

**Université de Montréal**

**Implication de l'ostéopontine dans le pathomécanisme de la  
scoliose idiopathique de l'adolescent**

par

**Hugo Boulanger**

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

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

Septembre 2005

© **Hugo Boulanger** 2005



W  
4  
058  
2006  
V.163

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Implication de l'ostéopontine dans le pathomécanisme de la  
scoliose idiopathique de l'adolescent**

présenté par  
**Hugo Boulanger**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Guy Boileau  
président-rapporteur

Dr Alain Moreau  
Directeur de recherche

Dr Carl-Éric Aubin  
Co-Directeur de recherche

Dr Isabelle Villemure  
Membre du jury

## Résumé

**Introduction :** La scoliose idiopathique de l'adolescent (SIA) est une pathologie grave du rachis dont l'étiologie et le pathomécanisme demeurent à ce jour inconnus. La mélatonine pourrait toutefois être impliquée dans l'initiation et le développement de la maladie en altérant la signalisation intracellulaire de certaines structures essentielles à la croissance vertébrale normale. **Hypothèse :** Il est proposé que la SIA est causée par la surexpression de l'ostéopontine (OPN) sous l'influence de la signalisation aberrante de la mélatonine et que l'OPN est nécessaire à l'induction et à la progression de l'atteinte. **Objectifs :** 1) Démontrer la pertinence de l'utilisation du poulet pinéalectomisés et de la souris C57BL/6j bipédales comme modèles d'étude de la scoliose. 2) Caractériser l'évolution de l'OPN, une protéine régulée par la mélatonine, chez les animaux et les humains normaux et scoliotiques. 3) Montrer l'implication obligatoire d'OPN dans l'initiation et le développement de la SIA. **Matériel et méthodes :** La détection de la scoliose chez les modèles animaux cités ci-haut se fait à l'aide de l'imagerie (ostéodensitomètre PIXImusII, rayons X) combinée à la mesure de l'angle de Cobb. Des prélèvements osseux, musculaires et sanguins ont respectivement permis les analyses d'expression génique (RT-PCR), d'expression protéique (immunobuvardage de type Western) et l'évaluation des concentrations sériques de l'OPN (ÉLISA). L'implication de l'OPN dans le processus pathologique de la SIA a été évaluée par l'injection d'un inhibiteur transcriptionnel chez le poulet pinéalectomisé et par l'utilisation d'un modèle murin knock-out (OPN et CD44). Quelques dosages préliminaires de l'OPN ont également été tentés chez les sujets scoliotiques humains (ÉLISA). **Résultats :** L'OPN n'est surexprimée, tant au niveau génique que protéique, que chez les poulets pinéalectomisés scoliotiques. De plus, l'injection d'un inhibiteur chez ces mêmes poulets a diminué l'incidence scoliotique de 40%. Les souris C57BL/6j scoliotiques affichent également des taux sériques très élevés d'OPN. Les souris C57BL/6j OPN-KO et C57BL/6j CD44-KO ne montrent aucune induction scoliotique comparativement aux contrôles (35% de scoliose). Finalement, il a été montré que les populations humaines testées affichent des taux nettement supérieurs en OPN lorsque comparées aux contrôles. **Conclusion :** L'OPN est un facteur clé de l'initiation et de la progression de la SIA. Des analyses complémentaires sur le pathomécanisme sous-tendant ces processus pourraient éventuellement mener à la création d'un test diagnostique précoce de la maladie et ultimement ouvrir une toute nouvelle option thérapeutique via la pharmacologie.

Mots clés : scoliose, mélatonine, osteopontine, proprioception, poulet pinéalectomisé, souris C57BL/6j.

## Abstract

**Introduction :** Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is a grave pathology affecting the spine and yet the exact etiology and pathomechanism remain unclear. The melatonin could be directly implicated in the phenomenon by altering the intracellular signalling of critical structures associated with normal vertebral growth. **Hypothesis :** It is proposed that the AIS is caused by the over expression of osteopontin (OPN) under the aberrant melatonin's signalization. **Objectives :** 1) Validate the use of pinealectomized chicken and bipedal C57BL/6j mice as animal models of the AIS. 2) Characterize the OPN levels in normal and scoliotic animal models and humans. 3) Demonstrate the implication of OPN in the initiation and development of the disease. **Matériel et méthodes :** Scoliosis monitoring was ensured by imagery (PIXImusII osteodensitometer, X-rays) combined with the Cobb's angle measurement. Bone, muscle and blood samples were taken to respectively analyze the genic (RT-PCR), proteic (Western blot) and serous (ELISA) expression of OPN in our animal models. OPN implication in pathomechanism of AIS was evaluated by transcriptional inhibitor injections in pinealectomized chicken and by the use of a murine knock-out (OPN and CD44). Few preliminary dosages (ELISA) were also attempted in human scoliotic patients. **Results :** OPN is over expressed, at a genic and proteic level, only in scoliotic pinealectomized chicken. Partial inhibition of OPN reduces by 40% the scoliotic induction in treated pinealectomized chicken. Scoliotic C57BL/6j also exhibited high rate of blood OPN. Both knock-out mice didn't develop any scoliosis when compared to controls (35%). Finally, human scoliotics showed higher OPN concentrations than the controls. **Conclusion :** OPN is an important factor in the initiation and progression of AIS. A better understanding of the underlying mechanisms of the OPN influence could lead to a whole new therapeutic approach using an early diagnostic test and a potential pharmacologic treatment.

**Key words :** scoliosis, mélatonin, osteopontin, proprioception, pinealectomized chicken, C57BL/6j mice

## Table des matières

Titre	ii
Identification du jury .....	iii
Résumé .....	iv
Abstract .....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des abréviations : .....	xi
Remerciements : .....	xii
<b>Chapitre 1- Revue de la littérature.....</b>	<b>1</b>
1.1-Scoliose : .....	1
1.1.1-Définition .....	1
1.1.2-Prévalence .....	2
1.2-Types de scoliose .....	4
1.2.1-Scoliose idiopathique.....	4
1.2.2-Scoliose idiopathique infantile.....	4
1.2.3-Scoliose idiopathique juvénile .....	4
1.2.4-Scoliose idiopathique adolescente.....	5
1.2.5-Scolioses secondaires .....	5
1.3-Les étiologies proposées à la scoliose idiopathique.....	6
1.3.1-Hypothèse génétique .....	8
1.3.2-Hypothèse impliquant les éléments structuraux du rachis.....	11
1.3.3-Hypothèse musculaire.....	13
1.3.4-Hypothèse neurologique .....	15
1.3.5-Hypothèse biomécanique.....	17
1.3.6-Hypothèse endocrinienne.....	18
2-Mélatonine .....	21
2.1-Généralités .....	21
2.2-Synthèse de la mélatonine : .....	23
2.3-Rôles physiologiques de la mélatonine .....	24
2.4-Signalisation cellulaire .....	29

3-Ostéopontine .....	33
3.1-Généralités .....	33
3.2-Structure de la protéine.....	33
3.3-Modifications postraductionnelles .....	34
3.4-Structure génique .....	35
3.5-Régulation transcriptionnelle.....	38
3.6-Localisation tissulaire.....	39
3.7-Fonctions potentielles.....	40
4-Les modèles animaux de la SIA .....	43
4.1-Le poulet pinéalectomisé.....	43
4.2-Le rat bipédal pinéalectomisé .....	44
4.3-La souris bipédale C57BL/6j.....	44
5-Plan de cette étude .....	45
5.1-Hypothèse de travail.....	45
5.2-Objectifs.....	46
<b>Chapitre 2 –Matériels et méthodes.....</b>	<b>47</b>
1-Poulets pinéalectomisés.....	47
2-Lignée de souris et souris transgéniques .....	52
3-Sujets scoliotiques humains :.....	54
<b>Chapitre 3-Résultats .....</b>	<b>55</b>
1- Étude réalisée sur le poulet pinéalectomisé.....	55
1.1-Diagnostic .....	55
1.2-Dosage des taux de mélatonine sérique.....	55
1.3-Densitométrie osseuse .....	60
1.4-Expression génique et protéique d'OPN .....	60
2-Étude réalisée sur les souris C57BL/6j et transgéniques.....	65
2.1-Diagnostic .....	65
2.2-Densité osseuse .....	69
2.3-Dosage d'OPN sérique .....	71
3-Étude réalisée sur sujets scoliotiques humains .....	71
3.1-Dosage de l'OPN sérique.....	71

<b>Chapitre 4-Discussion .....</b>	<b>74</b>
Insertion d'OPN au modèle hypothétique .....	74
<b>Chapitre 5-Conclusion .....</b>	<b>82</b>
1-Perspective des travaux supplémentaires requis.....	83
1.1-Étude de la séquence promotrice d'OPN.....	83
1.2-Étude de la signalisation en aval d'OPN .....	84
2 -Évaluation du potentiel thérapeutique.....	86
2.1-Élaboration d'un test diagnostique précoce .....	86
2.2-Développement d'un traitement pharmaceutique .....	87
<b>Bibliographie:.....</b>	<b>88</b>

## Liste des tableaux

Chapitre 1-Revue de la littérature .....	1
Tableau 1.1-Cause des scolioses secondaires .....	7
Tableau 1.2-Liste des loci de susceptibilité à la SIA, sites principaux et secondaires.....	10
Tableau 1.3-Principales étiologies proposées, groupes impliqués ainsi que leur possible implication réelle dans l'initiation de la maladie .....	32
Tableau 1.4-Résumé des principales séquences régulatrices retrouvées au sein du promoteur d'OPN humaine.....	37
Tableau 1.5-Résumé simplifié des principaux rôles d'OPN au sein de l'organisme. ....	42

## Liste des figures

<b>Chapitre 1-Revue de la littérature.....</b>	<b>1</b>
Figure 1.1-Le cercle vicieux de la SIA.....	3
Figure 1.2-Régulation épiphysaire par le faisceau rétinohypothalamique et noyau suprachiasmatique.....	22
Figure 1.3-Illustration de la synthèse de la mélatonine.....	25
<b>_Toc113857030Chapitre 3-Résultats .....</b>	<b>55</b>
Figure 3.1-Évolution des déformations scoliotiques chez le poulet pinéalectomisé en croissance.....	57
Figure 3.3-Comparaison des taux d'induction scoliotique entres les poulets pinéalectomisés traités et non traités au THX99.....	59
Figure 3.4-Comparaison de la densité osseuse des poulets traités au THX99 et les poulets non traités. ....	62
Figure 3.5- Expression génique d'OPN chez les poulets pinéalectomisés scoliotiques et non scoliotiques. ....	63
Figure 3.6-Expression protéique d'OPN dans la musculature parapinale de poulets pinéalectomisés scoliotiques et non scoliotiques.....	64
Figure 3.7-Souris C57BL/6j bipédales normale et scoliotique.....	67
Figure 3.8-Comparasison entre les poluations de souris issues du fond génétique C57BL/6j et les taux d'induction scoliotique. ....	68
Figure 3.9-Comparaison des niveaux de mélatonine sérique chez diverses souches de souris bipédales utilisées.....	70
Figure 3.10-Fluctutation des niveaux d'OPN sérique en fonction du temps chez la souris C57BL/6j bipédale scoliotique.....	72
Figure 3.11-Dosage de l'OPN sérique humaine chez des populations normale et scoliotique.....	73
<b>Chapitre 4-Discussion .....</b>	<b>74</b>
Figure 4.1-Illustation de l'hypothèse avancée par le groupe de Moreau .....	81

**Liste des abréviations :**

ACs : adénylates cyclases

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPc : adénosyl monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

DLL3 : delta like ligand 3

OPN : ostéopontine

HIOMT : hydroxyindole-O-méthyltransférase

MEL : mélatonine

NAT : arylalkylamine-N-acétyltransférase

PinX : pinéalectomisé

SIA : scoliose idiopathique de l'adolescent

SNC : système nerveux central

## Remerciements :

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de génétique moléculaire de l'os et des malformations musculo-squelettiques pour toute l'aide apportée à la réalisation de ce projet de recherche. J'exprime particulièrement ma reconnaissance à l'endroit de mon directeur de recherche, le Dr Alain Moreau qui, par sa grande rigueur, a fait de moi un individu meilleur. Sa grande disponibilité, son écoute, son expérience et ses sages conseils ont su me guider à travers le chemin tortueux de la recherche fondamentale. Je désire également remercier mon co-directeur de recherche, le Dr Carl-Éric Aubin, qui m'a permis de m'initier à une toute nouvelle facette de la recherche et qui a su, malgré un horaire très chargé, m'allouer le temps nécessaire à la réalisation d'un stage d'initiation en génie biomécanique.

Je souhaite remercier spécifiquement mes collègues de laboratoire pour leur soutien et leur agréable compagnie. Je tiens spécialement à remercier les gens ayant partagé l'expérimentation animale avec moi, leur support m'ayant été inestimable : Aurélie Fauvernier, Sandra Boyer, Jean-François Thouin, Mélanie Bernard, Bouziane Azeddine, Yi-Wei Liu, Billy Houde et Mark Limosani. Je désire remercier également toute l'équipe de l'animalerie, dont la passion envers leurs animaux et le professionnalisme dont ils font preuve sont tout simplement épatant.

Je remercie également mon entourage pour m'avoir grandement encouragé et appuyer tout au long du processus, parfois pénible, de la rédaction de cet ouvrage.

Je voudrais finalement de remercier la fondation Yves Cotrel de l'institut de France pour son support financier essentiel à la réalisation de ce projet et le programme MENTOR des IRSCs qui m'a généreusement octroyé une bourse d'étude.

## Chapitre 1- Revue de la littérature :

### *1.1-Scoliose :*

#### **1.1.1-Définition :**

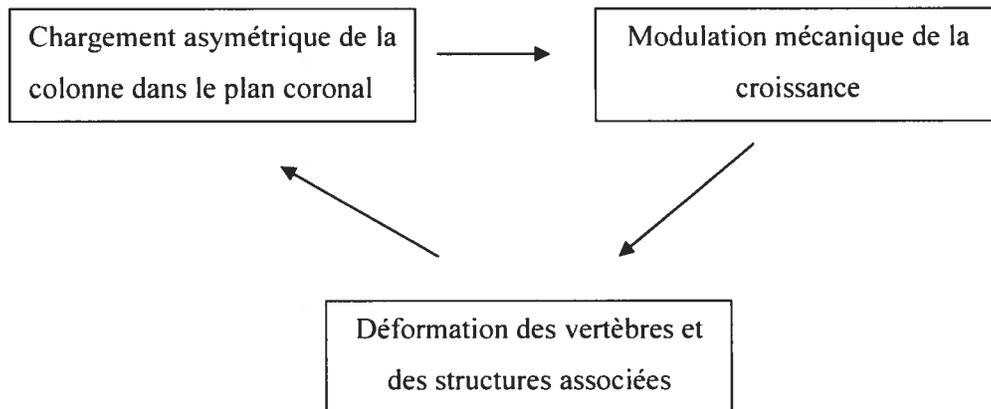
La scoliose tire son origine étiologique du mot grec « skolios », qui signifie tortueux. C'est une pathologie souvent observée chez l'enfant et l'adolescent mais également retrouvée chez l'adulte et qui se définit grossièrement par une courbure latérale au moins supérieure à 10° selon la mesure de l'angle de Cobb (1948). De façon plus exhaustive, la scoliose est une *« déformation rachidienne consistant en un déplacement relatif et progressif d'un élément constitutif (vertèbre) par rapport à son adjacent, se produisant dans les trois plans de l'espace (frontal, sagittal et coronal) sans perte de la continuité ostéoligamentaire et se développant sur tout ou une partie de la colonne vertébrale, essentiellement pendant la période de croissance »* (Dubousset 1999). La scoliose est donc une atteinte posturale complexe, principalement caractérisée par une déformation tridimensionnelle de la colonne vertébrale et des structures qui lui sont associées. Il est important de ne pas confondre scoliose et attitude scoliotique puisque cette dernière n'est qu'une simple inflexion latérale du rachis dans le plan frontal, sans véritable torsion vertébrale et sans déformation asymétrique du tronc ou des zones paravertébrales. Il est important de souligner que la colonne vertébrale est normalement rectiligne dans le plan frontal mais qu'elle comporte toutefois des courbures dans le plan sagittal : lordoses cervicale et lombaire, cyphoses thoracique et sacrée. Ces cambrures sont retrouvées chez les individus normaux et peuvent cependant être accentuées

ou altérées chez les sujets scoliotiques. Toute courbure du rachis n'est donc pas nécessairement le résultat d'une scoliose.

Bien qu'étant observée depuis l'antiquité (Hippocrate,  $\pm 400$  avant Jésus-christ) et définie pour la première fois par Galien (1544), l'étiologie et le pathomécanisme de la SIA demeurent toujours un mystère à ce jour. Il est toutefois reconnu que la maladie est de type évolutif, c'est-à-dire qu'elle progresse généralement en fonction du temps, étant parfois accompagnée d'une exacerbation marquée lors des périodes de croissance (**Fig. 1.1**). Cette progression persiste de façon auto-entretenu par des mécanismes biomécaniques impliquant la distribution asymétrique des charges rachidiennes, la modulation de la croissance vertébrale et finalement le développement des déformations scoliotiques (Stokes 2003).

### **1.1.2-Prévalence :**

La prévalence de la scoliose dans la population américaine entre l'âge de 10 et 16 ans est estimé à environ 2 à 4% de la population adolescente (Reamy 2001). Moins de 1% des patients affectés développeront une scoliose dont l'angle de Cobb sera supérieur à  $40^\circ$  où l'intervention chirurgicale est prise en considération. On retrouve jusqu'à 4 fois plus de filles que de garçons dans la population scoliotique et ces dernières montrent 10 fois plus de scoliose de plus de  $30^\circ$  que leurs homologues masculins (Stirling 1996). Globalement, il est estimé que la scoliose, incluant toutes les formes, affecte près de 1% de la population mondiale, ce qui en fait une atteinte musculo-squelettique de première importance (King 2005). Cette pathologie, si elle n'est pas traitée, peut même s'avérer mortelle dans les cas les plus sévères, la mort résultant d'une insuffisance pulmonaire et/ou cardiaque due au confinement et à la réduction de la cavité thoracique.



**Figure 1.1-Le cercle vicieux de la SIA.** Analyse de la symétrie du chargement du corps vertébral et de conséquences sur le rachis. (Adapté de Stokes 1997)

## ***1.2-Types de scoliose :***

### **1.2.1-Scoliose idiopathique :**

La scoliose idiopathique affecte près de 80% de tous les patients scoliotiques enregistrés. Comme son nom l'indique, son étiologie ainsi que son pathomécanisme demeurent toujours un mystère à ce jour. On pose un tel diagnostic par exclusion, c'est-à-dire lorsque toutes les causes dites secondaires ont été éliminées par le clinicien. Les scolioses idiopathiques se subdivisent en trois sous-classes, en fonction de leur âge d'apparition.

### **1.2.2-Scoliose idiopathique infantile :**

On qualifie une scoliose idiopathique d'infantile lorsqu'elle est diagnostiquée avant l'âge de 3 ans. Il est toutefois d'usage de réserver les termes « scoliose infantile » aux seules formes progressives. Il existe en effet des formes spontanément résolutive, nommées scoliose du nourrisson qui représente environ 70 à 90% des cas rencontrés. Elles affectent particulièrement les garçons (70% des cas) et sont caractérisées par une courbure thoracique gauche (Burgogyne 2001). Le mécanisme d'auto-résorption, encore inconnu, ouvre une voie d'investigation intéressante pour les autres cas de scoliose qui ne possèdent pas une telle caractéristique et qui ont plutôt tendance à être progressive. La scoliose infantile affecte un peu moins de 1% de la population scoliotique idiopathique (Dobbs 1999).

### **1.2.3-Scoliose idiopathique juvénile :**

La forme juvénile apparaît généralement chez le patient lorsque celui-ci est âgé de 3 à 10 ans. Cette forme touche entre 12 et 21% des patients souffrant de scoliose idiopathique. Contrairement à la forme infantile, ce sont les enfants de sexe féminin qui semblent être le

plus souvent affectés et ce, dans une proportion de 4 pour 1 (Dobbs 1999). Les courbures thoraciques droites sont généralement les plus souvent observées.

#### **1.2.4-Scoliose idiopathique adolescente :**

Ce type de scoliose affecte particulièrement les jeunes enfants dès l'âge de 10 ans et ce, jusqu'à la maturité complète du système musculo-squelettique. Il est à noter que la période de progression critique de la courbure se situe entre l'âge de 12 à 16 ans soit parallèlement aux phases aigües de croissance chez l'adolescent. Tous les types de courbures y sont observés à l'exception de la courbure thoracique gauche qui est très rare. Généralement, il y a stabilisation des déformations lorsque l'organisme atteint sa pleine maturité. Le mécanisme progressif peut toutefois reprendre en fonction des processus dégénératifs liés au vieillissement (Dobbs 1999). La scoliose idiopathique de l'adolescent est la forme la plus souvent retrouvée parmi la population scoliotique (Roach 1999).

#### **1.2.5-Scolioses secondaires :**

Les scolioses dites secondaires découlent d'une autre pathologie affectant le patient. Elles sont d'ordinaire causées par un désordre congénital des tissus conjonctifs (syndrome de Marfan), neurologiques (neurofibromatose) ou encore musculo-squelettiques (ostéogénèse imparfaite). Les principales pathologies sont par ailleurs mentionnées dans le tableau 1.1. Il existe également d'autres types de scolioses, ces dernières étant inclassables parmi les familles précédentes. Il s'agit de scolioses causées par un traumatisme ou encore par une intervention chirurgicale. Elles ne comptent cependant que pour une très faible minorité des cas.

Bien qu'étant de nature différente, les patrons de courbure peuvent parfois se ressembler d'un type de scoliose à un autre et même différer au sein d'une même famille. Ainsi, il n'est pas rare d'observer des scolioses thoraciques, lombaires ou même cervicales chez les sujets atteints de SIA. Des sujets affichent également une double déformation thoraco-lombaire. Le mécanisme provoquant l'apparition d'un type particulier de courbure ainsi que la mécanistique génétique induisant ce dernier sont par contre toujours inconnus.

### ***1.3-Les étiologies proposées à la scoliose idiopathique :***

Plusieurs hypothèses ont déjà été émises quant à l'étiologie de la scoliose idiopathique et déjà nombre de groupes et réseaux internationaux s'attaquent à différents aspects dans l'espoir de résoudre cet épineux problème. Les données tirées de la littérature sont très souvent contradictoires et conséquemment, il devient souvent ardu d'évaluer la pertinence d'une étiologie particulière. Notons toutefois les principaux champs d'intérêts impliquant des hypothèses : génétiques, structurales, musculaires, neurologiques, biomécaniques et endocriniennes. Un résumé des des étiologies proposées ainsi que les principaux groupes les investiguant est par ailleurs disponible dans le tableau 1.3.

