces facteurs de croissance sur l'ostéogénèse devrait peut-être, être réalisée.
- De nouveaux essais *in vitro* seraient nécessaires pour élucider le rôle de VEGF A et d'IGF 1 sur les ostéoblastes scoliotiques. Toutefois, il faut trouver une concentration idéale de ces facteurs qui pourraient avoir une influence positive sur l'ostéogénèse de l'ostéoblaste scoliotique.
- Il semble que pour les ostéoblastes scoliotiques, la mélatonine peut jouer un rôle dans l'expression des VEGF et d'IGF et de leurs récepteurs. Pour s'assurer qu'ils ne sont pas inhibés directement par la mélatonine, on doit reprendre les expériences en présence d'antagoniste de récepteurs de la mélatonine. Toutefois, on doit reprendre les expériences avec des patients SIA faisant partie des trois groupes fonctionnels tels que décrits par Moreau et al.

Bien que des résultats prometteurs aient été obtenus par plusieurs auteurs, davantage d'efforts de recherche seront essentiels afin d'optimiser l'utilisation des facteurs de croissance. Rappelons-nous que la guérison est un phénomène complexe qui nécessite une grande variété de types cellulaires et de médiateurs spécialisés dans une séquence temporelle spécifique. Plusieurs études devront être réalisées afin d'obtenir un meilleur contrôle sur le mécanisme de guérison.

## Bibliographie

- Aaro, S. and C. Ohlund (1984). "Scoliosis and pulmonary function." Spine **9**(2): 220-2.
- Adams, W. (1865). Lecture on the pathology and treatment of lateral and other forms of curvature of spine, London: Churchill and Sons.
- Akeno, N., M. F. Czyzyk-Krzeska, et al. (2001). "Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible factor-2alpha." Endocrinology **142**(2): 959-62.
- Amaar, Y. G., G. R. Thompson, et al. (2002). "Insulin-like growth factor-binding protein 5 (IGFBP-5) interacts with a four and a half LIM protein 2 (FHL2)." J Biol Chem **277**(14): 12053-60.
- Anciaux, M., A. Lenaert, et al. (1991). "Transcutaneous electrical stimulation (TCES) for the treatment of adolescent idiopathic scoliosis: preliminary results." Acta Orthop Belg **57**(4): 399-405.
- Anhe GF, Caperuto LC et al. (2004) "In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in rat hypothalamus." J Neurochem (90) : 559-566
- Archer I.A., Dickson R.A. (1985) "Stature and idiopathic scoliosis. A prospective study" J Bone Joint Surg Br; 67:185-8
- Armstrong, G. W., N. B. Livermore, 3rd, et al. (1982). "Nonstandard vertebral rotation in scoliosis screening patients. Its prevalence and relation to the clinical deformity." Spine **7**(1): 50-4.
- Ascani E., Borrelli P. et al. (1983) "Hormonal features in idiopathic scoliosis" M Pecina, ed Scoliosis and Kyphosis 246-7
- Asher, M. A. and D. C. Burton (1999). "A concept of idiopathic scoliosis deformities as imperfect torsion(s)." Clin Orthop Relat Res(364): 11-25.
- Axelgaard, J. and J. C. Brown (1983). "Lateral electrical surface stimulation for the treatment of progressive idiopathic scoliosis." Spine **8**(3): 242-60.
- Baker, J., J. P. Liu, et al. (1993). "Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth." Cell **75**(1): 73-82.