**Tableau 1.1-Cause des scolioses secondaires.**

(adapté de Reamy 2001)

<b>Origine Neurologique</b>	<b>Origine tissulaire (tissu conjonctif)</b>	<b>Origine musculo-squelettique</b>
Syringomyelie	Syndrome d'Ehlers-Danlos	Dysplasie de la hanche
Tumeurs du rachis	Syndrome de Marfan	Ostéogenèse imparfaite
Neurofibromatose	Homocystinurie	Syndrome de Klippel-Feil
Dystrophie Musculaire		
Poliomyelitisie		
Ataxie de Friedreich		
Syndrome de Riley-Day		
Maladie de Werding-Hoffmann		

### 1.3.1-Hypothèse génétique :

Plusieurs groupes soutiennent qu'il existe un patron de transmission génétique pouvant expliquer l'apparition de scoliozes récurrentes au sein d'une même famille. Dès 1934, le groupe de Garland montrait déjà la transmission dominante de la maladie chez les familles à haute fréquence scoliotique et ce, sur cinq générations. Faber (1936) étudie par la suite près de 660 individus atteints ainsi que leur famille pour en arriver à la même conclusion, la transmission dominante. Cette hypothèse est confirmée en 1968 par le docteur Wynne-Davies montrant des taux d'incidence de 6.94, 3.69 et 1.55% pour les première, deuxième et troisième génération de scoliotiques et ce, chez 114 individus. Ces derniers sont appuyés par Bell (1995) qui affirme également qu'une transmission autosomale dominante a lieu puisqu'elle semble dominer d'une génération à l'autre. Toutefois, cette hypothèse fut réfutée en 1973 par Wynnes-Davies qui cette fois conclut que la transmission est probablement multifactorielle. Ce dernier modèle semble être le plus soutenu puisque plusieurs groupes tels celui de Cowell (1972), Fisher (1967), abondent également dans ce sens.

Le débat continue lorsque Cowell, en 1972, propose un mode de propagation lié au chromosome X après avoir étudié 17 familles différentes, où il n'a jamais été observé de transmission père-fils. Cette affirmation est démentie par divers groupes tels que celui de Giampietro (1999) et de Miller (1998) qui ne supportent pas cette hypothèse d'hérédité liée au chromosome X puisque l'analyse de 14 familles composées de 136 individus n'a montré aucune liaison avec le chromosome sexuel sauf dans des cas très isolés. Des études ont également été menées sur des candidats idéals pour l'étude génétique : les jumeaux identiques. DeGeorge (1967) affirme tout d'abord que les jumeaux monozygotes auraient 100% de chance de souffrir du même type de déformation scoliotique alors que les jumeaux hétérozygotes n'afficheraient que 37.5% d'homologie symptomatique. Ces taux chutent

cependant à 73% (monozygotes) et 36% (hétérozygotes) avec des études effectuées sur un plus grand nombre de sujets atteints (Cowell 1972; Willners, 1994). Ces études prouvent donc en quelque sorte l'implication d'une susceptibilité génétique, le tout étant de savoir s'il s'agit d'un locus unique ou encore d'une combinaison de différents loci. De par la complexité et la composante multifactorielle mentionnées ci-haut, il semble que la dernière hypothèse soit la plus plausible du moins, du moins dans la plupart des cas (Wise 2000). De plus, à cette complexité s'ajoute la possibilité que la prédisposition génétique soit reliée à la mutation ou encore au polymorphisme d'un seul gène majeur dont l'activité pourrait être régulée par des facteurs extérieurs (Chakravarti 1999). Malgré ces difficultés d'analyse, certains gènes candidats ont tout de même été identifiés : Wise (2000) après avoir effectué des analyses de liaison non paramétrique cite les chromosomes 6p, 10q, 4q et 18q où des allèles seraient partagés entre 2 familles de scoliotiques. Chan et son groupe, en utilisant la même technique, ajoute le locus 19p13 à la liste en 2002. Plus récemment, le groupe de Miller (2005) propose un tout autre groupe de chromosome principaux : 6, 9 16 et 17 ainsi que plusieurs régions dites secondaires. Les principales découvertes sont résumées dans le tableau 1.2.

**Tableau 1.2-Liste des loci de susceptibilité à la SIA, sites principaux et secondaires.**

(Adapté de Miller 2005)

<b>Groupe</b>	<b>Région</b>	<b>Marqueur utilisé</b>
<b>Wise et coll. (2000)</b>	6q	N/A
	10q (distale)	N/A
	18q	N/A
<b>Chan et coll. (2002)</b>	19p13.3	D19S894
	19p13.3	D19S216
	19p13.3	D19S1034
	2q13	D2S160
	2q14.3	D2S347
	2q21.1	D2S112
	2q22.3	D2S151
<b>Salehi et coll.(2002)</b>	17p12	D17S1856
	17p12	D17S799
	17p12	D17S936
	17p12	D17S1808
	17p11.2	D17S805
	17p11.2	D17S925
<b>Justice et coll.(2003)</b>	Xq23	DXS6804
	Xq23	GATA172D05
	Xq24	GATA165B12
	Xq25	ATA59C05
	Xq26.1	DXS1047
<b>Miller et coll.(2005) [régions primaires]</b>	6	F13A1-D6S2439
	6	D6S1031-D6S1021
	9	D9S938-D9S1838
	16	D16S764-D16S3253
	17	D17S1303-D17S1293
<b>Miller et coll.(2005) [régions secondaires]</b>	1	D1S2845-D1S2660
	1	D1S518-D1S1660
	3	D3S2432-D3S2409
	5	D5S1457-D5S1725
	7	D7S3051-D7S1808
	8	D8S1469-D8S136
	8	D8S592-D8S373
	11	D11S1344-D11S1391
	12	D12S1375-D12S1064
	12	D12S395-D12S1045
	19	D19S591-D19S714

### **1.3.2-Hypothèse impliquant les éléments structuraux du rachis :**

La scoliose idiopathique pourrait être le fruit d'un défaut au sein d'une ou de plusieurs structures composant le rachis comme les ligaments ou encore les disques intervertébraux. Cette hypothèse est liée au fait que des maladies impliquant des désordres des tissus conjonctifs (voir tableau 1.1) provoquent des scoliozes secondaires (Hadley 1994). Par contre, il est difficile d'évaluer si les changements apparaissant dans les tissus conjonctifs des patients souffrant de scoliose idiopathique sont réellement la cause de leur condition ou simplement une conséquence reliée aux paramètres biomécaniques imposés par leur posture.

#### **1.3.2.1-Disques intervertébraux :**

La piste du collagène composant les disques intervertébraux est somme toute très nébuleuse. Aucun lien significatif n'a pu être établi entre la distribution du collagène de type I et II, composant pourtant près de 90% de la structure, chez les sujets atteints lorsque comparés aux contrôles (Beard 1981; Carr 1990). Une baisse significative des glycoaminoglycans au sein du *nucleus pulposus* des disques fut tout d'abord observée (Perdrini 1973). Zaleske (1980) confirma cette observation et montra également une hausse anormale d'une enzyme, la phosphatase acide (liée à l'activité lysosomique), prouvant la dégradation des glucoaminoglycans sans toutefois être en mesure de relier cette caractéristique à l'initiation scoliozique. Finalement, Taylor et ses collaborateurs (1981) ont proposé qu'un problème au niveau de la réticulation (liaison chimique entre les fibres) du collagène pourrait être en cause. Hypothèse soutenue par les groupes de Francis (1976) et de Venn (1983) ayant tous deux observé des problèmes de réticulation du collagène chez les patients scolioziques. Cependant, tous deux s'accordent pour affirmer que le phénomène n'est qu'une conséquence secondaire à la scoliose. Cette thèse vient également appuyer le modèle de Enneking (1969) qui, après avoir étudié l'histologie et la structure des éléments

structuraux n'a décelé aucune anomalie significative, ce qui lui permettra d'affirmer que la scoliose originerait d'une cause extra-osseuse et que les modifications observées au niveau du rachis ne serait que secondaires. Finalement, Antoniou (2001) découvre la présence d'une activité de synthèse accrue du côté convexe de la courbure, particulièrement en ce qui a trait au collagène de type-II, suggérant une défaillance du système de synthèse du collagène dans un environnement mécanique pathologique.

#### **1.3.2.2-Les fibres élastiques :**

Les fibres élastiques sont la seconde composante majeure du tissu conjonctif après le collagène. Echenne (1988) montre des anomalies de l'endoderme et du mésoderme chez près de 82% des patients analysés. Hadley (1994) obtient des résultats similaires chez 78% des patients analysés en examinant les biopsies de ligaments issus de sujets scoliotiques. Encore une fois, il n'apparaît pas clairement de lien entre ces phénomènes et l'apparition de la scoliose, ce qui les relègue au titre de conséquence secondaire de la pathologie.

La plupart de ces études s'étant révélées infructueuses, l'idée de l'implication du tissu conjonctif dans l'étiologie de la scoliose a rapidement été délaissée comme le prouve la presque totale absence d'études modernes sur le sujet.

### **1.3.3-Hypothèse musculaire :**

#### **1.3.3.1-Morphologie :**

L'hypothèse concernant l'implication de l'activité musculaire a été lancée il y a plusieurs années déjà. Le cas des scolioses secondaires, initiées par des maladies dégénératives du système musculaire (ex. dystrophie musculaire de Duchenne) n'a pas manqué d'alimenter la curiosité des scientifiques à l'égard de cette thèse. Le tout débute en fait par une hypothèse fondée par le docteur Langenskiold, en 1969, qui soupçonnait qu'une croissance altérée des muscles bordant la colonne vertébrale pourrait être à l'origine du problème postural. Cette thèse est soutenue par la découverte de deux types différents de fibres musculaires au sein de la musculature paraspinale des sujets atteints de scoliose idiopathique. Il s'agit en fait des fibres de type-I, à contraction lente, et de type-II, à contraction rapide (Spencer 1976). Ce dernier nota une nette diminution des fibres de type-II chez ces patients, symptôme probablement relié au processus myopathique. Bylund (1987) décrira pour sa part une distribution anormale des fibres de type-I du côté concave de la courbure. Par contre, Slager (1986) et ses collaborateurs, après avoir analysé 31 biopsies de muscles paravertébraux scoliotiques notent une diminution du nombre et de la taille des fibres de type-II et ce, indépendamment du côté de la courbure. Yarom (1979) confirmera la découverte en montrant le même phénomène retrouvé à la fois localement mais aussi distalement dans des muscles tels que le trapèze et le deltoïde, concluant ainsi à la thèse d'une myopathie généralisée. Dans cette même étude, il remarqua que les muscles scoliotiques affichent des taux anormalement élevés de calcium, suggérant un défaut membranaire, à savoir une dysfonction de la pompe calcique.

### **1.3.3.2-Activité musculaire :**

La modulation anormale de l'activité musculaire est également un sujet controversé dans l'étiopathogenèse de la scoliose. Butterworth (1969) remarqua une hausse de l'activité musculaire du côté convexe de la courbure particulièrement chez les scolioses progressives. Reuber (1983) a également étudié par électromyographie l'activité musculaire des groupes paravertébraux et ce, de part et d'autre de la courbure. Il n'a remarqué aucune différence significative de l'activité électromyographique des muscles, que ce soit du côté convexe ou concave de la courbure, chez les patients ayant un angle de Cobb inférieur à 25°. Cependant, dans les cas où l'angle de Cobb est supérieur à 25° l'activité côté convexe semble être plus élevée par rapport au côté concave. Zetterberg (1984) obtient des résultats similaires en mesurant des signaux myoélectriques plus intenses du côté convexe des courbures prononcées sans toutefois noter d'asymétrie particulière chez les sujets légèrement atteints et les témoins. Malgré le consensus apparent, les groupes se sont entendus pour affirmer que ces modulations de l'activité musculaire ne sont probablement qu'une conséquence secondaire à la pathologie plutôt qu'une cause directe comme proposé initialement.

### **1.3.3.3-Fuseaux neuro-musculaires :**

Une structure située au sein même de fibres musculaires est également altérée dans l'atteinte posturale. Il s'agit des fuseaux neuro-musculaires dont le rôle est, dans un premier temps, d'évaluer le degré d'étirement musculaire afin de prévenir le déchirement et, dans un second temps, de participer au processus proprioceptif. Cette dernière caractéristique est très importante puisqu'elle fait appel au système nerveux périphérique, également soupçonné de participer au processus pathologique de la scoliose. Le groupe de Low (1983) découvre tout d'abord une série d'anormalités morphologiques dont une accumulation de lipides et de particules de glycogène à l'intérieur même de la structure. Puis en s'attardant à l'étude

histologique de la portion nerveuse du fuseau, particulièrement à la gaine de myéline qui l'entoure, il remarque qu'il y a une étrange ressemblance avec les gaines observées par Chew (1980) dans les cas de scoliose paralytique et de tuberculose du rachis. Cette dernière caractéristique laissant vraisemblablement croire à une dysfonction des fuseaux neuromusculaires. Ford (1988) et Yekuitel (1989) démontrent respectivement une diminution significative du nombre de ces structures et des anomalies morphologiques de même nature dans la musculature paraspinale des sujets scoliotiques. Encore une fois, il fut impossible de discerner avec exactitude si ces modifications sont impliquées dans le processus initiateur de la scoliose ou si elles ne sont qu'une conséquence parmi tant d'autres associées à cette condition. Nous reviendrons au cas des fuseaux neuromusculaires dans le chapitre 3, section 3.2.

#### **1.3.4-Hypothèse neurologique :**

Le système moteur contrôle la posture et le positionnement du rachis dans l'espace grâce à des structures nerveuses, situées dans le subcortex frontal, le cervelet et le tronc cérébral du système nerveux central. Le fonctionnement de ce système repose principalement sur 3 sources d'information cruciales à la coordination de ses activités : la proprioception, les signaux originant du système vestibulaire et la vision (Murray 1975; Sahlstrand 1978, 1979).

##### **1.3.4.1-Proprioception :**

Conséquemment, il a été proposé que la perturbation de ces systèmes pourraient induire les déformations scoliotiques (Murray 1975; Sahlstrand 1978, 1979, 1980). Barrios (1987) induit la scoliose chez le lapin en créant des lésions unilatérales, privant alors le système nerveux central de ces animaux des apports proprioceptifs d'un seul côté de la

colonne. D'autres groupes comme celui de McInnes (1991) et de Wyatt (1986) montrent que les sujets scoliotiques sont nettement moins sensibles aux stimuli vibratoires que les sujets sains. Il est également découvert, par des tests d'orientation spatiale, que les patients souffrant de scoliose exhibent de piètres performances quant à leur fonction proprioceptive, comme le font les études de Keessen (1992) et de Sahlstrand (1979).

#### **1.3.4.2-Système vestibulaire :**

De par son implication dans le maintien de l'équilibre, la piste du système vestibulaire a également été investiguée. Un indice de son activité, le nystagmus (succession de mouvements rythmiques des globes oculaires, linéaires ou rotatoires) semble être altéré chez les scoliotiques (Sahlstrand 1980). Malheureusement, il fut impossible de déterminer si ce problème originait vraiment du système vestibulaire, du SNC ou encore de la déformation scoliotique elle-même. Yamada (1971) proposa que le SNC pourrait être à l'origine des déformations scoliotiques. Pour le prouver, il utilisa de jeunes rats bipédaux chez qui il détruisit la portion postérieure de l'hypothalamus et du cervelet. 15% des rats étudiés développèrent en effet une scoliose résultant probablement de l'incapacité du SNC d'intégrer correctement les informations posturales. Sahlstrand (1980) s'intéressa également au phénomène et mesura l'activité électrique du cerveau scoliotique montrant une activité anormale de ce dernier au repos. Cheng et ses collaborateurs (1999) montrent quant à eux une activité asymétrique anormale du cerveau des scoliotiques en corrélation avec le côté et la progression de la courbure en utilisant l'imagerie par résonance magnétique.

### **1.3.4.3-Système visuel :**

Finalement, on s'intéressa à la vision des scoliotiques afin de vérifier si cette composante ne serait pas en cause. Sahlstrand (1980) découvrit une dominance marquée de l'oeil gauche chez les patients affligés de déformations du côté droit alors qu'il découvrit l'inverse chez ceux souffrant de déformations orientées vers la gauche. L'auteur suggèrera alors que la dominance d'un œil pourrait forcer le patient à tanguer du côté opposé afin d'optimiser sa perception. Cette hypothèse est toutefois difficilement validable. Encore une fois, la même problématique persiste quant à ségréguer cause et conséquence.

### **1.3.5-Hypothèse biomécanique :**

Certains facteurs biomécaniques peuvent affecter l'alignement du rachis : les propriétés mécaniques des tissus, le chargement asymétrique et le support de la colonne vertébrale sont en mesure d'influencer le développement symétrique de l'ensemble de la structure. Certains chercheurs supposent que la pauvre qualité des os des membres inférieurs pourraient être en cause, particulièrement chez les scoliotiques affichant une ostéopénie marquée (Cheng 1997). On soupçonne également la faiblesse des muscles abdominaux et l'orientation du bassin comme étant en cause puisque ces structures sont en grande partie responsables du support de la colonne vertébrale (Lam 1999). D'autres chercheurs mettent en cause la qualité des tissus mous (flexibilité des tendons et ligaments) ou encore la croissance asymétrique des côtes. Cette dernière hypothèse est intéressante puisque Xiong (1994) décrit le cas de la résorption d'une scoliose grave ( $46^\circ$ ) en pratiquant la simple résection unilatérale des côtes du côté concave de la courbure. Plus récemment, il a été postulé que la scoliose serait un phénomène d'auto-aggravation et ce, à partir d'un certain seuil angulaire et de déformation anatomique structurale (Veldhuizen 2000). À la lumière de ces observations, il reste toutefois plusieurs doutes quant à la participation directe de ces divers facteurs à

l'initiation de la maladie. Certains chercheurs croient en effet que la scoliose pourrait être initiée malgré une structure biomécanique rachidienne tout à fait normale (Byl 1993).

### **1.3.6-Hypothèse endocrinienne :**

L'exacerbation de la pathologie à l'adolescence, le fait qu'elle affecte le plus souvent les individus de sexe féminin et la prévalence augmentée dans les pays largement exposés au soleil, poussent les scientifiques à croire que la régulation hormonale des sujets scoliotiques pourrait être également impliquée dans la pathogenèse de la SIA. Plusieurs hormones comme les facteurs de croissance, les œstrogènes et la mélatonine sont particulièrement à l'étude.

#### **1.3.6.1-Les hormones de croissance :**

De par leur implication directe dans le développement du corps en période pubertaire, les facteurs de croissance ont d'abord été le sujet de nombres d'études. Dès 1975, une équipe scandinave menée par Nordwall montrait que les sujets scoliotiques étaient en moyenne plus grands que leurs homologues sains. Hagglund (1992) supporte cette hypothèse en montrant que la plupart des scoliotiques atteignent leur taille moyenne 2 ans avant le reste de la population normale. Cependant, une étude menée par Yamada (1971) ne montre toutefois aucune hausse significative des niveaux d'hormones de croissance chez 10 patients scoliotiques. Conclusions similaires de la part du groupe de Misol (1971) qui a testé 15 patients scoliotiques ayant une moyenne d'âge de 13.8 ans. Finalement, une autre intéressante étude où les niveaux d'hormones de croissance ont été mesurés toutes les 20 minutes et ce, sur une période de 24 heures n'a pu également établir de différence entre scoliotiques et contrôles lorsque ces derniers étaient à maturité selon l'échelle de Tanner. Cependant, deux cas ont été répertoriés comme affichant des taux anormalement élevés d'hormones de croissance au niveau 2 de l'échelle de Tanner (Ahl 1988). Cette observation

va de pair avec une étude de Willner (1974) qui montra que les jeunes filles scoliotiques grandissaient significativement plus vite lorsqu'elles étaient âgées d'environ 8 à 9 ans. Wang et ses collaborateurs proposent qu'un traitement aux hormones de croissance exacerberait les déformations scoliotiques comme le prouve leur étude menée en 1997 sur près de 250 enfants traités à l'hormone de croissance. Ils ont observé la naissance d'une courbure chez 10 individus, 6 de ces derniers affichant une progression scoliotique annuelle de 26°, en moyenne. L'implication des facteurs de croissance dans l'étiologie de la scoliose est toutefois très bien résumée par Goldberg (1995) et Ahn (2002) qui affirment que ce sont les mécanismes génétiques influençant la croissance qui seraient en cause et non pas la croissance en elle-même. Les individus seraient prédisposés génétiquement au phénomène.

#### **1.3.6.2-Les oestrogènes :**

Comme mentionné ci-haut, la scoliose idiopathique affecte le plus souvent les jeunes filles à l'âge pré-pubertaire, période correspondant à la hausse de sécrétion des œstrogènes, dans une proportion de 4 pour 1 par rapport aux garçons du même âge (Shohat 1988). Cette constatation a évidemment tôt fait de lancer les chercheurs sur cette voie d'investigation. Il a par ailleurs déjà été démontré que les oestrogènes, à l'instar des autres stéroïdes ovariens, jouent un rôle essentiel dans la physiologie osseuse (Balasch 2003). Une étude, menée par le groupe de Inoue (2002), suggère la corrélation entre un polymorphisme (XbaI) du gène encodant le récepteur nucléaire oestrogénique et la sévérité de la courbure. Le problème étant toutefois de savoir si ce polymorphisme est bien une cause réelle de l'initiation scoliotique ou encore un facteur aggravant.

### 1.3.6.3-La mélatonine :

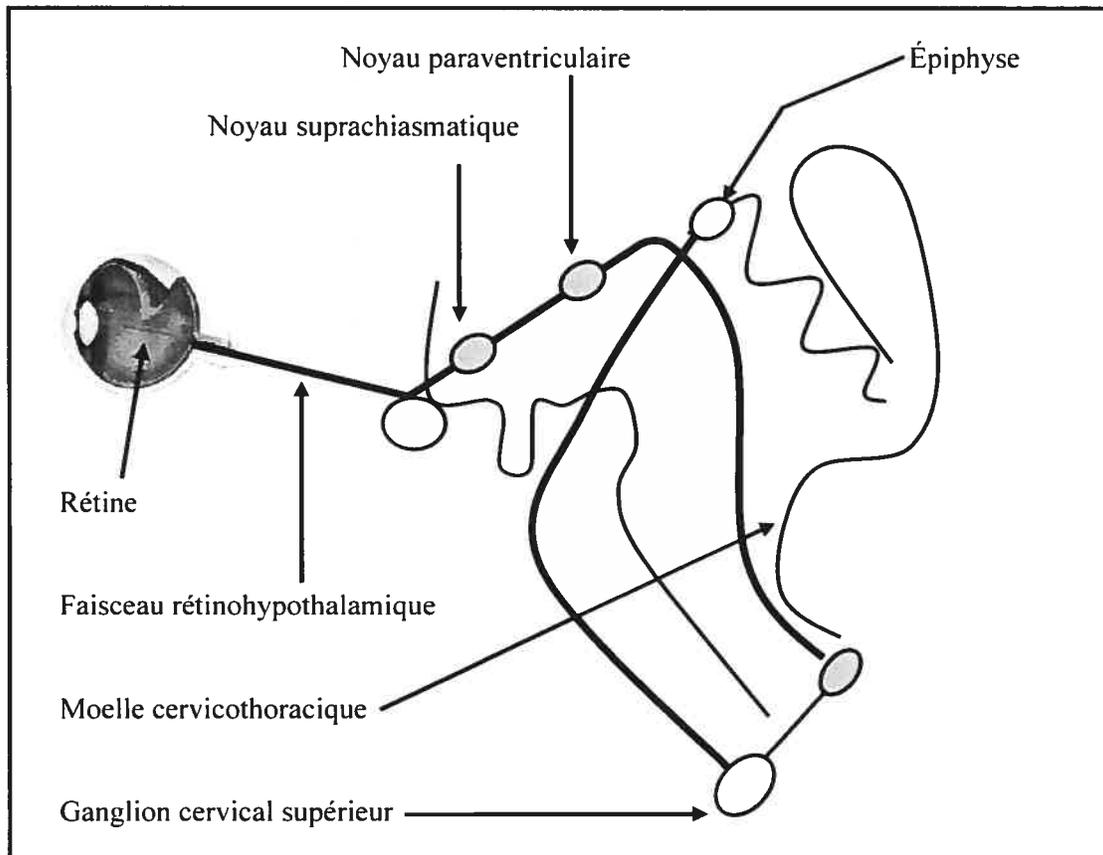
L'hypothèse impliquant la mélatonine est née des recherches de Thillard (1959) qui se rendit compte que l'ablation de la glande pinéale (site principal de la synthèse de la mélatonine) chez le poussin induisait la formation de scoliose chez environ 50% des animaux. Dubousset (1983) et Machida (1993) utilisèrent donc ce banc d'essai afin de percer le secret de l'implication de l'hormone dans l'étiologie de la scoliose. Machida amena également deux nouveaux modèles d'étude : le rat bipédal pinéalectomisé (1999) et la souris C57BL/6j bipédale (2003, non publié). Malgré ces réalisations, Machida (1996) fut le seul à montrer une diminution significative des niveaux de mélatonine sérique et ce, exclusivement chez les sujets atteints de scoliose progressives. Aucune autre étude n'a pu mettre en évidence une baisse notable en mélatonine dans les cas de scoliose (Fagan 1998 ; Hilibrand 1996). En conclusion, la seule carence en mélatonine semble insuffisante pour provoquer la pathologie. C'est sur cette hypothèse que le groupe de Moreau (2004) appuie son projet de recherche, stipulant que les déformations scoliotiques naissent d'un défaut de signalisation de l'hormone plutôt que sa simple carence. Pour étudier et approfondir cette thèse, nous allons donc décrire avec détails les rôles physiologiques majeurs de la mélatonine, ses mécanismes de régulation ainsi que les mécanismes intra-cellulaires activés sous son influence.

## **2-Mélatonine :**

### **2.1-Généralités :**

La mélatonine (5-methoxy N-acétyltryptamine) est une hormone synthétisée à partir de la sérotonine par le corps pinéal, également appelé glande épiphyse. Cette dernière est une petite masse de tissu épithélial glandulaire située près du centre de l'encéphale (région de l'épithalamus, à l'arrière du troisième ventricule) chez les mammifères mais située beaucoup plus près du cortex cérébral chez d'autres vertébrés comme le poulet. La glande pinéale agit en fait telle une horloge dont le mécanisme est asservi au rythme imposé par le noyau suprachiasmatique. Chez l'homme toutefois, le rôle exact de la mélatonine demeure toujours hypothétique. Il est mentionné qu'elle faciliterait le sommeil et la régulation de certains axes endocriniens selon deux horloges, circadienne et circanuelle (voir section 2.3).

Chez l'animal, elle régule l'activité sexuelle chez les espèces à reproduction saisonnière. Il existe même chez certains amphibiens et reptiles une structure régulatrice visant à déterminer les niveaux d'éclairage ambiant de façon à obtenir une parfaite synchronisation avec l'axe épiphysaire. Ce troisième œil (œil pinéal ou œil pariétal) situé sous la structure crânienne est dépourvu de cornée et de cristallin mais fait partie intégrante du système visuel puisqu'il est composé en majorité de cônes. Les humains et les autres mammifères, évidemment dépourvus de ce type de structure, soumettent leur régulation épiphysaire au faisceau rétinohypothalamique et au noyau suprachiasmatique (Moore 1996) comme le montre la figure 2 (Guénard H. Physiologie humaine, 2<sup>ème</sup> édition 1996).



**Figure 1.2-Régulation épiphysaire par le faisceau rétinohypothalamique et noyau suprachiasmatique.** (adaptée de Guénard H. Physiologie humaine 2ième édition, 1996).

## 2.2-Synthèse de la mélatonine :

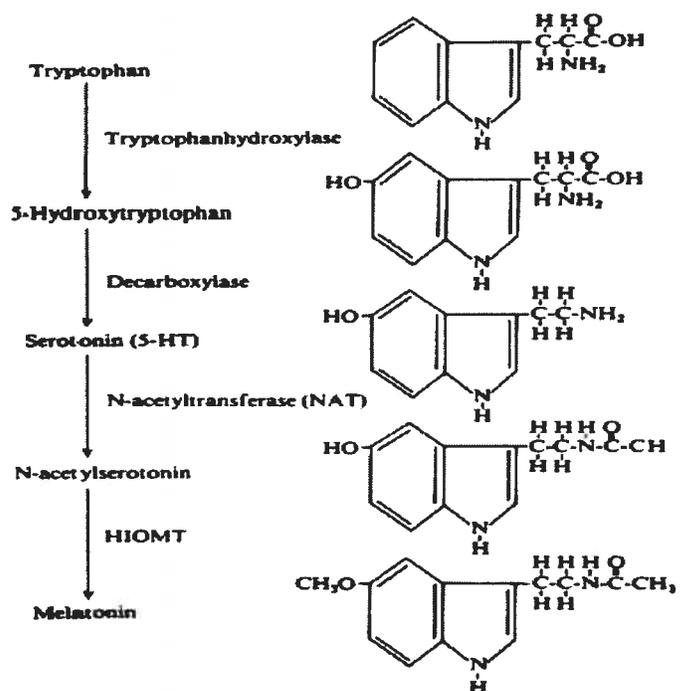
La mélatonine est synthétisée à partir d'un acide aminé, le tryptophane, via une cascade enzymatique linéaire. Sa synthèse est régulée par l'axe rétinohypothalamique et atteint généralement son apogée vers la fin de la période nocturne. Une première réaction enzymatique, faisant appel à la tryptophane hydroxylase, est initiée transformant d'abord l'acide aminé en 5-hydroxytryptophane. Ensuite une seconde enzyme, la décarboxylase, convertit le tout en une hormone, la sérotonine. Il est à noter que ces enzymes sont exprimés de façon ubiquitaire, ce qui signifie que la sérotonine n'est pas exclusivement synthétisée dans la glande pinéale. Ce n'est toutefois pas la cas de la mélatonine puisque les enzymes nécessaires à sa production ne se retrouvent que dans certains tissus spécialisés comme celui de l'épiphyse et de la rétine (Beshare, 1983 ; Zawilska, 1992) et les lymphocytes T (Carrillo-Vico 2005). La cascade se poursuit avec l'acétylation de la sérotonine par l'arylalkylamine-N-acétyltransférase (NAT) donnant comme sous-produit la N-acétylsérotonine. Cette dernière est ensuite méthylée par l'hydroxyindole-O-méthyltransférase (HIOMT) pour donner la mélatonine (Figure 1.3).

Ces deux dernières enzymes (NAT et HIOMT), hautement spécifiques à la production de mélatonine montrent cependant des périodes d'activité très différentes (Klein 1971). En effet, l'activité de l'HIOMT demeure pratiquement inchangée entre les périodes diurnes et nocturnes, contrairement à la NAT qui se retrouve en quantité nettement plus importante (50 à 100 fois plus élevée) durant la nuit, ce qui en fait probablement l'agent limitant de la biosynthèse de la mélatonine (Klein 1973). Cette enzyme est soumise à un étroit contrôle de son expression et/ou de son activité par divers mécanismes, restreignant ainsi son activité aux périodes obscures. Les travaux d'Axelrod (1965) chez le rat et ceux de Klein (1972) prouvent cette hypothèse en montrant que l'activité de la NAT est complètement inhibée 15 minutes

seulement après l'exposition du sujet à un bref éclat lumineux. Preuve de ce mécanisme de régulation, une étude menée par Mess (1996) sur des glandes pinéales de poulets et de rats isolées et mises en culture montre que l'application directe de lumière sur le tissu glandulaire n'affecte en rien l'activité synthétique du rat qui demeure basale alors qu'elle module la sécrétion de la mélatonine chez l'oiseau. De plus, l'addition de norépinéphrine stimule la production de l'hormone de façon dose-dépendante chez le rat tandis que ce neurotransmetteur en inhibe la sécrétion chez le poulet. Il illustre ainsi la différence de la régulation sécrétoire de la mélatonine inter-espèce, étant soumise à une innervation périphérique sympathique chez le rat alors qu'elle est dite circadienne intrinsèque chez le poulet. Les mécanismes de modulation *in vivo* exacts n'ont toutefois pu être déterminés avec exactitude.

### **2.3-Rôles physiologiques de la mélatonine :**

La mélatonine, une hormone indolique, a été isolée pour la première fois en 1958 par Lerner. Le premier rôle attribué à l'hormone était l'agrégation pigmentaire chez *Xenopus laevis*. Or, au fil des décennies, il s'avéra que ladite hormone relevait d'une importance capitale et ce, dans toutes sortes de systèmes. Furent ainsi découverts plusieurs rôles physiologiques comme la régulation des horloges circannuelle et circadienne, des effets paracrines et autocrines, la stimulation du système immunitaire et le maintien de l'équilibre osseux.



**Figure 1.3-Illustration de la synthèse de la mélatonine.**

(Adapté de Simonneaux 2003).

### **2.3.1-Régulation de l'horloge circannuelle :**

La mélatonine permet l'adaptation aux modifications annuelles liées aux photopériodes de durées différentes, soit l'ajustement aux saisons ou rythme circannuel. Il est supposé que cette capacité d'adaptation soit intimement liée au cycle circadien mais il existe d'autres cibles potentielles comme le *Pars tuberalis* et l'adénohypophyse, structures neurales à haute teneur en récepteurs mélatoninergiques (Hazlerigg 2001). Toutefois, la réponse exacte de ces tissus neurologiques à la mélatonine chez l'humain demeure toujours inconnue.

### **2.3.2-Régulation de l'horloge circadienne :**

Ce système est soumis à la sécrétion cumulée de mélatonine sur une période de 24 heures (nycthémère) qui est elle-même régulée en fonction de la photopériode soit la durée relative du jour et de la nuit. Les taux circulants de mélatonine varient selon l'alternance des cycles nocturnes et diurnes, atteignant son paroxysme juste avant l'aurore et ce, chez la plupart des mammifères étudiés. La régulation de ces cycles chez les autres vertébrés peut être en partie ou totalement supprimée avec la résection complète du corps pinéal comme le montre une étude menée en 1998 par Cassone et ses collaborateurs. Il est toutefois mentionné que la mélatonine pourrait agir comme agent d'auto-régulation non seulement sur le noyau suprachiasmatique, ce dernier étant riche en récepteurs mélatoninergiques (Vanecek 1987) mais aussi sur tous les tissus soumis à la régulation circadienne (Prévet 1996). La mélatonine peut être utilisée chez l'humain pour des fins de re-synchronisation du cycle circadien afin de lutter contre les effets du décalage horaire, faciliter le sommeil des travailleurs de nuit, des insomniaques chroniques et même de certains aveugles (Arendt 1997).

### **2.3.3-Effets paracrines et autocrines :**

Il existe d'autres sites de synthèse de la mélatonine comme la rétine et certaines portions des viscères. Comme ces structures sont riches en récepteurs mélatoninergiques, il est présumé que l'hormone y joue également un rôle d'auto-régulation d'où les effets paracrines et autocrines (Simoneaux 2003). Le métabolisme de la rétine est par exemple influencé par les cycles circadiens en ce qui concerne la synthèse des photorécepteurs (Cahill 1995), entre autres. L'action de la mélatonine sur ces structures visuelles est soit directe, par le contrôle du mouvement des granules mélanosomales ou encore indirecte, par l'inhibition de la dopamine, inhibiteur de la synthèse mélatoninergique (Dubocovich 1997) au niveau rétinien. Cet effet sur la dopamine amène à penser que la mélatonine pourrait également jouer le rôle de modulateur des neurotransmissions puisqu'elle est en mesure d'influencer d'autres neurotransmetteurs comme l'acétylcholine et la norépinéphrine (Cardinali 1975). Il demeure toutefois incertain à ce jour si cet effet est pré ou post-synaptique ou encore une combinaison des deux.

### **2.3.4-Effets immunitaires :**

La pinéalectomie chez le rat entraîne des changements structuraux importants dans le thymus, ce qui porte à croire que la mélatonine puisse avoir une certaine influence sur le système immunitaire (Provinciali 1996). Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'administration de doses exogènes de mélatonine stimulerait le système immunitaire en accroissant par exemple l'activité des cellules lymphocytaires et la production d'interleukines.

### **2.3.5-Métabolisme osseux :**

Il est connu depuis plusieurs années que la mélatonine joue un rôle sur la régulation de l'ostéogenèse. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'hormone agit sur le métabolisme du calcium (Csaba 1977) et que l'on en retrouve en grande quantité dans la moëlle osseuse des mammifères (Conti 2000). Toutefois, bien que l'on ait retrouvé une forte activité de la NAT au sein de cette structure, il est encore difficile de savoir s'il s'agit d'une site véritable de synthèse ou d'une site de stockage de l'hormone. Roth (1999), suite à des essais *in vitro* montre que la mélatonine provoque également la différenciation cellulaire et initie la formation osseuse ce qui expliquerait le fait que les souris C57BL/6j, naturellement déficiente en mélatonine, montrent des densités osseuses nettement inférieures lorsque comparées aux souris C3H, une lignée surproduisant l'hormone. Finalement, l'hormone montre aussi une influence certaine sur la mécanique du remodelage osseux, composante importante de l'équilibre de l'ostéogenèse. En effet, il semble que la mélatonine ait un effet direct sur l'activité et la maturation des ostéoclastes via des protéines telles que l'ostéoprotégérine, RANK et RANKL (Teitelbaum 2003).

### **2.3.6-Autres rôles physiologiques :**

Il est également connu que la mélatonine agirait comme agent oncostatique dans certains types de cancer comme le cancer du sein (Sanchez-Barcelo 2003) ainsi que dans l'étiologie de certaines maladies immunitaires. Elle jouerait aussi le rôle d'agent anti-oxydant (Reiter 1995) limitant les dégâts infligés par les radicaux libres et le vieillissement. Finalement, elle inhiberait l'activation de la poly (ADP-ribose) synthetase limitant ainsi les dégâts causés par les phénomènes de l'inflammation, l'ischémie et des perfusions (Cuzzocrea 2001).

## 2.4-Signalisation cellulaire :

La mélatonine est diffusée dans l'organisme d'une part dans le liquide céphalo-rachidien (système nerveux central et périphérique) et d'autre part via le flux sanguin. Il s'agit d'une régulation complexe où nombre de tissus sont impliqués et ce, en fonction des rythmes circadiens et circannuels. Elle exerce donc son action cellulaire par l'intermédiaire de son interaction avec ses récepteurs à localisation multiple. Il existe en effet quatre types distincts de récepteurs pouvant être séparés en trois catégories : membranaires (MT<sub>1</sub>, MT<sub>2</sub>), cytosoliques (MT<sub>3</sub>) et nucléaires (RZR/ROR).

### 2.4.1-Les récepteurs membranaires :

Les récepteurs MT<sub>1</sub> et MT<sub>2</sub> anciennement nommés Mel<sub>1A</sub> et Mel<sub>1B</sub> ont été identifiés et localisés grâce à un radioligand de synthèse, la 2-[<sup>125</sup>I]iodomélatonine, permettant respectivement des essais de liaisons (Dubocovich 1987) et l'autoradiographie (Vanecek 1989).

#### 2.4.1.1-Le récepteur MT1 :

L'hybridation *in situ* a permis de localiser ce récepteur particulièrement présent au sein du système nerveux central où il y occuperait une fonction de régulation de l'horloge circadienne (Vanecek 1998). On le retrouve également au niveau de la rétine (Scher 2002), et des fibres cardiaques contractiles (Doolen 1998), entre autres. Il est couplé à plusieurs isoformes de la protéine G dont une forme inhibitrice limitant la voie de production d'AMP cyclique (Witt-Ebery 1998). C'est par ailleurs cette dernière caractéristique qui rend l'hypothèse impliquant la mélatonine si intéressante. Il se trouve en effet que l'AMP cyclique est un messager secondaire chargé de promouvoir la synthèse protéique cellulaire. Un dysfonctionnement du système d'inhibition mélatoninergique, comme suggéré par Moreau (2004), pourrait alors entraîner une accumulation de protéines et même éventuellement

provoquer l'altération de la fonction cellulaire. Nous discuterons plus en détails des conséquences possibles d'un tel changement au chapitre 3, section 3.2.

#### **2.4.1.2-Le récepteur MT2 :**

C'est le développement d'antagonistes sélectifs qui a permis de découvrir le rôle de ce récepteur dans la physiologie humaine ainsi que les propriétés liées à sa signalisation intracellulaire (Dubocovich 1997). Sa distribution, bien qu'étant moins large que celle de MT<sub>1</sub> comprend la rétine, les reins et certaines parties du système nerveux central (Witt-Enderby 2003). Il serait impliqué dans divers mécanismes dont la physiologie rétinienne (Dubocovich 1997) et la dilatation des vaisseaux cardiaques (Doolen 1998). Fait intéressant, des travaux effectués dans nos installations ont permis de démontrer sa présence chez l'ostéoblaste et l'ostéoclaste humain.

#### **2.4.1.3-Les récepteurs cytosoliques :**

Cette classe ne comprend qu'un seul récepteur, MT<sub>3</sub>, nettement différent de ses prédécesseurs au sens qu'il appartient à la famille des protéines quinone réductases. En fait, MT<sub>3</sub> montre près de 95% d'homologie avec la quinone réductase 2, enzyme impliquée dans la détoxification cellulaire (Nosjean 2000). Une étude menée par ce même auteur en 2001 montre sa localisation chez plusieurs animaux mais sa fonction primaire et sa localisation tissulaire demeurent toutefois inconnues chez l'humain. Seul un rôle secondaire dans la réponse inflammatoire lui est actuellement incombé dans la physiologie humaine (Lotufo 2001).

#### 2.4.1.4-Les récepteurs nucléaires :

La mélatonine peut avoir un effet cellulaire sans toutefois utiliser les récepteurs cités auparavant en se fixant directement à la membrane nucléaire via les récepteurs RZR/ROR $\alpha$  (Becker-André 1994) et RZR $\beta$  (Carlberg 1994). Ces récepteurs, autrefois connus sous le nom d'orphelins, parce que sans ligands connus, montrent des domaines de liaisons à l'ADN contenant la séquence consensus RGGTCA où « R » est une guanine ou une adénosine. Peu de chose sont connues quant à la fonction de ces derniers si ce n'est que la régulation des gènes encodant les protéines 5-lipoxygénase, p21<sup>WAF1/CIP1</sup> et BSP (Bone sialoprotein) Carlberg 2000). L'action de ces récepteurs a été associée à la rythmicité circadienne, dont l'influence module comme précédemment cité le système immunitaire, la prolifération et la différenciation cellulaire.

**Tableau 1.3-Principales étiologies proposées, groupes impliqués ainsi que leur possible implication dans l'initiation de la maladie. (Adapté de Machida 1999)**

	<b>Groupes</b>	<b>Rôle primaire</b>	<b>Rôle secondaire</b>
<b>Os</b>			
Hemirésection des côtes et vertèbres	Dubousset et coll. 1983		+
<b>Muscles et ligaments</b>			
Muscles érecteurs du rachis	Langenskiold et coll. 1969		+
Ligaments costotransverses	Michelsson et coll. 1965		+
<b>Disques intervertébraux</b>			
Glycoaminoglycans	Sahgal et coll. 1983		+
Protéoglycan	Perdrini et coll. 1972		+
<b>Système nerveux</b>			
Circulation céphalo-rachidienne	Yamada et coll. 1969		+
Moëlle épinière	Pincott et coll. 1982		+
<b>Système endocrinien</b>			
Hormones de croissance	Willner et coll. 1976		+
Mélatonine	Machida et coll. 1996 Moreau et coll. 2004		
Œstrogènes	Inoue et coll. 2002		+
<b>Contrôles posturaux</b>	Yamada et coll. 1969	?	
<b>Système vestibulaire</b>	Shalstrand et coll. 1980	?	
<b>Prédispositions génétiques</b>	Wise et coll. 2000 Miller et coll. 2005		

### ***3-Ostéopontine :***

#### **3.1-Généralités :**

Ostéopontine (OPN) est une glycoprotéine phosphorylée et multifonctionnelle particulièrement exprimée au sein des structures osseuses mais également retrouvée dans plusieurs tissus composant l'organisme. Autrefois appelée SppI (secreted phosphoprotein I), BSPII ou encore Eta-1, elle a été isolée pour la première fois, chez le bovin, à partir de la matrice osseuse par le groupe de Franzén (1985) puis maintes fois extraite par divers groupes tels que Fisher (1987), Gerstenfeld (1990) et Bayless (1997). Il a d'abord été proposé par Senger (1979) que la phosphoprotéine n'était sécrétée que par les cellules transformées et différenciées issues de lignées de mammifères. Cette affirmation sera bien rapidement réfutée alors que différents groupes pousseront les analyses, utilisant des techniques modernes afin de caractériser la structure, la fonction et la localisation tissulaire de cette protéine aux multiples fonctions.