- Barr, S. J., A. M. Schuette, et al. (1997). "Lumbar pedicle screws versus hooks. Results in double major curves in adolescent idiopathic scoliosis." Spine **22**(12): 1369-79.
- Barrack, R. L., T. S. Whitecloud, 3rd, et al. (1984). "Proprioception in idiopathic scoliosis." Spine **9**(7): 681-5.
- Bellows, C. G., J. E. Aubin, et al. (1987). "Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro." Endocrinology **121**(6): 1985-92.
- Bergofsky, E. H., G. M. Turino, et al. (1959). "Cardiorespiratory failure in kyphoscoliosis." Medicine (Baltimore) **38**: 263-317.
- Bhargava, U., M. Bar-Lev, et al. (1988). "Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells." Bone **9**(3): 155-63.
- Bjerkreim, I., B. Carlsen, et al. (1982). "Preoperative Cotrel traction in idiopathic scoliosis." Acta Orthop Scand **53**(6): 901-5.
- Bjure, J. and A. Nachemson (1973). "Non-treated scoliosis." Clin Orthop Relat Res(93): 44-52.
- Blanco, J. S. and C. J. Sears (1997). "Allograft bone use during instrumentation and fusion in the treatment of adolescent idiopathic scoliosis." Spine **22**(12): 1338-42.
- Blount, W. P., A. C. Schmidt, et al. (1958). "The Milwaukee brace in the operative treatment of scoliosis." J Bone Joint Surg Am **40-A**(3): 511-25.
- Boden, S. D., G. J. Martin, Jr., et al. (1999). "The use of coralline hydroxyapatite with bone marrow, autogenous bone graft, or osteoinductive bone protein extract for posterolateral lumbar spine fusion." Spine **24**(4): 320-7.
- Boivin, G. and P. J. Meunier (2003). "The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research." Osteoporos Int **14 Suppl 3**: S19-24.
- Boonen, S., S. Mohan, et al. (1999). "Down-regulation of the serum stimulatory components of the insulin-like growth factor (IGF) system (IGF-I, IGF-II, IGF binding protein [BP]-3, and IGFBP-5) in age-related (type II) femoral neck osteoporosis." J Bone Miner Res **14**(12): 2150-8.
- Bozic, K. J., P. A. Glazer, et al. (1999). "In vivo evaluation of coralline hydroxyapatite and direct current electrical stimulation in lumbar spinal fusion." Spine **24**(20): 2127-33.
- Bradford, D. S., A. Tanguy, et al. (1983). "Surface electrical stimulation in the treatment of idiopathic scoliosis: preliminary results in 30 patients." Spine **8**(7): 757-64.



- Breen, E. C., R. A. Ignatz, et al. (1994). "TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype." J Cell Physiol **160**(2): 323-35.
- Bridwell, K. H. (1998). "Normalization of the coronal and sagittal profile in idiopathic scoliosis: options of treatment." J Orthop Sci **3**(2): 125-34.
- Bridwell, K. H., J. W. McAllister, et al. (1991). "Coronal decompensation produced by Cotrel-Dubousset "derotation" maneuver for idiopathic right thoracic scoliosis." Spine **16**(7): 769-77.
- Brown, C. A., L. G. Lenke, et al. (1998). "Complications of pediatric thoracolumbar and lumbar pedicle screws." Spine **23**(14): 1566-71.
- Brown, J. C., J. Axelgaard, et al. (1984). "Multicenter trial of a noninvasive stimulation method for idiopathic scoliosis. A summary of early treatment results." Spine **9**(4): 382-7.
- Bruder, S. P. and B. S. Fox (1999). "Tissue engineering of bone. Cell based strategies." Clin Orthop Relat Res(367 Suppl): S68-83.
- Bunnell, W. P. (1986). "The natural history of idiopathic scoliosis before skeletal maturity." Spine **11**(8): 773-6.
- Bunnell, W. P. (1986). "Spinal deformity." Pediatr Clin North Am **33**(6): 1475-87.
- Bunnell, W. P. (1988). "The natural history of idiopathic scoliosis." Clin Orthop Relat Res(229): 20-5.
- Bunnell, W. P., G. D. MacEwen, et al. (1980). "The use of plastic jackets in the non-operative treatment of idiopathic scoliosis. Preliminary report." J Bone Joint Surg Am **62**(1): 31-8.
- Buric M., Momcilovic B (1975) "Growth pattern and skeletal age in school girls with idiopathic scoliosis." Clin Orthop; 110:6-10
- Bushell, G. R., P. Ghosh, et al. (1979). "The collagen of the intervertebral disc in adolescent idiopathic scoliosis." J Bone Joint Surg Br **61-B**(4): 501-8.
- Bylund, P., S. Aaro, et al. (1987). "Is lateral electric surface stimulation an effective treatment for scoliosis?" J Pediatr Orthop **7**(3): 298-300.
- Canalis, E. (1983). "The hormonal and local regulation of bone formation." Endocr Rev **4**(1): 62-77.