#### **3.2-Structure de la protéine :**

OPN est une glycoprotéine acide et hydrophile, négativement chargée, composée d'environ 300 acides aminés (exactement 298). Cette acidité lui est en fait conférée par sa saturation en acide sialique (Oldberg 1986). Le poids moléculaire de la protéine varie de 44 à 75kDa, en fonction de la composition du gel SDS polycrylamide utilisé. À ce jour, la séquence en acides aminés d'OPN a été caractérisée chez 7 espèces différentes afin de comparer le niveau de conservation de ses résidus et ainsi tenter d'en comprendre la fonction au sein de ces divers organismes : rat (Oldberg 1986), souris (Craig 1989), humain (Kiefer 1989), porc (Wrana 1989), bœuf (Kerr 1991) et poulet (Moore 1991). Après alignement des séquences, on note une homologie avoisinant 19% chez ces espèces complètement différentes. Cette comparaison comprend l'ostéopontine du poulet qui est de loin la plus

divergente. Lorsque cette dernière est retirée, le taux d'homologie grimpe à 40%. On retrouve parmi ces consensus une séquence-leader hydrophobe d'environ 16 acides aminées, une portion initiale NH<sub>2</sub>, un segment GRGDS liant les intégrines et finalement une portion COOH terminale. On compte également une séquence poly-Asp suspectée d'interagir avec la calcium phosphate apatite d'où le possible rôle d'OPN dans le processus de minéralisation. La protéine montre des signes de clivage par la trypsine, particulièrement près de la séquence GRGDS pouvant avoir une importance biologique, dans le processus inflammatoire par exemple. Finalement, on retrouve des sites de glycosylation et de phosphorylation chez pratiquement tous les organismes analysés, exposant la protéine à l'activité enzymatique (Butler 1989).

### **3.3-Modifications postraductionnelles :**

#### **3.3.1-Phosphorylation :**

La forme de modification la plus importante est la phosphorylation des résidus sérine (composant en majeure partie la protéine) et thréonine. Une expérience menée par Sodek (1995) montre que les ostéoblastes synthétisant OPN le font sous deux degrés de phosphorylation, produisant ainsi une forme à 55kDa et une autre à 44kDa. Mckee (1993) proposera alors que cette synthèse disparate est le fruit d'un niveau différent de maturité ostéoblastique. En effet, il semble que la forme de 55kDa soit produite en majorité par des ostéoblastes moins différenciés, expliquant ainsi sa présence remarquée près des front de minéralisation. La forme de 44kDa serait quant à elle produite par des cellules plus matures, se retrouvant disséminées partout dans l'os. Ek-Rylander (1994) proposera que les groupement phosphates d'OPN pourrait aider à la fixation des ostéoclastes, favorisant ainsi la résorption osseuse.

### **3.3.2-Glycosylation :**

Des sites de N-glycosylation et de O-glycosylation, sont tous deux retrouvés sur la protéine OPN. Ces sites sont généralement associés aux protéines à localisation membranaire et permettent l'attachement d'oligosaccharides qui, chez OPN sont composés d'environ 31 monosaccharides dont 10 résidus d'acide sialique (Prince 1987). C'est par ailleurs à cause de cette caractéristique que OPN fut tout d'abord nommée sialoprotéine I par Franzen (1985). La fonction et la structure tridimensionnelle de ces structures restent encore à déterminer. Finalement, OPN peut être également la cible d'une autre famille d'enzyme, les transglutaminases. Cette réaction est soupçonnée d'être responsable de la stabilisation des liaisons d'OPN avec d'autres protéines ou encore avec elle-même.

### **3.4-Structure génique :**

#### **3.4.1-Localisation chromosomique :**

Le locus du gène encodant OPN chez l'humain est situé sur le chromosome 4q13 et sur le chromosome 5 chez la souris (Patarca 1989). Les séquences génétiques encodent sept exons d'une longueur totale de 9 et de 7.5kb respectivement (Hijiya 1994; Miyazaki 1990). Goodison (1999) montre des évidences d'épissage alternatif lors de la transcription, opération soumise au type de stimulation subie par le promoteur d'OPN.

#### **3.4.2-Séquence promotrice :**

La séquence promotrice est hautement conservée de la région -1 à -250 entre les espèces mais varie de façon drastique jusqu'à la position -650 (Yamamoto 1995). On y retrouve une variété de motifs dont une séquence riche en purines (Denhardt 1993), des éléments de réponse à la vitamine D et aux glucocorticoïdes (Koszewski 1996), des séquences répondant à l'induction des interférons et des alignements de type-Ets (Patarca 1993).

Plusieurs séquences régulatrices y ont été identifiées dont des régions similaires aux boîtes TATA (TTTAAA) aux environs de la position -25. Bien que de réelles boîtes TATA aient bel et bien été localisées, il semble qu'elles soient situées beaucoup trop en amont du site d'initiation afin d'avoir un quelconque pouvoir de régulation. Santoro (1988) a retrouvé des boîtes CCAAT, à partir de la position -73 et ce jusqu'à -2190 soit assez loin de leur position régulatrice usuelle (-50 à -100). Des éléments de réponse à la vitamine D ont également été situés vers -698 à -684 (Schüle 1990) et de -1892 à -1878 (Zhang 1992). Un résumé des principaux sites régulateurs sont par ailleurs retrouvés dans le tableau 1.4. Il est toutefois à noter que ce tableau n'est pas exhaustif. Seules les séquences les plus importantes y ont été retenues. Pour obtenir une liste plus complète, se référer à l'article de Yamamoto (1995). Une étude récente (Denhardt 2003) montre des évidences indiquant la présence d'une enhancer activé par la molécule Ras, un oncogène.

**Tableau 1.4-Résumé des principales séquences régulatrices retrouvées au sein du promoteur d'OPN humaine.** Données extraites de Yamamoto (1995).

Groupe	Séquence	Position
Zhang (1992)	TTTAAA (TATA-like)	-27 à -22bp
Santoro (1988)	CCAATT-like	-73 à -2190
Schüle (1990)	VDRE-like	-1982 à -1878
Akira (1990)	NF-IL6	-2091 à -2083,-1950 à -1942, - 1778 à -1770\ -1007 à -999
Orkin (1990)	GATA-1(GF-1)	-1616 à -1611 \ -1252 à -1247
Yamamoto (1990)		-851 à -847 \ -366 à -362
Angel (1987)	TGACACA (AP1)	-78 à -72
Fujita (1985)	AACTGA (IRF-1)	-1270 à -1264
Isseman (1990)	PPAR	Coiffe

### **3.5-Régulation transcriptionnelle :**

#### **3.5.1-Régulation multisystémique :**

De par son implication multisystémique, la régulation transcriptionnelle d'OPN est souvent très spécifique, en fonction du système tissulaire dans laquelle elle est retrouvée. Elle n'est donc pas universelle et il devient crucial de mentionner le type cellulaire impliqué. Tout d'abord, il est reconnu que les cytokines pro-inflammatoires stimulent la transcription de gène OPN et son expression chez les cellules impliquées dans le processus. Par exemple, les macrophages, une fois activés par de l'oxide nitrique et des lipopolysaccharides induisent l'expression génique et la sécrétion protéique d'OPN (Guo 2001). Toujours d'un point de vue immunitaire, l'interleukine-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  en stimulent également l'expression (Yu 1999).

#### **3.5.2- Régulation du métabolisme osseux :**

Du côté de la biominéralisation, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 (Kubota 1989), l'acide rétinoïque, l'endothéline, BMP-2 (Noda 1995) et la vitamine D (Prince 1987) stimulent à leur tour la production d'ARNm d'OPN dans les lignées dérivées d'ostéoblastes en l'occurrence, ROS 17/2.8 et MC3T3-E1. Chez les ostéoclastes, l'acide rétinoïque augmente également la transcription d'OPN alors que la calcitonine l'inhibe (Kaji 1995). Finalement, notons l'action des autres médiateurs dont l'action induit l'expression génique d'OPN dont l'angiotensine II (Ricardo 2000), le dexaméthasone (Chen 1996), l'hyperglycémie (Takemoto 2000), l'hypoxie (Sodhi 2001) et même l'augmentation de la pression atmosphérique (Iizuka 2001). Malgré le nombre impressionnant de facteurs découverts, le patron établissant la fonction et les mécanismes exacts de ces régulations demeurent à ce jour incomplets.

### **3.5.3-Régulation via les récepteurs orphelins :**

La séquence promotrice d'OPN peut également être influencée par des récepteurs nucléaires orphelins. Nurr1, particulièrement retrouvés dans le système nerveux est également exprimé dans l'ostéoblaste où son activation stimule l'expression d'OPN (Lammi 2004). Cette étude souligne également l'action synergique de Nurr1 et de la vitamine D sur le promoteur d'OPN indiquant leurs rôles dans l'ostéogénèse. Une autre famille de récepteurs orphelins est également en mesure de moduler l'expression génique de la protéine. Il s'agit cette fois des récepteurs orphelins reliés aux récepteurs  $\alpha$  des œstrogènes (ERR  $\alpha$ ). Encore une fois, un possible lien pourrait être établi entre la prévalence à forte dominance féminine et cette régulation spécifique aux hormones ovariennes (voir section 3.7.1 et chapitre 3, section 3.2). La fixation des oestrogènes au récepteurs ERR  $\alpha$  provoque la hausse de synthèse d'ostéopontine de manière dose-dépendante (Vanacker 1998) dans les cellules issues des lignées ostéoblastiques, soulignant l'importance de ces hormones dans l'ostéogénèse. Il est également important de mentionner que ces récepteurs sont exprimés au sein de divers systèmes tels que le SNC, le cœur, les muscles, les tissus adipeux et la peau (Bonnelye 1997) lors du développement embryonnaire.

### **3.6-Localisation tissulaire :**

Bien que n'étant pas exprimée de façon ubiquitaire, OPN est retrouvée dans un vaste nombre de tissus et systèmes. Elle a été localisée dans l'os (Mark 1988), le rein (Malyankar 1997), le placenta et l'endoderme (Briese 2005), le sang (VandenBos 1999), les cellules des systèmes nerveux central et périphérique (Jander 2002), les macrophages, les muscles lisses, les cellules épidermales (O'Brien 1994), l'odontoblastes (Helder 1993), les fuseaux neuro-musculaires (Ichikawa 2000), la rétine (Ju 2000) et le système vestibulaire (Uno 2000) pour

ne citer que ceux-là. Phénomène intéressant, la protéine est co-localisée dans tous les tissus à haute teneur à récepteurs mélatoninergiques et on note facilement sa présence systématiquement chez tous les tissus et systèmes se trouvant altérés dans la SIA d'où sa possible implication dans l'étiopathogénèse de la pathologie. C'est n'est toutefois que pure spéculation et nous y reviendrons au chapitre 4.

### **3.7-Fonctions potentielles:**

Il est reconnu que OPN soit impliquée dans nombres d'évènements physiologiques et pathologiques. Elle est entre autres impliquée dans le remodelage osseux (Denhardt 1998), la guérison des blessures (Liaw 1998) et le processus l'inflammatoire (Giachelli 2000) mais aussi dans la progression de certaines maladies auto-immunes (Cantor 1995), dans le processus métastatique des cellules cancéreuses (Moye 2004), la formation de calculs rénaux et urinaires (Kohri 1993), la calcification dystrophique (Aherrahrou 2004) et la resténose coronaire (Panda 1997). Ce n'est toutefois qu'un aperçu des implications de la protéine au sein de l'organisme, preuve de sa multifonctionnalité. Nous allons néanmoins approfondir certaines fonctions importantes de la protéine comme son rôle dans l'attachement, la migration et la signalisation cellulaire ainsi que sa fonction au sein du maintien de l'équilibre du remodelage osseux.

#### **3.7.1-Fonctions cellulaires :**

OPN agit au niveau cellulaire grâce à divers récepteurs dont les intégrines  $\alpha_v(\beta_1, \beta_3, \beta_5)$  et  $\beta_1(\alpha_4, \alpha_5, \alpha_8, \alpha_9)$  et son récepteur principal, CD44 (une glycoprotéine transmembranaire largement distribuée) particulièrement les formes v6 et/ou v7 (Katagiri 1999). La séquence GRGDS serait à l'origine de l'attachement cellulaire provoqué par OPN (Oldberg 1986). Cette caractéristique permettrait aux ostéoclastes, entre autres, de se fixer au tissu minéral via

l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  afin d'effectuer la résorption osseuse (Dodds 1995). En plus de l'attachement cellulaire, OPN serait également impliquée dans la migration cellulaire. Elle provoquerait le recrutement et la rétention des macrophages et des lymphocytes T au site d'inflammation (Giachelli 1998). Le clivage par la thrombine à ce même site résulte en la formation d'une variante écourtée de la protéine qui devient alors plus efficace à provoquer le recrutement, l'adhésion et même la prolifération des cellules T et ce, même si ces dernières n'ont pas la capacité de sécréter OPN (O'Reagan 1999). OPN est aussi étroitement reliée à la survie cellulaire. En effet, il semble que la protéine ait un effet anti-apoptotique encore une fois via l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  qui activerait le facteur de transcription NF $\kappa$ B des cellules épithéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules hémathopoiétiques (Scatena 1998 ;Weintraub 2000 ; Lin 2000). Finalement, l'OPN pourrait agir comme mécano-récepteur moléculaire au sein des fuseaux neuro-musculaires, structures impliquées dans la proprioception (Proske 2000). Une autre étude menée par Ichikawa (2000) montre en effet la présence de la protéine au sein même de ces structures. Toutefois, il n'est toujours pas possible de comprendre comment l'expression d'OPN dans les fuseaux neuro-musculaire est à même d'influencer le contrôle postural. Étant donnée les notions biomécaniques citées précédemment, il est néanmoins très intéressant de prendre note de ce phénomène en regard à l'étiopathogénèse de la scoliose idiopathique de l'adolescent. Les fonctions principales d'OPN dans l'organisme sont résumées dans le tableau 1.5.

**Tableau 1.5-Résumé simplifié des principaux rôles d'OPN au sein de l'organisme.**

(Adapté de Mazzali 2002)

<b>Système</b>	<b>Fonction</b>
Biominéralisation	Régulation de la résorption osseuse
	Inhibition de la cristallisation urinaire et de la calcification cardiovasculaire
Immunité	Production des cytokines chez les macrophages
	Activation des cellules T
	Stimulation de la réponse Th1
	Recrutement des macrophages et des cellules T
Survie cellulaire	Cellules épithéliales
	Cellules endothéliales
	Cellules musculaires lisses
Réparation des plaies	Fibrose
	Prolifération cellulaire
Biologie du cancer	Invasion tumorale
	Étalement métastatique
Contrôle postural	Proprioception

#### ***4-Les modèles animaux de la SIA :***

Il existe principalement trois modèles animaux relatifs à l'étude de l'induction et de la progression scoliotique. Il s'agit du poulet pinéalectomisé, développé par Thillard (1959), du rat bipédal pinalectomisé (Machida 1999) et de la souris C57BL/6j bipédale (Machida 2003 non publié. Boulanger 2005 non publié). Dans cette section, nous comparerons la pertinence de l'utilisation de chacun de ces modèles quant à l'étude de l'étiopathogénèse de la SIA.

##### **4.1-Le poulet pinéalectomisé :**

Il s'agit du premier véritable banc d'étude animal de la scoliose. Il présente les avantages d'être un bipède naturel dont la glande pinéale est située non pas au cœur du système cérébral comme chez les mammifères mais en portion superficielle postérieure, ce qui rend son ablation relativement moins difficile. De plus, il devient possible, grâce à sa très rapide croissance, d'évaluer la progression des déformations sur une période inférieure à 40 jours, ce qui représente une économie temporelle significative. Le poulet pinéalectomisé demeure toutefois un sujet de controverse puisqu'il présente des divergences biomécaniques diamétralement opposées aux mammifères évolués tels que l'être humain. En effet, la portion vertébrale scoliotique de poulets pinéalectomisés correspondant à un segment horizontal du rachis, étant conséquemment soumis à des contraintes mécaniques nettement différentes des autres bipèdes évoluant également sur leurs membres inférieurs. De fait, la colonne vertébrale du poulet ne supporte pas en compression le poids de la portion antérieure de l'animal et réagit donc probablement de façon différente aux contraintes gravitationnelles. De plus, comme seulement 50% des animaux développent une scoliose, il devient nécessaire de développer des cohortes importantes pour obtenir la moindre signifiante statistique, ce qui entraîne évidemment des coûts d'exploitation élevés. De par leur taille impressionnante (2kg

ou plus en 35 jours) il est parfois également difficile de les contraindre et de monitorer la progression de la courbure avec les appareils diagnostiques. Néanmoins, de par la facilité de manipulations requises et sa relative docilité (surtout en bas âge), le poulet est un excellent modèle primaire, qui a permis de constater l'implication d'OPN dans le processus pathologique de la SIA (voir chapitre 4).

#### **4.2-Le rat bipédal pinéalectomisé :**

Ce modèle, de par les lourdes manipulations chirurgicales imposées est très impopulaire. En effet, il exige non seulement la résection ou du moins la complète inactivation du corps pinéal, profondément enfoui dans le cerveau de l'animal mais également l'ablation des membres antérieurs et de la queue. Ces opérations sont coûteuses en temps et les taux de survie sont faibles. Toutefois, ce modèle a permis de constater la nécessité de la position bipédale au développement scoliotique, indiquant la présence d'un élément biomécanique putatif jouant un rôle crucial dans l'induction de la pathologie. L'impossibilité d'inhiber l'expression génique systémique chez le rat limite toutefois les possibilités d'études, les restreignant, à l'instar du poulet, à l'injection exogène de composés pharmaceutiques.

#### **4.3-La souris bipédale C57BL/6j :**

Ce modèle ne présente que des avantages dont le plus flagrant est sa déficience naturelle en mélatonine. Facile de manipulation, la souris ne demande que très peu d'expérience de la part des expérimentateurs et sa petite taille ne limite aucunement l'utilisation d'appareils de mesure (PIXImusII) ou de diagnostic. Bien que la résection des membres antérieurs et de la queue demande une certaine expertise chirurgicale et une grande dextérité, la technique est relativement facile à apprendre et les taux de survie dépassent 80%, ce qui est éthiquement acceptable. Ce système offre un très grand avantage puisqu'il offre la

possibilité de valider l'influence spécifique de certains gènes (gain et/ou perte d'effet). Il est toutefois nécessaire de disposer d'installation spécifique (chambre à pression positive) pour permettre l'utilisation d'un tel modèle d'où un coût substantiellement plus élevé que les deux modèles précédents.

### ***5-Plan de cette étude :***

Plusieurs études à caractère étiologique montrent l'implication de la mélatonine dans le processus pathologique de la SIA (voir chapitre 1, section 1.3.6.3). En effet, la carence en mélatonine chez le poulet pinéalectomisé et le rat pinéalectomisé bipédal souligne le rôle potentiel que joue l'hormone au sein du pathomécanisme de la pathologie. Toutefois, les concentrations normales en mélatonine observées chez les sujets scoliotiques humains et l'importance visible d'un facteur biomécanique relié à la posture bipédale nous amènent à penser que le simple manque en mélatonine ou un défaut de signalisation de cette hormone pourrait n'être qu'un facteur déclenchant du pathomécanisme responsable du développement asymétrique du rachis de la SIA.

### **5.1-Hypothèse de travail :**

Différentes données extraites de la littérature et obtenues à l'aide de l'étude des modèles animaux de la SIA nous permettent de postuler l'hypothèse suivante : « La SIA est causée par une dysfonction de la signalisation de la mélatonine dans les tissus musculo-squelettiques plutôt que par la simple carence en l'hormone. De plus, cette signalisation aberrante de la mélatonine entraîne la surexpression de diverses protéines, dont l'ostéopontine, au niveau du SNC et des centres proprioceptifs périphériques provoquant ainsi le développement asymétrique de la colonne vertébrale et des structures qui lui sont associées. »

## 5.2-Objectifs :

Les objectifs de cette étude sont d'une part de montrer la pertinence de l'utilisation du poulet pinéalectomisé et de la souris bipédale C57BL/6j comme modèles animaux de la SIA et d'élucider l'étiologie de la SIA. Les travaux de cette seconde partie ont été orientés de façon à identifier et à caractériser un effecteur commun, régulé par la mélatonine, qui serait à la fois retrouvé chez les modèles animaux et les sujets scoliotiques en l'occurrence l'OPN. Finalement, nous avons vérifié et démontré que l'OPN était un facteur essentiel dans le processus initiateur de la scoliose à l'aide d'approches pharmacologiques et génétiques. Ces travaux pourront ultimement mener à la découverte et au développement de nouvelles options thérapeutiques à la SIA.

## Chapitre 2 – Matériels et méthodes :

### 1-Poulets pinéalectomisés :

Pour la réalisation de cette partie de l'étude, des poulets de race *Mountain Hubbard*, furent achetés et les pinéalectomies ont été réalisées à Edmonton, par l'équipe du Dr Keith Bagnall (University of Alberta, Edmonton) un de nos collaborateurs. Les chirurgies, toutes effectuées par le même expérimentateur, ont été réalisées de 3 à 5 jours suivants l'éclosion des œufs. Après une journée entière de repos, les poulets ont transité vers nos installations où les expérimentations débutèrent 24 heures après leur réception. Les poulets furent alors placés dans un environnement à atmosphère contrôlée (26°C, 70% d'humidité) où les cycles lumière/obscurité furent établis sur un ratio de 12/12 heures. Une cohorte de 80 poulets fut subséquemment divisée en trois groupes expérimentaux: 1) pinéalectomisés (n=45), 2) type-sauvage (n=10) et 3) contrôles chirurgicaux (shams ; n=25). Les poulets du dernier groupe, les contrôles chirurgicaux (shams), n'ont subi qu'une incision crânienne sans la résection de la glande pinéale. Il est également important de souligner que le premier groupe (poulets pinéalectomisés) fut également divisé en un sous-groupe expérimental (n=20) pour être traité par un agent pharmacologique pouvant inhiber la transcription d'OPN.

#### 1.1-Administration du composé pharmacologique :

Le sous-groupe en question (n=20) a subi l'administration quotidienne d'un inhibiteur d'OPN (THX99, la compagnie pharmaceutique ne peut être indiquée en vertu d'une entente de confidentialité) dilué dans une solution saline stérile (0.9% chlorure de sodium) sous la forme d'une injection sous-cutanée, à l'aide d'une aiguille de calibre 28G½ et ce, dans un volume variant entre 1 et 3 ml. Les sites d'injection furent limités à la région abdominale de

l'animal, là où les plumes sont le plus dispersées. Le poids de chaque poulet fut mesuré à tous les deux jours de façon à respecter la dose quotidienne établie de 500µg/kg de poids corporel.