- Canalis, E. (1985). "Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation." Clin Orthop Relat Res(193): 246-63.
- Carlevaro, M. F., S. Cermelli, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation." J Cell Sci **113 ( Pt 1)**: 59-69.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature **438**(7070): 932-6.
- Carr, W. A., J. H. Moe, et al. (1980). "Treatment of idiopathic scoliosis in the Milwaukee brace." J Bone Joint Surg Am **62**(4): 599-612.
- Carrington, J. L. and A. H. Reddi (1991). "Parallels between development of embryonic and matrix-induced endochondral bone." Bioessays **13**(8): 403-8.
- Centrella, M. and E. Canalis (1985). "Local regulators of skeletal growth: a perspective." Endocr Rev **6**(4): 544-51.
- Cheng, J. C. and X. Guo (1997). "Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A primary problem or secondary to the spinal deformity?" Spine **22**(15): 1716-21.
- 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.
- Cheung CSK, L. W., Tse YK, Tang SP, Lee KM, Guo X, Cheng JCY. (2003). "Abnormal peripubertal anthropometric measurements and growth pattern in adolescent idiopathic scoliosis: a study of 589 patients." Spine **28**: 2152-2157.
- Cheung CSK, Lee WTK et al. (2006) "Generalized osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis - association with abnormal pubertal growth bone turnover and calcium intake?" Spine **31**(3):330-338
- Christoffersen, C. T., H. Tornqvist, et al. (1998). "Insulin and insulin-like growth factor-I receptor mediated differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes: effect of PI 3-kinase inhibition." Biochem Biophys Res Commun **246**(2): 426-30.
- Cobb, J. (1948). "Outline for the study of scoliosis " American Academy of Orthopaedic Surgeons: instructional course **5**.
- Coillard, C., M. A. Leroux, et al. (2003). "SpineCor--a non-rigid brace for the treatment of idiopathic scoliosis: post-treatment results." Eur Spine J **12**(2): 141-8.
- Coillard, C. and C. H. Rivard (1996). "Vertebral deformities and scoliosis." Eur Spine J **5**(2): 91-100.

- Coillard, C., V. Vachon, et al. (2007). "Effectiveness of the SpineCor brace based on the new standardized criteria proposed by the scoliosis research society for adolescent idiopathic scoliosis." J Pediatr Orthop **27**(4): 375-9.
- Collin-Osdoby, P. (1994). "Role of vascular endothelial cells in bone biology." J Cell Biochem **55**(3): 304-9.
- Cook, S. D., J. E. Dalton, et al. (1995). "In vivo evaluation of demineralized bone matrix as a bone graft substitute for posterior spinal fusion." Spine **20**(8): 877-86.
- Cruess, R. L. (1986). "Osteonecrosis of bone. Current concepts as to etiology and pathogenesis." Clin Orthop Relat Res(208): 30-9.
- Deckers, M. M., M. Karperien, et al. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation." Endocrinology **141**(5): 1667-74.
- Dell, G., A. Ward, et al. (1997). "Regulation of a promoter from the mouse insulin like growth factor II gene by glucocorticoids." FEBS Lett **419**(2-3): 161-5.
- DePalma, A. F., R. H. Rothman, et al. (1972). "Anterior interbody fusion for severe cervical disc degeneration." Surg Gynecol Obstet **134**(5): 755-8.
- Dickson, J. H., W. D. Erwin, et al. (1990). "Harrington instrumentation and arthrodesis for idiopathic scoliosis. A twenty-one-year follow-up." J Bone Joint Surg Am **72**(5): 678-83.
- Dickson, R. A. (1984). "Screening for scoliosis." Br Med J (Clin Res Ed) **289**(6440): 269-70.
- Dickson, R. A. (1988). "The aetiology of spinal deformities." Lancet **1**(8595): 1151-5.
- Diegelmann, R. F. and M. C. Evans (2004). "Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing." Front Biosci **9**: 283-9.
- Dobbs, M. B., J. Buckwalter, et al. (1999). "Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist." Iowa Orthop J **19**: 43-52.
- Dubousset, J. and Y. Cotrel (1991). "Application technique of Cotrel-Dubousset instrumentation for scoliosis deformities." Clin Orthop Relat Res(264): 103-10.
- Duval-Beaupere, G. and J. Combes (1971). "[Upper and lower segments in the physiological growth of girls. Long-term study of the growth of 54 girls]." Arch Fr Pediatr **28**(10): 1057-71.

- Eliason, M. J. and L. C. Richman (1984). "Psychological effects of idiopathic adolescent scoliosis." J Dev Behav Pediatr **5**(4): 169-72.
- Emans, J. B., A. Kaelin, et al. (1986). "The Boston bracing system for idiopathic scoliosis. Follow-up results in 295 patients." Spine **11**(8): 792-801.
- Engsig, M. T., Q. J. Chen, et al. (2000). "Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones." J Cell Biol **151**(4): 879-89.
- Ferguson, C., E. Alpern, et al. (1999). "Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?" Mech Dev **87**(1-2): 57-66.
- Fisher, D. A., G. F. Rapp, et al. (1987). "Idiopathic scoliosis: transcutaneous muscle stimulation versus the Milwaukee brace." Spine **12**(10): 987-91.
- Folkman, J. and Y. Shing (1992). "Angiogenesis." J Biol Chem **267**(16): 10931-4.
- Friedlaender, G. E. and H. J. Mankin (1984). "Transplantation of osteochondral allografts." Annu Rev Med **35**: 311-24.
- Froum, S. J., S. S. Wallace, et al. (2002). "Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports." Int J Periodontics Restorative Dent **22**(1): 45-53.
- Frymoyer, J. W., A. Newberg, et al. (1984). "Spine radiographs in patients with low-back pain. An epidemiological study in men." J Bone Joint Surg Am **66**(7): 1048-55.
- Furman, M. I., L. Liu, et al. (1998). "The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3082-7.
- Furumatsu, T., Z. N. Shen, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis." J Biochem **133**(5): 633-9.
- Garcia-Ramirez, M., N. Toran, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor is expressed in human fetal growth cartilage." J Bone Miner Res **15**(3): 534-40.
- Gartland, A., K. A. Buckley, et al. (2005). "Isolation and culture of human osteoblasts." Methods Mol Med **107**: 29-54.
- Gentry, P. A. (1992). "The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair." J Comp Pathol **107**(3): 243-70.