### **1.2-Examens radiographiques:**

Tous les poulets, incluant les contrôles, ont été soumis à l'analyse radiographique sous anesthésie aux jours 14 et 21 à l'aide d'un ostéodensitomètre (DEXA PIXImus II, Lunar Corp., WI, É-U) et par radiographie à rayons X (exclusivement au jour 28) conséquemment à la taille imposante des spécimens. Les images ont été prises alors que l'animal gisait sur le dos, les ailes déployées, maintenu dans cette position suite à une anesthésie par inhalation d'Isoflurane™. Les images digitales et sur film obtenues permettent non seulement la pose du diagnostic mais également de mesurer la densité osseuse totale et/ou locale des individus analysés. Il est toutefois important de noter que le diagnostic final et définitif fut établi à partir des radiographies prises au jour 28.

### **1.3-Mesure de l'angle de Cobb :**

Les radiographies du rachis des poulets pinéalectomisés furent analysées en fonction du niveau de déformations présentées par ces derniers. La sévérité des scoliozes fut déterminées par la mesure de l'angle de Cobb (1948) où la valeur déterminant la condition scoliozique fut établie à un minimum de 10° d'angle de Cobb, soit le même paramètre d'inclusion utilisé chez les sujets humains (Reamy 2001). L'angle de Cobb se calcule à partir de l'intersection de la droite tangentielle au plateau supérieur de la vertèbre limite supérieure et de celle tangentielle au plateau inférieur de la vertèbre limite inférieure. Cette méthode est toutefois soumise à l'interprétation de l'expérimentateur, ce qui constitue sa principale limite.

#### 1.4-Dosage de la mélatonine:

Des échantillons sanguins (1 à 2 ml) furent prélevés d'une veine périphérique, située sous l'aile pour chaque poulet, en utilisant une aiguille de calibre 27G½ aux jours 14, 21 et 28, avec une période de cueillette entre 8h00 à 11h00 le matin. Le sérum, recueilli sur gel séparateur (Vacutainer, Becton-Dickinson, É-U), fut isolé par centrifugation (3000rpm/5min) et immédiatement congelé à -80°C pour analyses ultérieures. Les concentrations sériques de la mélatonine ont été déterminées suite à l'utilisation d'un test ELISA (Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Allemagne).

#### 1.5-Analyse de l'expression génique d'OPN:

Les poulets furent sacrifiés au 30<sup>ème</sup> jour de vie. Des échantillons de muscles paraspinaux et de vertèbres furent alors prélevés de part et d'autres du rachis et congelés dans l'azote liquide, puis à -80°C pour l'extraction ultérieure de l'ARN. L'ARN total fut obtenu grâce à une série d'extractions au phénol/chloroforme (Current protocols in molecular biology). Une réaction de transcription inverse fut alors réalisée à partir de 1 µg d'ARN total à l'aide d'un kit commercial (ThermoScript™ RT-PCR System, Invitrogen, Ont, CA) selon les recommandations du manufacturier. L'ADN complémentaire ainsi obtenu fut alors utilisé pour la réaction de la polymérase en chaîne (PCR-Biometra T3Thermocycler, Göttingen, Allemagne) utilisant 2,5 unités de *Taq DNA* polymérase (Invitrogen, Ont, CA) par tubes afin de déterminer l'expression d'ARN messenger spécifique à OPN (produit PCR de 420 pb) et ce, en utilisant les amorces de synthèse (sens : 5'-ACACTTTCCTCCAATCGTCC -3' et anti-sens: 5'-TGCCCTTTCCTGTTGTCC-3') selon le protocole suivant : dénaturation à 95°C/45sec / appariement 66°C/45sec / extension 72°C/1min, 35 cycles. Les produits de PCR ont également été normalisés avec la détermination des niveaux d'expression de β-actine

(produit PCR de 460 pb), (sens : 5'-GGAAATCGTGCGTGACAT-3', anti-sens: 5'-TCATGATGGAGTTGAATGTAGTT-3') selon le protocole suivant : dénaturation 94°C/45sec / appariement 55°C/45 sec / extension 72°C/1min, 32 cycles. La séparation des amplicons fut réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) en présence de tampon TBE1x (donner la composition du tampon dans sa forme 1x) et visualisé après coloration au bromure d'éthidium (1µl/25ml) en lumière UV.

### **1.6-Immunoprécipitation et Immunobuvardage de type Western :**

Les échantillons musculaires paraspiniaux prélevés et surgelés à -80°C lors du sacrifice des poulets pinéalectomisés ont été homogénéisés à l'aide d'un polytron (Kinematica, VI, É-U) dans une solution tampon à base de tris à une température de 4°C. Les protéines ont d'abord été dosées par la méthode de Bradford à l'aide de la trousse BioRad (BioRad, Ont, CA) et ensuite incubées en présence de l'anticorps anti-OPN humain, (clone 5D10) dans une dilution de 1:50 et ce, toute la nuit. Le lendemain, 50µl d'une suspension de billes de protéines A-shéparose (Sigma, Ont. CA) ont été ajoutées aux échantillons pour subir une incubation d'une durée de six heures à 4°C sous agitation. Les échantillons furent alors lavés à quatre reprises avec une solution composée de 75mM de tampon Tris, 12nM de MgCl<sub>2</sub>, 2mM EDTA, 0,05% Triton, le tout à pH 7,4. Le culot fut ensuite suspendu dans un volume de 30µl de tampon de chargement (70 mM Tris/HCl, 2% SDS, 4 mM urée, 40 mM Dithiothreitol (DTT) 10% glycérol, 0,05% bromophénol bleu, pH 6.8). Une première migration sur gel SDS-polyacrylamide 10% (50V/30min et 75V/90min) a été effectuée puis les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose pour y être séchées à l'air. Les membranes ont par la suite été bloquées à l'aide d'une solution de TBST 1X (0,5% NaCl, 0.01% Tris, 0,005% Tween) + 5% lait écrémé (P/V) durant deux heures puis incubées en présence de l'anticorps primaire, anti-OPN humain clone 8E5 (Kamiya Biomedical, WA,

É-U), toute la nuit à une température de 4°C. Après incubation avec cet anticorps primaire (dilution 1:800), trois lavages dont deux d'une durée de 5 min puis un autre de 15 min ont été effectués avec une solution de TBST 1X. Les membranes furent alors à nouveau bloquées et incubées en présence de l'anticorps secondaire (anti-souris, dilution 1:20 000) couplé à la peroxydase HRP (Biosource Inc. Camarillo, CA, É-U) durant 60 minutes, à température ambiante. La révélation des membranes fut effectuée par chemiluminescence à l'aide du kit BM Chemiluminescent blotting substrate POD selon les recommandations du fabricant (Roche Diagnostic Corp., IN, É-U).

#### **1.7-Analyse statistique des données :**

Les données ont été analysées par l'utilisation du test Mann-Whitney utilisant le logiciel Statistica™.  $P=0.05$  a été utilisée comme valeur significative.

## **2-Lignée de souris et souris transgéniques utilisées:**

### **2.1-Groupes et procédure chirurgicale :**

Les souris C57BL/6j (n=34) (achetées chez Jackson Laboratory) offrent la principale caractéristique de montrer une déficience naturelle en mélatonine, ce qui permet d'éviter de réaliser une pinéalectomie chez ces animaux. La génération de souris bipédale fut en grande partie inspirée des travaux réalisés, chez le rat, par Machida (1996). L'intervention chirurgicale consiste en l'ablation des membres antérieurs à partir de l'humérus proximal et des deux tiers distaux de la queue. La dernière procédure a pour objectif d'éviter l'utilisation de l'appendice caudal comme d'un trépied par l'animal. Toutes les interventions chirurgicales furent effectuées sous anesthésie gazeuse complète (Isoflurane™) et sous analgésie (Bupénorphrine 0,05mg/kg administrée 1 heure avant la procédure). Les souriceaux ont été opérés après sevrage lors de leur 21<sup>ème</sup> journée d'existence et ensuite immédiatement placés dans un environnement favorisant la posture bipédale (tiges distributrices d'eau plus courtes de 3,5cm et accès à la nourriture 4cm plus haut dans la cage). Les souris C57BL/6j OPN k.o. (n=46), obtenues grâce aux docteurs Susan Rittling et David Denhardt (Rutger University, NJ, É-U) ainsi que les souris C57BL/6j CD44 k.o. (n=20), obtenues grâce au docteur Tak Mak (University of Toronto, Ont, CA) subirent exactement le même traitement. Quelques souris de souche différente (FVB, n=4) furent également opérées et des individus (n=10 pour toutes les souches dérivées du fond génétique C57BL/6j) furent laissés en mode quadrupédal pour la génération de témoins. Les souris furent conservées sur une période minimale d'un an afin de monitorer toutes perturbations métaboliques reliées au vieillissement et au fond génétique.

## **2.2-Examens radiographiques :**

Toutes les souris furent examinées à l'aide d'un ostéodensitomètre (PixiMusII) à toutes les 2-3 semaines pendant une période pouvant aller jusqu'à 12 mois après la procédure chirurgicale. Les souris, reposant sur leur ventre, le rachis en traction, furent maintenues en place par inhalation gazeuse d'Isoflurane™. Les images furent subséquentement analysées pour obtenir les valeurs de densité osseuse mais également afin d'observer la progression scoliothique, si elle avait lieu, d'où la prise multiple de clichés (3 au minimum par animal). Il est à noter que le diagnostic final et définitif ne fut posé qu'au moment du sacrifice. La valeur seuil de l'angle de Cobb fut fixée à 10° pour le diagnostic scoliothique positif, à l'instar des humains et des poulets pinéalectomisés (Reamy 2001).

## **2.3-Prélèvements biologiques :**

Dès que les souris affichaient un poids supérieur à 20g, elles étaient ponctionnées au niveau de la veine saphène à l'aide d'une aiguille de calibre 25G½, de façon à obtenir un minimum de 150µl de sang. La période de prélèvements se situait entre 8h00 à 10h00 le matin. Le sérum était récolté par centrifugation (3000rpm/min) et immédiatement congelé et entreposé à -80°C jusqu'aux tests subséquents. Cette opération fut également répétée, à plusieurs reprises (en fonction du nombre de souris) sur une période s'étalant sur une année et ce, afin de monitorer de possibles changements métaboliques chez ces souris. Lors du sacrifices, des échantillons musculaires de part et d'autres du rachis furent recueillis, congelés immédiatement dans l'azote liquide et entreposés à -80°C pour des analyses ultérieures. Un prélèvement sanguin intracardiaque terminal (1ml) était également effectué à cette étape.

## **2.4-Dosage de la mélatonine et de l'ostéopontine :**

La teneur en mélatonine et en ostéopontine des sérums ainsi recueillis a été mesurée au moyen de tests ÉLISA (Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Allemagne) selon les recommandations du manufacturier.

## **3-Sujets scoliotiques humains :**

### **3.1-Dosage de l'ostéopontine:**

Des échantillons sanguins (5 ml) furent prélevés dans la veine médiane de l'avant-bras, en utilisant une aiguille de calibre 27G½ avec une période de cueillette ayant lieu entre 8h00 et 11h00 le matin. Ces prélèvements furent effectués lors d'examen médicaux dans le cas des sujets scoliotiques. Des échantillons de contrôles furent également prélevés chez des sujets sains par la même méthode. Le sérum, recueilli sur gel séparateur (Vacutainer, Becton-Dickinson, É-U), fut isolé par centrifugation (3000rpm/5min) et immédiatement congelé à -80°C pour analyses ultérieures. Les concentrations sériques de la mélatonine ont été déterminées suite à l'utilisation d'un test ELISA (Immuno-Biological Laboratories, Hamburg, Allemagne).

## Chapitre 3-Résultats :

### *1- Étude réalisée sur le poulet pinéalectomisé :*

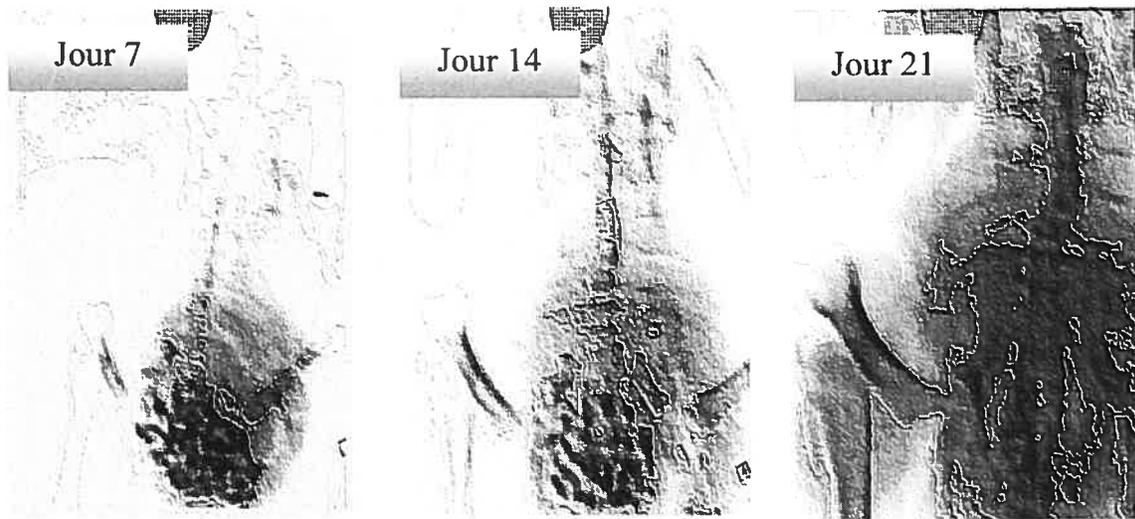
#### **1.1-Diagnostic :**

Le diagnostic final, posé au jour 28 par radiographie à rayons X, montre que 56% (14/25) des poulets pinéalectomisés développent une scoliose (**Fig. 3.1**), une valeur correspondant aux taux habituellement observés dans plusieurs autres études (Dubousset 1983; Bagnall 1999) . Le sous-groupe ayant reçu des doses quotidiennes d'inhibiteurs d'OPN (THX99) affiche un taux de scoliose nettement inférieur au groupe précédent : 22% (4/18). Cette réduction du nombre de scolioses via une interférence dans la transcription du gène OPN est une indication indirecte du rôle joué par l'OPN dans l'initiation de ce type de déformation.

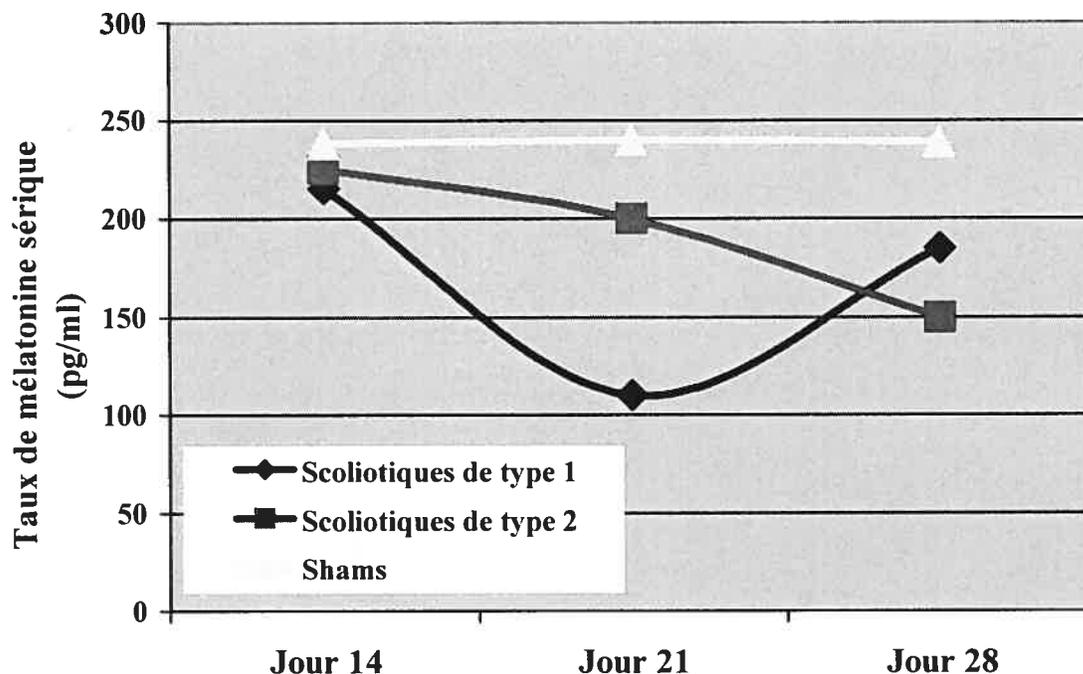
#### **1.2-Dosage des taux de mélatonine sérique :**

Nos expérimentations montrent, pour la première fois, une variation marquée mais transitoire des taux de mélatonine sérique chez le poulet pinéalectomisé développant une scoliose. En effet, la population scoliotique peut être séparée en fonction des différences affichées quant à la fluctuation des concentrations de l'hormone durant les 28 premiers jours comme le montre la figure 3.2. Un premier groupe (n=9) montre un patron d'expression biphasique où il y a une forte baisse des concentrations sériques de l'hormone entre les jours 14 et 21. S'ensuit alors une forte récupération jusqu'au jour 28. Le second groupe (n=6), quant à lui, exhibe une régression linéaire, caractérisée par une baisse lente et constante de la mélatonine durant ces 28 mêmes jours (**Fig.3.2**). Les contrôles chirurgicaux (shams, n=4) ne

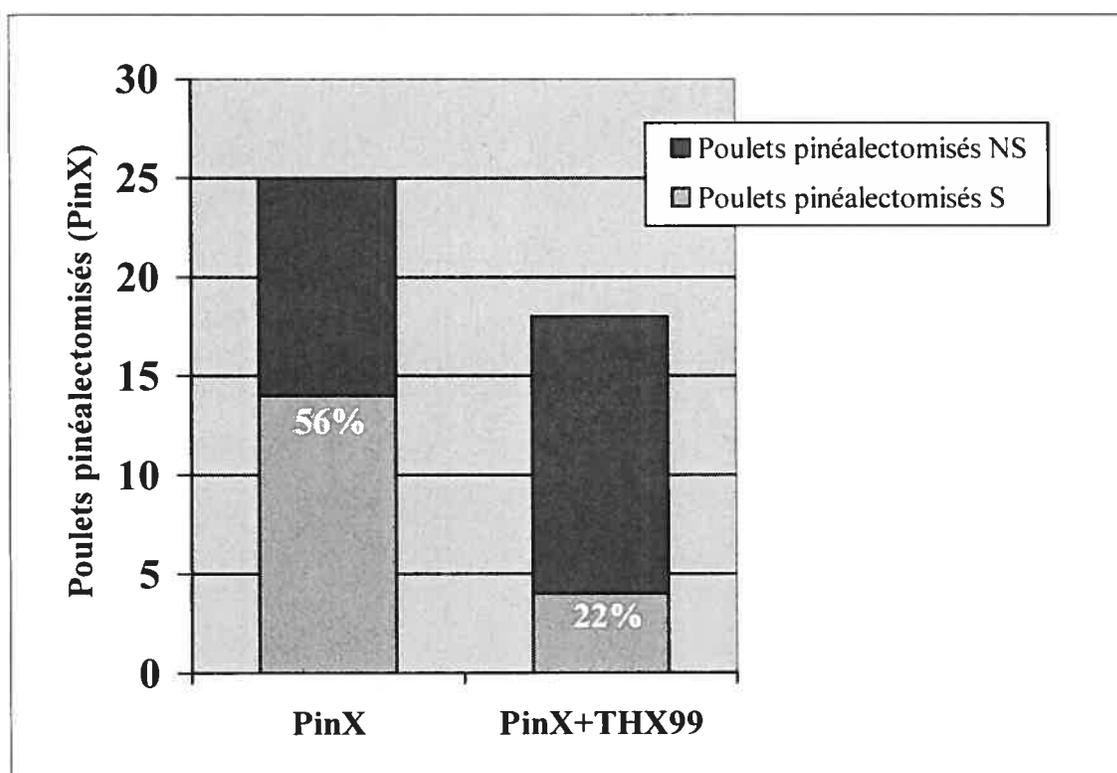
démontrent aucune variation significative de l'hormone sur la même période de temps, ce qui était prévisible puisque ces derniers n'ont pas subi la résection du corps pinéal.



**Figure 3.1-Évolution des déformations scoliotiques chez le poulet pinéalectomisé en croissance.** Les images obtenues à l'aide de l'ostéodensitomètre permettent non seulement l'étude de la progression de la scoliose chez un même individu mais aussi la détermination d'un diagnostic définitif.



**Figure 3.2-Patrons d'expression de la mélatonine chez les poulets pinéalectomisés scoliotiques.** Les scoliotiques de type 1 (n=9) affichent une diminution drastique en mélatonine entre les jours 14 à 21 suivie d'un fort recouvrement jusqu'au jour 28. Les scoliotiques de type 2 (n=6) ne montrent quant à eux qu'une baisse lente et constante de l'hormone pendant ces 28 jours. Les contrôles chirurgicaux (n=4) ne montrent pas de fluctuation significative au niveau de leur concentration sérique de mélatonine.



**Figure 3.3-Comparaison des taux d'induction scoliotique entre les poulets pinéalectomisés traités et non traités au THX99.** Le nombre de poulets scoliotiques (S), en bleu, est nettement moins élevé dans la population recevant des doses quotidiennes d'inhibiteur d'OPN (22%, n=18) par rapport à la population non-traitée (56%, n=25).