- Gerber, H. P., T. H. Vu, et al. (1999). "VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation." Nat Med **5**(6): 623-8.
- Germeyer, A., A. E. Hamilton, et al. (2005). "Cellular expression and hormonal regulation of neuropilin-1 and -2 messenger ribonucleic Acid in the human and rhesus macaque endometrium." J Clin Endocrinol Metab **90**(3): 1783-90.
- Gerstenfeld, L. C., S. D. Chipman, et al. (1987). "Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts." Dev Biol **122**(1): 49-60.
- Glowacki, J. (1998). "Angiogenesis in fracture repair." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S82-9.
- Govoni, K. E., D. J. Baylink, et al. (2005). "The multi-functional role of insulin-like growth factor binding proteins in bone." Pediatr Nephrol **20**(3): 261-8.
- Griffet, J., M. A. Leroux, et al. (2000). "Relationship between gibbosity and Cobb angle during treatment of idiopathic scoliosis with the SpineCor brace." Eur Spine J **9**(6): 516-22.
- Hamill, C. L. and E. D. Simmons, Jr. (1997). "Interobserver variability in grading lumbar fusions." J Spinal Disord **10**(5): 387-90.
- Harrington, P. R. (1962). "Treatment of scoliosis. Correction and internal fixation by spine instrumentation." J Bone Joint Surg Am **44-A**: 591-610.
- Heemskerk, V. H., M. A. Daemen, et al. (1999). "Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation." Cytokine Growth Factor Rev **10**(1): 5-14.
- Helfrich, M. H. (2003). "Osteoclast diseases." Microsc Res Tech **61**(6): 514-32.
- Helm, G. A., H. Dayoub, et al. (2001). "Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis." Neurosurg Focus **10**(4): E4.
- Herbert, M. A. and W. P. Bobeckko (1987). "Paraspinal muscle stimulation for the treatment of idiopathic scoliosis in children." Orthopedics **10**(8): 1125-32.
- Herron, L. D. and A. C. Trippi (1989). "L4-5 degenerative spondylolisthesis. The results of treatment by decompressive laminectomy without fusion." Spine **14**(5): 534-8.
- Houck, K. A., N. Ferrara, et al. (1991). "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA." Mol Endocrinol **5**(12): 1806-14.

- Iwamoto, M., K. Shibano, et al. (1993). "Culture of marrow stromal cells derived from bone marrow specimens formed at fracture site of human long bone." Bone **14**(5): 799-805.
- Jackson, R. P., E. H. Simmons, et al. (1983). "Incidence and severity of back pain in adult idiopathic scoliosis." Spine **8**(7): 749-56.
- Jarvis, J. G. and R. N. Greene (1996). "Adolescent idiopathic scoliosis. Correction of vertebral rotation with use of Wisconsin segmental spinal instrumentation." J Bone Joint Surg Am **78**(11): 1707-12.
- Jeng, C. L., P. D. Sponseller, et al. (1993). "Outcome of Wisconsin instrumentation in idiopathic scoliosis. Minimum 5-year follow-up." Spine **18**(12): 1584-90.
- Jia, D. and J. N. Heersche (2000). "Insulin-like growth factor-1 and -2 stimulate osteoprogenitor proliferation and differentiation and adipocyte formation in cell populations derived from adult rat bone." Bone **27**(6): 785-94.
- Kahanovitz, N. and S. Weiser (1986). "Lateral electrical surface stimulation (LESS) compliance in adolescent female scoliosis patients." Spine **11**(7): 753-5.
- Kane, W. J. (1977). "Scoliosis prevalence: a call for a statement of terms." Clin Orthop Relat Res(126): 43-6.
- Kane, W. J. and J. H. Moe (1970). "A scoliosis-prevalence survey in Minnesota." Clin Orthop Relat Res **69**: 216-8.
- Kim, S. G., C. H. Chung, et al. (2002). "Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants." Int J Oral Maxillofac Implants **17**(1): 86-94.
- King, H. A., J. H. Moe, et al. (1983). "The selection of fusion levels in thoracic idiopathic scoliosis." J Bone Joint Surg Am **65**(9): 1302-13.
- La Grone, M. O. (1988). "Loss of lumbar lordosis. A complication of spinal fusion for scoliosis." Orthop Clin North Am **19**(2): 383-93.
- LeBlanc, R., H. Labelle, et al. (1998). "Morphologic discrimination among healthy subjects and patients with progressive and nonprogressive adolescent idiopathic scoliosis." Spine **23**(10): 1109-15; discussion 1115-6.
- Lee, H. M., V. Udupi, et al. (1999). "Stimulatory actions of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha on intestinal neurotensin and peptide YY." Endocrinology **140**(9): 4065-9.