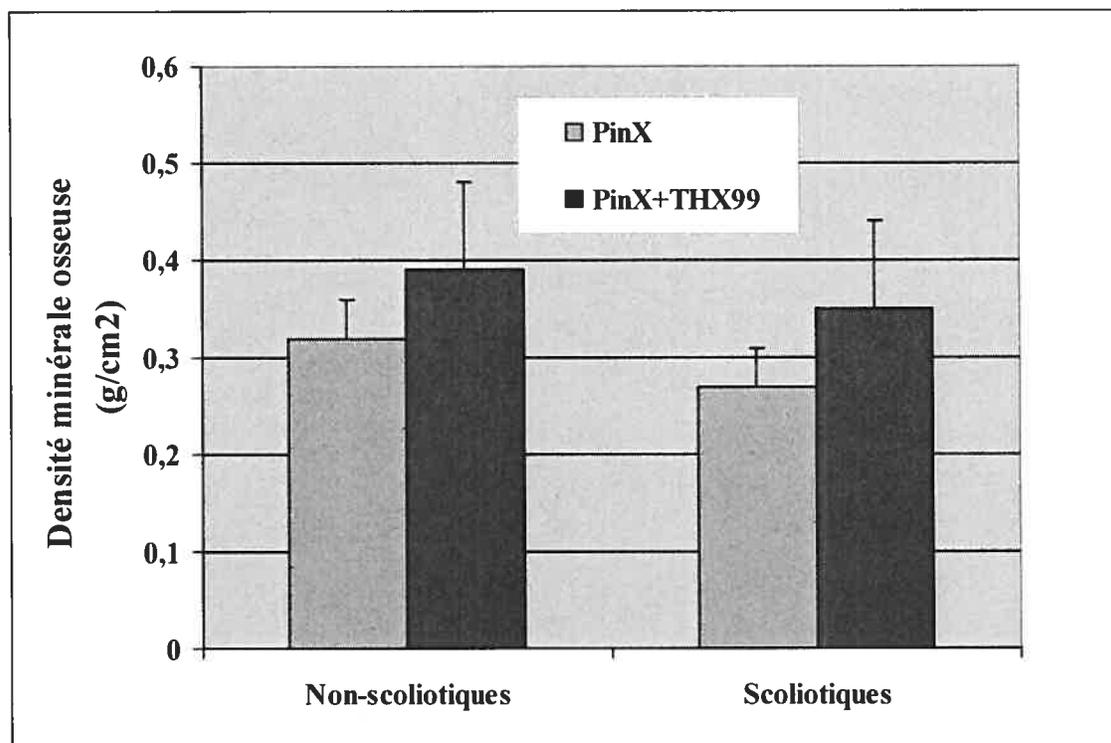
### 1.3-Densitométrie osseuse :

La densité osseuse est un facteur étroitement lié à OPN, cette dernière étant impliquée dans l'équilibre de l'ostéogenèse, particulièrement en ce qui a trait à l'attachement des ostéoclastes (voir chapitre 1, section 2.3.5). Effectivement, l'analyse des données extraites de l'ostéodensitomètre indique que les poulets ayant reçu une dose quotidienne d'un inhibiteur transcriptionnel d'OPN (n=18) exhibent des taux de densité osseuse supérieurs à la population non traitée (n=25) et ce, sans tenir compte du diagnostic (**Fig.3.4**). Une différence est toutefois observée entre les populations non scoliotique et scoliotique, ces derniers montrant généralement les plus faibles taux de minéralisation. Ces observations sont intéressantes dans la mesure où il est connu que la mélatonine exerce une action concrète sur le métabolisme osseux (voir chapitre 1, section 2.3.5). Le fait que les poulets pinéalectomisés scoliotiques affichent des taux nettement inférieurs quant à leur densité osseuse pourrait donc s'expliquer par une perte accrue des fonctions métaboliques de la mélatonine.

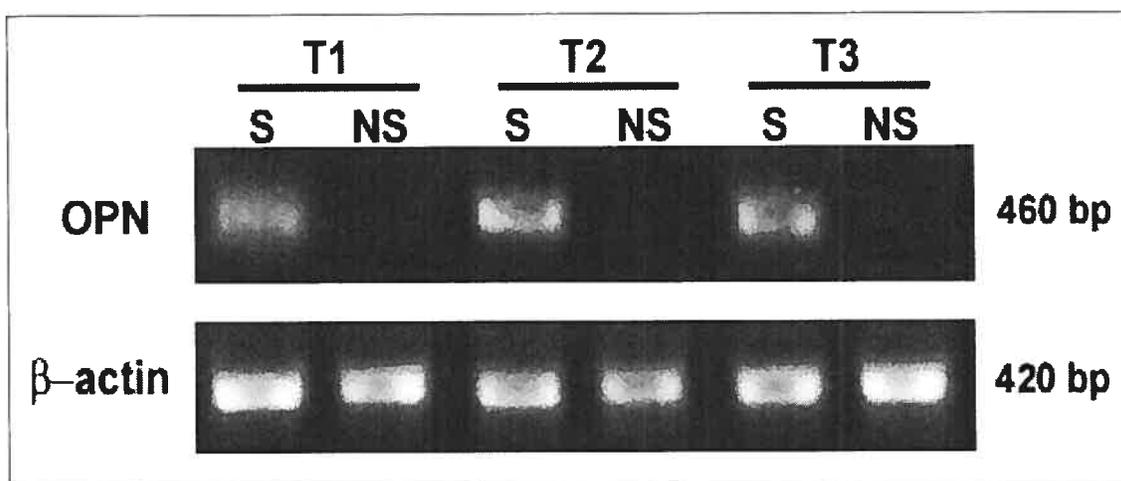
### 1.4-Expression génique et protéique d'OPN :

Les analyses d'expression génique montrent des taux de transcription très élevés du gène *SSP1* codant pour la protéine OPN et ce, exclusivement chez le poulet pinéalectomisé développant une scoliose (**Fig. 3.5**). L'expérience, effectuée à trois niveaux vertébraux différents (vertèbres thoraciques 1, 2 et 3), démontre clairement l'accumulation d'ARN messager chez les animaux scoliotiques, contrairement aux poulets pinéalectomisés non scoliotiques et aux contrôles. Il est important de noter que cette expérience a été normalisée à l'aide de la mesure de l'expression du gène  $\beta$ -actine.

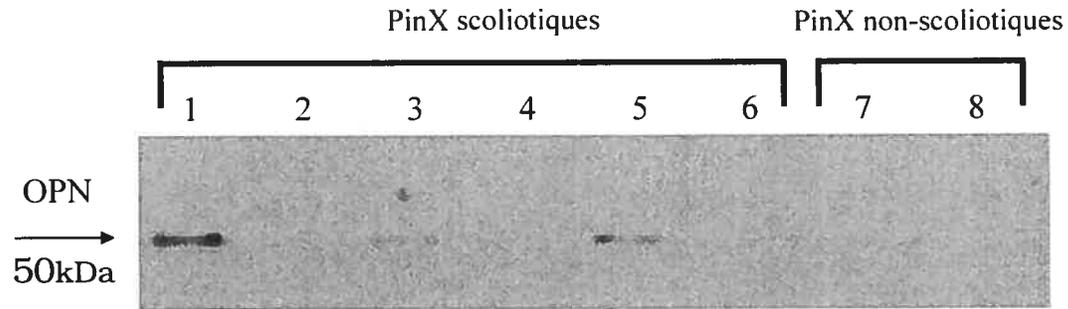
Cette surexpression exclusive aux poulets scoliotiques est confirmée au niveau protéique par les résultats d'immunobuvardage de type Western (**Fig.3.6**). En effet, la protéine est retrouvée en surabondance dans la musculature paraspinale exclusivement chez les poulets pinéalectomisés scoliotiques analysés alors que l'on note à peine une trace d'OPN chez leurs congénères non affectés par la maladie.



**Figure 3.4-Comparaison de la densité osseuse des poulets traités au THX99 et les poulets non traités.** Globalement, les animaux non-scoliotiques (NS,  $p=0.03$ ) affichent des taux de densité osseuse plus élevés que les individus scoliotiques (S,  $p=0.008$ ). Les poulets pinéalectomisés traités ( $n=18$ ) avec le THX99, un inhibiteur transcriptionnel d'OPN, montrent toutefois des taux supérieurs à la population non traitée ( $n=25$ ) et ce, peu importe le diagnostic.



**Figure 3.5- Expression génique d'OPN chez les poulets pinéalectomisés scoliotiques et non scoliotiques.** OPN se trouve surexprimée exclusivement chez les poulets pinéalectomisés développant une scoliose et ce, à 3 niveaux vertébraux différents ; vertèbre thoracique 1, 2 et 3. Les produits de PCR ont été normalisé par l'expression génique de la  $\beta$ -actine.



**Figure 3.6-Expression protéique d'OPN dans la musculature parapinale de poulets pinéalectomisés scoliotiques et non scoliotiques.** Les poulets pinéalectomisés (PinX) développant une scoliose affichent une surexpression de la protéine OPN comme le montre les puits 1, 3 et 5 où une immunoprécipitation a été effectuée à l'aide d'un anticorps anti-OPN. Les puits 2, 4 et 6 ne sont que des contrôles négatifs où un anti-corps non spécifique fut utilisé. Les poulets pinéalectomisés non scoliotiques ne montrent pas une telle surexpression comme le montrent les puits 7 et 8.

## ***2-Étude réalisée sur les souris C57BL/6j et transgéniques :***

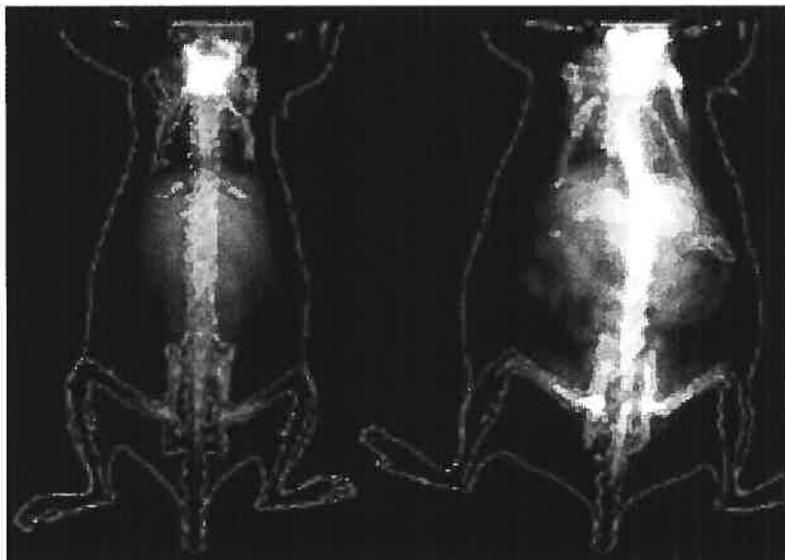
### **2.1-Diagnostic :**

#### **2.1.1-Souris C57BL/6j bipédales :**

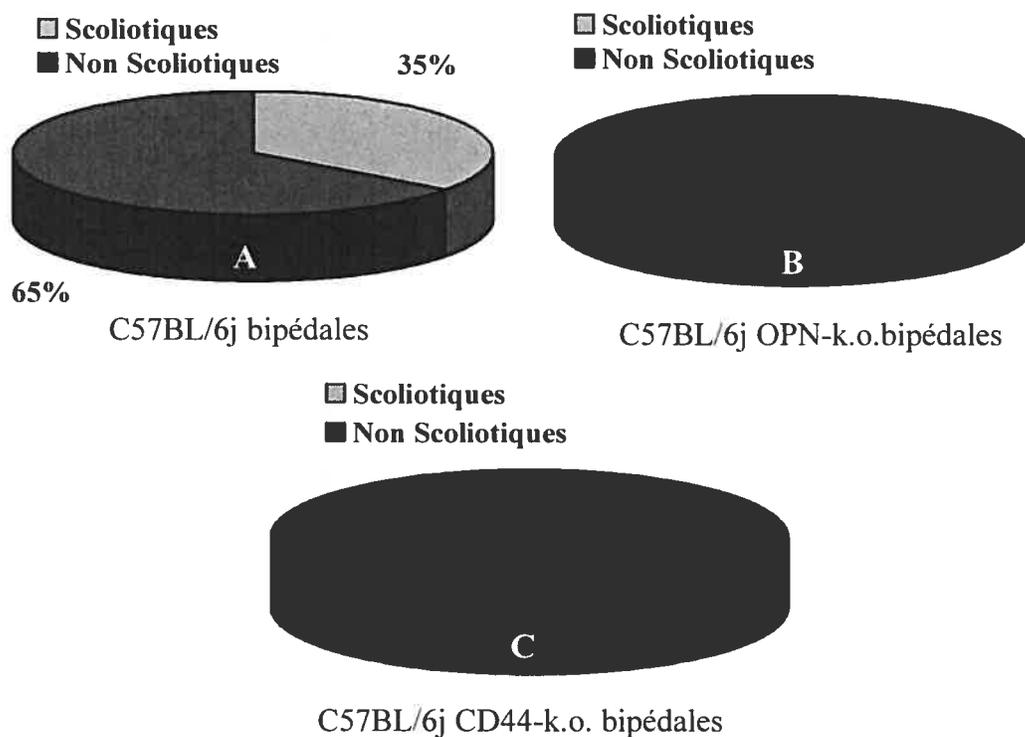
L'analyse des clichés obtenus par l'ostéodensitomètre nous a permis d'établir les diagnostics définitifs lors du sacrifice des souris, soit après une année de vie. Ces analyses nous ont rapidement montré l'importance d'un facteur biomécanique étroitement lié à l'initiation et au développement de la scoliose. En effet, seulement 18% (2/11) des premières souris C57BL/6j bipédales générées développaient des scoliose. Il est toutefois à noter que ces dernières étaient placées dans un environnement standard (cages à souris) ne favorisant pas nécessairement la démarche bipède. Pour résoudre ce problème, les souris ont donc été placées dans des cages plus hautes (cages à rats) où l'accès aux vivres n'est possible que si les animaux se tiennent debout sur leurs membres inférieurs. Dans ces conditions, le taux d'induction scoliotique a grimpé à 35% (12/34) chez les souris C57BL/6j bipédales (**Fig.3.7 et 3.8**), faisant d'elles un modèle pertinent pour l'étude de la SIA. La liaison entre la carence en mélatonine et l'induction scoliotique a également été démontrée par la génération de souris FVB bipédales (n=4) où aucune scoliose n'a été observée. Toutefois, il y est clairement illustré que le simple manque en l'hormone n'est pas à même d'induire la scoliose, comme le prouvent les expériences réalisées sur les souris transgéniques issues du même fond génétique (**Fig. 3.9**).

### 2.1.2-Souris C57BL/6j OPN-k.o. bipédales :

L'utilisation des souris C57BL/6j OPN-k.o. nous a permis de vérifier l'importance de l'OPN dans les processus initiant la SIA. En effet, dans le cas où la protéine serait vraiment nécessaire au développement de la maladie, aucune des souris bipédales issues de ce fond génétique ne devrait développer de scoliose puisque l'expression d'OPN y est réprimée de façon systémique. Hypothèse confirmée à l'analyse des images extraites de l'ostéodensitomètre où il fut possible de constater qu'aucune de ces souris (n=46) n'a développé de scoliose (**Fig. 3.9**). Par cette expérience, la nécessité d'OPN dans le pathomécanisme sous-tendant la SIA est prouvée.



**Figure 3.7-Souris C57BL/6j bipédales normale et scoliotique.** Les images obtenus grâce à l'ostéodensitomètre permettent de suivre les progressions scoliotiques et de poser un diagnostic définitif. À gauche, une souris C57BL/6j bipédale normale et à droite une souris C57BL/6j bipédale scoliotique.



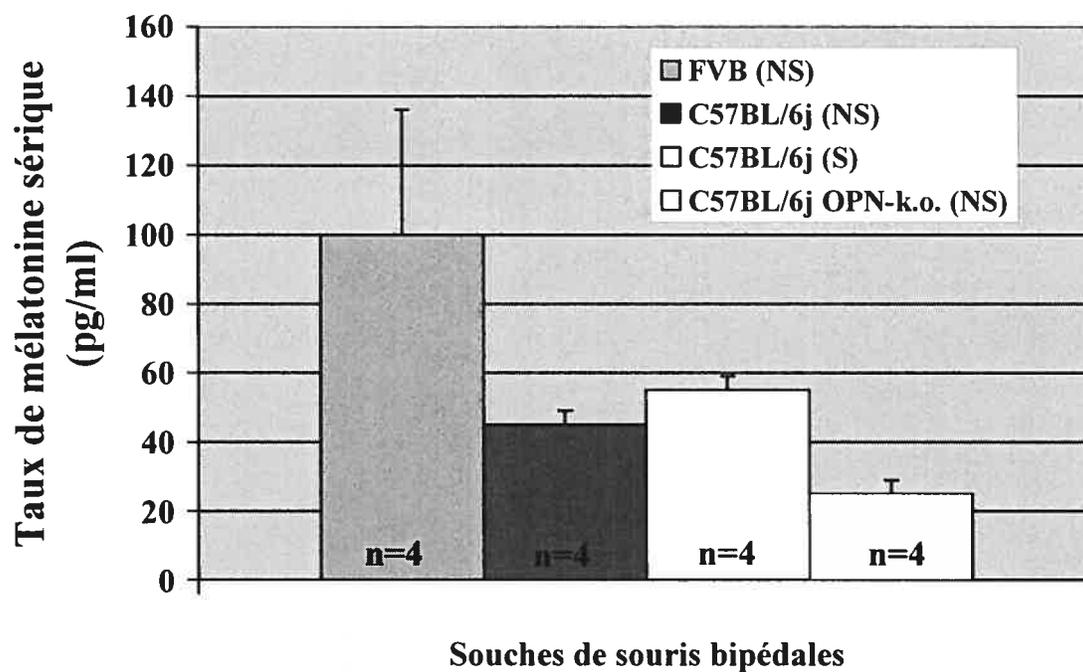
**Figure 3.8-Comparaison entre les populations de souris issues du fond génétique C57BL/6j et les taux d'induction scoliotique.** La population des souris C57BL/6j (A, n=34) montre un taux d'induction scoliotique de 35%. Par contre, les souris transgéniques C57BL/6j OPN-k.o. (B, n=46) et C57BL/6j CD44-k.o. (C, n=18) ne comptent aucune scoliose parmi leurs rangs.

### 2.1.3-Souris C57BL/6j CD44-k.o. :

L'implication obligatoire d'OPN dans l'initiation et le développement de la SIA ayant précédemment été démontrée, une vingtaine de souris C57BL/6j CD44-k.o. bipédales ont été générées afin de montrer si OPN effectuait son action via ce récepteur. Ces souris présentent donc de faibles niveaux de mélatonine mais expriment de façon normale l'OPN, conditions induisant 35% de scoliose chez les souris C57BL/6j. Toutefois, si l'action d'OPN dans la SIA est réellement médiée via son récepteur CD44, les souris C57BL/6j CD44-k.o. ne devraient pas, à l'instar des souris C57BL/6j OPN-k.o., développer de scoliose. Cette hypothèse est encore une fois validée par la constatation qu'aucune de ces souris (n=18) n'a développé de déformations scoliotiques à ce jour (**Fig. 3.9**). L'action d'un autre récepteur (intégrines  $\alpha_v\beta_3$ ) pourra être éventuellement démontrée, par la même expérience, en utilisant des souris C57BL/6j  $\beta_3$ -k.o. disponibles commercialement.

### 2.2-Densité osseuse :

L'étude des paramètres issus de l'ostéodensitomètre nous a permis d'établir une corrélation entre l'expression de la protéine OPN et le taux de minéralisation. En effet, les souris C57BL/6j OPN-k.o. affichent des taux de densité osseuse légèrement supérieurs lorsque comparés aux souris C57BL/6j et C57BL/6j CD44-k.o (donnée non affichée). Il est toutefois à noter que la variation entre ces espèces est somme toute assez faible ce qui la rend non significative.



**Figure 3.9-Comparaison des niveaux de mélatonine sérique chez diverses souches de souris bipédales utilisées.** Il n'existe pas de différence marquée entre les niveaux circulants de mélatonine chez les souris issues du fond génétique C57BL/6j, qu'elles soient scoliotiques ou non. Les souris FVB montrent quant à elles des taux normalement élevés.

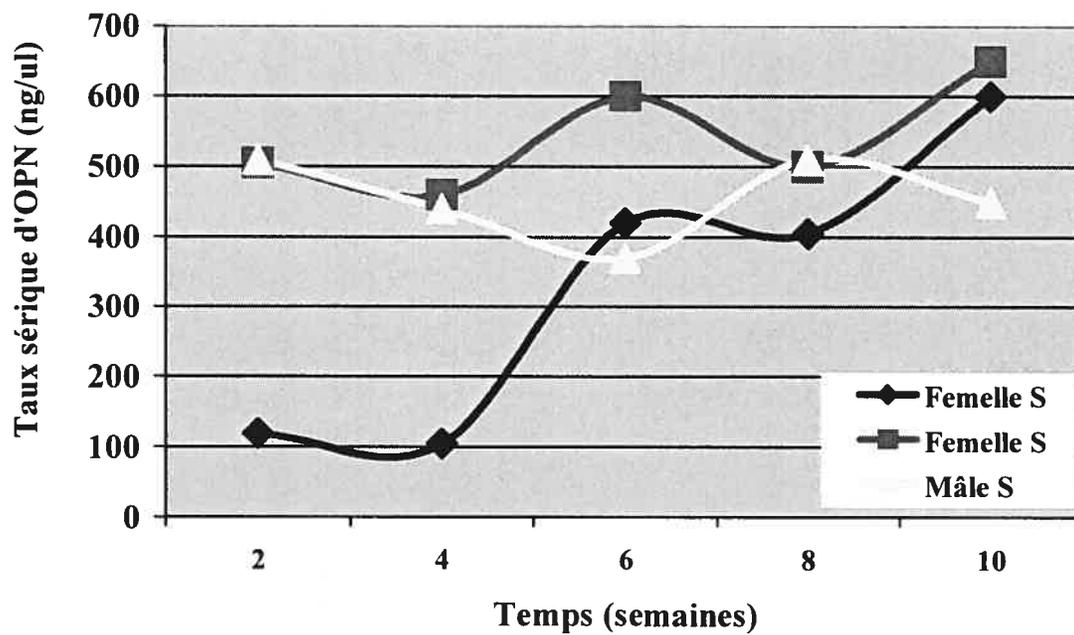
### **2.3-Dosage d'OPN sérique :**

Les prises de sang effectuées aux deux semaines environ a permis d'établir un patron d'expression d'OPN chez les souris C57BL/6j bipédales scoliotiques en fonction du temps (Fig.3.10). Il a donc été démontré chez deux femelles et un mâle atteints de scoliose que les niveaux d'OPN sérique fluctuent à la hausse pendant les deux premiers mois de la vie de ces souris. Bien que les individus affichent entre eux des différences quant au type de fluctuation observée, la conséquence demeure la même soit l'élévation marquée de la protéine et ce, particulièrement chez la femelle, laissant ainsi croire à une possible influence oestrogénique. Des études supplémentaires, où le dosage oestrogénique des souris témoins serait effectué, sont toutefois nécessaire afin de valider la dernière hypothèse.