- Lenke, L. G., K. H. Bridwell, et al. (1995). "Analysis of pulmonary function and chest cage dimension changes after thoracoplasty in idiopathic scoliosis." Spine **20**(12): 1343-50.
- Leung, D. W., G. Cachianes, et al. (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." Science **246**(4935): 1306-9.
- Lindh, M. and J. Bjure (1975). "Lung volumes in scoliosis before and after correction by the Harrington instrumentation method." Acta Orthop Scand **46**(6): 934-48.
- Longo, N., R. Singh, et al. (2001). "Decreased half-life of insulin-like growth factor I in Rabson-Mendenhall syndrome." J Inherit Metab Dis **24**(5): 546-50.
- Lonstein, J. E. (1994). "Adolescent idiopathic scoliosis." Lancet **344**(8934): 1407-12.
- Lonstein, J. E. (2006). "Scoliosis: surgical versus nonsurgical treatment." Clin Orthop Relat Res **443**: 248-59.
- Lonstein, J. E. and J. M. Carlson (1984). "The prediction of curve progression in untreated idiopathic scoliosis during growth." J Bone Joint Surg Am **66**(7): 1061-71.
- Lovallo, J. L., J. V. Banta, et al. (1986). "Adolescent idiopathic scoliosis treated by Harrington-rod distraction and fusion." J Bone Joint Surg Am **68**(9): 1326-30.
- Luque, E. R. (1982). "Segmental spinal instrumentation for correction of scoliosis." Clin Orthop Relat Res(163): 192-8.
- Machida, M., J. Dubousset, et al. (2006). "Experimental scoliosis in melatonin-deficient C57BL/6J mice without pinealectomy." J Pineal Res **41**(1): 1-7.
- Maes, C., P. Carmeliet, et al. (2002). "Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188." Mech Dev **111**(1-2): 61-73.
- Marx, R. E., E. R. Carlson, et al. (1998). "Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **85**(6): 638-46.
- Mayo, N. E., M. S. Goldberg, et al. (1994). "The Ste-Justine Adolescent Idiopathic Scoliosis Cohort Study. Part III: Back pain." Spine **19**(14): 1573-81.
- Mayr-Wohlfart, U., J. Waltenberger, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts." Bone **30**(3): 472-7.
- Mehta, M. H. (1992). "The conservative management of Juvenile Idiopathic Scoliosis." Acta Orthop Belg **58 Suppl 1**: 91-7.

- Midy, V. and J. Plouet (1994). "Vasculotropin/vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts." Biochem Biophys Res Commun **199**(1): 380-6.
- Miller, N. H. (1999). "Cause and natural history of adolescent idiopathic scoliosis." Orthop Clin North Am **30**(3): 343-52, vii.
- Miller, N. H., C. M. Justice, et al. (2005). "Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis." Spine **30**(10): 1181-7.
- Mohan, S. and D. J. Baylink (1996). "Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption." Horm Res **45 Suppl 1**: 59-62.
- Mohan, S., D. J. Baylink, et al. (1996). "Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins in serum--do they have additional roles besides modulating the endocrine IGF actions?" J Clin Endocrinol Metab **81**(11): 3817-20.
- Mohan, S., C. Richman, et al. (2003). "Insulin-like growth factor regulates peak bone mineral density in mice by both growth hormone-dependent and -independent mechanisms." Endocrinology **144**(3): 929-36.
- Nachemson, A. (1968). "A long term follow-up study of non-treated scoliosis." Acta Orthop Scand **39**(4): 466-76.
- Nagi, M. H. and E. G. Stockwell (1973). "Socioeconomic differentials in mortality by cause of death." Health Serv Rep **88**(5): 449-56.
- Nakagawa, M., T. Kaneda, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts." FEBS Lett **473**(2): 161-4.
- Nather, A. (1999). "Use of allografts in spinal surgery." Ann Transplant **4**(3-4): 19-22.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." FASEB J **13**(1): 9-22.
- Nilsson, U. and K. D. Lundgren (1968). "Long-term prognosis in idiopathic scoliosis." Acta Orthop Scand **39**(4): 456-65.
- Nilsson, A., J. Isgaard, et al. (1986). "Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate." Science **233**(4763): 571-4.
- Niu, T. and C. J. Rosen (2005). "The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal." Gene **361**: 38-56.



- Ogilvie, J. W. and M. J. Schendel (1988). "Calculated thoracic volume as related to parameters of scoliosis correction." Spine **13**(1): 39-42.
- Oue, T., Y. Taira, et al. (1999). "Effect of antenatal glucocorticoid administration on insulin-like growth factor I and II levels in hypoplastic lung in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia in rats." Pediatr Surg Int **15**(3-4): 175-9.
- Pereira, R. C. and E. Canalis (1999). "Parathyroid hormone increases mac25/insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 expression in cultured osteoblasts." Endocrinology **140**(5): 1998-2003.
- Phillips, H. S., J. Hains, et al. (1990). "Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum." Endocrinology **127**(2): 965-7.
- Ponseti, I. V. and B. Friedman (1950). "Changes in the scoliotic spine after fusion." J Bone Joint Surg Am **32**(A:4): 751-66.
- Ramirez, N., C. E. Johnston, et al. (1997). "The prevalence of back pain in children who have idiopathic scoliosis." J Bone Joint Surg Am **79**(3): 364-8.
- Reamy, B. V. and J. B. Slakey (2001). "Adolescent idiopathic scoliosis: review and current concepts." Am Fam Physician **64**(1): 111-6.
- Renshaw, T. S. (1993). "Idiopathic scoliosis in children." Curr Opin Pediatr **5**(4): 407-12.
- Rifas, L. (1999). "Bone and cytokines: beyond IL-1, IL-6 and TNF-alpha." Calcif Tissue Int **64**(1): 1-7.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-4.
- Risser, J. C. (1958). "The Iliac apophysis; an invaluable sign in the management of scoliosis." Clin Orthop **11**: 111-9.
- Roach, J. W. (1999). "Adolescent idiopathic scoliosis." Orthop Clin North Am **30**(3): 353-65, vii-viii.
- Rodan, G. A. and T. J. Martin (2000). "Therapeutic approaches to bone diseases." Science **289**(5484): 1508-14.
- Rogala, E. J., D. S. Drummond, et al. (1978). "Scoliosis: incidence and natural history. A prospective epidemiological study." J Bone Joint Surg Am **60**(2): 173-6.
- Sahlstrand, T. and B. Petruson (1979). "A study of labyrinthine function in patients with adolescent idiopathic scoliosis. I. An electro-nystagmographic study." Acta Orthop Scand **50**(6 Pt 2): 759-69.

- Sanders, J.O., Browne, R.H., et al. (2006) "Correlates of the peak height velocity in girls with idiopathic scoliosis" Spine **31** (20) 2289-2295
- Sandhu, J. S., R. Gorczynski, et al. (1995). "A human model of xenogeneic graft-versus-host disease in SCID mice engrafted with human peripheral blood lymphocytes." Transplantation **60**(2): 179-84.
- Savage, M. O., C. Camacho-Hubner, et al. (2004). "Therapeutic applications of the insulin-like growth factors." Growth Horm IGF Res **14**(4): 301-8.
- Sawatzky, B. J., S. B. Jang, et al. (1998). "Intra-Operative Analysis of Scoliosis Surgery in 3-D." Comput Methods Biomech Biomed Engin **1**(3): 211-221.
- Scott, M. M. and H. Piggott (1981). "A short-term follow-up of patients with mild scoliosis." J Bone Joint Surg Br **63B**(4): 523-5.
- Seyedin, S. M., A. Y. Thompson, et al. (1986). "Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta." J Biol Chem **261**(13): 5693-5.
- Skogland L, Miller J et al. (1981) "Serum somatomedins and non dialysable urinary hydroxyproline in girls with idiopathic scoliosi. Acta Orthop Scand 52:307-13
- Spencer G (1977) 'Plasma and muscle somatomedins in scoliotic children' in: P Zorab, ed Scoliosis. London Academic press: 191-9
- Steinbrech, D. S., B. J. Mehrara, et al. (2000). "VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism." Am J Physiol Cell Physiol **278**(4): C853-60.
- Stirling, A. J., D. Howel, et al. (1996). "Late-onset idiopathic scoliosis in children six to fourteen years old. A cross-sectional prevalence study." J Bone Joint Surg Am **78**(9): 1330-6.
- Street, J., M. Bao, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9656-61.
- Streeten, E. A. and M. L. Brandi (1990). "Biology of bone endothelial cells." Bone Miner **10**(2): 85-94.
- Subach, B. R., R. W. Haid, et al. (2001). "Bone morphogenetic protein in spinal fusion: overview and clinical update." Neurosurg Focus **10**(4): E3.
- Suk, S. I., C. K. Lee, et al. (1995). "Segmental pedicle screw fixation in the treatment of thoracic idiopathic scoliosis." Spine **20**(12): 1399-405.