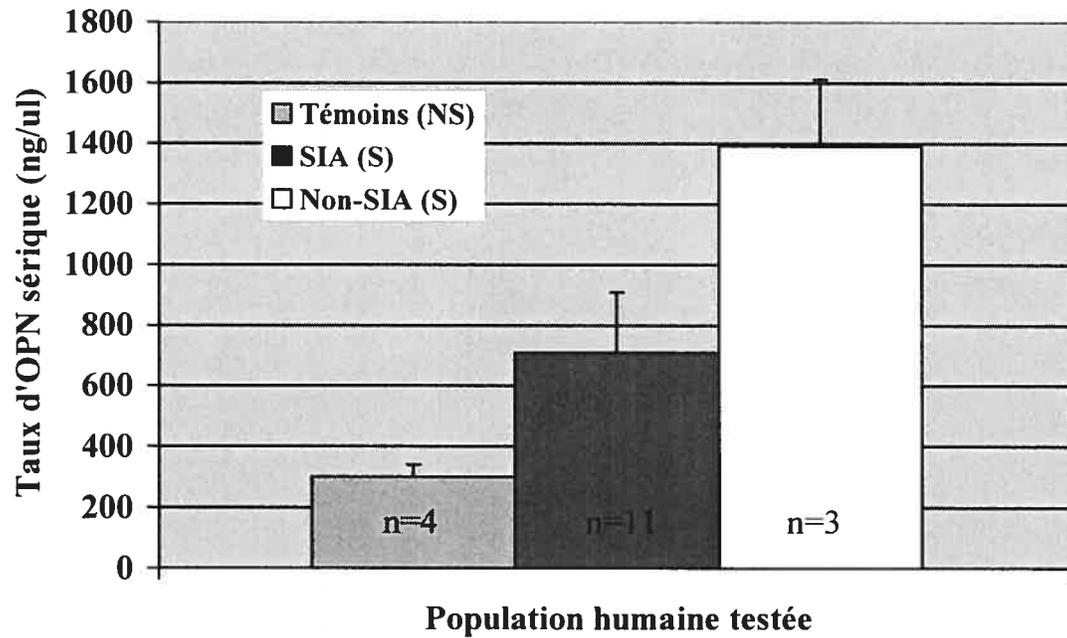
### ***3-Étude réalisée sur sujets scoliotiques humains :***

#### **3.1-Dosage de l'OPN sérique :**

Encouragés par le succès des expériences précédentes où l'importance cruciale d'OPN dans l'initiation et le développement de la SIA a été clairement démontrée, nous avons effectué des études préliminaires chez un certain nombre de sujets scoliotiques. Deux groupes de scoliotiques, l'un étant constitué de patients SIA (n=11) et l'autre étant composé de sujets scoliotiques non liés à la SIA (n=3) furent analysés. La figure 3.11 illustre la différence au niveau des concentrations sériques entre ces groupes où l'on note une forte élévation des taux d'OPN lorsque comparés aux témoins (n=4) (Fig.3.11).



**Figure 3.10-Fluctuation des niveaux d'OPN sérique en fonction du temps chez la souris C57BL/6j bipédale scoliotique.** La figure illustre la différence d'expression d'OPN sérique chez 3 souris C57BL/6j bipédales scoliotiques. Bien que les patrons d'expression diffèrent, les taux d'OPN finissent et ce, dans les 3 cas, par être élevés après le deuxième mois de vie.



**Figure 3.11-Dosage de l'OPN sérique humaine chez des populations normale et scoliotique.** La protéine OPN est clairement surexprimé chez les patients souffrant de scoliose par rapport à la population normale. Notons la très forte différence entre les témoins et les patients atteints de scoliose non idiopathiques (congénitale ou secondaire).

## Chapitre 4-Discussion :

Les travaux de recherche effectués dans le cadre de ce mémoire portent à la fois sur des volets fondamentaux et cliniques. La présente section rapporte donc les principales découvertes obtenues à l'aide des modèles animaux utilisés dans cette étude et en particulier le rôle joué par l'OPN et sa signalisation dans le pathomécanisme de la SIA.

### *Insertion d'OPN au modèle hypothétique :*

Les premières expériences menées chez le poulet pinéalectomisé ont livré nombre de résultats, améliorant ainsi la compréhension des événements précoces déclenchant les mécanismes initiateurs de la scoliose. Il y fut montré que les animaux scoliotiques affichaient tous une baisse notable des niveaux de mélatonine lorsque comparés aux contrôles chirurgicaux et aux poulets de type sauvage. De plus, il a été observé que les poulets scoliotiques montraient des différences quant au niveau de mélatonine circulant entre les jours 14, 21 et 28. Tout d'abord, un premier groupe affiche une chute lente, mais constante de l'hormone pendant ces 28 jours. Ensuite, un second groupe montre une baisse drastique des taux en mélatonine entre les jours 14 à 21, suivi d'un fort recouvrement jusqu'au jour 28 concluant en un patron d'expression dit bi phasique (**Fig. 3.2**).

### **Est-ce que la mélatonine joue un rôle dans les mécanismes globaux initiant la scoliose?**

Premièrement, il devient évident, grâce à l'utilisation des contrôles chirurgicaux, que la scoliose est réellement le fruit du manque de mélatonine et non pas le résultat d'un artéfact chirurgical. Deuxièmement, les poulets scoliotiques affichant des courbes bi phasiques quant à leur sécrétion de mélatonine, comme l'illustre la figure 3.2, montrent que certains mécanismes palliatifs (de synthèse et/ou de libération) sont en mesure d'être activés sous la pression d'une baisse marquée de l'hormone. Ceci est d'ailleurs supporté par plusieurs

données de la littérature démontrant la synthèse extra pinéale de mélatonine dans différents tissus dont les lymphocytes, le thymus et possiblement par certaines cellules de la moëlle osseuse (Carrillo-Vico 2005 ; Jimenez-Jorge 2005; Conti 2000).

### **Existe-t-il des corrélations cliniques possibles entre la variation des taux plasmatiques en mélatonine et le développement de scoliose ?**

Du point de vue clinique, cette chute transitoire des niveaux plasmatiques en mélatonine observée chez un sous-groupe de poulets pinéalectomisés et sa récupération pourrait contribuer à expliquer les scoliose infantiles auto résorbantes qui sont plus fréquemment observées en Europe qu'en Amérique du Nord. Cette dernière observation laisse entrevoir des interactions gènes-environnement associées à ce type de scoliose. Il serait possible en effet que les nourrissons affectés arrivent, par des mécanismes encore inconnus à ce jour, à réguler les concentrations de mélatonine de façon à inverser les processus provoquant la progression de la scoliose. Un facteur temporel s'avère toutefois crucial puisque l'activation tardive de ces mécanismes semble être nettement insuffisante pour protéger les individus de l'initiation scoliotique, comme le montre l'expérience effectuée chez le poulet pinéalectomisé (**Fig. 3.2**). De plus, la majorité des études réalisées chez les patients atteints de scoliose idiopathique adolescente (SIA) n'ont pu mettre en évidence des variations significatives dans les taux de mélatonine circulante ce qui pourrait s'expliquer également par cette récupération (Bagnall 1996). Toutefois, il est possible de critiquer la validité des conclusions de ces études puisque celles-ci ont été réalisées sur un faible nombre de patients, dans différentes conditions cliniques avec des méthodologies diverses pour le dosage de la mélatonine et à un moment où leur état était nettement avancé du point de vue de la courbure du rachis. Cette constatation relève l'importance de ce facteur temporel dans le diagnostic mais surtout dans le traitement de la SIA; les mécanismes engendrant la scoliose sont probablement beaucoup plus précoces

et l'intervention thérapeutique est quant à elle relativement tardive puisqu'on doit attendre l'apparition des symptômes. Finalement, ces observations montrent pour la première fois l'implication de la mélatonine dans les prémices de la croissance et du développement où celle-ci continue à jouer un rôle régulateur sur les tissus musculo-squelettiques et ce, même après la naissance.

**Par quel mécanisme la perte de mélatonine ou un dysfonctionnement dans sa signalisation entraîne la croissance asymétrique du rachis?**

L'étude des changements cellulaires et moléculaires précoces associés à l'initiation des déformations scoliotiques s'avère impossible chez l'humain compte tenu de l'apparition tardive des symptômes et de notre incapacité à identifier les sujets à risque de développer une scoliose avant ou juste au moment des manifestations cliniques (début de la déformation du rachis). Par ailleurs, comment expliquer que des défauts systémiques dans la signalisation de la mélatonine induits soit par des mutations augmentant la phosphorylation des protéines  $G_i$  chez les patients SIA ou encore provoquées par une déficience en l'hormone (causée par l'ablation de la glande pinéale chez les modèles animaux scoliotiques), puissent générer un phénotype similaire? Il est fort probable que ces deux défauts systémiques puissent avoir comme conséquence de perturber l'expression d'un effecteur commun situé en aval, contribuant ainsi à l'initiation de déformations du rachis dans la SIA. Parmi les candidats présumés, nous avons identifié expérimentalement une surexpression du gène *osp1* codant pour l'ostéopontine (OPN) et ce, exclusivement chez les poulets pinéalectomisés développant une scoliose, alors que les poulets pinéalectomisés restant normaux (non scoliotiques) présentaient une très faible expression de ce même gène (**Fig. 3.5**). Cette surexpression a été confirmée au niveau protéique par une accumulation d'OPN, notamment au niveau de la musculature paraspinale comme le montre la figure 3.6. Une accumulation accrue d'OPN, un

mécanorécepteur moléculaire normalement régulé par la mélatonine dans le SNC et les centres de proprioception périphériques, pourrait conduire à des défauts du contrôle postural initiant ainsi une croissance asymétrique du rachis dans la SIA et chez les poulets pinéalectomisés.

### **L'OPN est-elle véritablement essentielle à l'initiation des déformations scoliotiques et leur progression?**

La pertinence pathophysiologique de l'OPN dans la SIA découle du fait que :

- i) L'OPN est exprimée dans l'os (Mark 1988), les tissus neuromusculaires (Ichikawa 2000), l'oreille interne (Uno 2000) et le SNC (Jander 2002), tous des systèmes ou tissus perturbés dans la SIA (voir chapitre 1 section 3.6).
- ii) Les souris C57Bl/6j, naturellement déficientes en mélatonine, développent une scoliose lorsque maintenues dans une posture bipédale, présentent une augmentation de deux fois supérieure d'OPN circulant lorsque comparées aux souris C3H, ces dernières sécrétant de hauts niveaux de mélatonine (Aherrahrou 2004).
- iii) L'inhibition pharmacologique de l'expression d'OPN réduit de 50% le nombre de poulets pinéalectomisés scoliotiques conditionnellement au traitement précoce pré et postopératoire (**Fig. 3.3**).
- iv) L'inactivation génique du gène OPN chez les souris C57Bl/6j prévient le développement d'une scoliose chez 100% des souris bipèdes testées à ce jour.
- v) L'analyse des variations plasmatique en OPN chez les souris bipédales C57Bl/6j développant une scoliose a permis de mettre en évidence une plus forte progression dans le temps des niveaux plasmatiques en OPN chez les femelles bipédales (**Fig. 3.10**). Il est concevable que cette augmentation accrue puisse être modulée par l'action des oestrogènes, qui sont bien connus pour activer l'expression d'OPN, ce qui pourrait ainsi expliquer le plus

grand nombre de cas et la sévérité augmentée de ceux-ci chez les jeunes filles atteintes de la SIA (Stirling 1996).

La découverte de l'OPN représente donc une percée importante dans notre compréhension du pathomécanisme initiant les déformations scoliotiques et permet également de rapprocher le modèle animal de la pathologie humaine nonobstant les différences morpho-anatomiques. En effet, bien que le poulet pinéalectomisé développe des déformations très similaires à la maladie humaine, plusieurs doutes subsistaient quant à la validité de l'utilisation de ce modèle animal (déficient en mélatonine) surtout après que des expériences eurent démontré qu'aucune baisse significative de l'hormone ne fut rencontrée chez les sujets scoliotiques humains (Bagnall 1996).

#### **Est-ce que les patients scoliotiques produisent plus d'OPN?**

Le succès des expériences précédentes nous a conduit à vérifier s'il y avait effectivement des niveaux plus élevés en OPN chez les sujets scoliotiques (SIA et provenant d'autres conditions). De fait, ce dosage a permis de découvrir que les patients scoliotiques présentaient en effet des niveaux plasmatiques jusqu'à quatre fois supérieurs par rapport aux sujets sains analysés (**Fig. 3.11**). Il faut toutefois souligner que ces analyses ne sont que préliminaires et que d'autres tests abondant en ce sens devront être effectués avant de confirmer définitivement cette tendance. Néanmoins, certaines connaissances issues de la littérature semblent appuyer le modèle proposé : outre le fait que la mélatonine soit un régulateur transcriptionnel d'ostéopontine (Roth 1999), il existe des polymorphismes et des haplotypes prédisposant certains individus à produire plus d'OPN (Giacopelli 2004). Ces haplotypes sont d'ailleurs associés à certaines conditions pathologiques se manifestant habituellement au courant de la vie adulte: lupus érythémateux (Forton 2002), lithiase urinaire

(Yamate 2000), cirrhose biliaire primitive (Kikuchi 2003), sclérose en plaques (Niino 2003) et syndrome lymphoprolifératif autoimmun (Chiocchetti 2004). Néanmoins, ces maladies ne génèrent pas des niveaux plasmatiques aussi élevés que ceux qui ont été déterminés chez les sujets scoliotiques, même en considérant le sexe des sujets testés, et ne surviennent pas ou rarement chez les enfants et les adolescents.

### **Par quel mécanisme la surexpression d'OPN induit-elle la croissance asymétrique du rachis dans la SIA?**

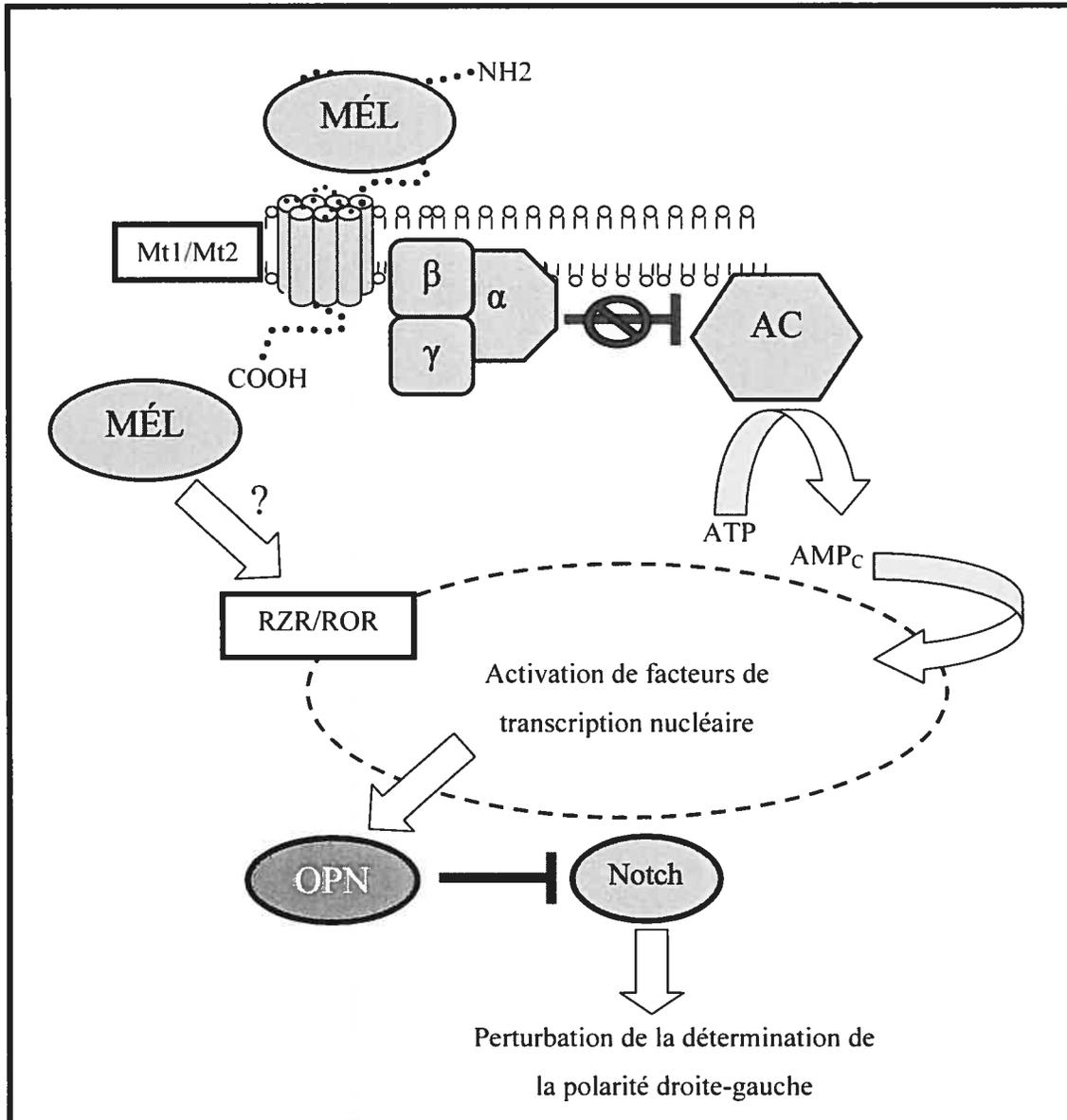
Afin d'élucider si les effets de l'OPN chez les souris C57Bl/6j sont régis par des interactions avec l'un ou l'autre de ces récepteurs connus, soient CD44 et les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , nous avons utilisé la même approche génétique en utilisant des souris bipédales C57Bl/6j CD44 knock-out (gracieusement obtenues du Dr Tak Mak, Université de Toronto). Jusqu'à maintenant, aucune des 20 souris bipédales C57Bl/6j CD44-k.o. générées n'a développé de scoliose, supportant ainsi que le récepteur CD44 soit essentiel à ce processus pathophysiologique. Toutefois, un plus grand nombre de souris devra être analysé afin de conclure hors de tout doute sur le rôle joué par ce récepteur dans l'initiation des déformations scoliotiques. De plus, il serait souhaitable d'évaluer par cette approche génétique la contribution possible d'un second récepteur, les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , en utilisant des souris C57Bl/6j  $\beta_3$  knock-out commercialement disponibles (Jackson Laboratory), qui sont viables contrairement aux souris knock-out  $\alpha_v$ .

Au niveau du rôle de l'OPN et de sa signalisation dans la croissance asymétrique du rachis dans le cadre pathologique de la SIA, plusieurs aspects restent encore sans réponse. Néanmoins, de récents travaux ont pu mettre en évidence que l'OPN peut inhiber l'expression de Notch-1 notamment dans les cellules CD34+ (Iwata 2004). Ceci est particulièrement

intéressant compte tenu du rôle de Notch-1, et de sa signalisation dans la régulation des gènes contrôlant le développement asymétrique gauche-droit comme Nodal, Lefty2 et Pitx2 (fig. 4.1). Ce dernier facteur de transcription est d'intérêt puisqu'il est l'agent causal du syndrome d'Axenfeld-Rieger, une condition entraînant la formation d'une scoliose chez un grand nombre de patients atteints (Borgues 2002). Cependant, on ignore encore beaucoup de choses au niveau de la signalisation de Notch-1, tant au niveau périnatal qu'au cours de la vie adulte. Dans ce contexte, les profils d'expression du récepteurs Notch-1, de ses ligands potentiels (Delta et Jagged), de même que de ses cibles (Nodal, Lefty et Pitx2) devraient être réalisés dans les tissus des différents modèles animaux utilisés dans le cadre de ce mémoire.

**A quels niveaux tissulaires ou dans quels systèmes l'accumulation d'OPN est cruciale pour l'initiation des déformations scoliotiques?**

Deux sites anatomiques ont particulièrement retenu notre attention lors de l'étude de l'influence de la surabondance d'OPN sous la signalisation aberrante de la mélatonine. Il s'agit du système vestibulaire et des fuseaux neuro-musculaires. Ces systèmes sont d'une part visiblement altérés dans la SIA (voir chapitre 1, sections 1.3.4 et 1.3.3 respectivement) et montrent la présence d'OPN et une haute concentration en récepteurs mélatoninergiques. De plus, tous deux sont intimement liés aux systèmes nerveux périphérique et central dans l'intégration et la régulation de la proprioception (voir chapitre 1, section 3.7.1). Il serait donc important d'effectuer des hybridations *in situ* pour débiter afin de prouver la co-localisation de ces diverses protéines lors des événements précoces de la croissance chez l'animal. D'autres expériences comme l'inhibition systémique de Notch-1 (knock-out), dans un fond génétique C57BL/6j pourraient également être envisageables, à plus long terme.



**Figure 4.1-Illustration de l'hypothèse avancée par le groupe de Moreau (2004).** La mélatonine se fixe à son récepteur membranaire et active ce dernier. Survient alors le recrutement de protéines G inhibitrices. Une mutation empêche toutefois ces dernières de passer en mode actif, levant alors le rôle d'inhibiteur des adénylates cyclases. Ces derniers produiraient alors une quantité d'AMPc, un messenger secondaire provoquant l'activation des facteurs de transcription nucléaire entraînant conséquemment une synthèse anarchique de protéines, dont OPN. OPN, connue pour son action répressive de Notch, pourrait ce faisant perturber la détermination de la symétrie droite-gauche.

## Chapitre 5-Conclusion :

En résumé, il a été clairement démontré que l'OPN est une protéine nécessaire à l'induction et à la progression scoliotique. Cette affirmation repose principalement sur trois faits issus de nos expérimentations:

1) Seuls les poulets pinéalectomisés ne surexpriment et ce, tant au niveau génique que protéique, la protéine OPN.

2) L'inhibition partielle de l'OPN chez ces mêmes poulets a eu pour effet de réduire de près de la moitié les taux d'apparition de la scoliose.

3) L'inhibition systémique de l'OPN et/ou de son récepteur (CD44) chez la souris C57BL/6j ait un effet protecteur contre la pathologie.

Cette tendance a également été observée chez les patients scoliotiques humains examinés. Toutefois, il sera nécessaire de poursuivre ces expérimentation avant de conclure sur la réelle implication de la protéine chez l'humain ceci étant dû au faible nombre de patients testés. Il est toutefois important de souligner l'importance clinique de cette percée puisqu'elle risque d'avoir un impact significatif sur le diagnostic et le traitement des patients atteints de scoliose idiopathique.

D'un côté plus fondamental ces travaux ont également permis de mieux comprendre la cinétique de la régulation mélatoninergique chez les animaux affichant une déficience en l'hormone. En effet, il a été démontré que certains animaux possèdent la capacité de maintenir des niveaux sériques à des valeurs pratiquement normales et ce, en absence de la glande pinéale. Il reste néanmoins beaucoup de travail pour comprendre la totalité des mécanismes sous-tendants l'initiation de la scoliose sous l'influence de la mélatonine et de l'ostéopontine. La prochaine section portera d'ailleurs sur l'étendue et la portée de ces travaux futurs.

## ***1-Perspective des travaux supplémentaires requis :***

Différentes perspectives sont envisageables quant aux travaux supplémentaires visant à une meilleure compréhension du rôle d'OPN dans l'étiopathogénèse de la SIA. Il sera donc question dans ces sections des expériences projetées à court, moyen et à long terme.