- Sweet, F. A., L. G. Lenke, et al. (1999). "Maintaining lumbar lordosis with anterior single solid-rod instrumentation in thoracolumbar and lumbar adolescent idiopathic scoliosis." Spine **24**(16): 1655-62.
- Tanner, J. M. (1975). "The measurement of maturity." Trans Eur Orthod Soc: 45-60.
- Tayapongsak, P., D. A. O'Brien, et al. (1994). "Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow." J Oral Maxillofac Surg **52**(2): 161-5; discussion 166.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." Science **289**(5484): 1504-8.
- Thalgott, J. S., K. Fritts, et al. (1999). "Anterior interbody fusion of the cervical spine with coralline hydroxyapatite." Spine **24**(13): 1295-9.
- Trevor, S. (1980). "Growth landmarks and the evolution of scoliosis: a review of pertinent studies on their usefulness." Dev Med Child Neurol **22**.
- Ueno, K., T. Katayama, et al. (1992). "Interleukin-4 enhances in vitro mineralization in human osteoblast-like cells." Biochem Biophys Res Commun **189**(3): 1521-6.
- Vedantam, R., L. G. Lenke, et al. (2000). "A prospective evaluation of pulmonary function in patients with adolescent idiopathic scoliosis relative to the surgical approach used for spinal arthrodesis." Spine **25**(1): 82-90.
- Wagner, E. F. and G. Karsenty (2001). "Genetic control of skeletal development." Curr Opin Genet Dev **11**(5): 527-32.
- Weibrich, G., W. K. Kleis, et al. (2002). "Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count." J Craniomaxillofac Surg **30**(2): 97-102.
- Weinstein, J. N. (2001). "Spine is expanding on the Internet." Spine **26**(2): 125.
- Weinstein, S. L. (1986). "Idiopathic scoliosis. Natural history." Spine **11**(8): 780-3.
- Weinstein, S. L. and I. V. Ponseti (1983). "Curve progression in idiopathic scoliosis." J Bone Joint Surg Am **65**(4): 447-55.
- Weinstein, S. L., D. C. Zavala, et al. (1981). "Idiopathic scoliosis: long-term follow-up and prognosis in untreated patients." J Bone Joint Surg Am **63**(5): 702-12.
- Whitecloud, T. S., 3rd and J. C. Butler (1988). "Anterior lumbar fusion utilizing transvertebral fibular graft." Spine **13**(3): 370-4.

- Willner S, Nilsson K, et al. (1974) "Studies of growth hormone in girls with idiopathic scoliosis." Acta Orthop Scand (45):982-91
- Woods, K. A., C. Camacho-Hubner, et al. (1996). "Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene." N Engl J Med 335(18): 1363-7.
- Woods, L. A., R. J. Haller, et al. (1995). "Decreased incidence of scoliosis in hearing-impaired children. Implications for a neurologic basis for idiopathic scoliosis." Spine 20(7): 776-80; discussion 781.
- Yeung HY, Tang NL et al. (2006). "Genetic association study of insulin-like growth factor 1 (IGF 1) gene with curve severity and osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis." Stud Health Technol Inform 123: 18-24
- Zelzer, E. and B. R. Olsen (2005). "Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair." Curr Top Dev Biol 65: 169-87.