### **1.1-Étude de la séquence promotrice d'OPN :**

L'étude en profondeur de la séquence promotrice est de première importance. Il est en effet crucial d'expliquer les mécanismes pouvant entraîner la surexpression d'OPN chez les sujets scoliotiques. Tout d'abord, la construction d'un vecteur d'expression incluant toute séquence promotrice du gène d'intérêt pourrait être utilisée de deux façons :

- 1- Identifier et caractériser un élément de réponse à la mélatonine par le biais de transfections et de délétions successives.
- 2- Tenter de retrouver les haplotypes décrits dans l'article de Giacomelli (2004) où il a été démontré que certains polymorphismes pathologiques seraient retrouvés au sein du promoteur d'OPN entraînant ainsi la surexpression de la protéine.

Advenant la découverte de ces éléments de régulation, une étude clinique pourrait être effectuée afin de tenter d'établir une corrélation entre les polymorphismes identifiés et les principaux types de déformations rencontrées. Néanmoins, compte tenu des nombreuses manipulations exigées par ces démonstrations, ces études ne pourraient être complétées qu'à moyen terme.

## **1.2-Étude de la signalisation en aval d'OPN :**

Dans cette section, il sera question de la façon dont la surexpression d'OPN est en mesure d'influencer la croissance symétrique de la colonne vertébrale et des structures qui lui sont liées. Nous traiterons donc dans un premier temps des mécanismes établissant l'asymétrie droite-gauche et des principaux sites anatomiques susceptibles de moduler ce phénomène.

### **1.2.1-Mise en place de l'asymétrie droite-gauche :**

Ce concept, bien qu'étant en apparence paradoxal, se veut vital chez les vertébrés supérieurs. En effet, le développement et le bon fonctionnement de certaines structures de l'organisme sont intimement liés à la polarité droite-gauche. Divers facteurs influencent le processus qui est par ailleurs très bien résumé dans un article de Hamada (2002) où il étudie l'ensemble du procédé chez la souris. Dans la présente section, nous discuterons donc les principales molécules étant à la fois impliquées dans la différenciation de l'axe droite-gauche et dans la signalisation d'OPN. Le tout débute avec l'expression très précoce de Notch 1/2, activant l'expression d'une autre protéine, Nodal, dans le nœud embryonnaire. Cette réaction entraîne un changement dans le flux interne du nœud embryonnaire amenant une très forte concentration de Nodal du côté gauche de ce dernier, phénomène communément appelé cassure de la symétrie. S'ensuit alors le transfert d'un signal asymétrique (de nature indéterminée mais Nodal et Fgf8 sont des candidats potentiels) vers le mésoderme de la lame latérale gauche. Ce signal entraîne alors l'expression asymétrique de divers gènes comme Nodal, Lefty2 et Pitx2 qui détermineront alors la polarité droite-gauche et ce, durant tout le processus de l'organogenèse.

Il est montré qu'OPN influence de façon négative l'expression de Notch-1 (Iwata 2004). Cela pourrait donc se traduire par une réduction significative du gène initiant la formation de l'axe droite-gauche. Par ailleurs, il a clairement été démontré que Notch-1 est impliqué dans le développement du rachis, notamment au niveau de la segmentation vertébrale (Pammeirim 1997) et que l'un de ses ligands (delta-like 3, DLL3) est un candidat suspecté quant à la prédisposition génétique entraînant l'apparition d'une maladie, le syndrome de Jarcho-Levin (dysostose spondylo-costale) où des déformations rachidiennes sont observées (Turnpenny 2003; Bulman 2000). De plus, DLL3 pourrait être directement impliqué dans l'étiopathogénie de la scoliose, hypothèse née suite à la découverte de formes mutantes de DLL3 chez des patients atteints de scolioses congénitales (Maisenbacher 2005). Les patients analysés dans ce dernier papier affichent même de fréquents problèmes de nature rénale ou cardiaque, organes riches en OPN (voir chapitre 1, sections 3.6 et 3.7) où la signalisation de Notch pourrait être également altérée. Finalement, un dernier phénomène est à même de relier la signalisation de Notch et l'OPN dans l'initiation des déformations scoliotiques est l'hypoxie. En effet, l'hypoxie entraîne à la fois la hausse des niveaux d'OPN (Sodhi 2001) et la baisse des taux de Notch (Fan 2005) tout en étant en mesure d'induire la scoliose chez la souris, lorsque appliquée au niveau fœtal (Rivard 1982).

Considérant ces hypothèses, la modulation des taux d'OPN dans certaines structures lors du développement pourrait devenir très critique pour maintenir une croissance symétrique du rachis. La régulation effectuée par OPN devra donc être étudiée dans certains tissus ciblés, à moyen ou à long terme, afin de découvrir le patron de cette cascade moléculaire et ainsi trouver de nouvelles cibles thérapeutiques susceptibles d'influencer le phénomène.

## ***2 -Évaluation du potentiel thérapeutique :***

### **2.1-Élaboration d'un test diagnostique précoce :**

Les travaux réalisés dans le cadre de ce mémoire devraient un jour permettre d'identifier les enfants à risque de développer une scoliose avant même l'apparition des manifestations cliniques de la maladie et de cibler parmi les sujets déjà atteints ceux dont les déformations risquent de prendre une tangente progressive. En effet, connaissant le principe de transmission génétique de la pathologie, il devient assez facile de cerner les foyers à risque simplement en consultant l'historique familial. L'apparition d'un cas de scoliose au sein d'une famille, même chez un parent éloigné, pourrait justifier la mise en branle d'un système diagnostique qui nous permettrait d'identifier les sujets qui seront probablement atteints chez la nouvelle génération. Une prise de sang ou un échantillon de la muqueuse buccale pourraient suffire à fournir le code génétique de l'individu et permettre la localisation des diverses mutations susceptibles d'entraîner l'apparition et le développement de la scoliose. En guise d'alternative, les niveaux d'OPN pourraient être mesurés chez ces patients afin de démontrer toute surexpression susceptible d'induire la scoliose. Pour ce faire, une simple prise de sang ou le dosage d'OPN urinaire pourrait s'avérer suffisant. Bien que ces résultats soient toujours préliminaires, il est clair que nous obtiendrons et ce, à moyen terme, une liste assez complète des loci de susceptibilité nous permettant la détection des sujets potentiels et l'initiation des approches thérapeutiques avant même l'apparition des premiers symptômes. C'est par ailleurs ce qui rend le traitement de la scoliose si difficile actuellement: l'absence de signes précurseurs. En effet, le diagnostic scoliotique n'est généralement posé qu'à la suite des premières apparitions des déformations et il est déjà malheureusement trop tard. Le processus est déjà commencé et les intervenants ne peuvent généralement que limiter la progression avec la pose de corsets orthopédiques ou encore corriger littéralement

l'alignement rachidien via des techniques chirurgicales très invasives chez les patients les plus atteints (50° et plus).

## **2.2-Développement d'un traitement pharmaceutique :**

Nos travaux devraient non seulement nous permettre d'élaborer un test de dépistage précoce mais aussi la mise au point d'un outil pharmacologique révolutionnaire. En effet l'injection d'inhibiteurs transcriptionnels d'OPN pourrait, à l'instar des poulets pinéalectomisés protéger les sujets susceptibles de développer la maladie.

Il serait également possible d'appliquer cette médication aux sujets ayant déjà initié le développement de la pathologie, espérant ainsi stopper ou du moins ralentir la progression de la scoliose. Cette approche thérapeutique serait très avantageuse au sens qu'elle est nettement moins invasive que les traitements contemporains mais surtout qu'elle comporte possiblement moins de risque que la chirurgie corrective. Il serait donc possible de commencer la thérapie immédiatement après la validation des précédentes hypothèses émises, ce qui constituerait une véritable révolution dans l'antique domaine de la SIA. Il est toutefois à noter que cette réalisation ne sera possible qu'avec la réalisations d'analyses plus poussées puisque nous n'avons pas encore à ce jour de données concernant la réduction systémique de l'OPN chez l'humain. L'OPN étant impliquée dans nombres de réactions physiologiques, il est primordial de vérifier s'il sera possible d'isoler les tissus et structures véritablement impliqués dans le développement de la SIA et de trouver un moyen d'intervenir localement afin d'éviter de perturber l'équilibre homéostatique naturel et ainsi provoquer d'autres pathologies subséquentes.

## Bibliographie:

- Ahl T, Albertsson-Wilklund K, Kalen R. Growth hormone profiles in pubertal girls with idiopathic scoliosis. *Spine* 1988; **13**: 139-142.
- Ahn UM, Ahn NU, Nallamshetty L, Buchowski JM, Rose PS, Miller NH, Kostuik JP, Sponseller PD. The etiology of adolescent idiopathic scoliosis. *Am J Orthop*. 2002 Jul; **31(7)**: 387-95.
- Aherrahrou Z, Axtner SB, Kaczmarek PM, Jurat A, Korff S, Doehring LC, Weichenhan D, Katus HA, Ivandic BT. A Locus on Chromosome 7 Determines Dramatic Up-Regulation of Osteopontin in Dystrophic Cardiac Calcification in Mice. *Am. J. Pathol.*, Apr 2004; **164**: 1379-1387.
- Antoniou J, Arlet V, Goswami T, Aebi M, Alini M. Elevated synthetic activity in the convex side of scoliotic intervertebral discs and endplates compared with normal tissues. *Spine* 2001; **26(10)**: E198-E206.
- Arendt J, Skene DJ, Middleton B, Lockley SW, Deacon S. Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work and blindness. *J Biol Rhythms* 1997 **12**: 604-617.
- Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH. Control of hydroxyindole-o-methyltransferase activity in the rat by environmental lighting. *J. Biol. Chem.* 1965 **240**: 949-954.
- Balasz J. Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum. Reprod. Update*, May 2003; **9**: 207 - 222. Jander S, Bussini S, Neuen-Jacob E, Bosse F, Menge T, Muller HW, Stoll G. Osteopontin: a novel axon-regulated Schwann cell gene. *J Neurosci Res*. Jan 2002; **67(2)**: 156-66.
- Bagnall KM, VJ Raso VJ, DL Hill DL, M Moreau M, JK Mahood JK, H Jiang H, G Russell G, M Bering M, and GR Buzzell GR. Melatonin levels in idiopathic scoliosis. Diurnal and nocturnal serum melatonin levels in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine*, 1996; **21(17)**: 1974-1978.
- Bagnall KM, Beuerlein M, Johnson P, Wilson J, Raso VJ, Moreau M. Pineal transplantation after pinealectomy in young chickens has no effect on the development of scoliosis. *Spine* May 2001; **26(9)**: 1022-1027.
- Bagnall K, Raso VJ, Moreau M, Mahood J, Wang X, Zhao JIE. The Effects of Melatonin Therapy on the Development of Scoliosis After Pinealectomy in the Chicken. *J Bone Joint Surg Am*. Feb 1999; **81**: 191-199.

- Barrios C, Tunon MT, DeSalis JA, Beguiristain JL, Canadell J. Scoliosis induced by medurally damage: an experimental study in rabbits. *Spine* 1987; **12**: 433-439.
- Bayless, K.J., Davis, G.E. and Meininger, G.A. Isolation and Biological of Osteopontin from Bovine Milk. *Protein Expression and Purification*. 1997; **9**: 309-314.
- Beard HK, Roberts S, O'Brien JP. Immunofluorescent staining for collagen and proteoglycan in normal and scoliotic intervertebral discs. *J Bone Joint Surg Br* 1981; **63**: 529-534.
- Becker-André M, André, Delamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; **194**: 1371-1379.
- Bell M, Teebi AS. Autosomal dominant idiopathic scoliosis (résumé) *Am J Med Genet* 1995; **55**: 112.
- Beshare JC, Dunis DA. Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding, *Science* 1983; **219**: 1341-1343.
- Bonnelye E, Vanacker JM, Dittmar T, Begue A, Desbiens X, Denhardt DT, Aubin JE, Laudet V, Fournier B. The ERR-1 orphan receptor is a transcriptional activator expressed during bone development. *Mol Endocrinol.* 1997; **11**: 905-916.
- Borges AS, Susanna R, Carani JC, Betinjane AJ, Alward WL, Stone EM, Sheffield VC, Nishimura DY. Genetic analysis of PITX2 and FOXC1 in Rieger Syndrome patients from Brazil. *J Glaucoma*, Feb 2002; **11(1)**: 51-56.
- Briese J, Oberndörfer M, Päschenik C, Heinrich M, Schulte HM, Makrigiannakis A, Löning T, Bamberger A-M. Osteopontin (OPN) is colocalized with the adhesion molecule CEACAM1 in the extravillous trophoblast of the human placenta and enhances invasion of CEACAM1-expressing placental cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Jun 2005; **10.1210/jc** :2004-2434.
- Bulman MP, Kusumi K, Frayling TM, McKeown C, Garrett C, Lander ES, Krumlauf R, Hattersley AT, Ellard S, Turnpenny PD. Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis. *Nat Genet.* Apr 2000; **24(4)**: 438-441.
- Burgoyne.W and J. Fairbanks The management of scoliosis. *Current Paediatrics* 2001; **11**: 323-331.

- Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res*, Jan 1989; **23**(2-3): 123-36.
- Butterworth TR, James C. Electromyographic studies in idiopathic scoliosis. *South Med J*. 1969; **62**: 1005-1010.
- Byl NN, Gray JM. Complex balance reactions in different sensory conditions: adolescent with and without idiopathic scoliosis. *J Orthop Res*. 1993; **11**: 215-227.
- Cahill GM, Beshare JC. Circadian rhythmicity in vertebrae retinas: regulation by photoreceptor oscillator. *Prog Ret Eye Res* 1995; **90**: 9305-9309.
- Cantor H. The role of Eta-1/osteopontin in the pathogenesis of immunological disorders. *Ann NY Acad Sci*. Apr 1995; **760**: 143 - 150.
- Cardinali DP, Nagle CA, Freire F, Rosner JM. Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1975; **18**: 72-85.
- Carlberg C, Hooft Van Huijsduijnen R, Staple J, Delamarter JF, Becker-André M. RZR<sub>s</sub>, a novel class of retinoid related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol*. 1994; **8**: 757-770.
- Carlberg C. Gene Regulation by Melatonin. *Ann NY Acad Sci*. Jan 2000; **917**: 387 - 396.
- Carr AJ. Adolescent idiopathic scoliosis in identical twins. *J Bone Joint Surg Br* 1990; **72**: 1077.
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Fernández-Santos JM, Martín-Lacave I, Calvo JR, Karasek M, Guerrero JM. Human Lymphocyte-Synthesized Melatonin Is Involved in the Regulation of the Interleukin-2/Interleukin-2 Receptor System. *J Clin Endocrinol Metab*. Feb 2005; **90**: 992-1000.
- Cassone VM. Melatonin's role in vertebrate circadian rhythms. *Chronobiol Int*. 1998 Sep; **15**(5):457-73.
- Chakravarti A. Population genetics: making sense out of sequence. *Nat Genet*. 1999; **21**: 56-60.
- Chan V, Fong GC, Luk KD, Yip B, Lee MK, Wong MS, Lu DD, Chan TK. A genetic locus for adolescent idiopathic scoliosis linked to chromosome 19p13.3. *Am J Hum Genet*. 2002; **71**: 401-406.

- Chen J, Thomas HF, Sodek J. Regulation of bone sialoprotein and osteopontin mRNA expression by dexamethasone and 1,25dihydroxyvitamin D3 in rat bone organ cultures. *Connec Tissue Res.* 1996; **34**: 41-51.
- Cheng JC, Guo X, Sher AH, Chan YL, Metreweli C. Correlation between curve sensitivity, somatosensory evoked potentials and magnetic resonance imaging in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1999; **24**: 1679-1684.
- Cheng JC, Guo X. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A primary problem or secondary to the spinal deformity? *Spine* 1997; **22**: 1716-1721.
- Cheng MZ, Zaman G, Lanyon LE. Estrogen enhances the stimulation of bone collagen synthesis by loading and exogenous prostacyclin, but not prostaglandin E2, in organ cultures of rat ulnae. *JBMR* 1994; **9(6)**: 805-816.
- Chew, EC, Low, WD, Chin NK, Hsu L, Yau ACMC. Membranous bodies in the myelin sheath of Schwann cells. *Cell Biol Int. Rep.* 1980; **4**: 11.
- Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, Castelli L, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Immunobiology* 2004; **103(4)**: 1376-1382.
- Church CJ, Kushner PJ, Greene GL. The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Mol Endocrinol.* 1994; **8**:1407-1419.
- Clemens JW, Jarzynka MJ, Witt-Enderby PA. Down-regulation of mt1 melatonin receptor in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sciences* 2001; **69(1)**: 27-35.
- Cobb JR. Outline study of scoliosis. In *Instructional Course. Letters America Academy of Orthopaedic Surgeons* 1948: 261-275.
- Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res.* 2000 May; **28(4)**: 193-202.
- Cowell HR, Hall JN, Mac Ewen G. Genetic aspects of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop.* 1972; **86**: 121-131.

- Craig AM, Smith JH, Denhardt DT. Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. *J. Biol. Chem.* Jun 1989; **264**: 9682-9689.
- Csaba G, Bokay J. The effect of melatonin and corpus pineale extract on serum electrolytes in the rat. *Acta Biol.* 1977; **28(1)**: 143-4.
- Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol.* August 24, 2001; **426(1-2)**: 1-10.
- DeGeorge FV, Fisher RL (résumé). Idiopathic scoliosis: genetic and environmental aspects. *J Med Genet.* Dec 1967; **4**: 251-257.
- Denhardt D, Mistretta D, Chambers AF, Krishna S, Porter JF, Raghuram S, Rittling SR. Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: Evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clinical & Experimental Metastasis.* 2003; **20**: 77-84.
- Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodelling. *J Cell Biochem Suppl.* Jan 1998; **30-31**: 92-102.
- Dobbs MB, Weinstein SL. Infantile and juvenile scoliosis. *Orthop Clin North Am* 1999; **30**: 331-41.
- Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharm.* 1998; **345(1)**: 67-69.
- Dubocovich ML, Masana MI, Iacob S et Sauri DM. Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of the rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1997; **355(3)**: 365-375.
- Dubocovich ML, Tkahasji JS. Use of 2[125I]iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; **64**: 2765-2773.
- Dubousset J, Queneau P, Thillard MJ. Experimental scoliosis induced by pineal and diencephalic lesions in young chickend: its relation with clinical findings. *Orthop Trans* 1983; **7**: 7.
- Dubousset, J. Les scolioses dites idiopathiques. Définition-Pathologie-Classification-Étiologie. *Bulletin de l'Academie Nationale de Médecine* 183.4. 1999: 699-704.

- Echenne B, Barneon G, Pages M, Caillens JP, Guibal C, Jarrousse Y, Dimeglio A, Pous JG. Skin elastic fiber pathology and idiopathic scoliosis. *J Pediatr Orthop*. 1988 Sep-Oct; **8(5)**: 522-8.
- Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J. Biol. Chem.*, May 1994; **269**: 14853-14856.
- Enneking WF, Harrington P. Pathological changes in scoliosis. *J Bone Joint Surg Am*. 1969 Jan; **51(1)**: 165-84.
- Faber A.: Untersuchungen über die Erbllichkeit der Skoliose. *Arch Orthop Unfallchir* 193; **36**: 247-249.
- Fagan AB, Kenneway DJ, Sutherland AD. Total 24-hour melatonin secretion in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1998; **23**: 41-46.
- Fisher, L.W., Hawkins, G.R., Tuross, N. and Termine, J.D. Purification and partial characterization of small proteoglycans I and II, bone sialoproteins I and II, and osteonectin from the mineral compartment of developing human bone. *J. Biol. Chem.* 1987; **262**: 9702-9708.
- Ford DM, Bagnall KM, Clements CA, McFadden KD. Muscle spindles in the paraspinal musculature of patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1988 May; **13(5)**: 461-465.
- Forton AC, Petri MA, Goldman D, Sullivan KE. An osteopontin (SPP1) polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *Hum Mutat*. 2002; **19**: 459.
- Francis MJ, Sanderson MC, Smith R. Skin collagen in idiopathic scoliosis and Marfan syndrome. *Clin Sci Mol Med*. 1976; **51** : 467-474.
- Franzen, A. and Heinegård, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*. 1985; **232(3)**: 715-24.
- Galien. De Moto Musculorum. *National library of Medicine*; 1544.
- Garland HG. Hereditary scoliosis (résumé) *BMJ*. 1934; **1**: 328.
- Gerstenfeld LC, Gotoh Y, Mckee MD, Nanci A, Landis WJ, Glimcher MJ. Expression and ultrastructural immunolocalization of a major 66 kDa phosphoprotein synthesized by chicken osteoblasts during mineralization *in vitro*. *Anat. Rec*. 1990; **228**:93-103.

- Giachelli CM, Lombardi D, Johnson Rj, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol.* 1998; **152**: 353-358.
- Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol*, Dec 2000; **19(7)**: 615-22.
- Giacopelli F, Marciano R, Pistorio A, Catarsi P, Canini S, Karsenty G, Ravazzolo R. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics.* 2004; **20**: 87-96.
- Giampietro PF, Raggio CL, Blank RD. Synteny-defined candidate genes for congenital and idiopathic scoliosis. *Am J Med Genet.* Mar 1999; **83(3)**: 164-77.
- Goldberg CJ, Dowling FE, Fogarty EE, Moore DP. Adolescent idiopathic scoliosis as developmental instability. *Genetica* 1995; **96**: 247-255.
- Guénard H, Boiseau MR, Carré F, Corompt E, Demotes-Mainard J, Devillier P, Hanoune J, Harf A, Lacour JR, Lamour Y, Lévy B, Marthan R, Martineaud JP, Minaire Y, Mion F, Paillard M, Swynghedauw B, Varène P, Vincent JD. *Physiologie humaine 2ième édition.* 1996, éditions Pradel p.131-133.
- Guo H, Cai CQ, Schroeder RA, Kuo PC. Osteopontin Is a Negative Feedback Regulator of Nitric Oxide Synthesis in Murine Macrophages. *J. Immunol.*, Jan 2001; **166**: 1079-1086.
- Hadley NA. The potential role of the elastic-fiber system in adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint surg Am.* 1994; **76**: 1193-1206.
- Hagglund G, Karlberg J, Willner S. Growth in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1992; **17**: 108-111.
- Hamada H, Meno C, Watanabe D, Saijah Y. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet.* 2002; **3**: 103-113.
- Hazlerigg DG, Morgan PJ, Messenger S. Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the pars tuberalis? *J Biol Rhythms* 2001; **16**: 326-335.
- Helder MN, Bronckers AL, Woltgens JH. Dissimilar expression patterns for the extracellular matrix proteins osteopontin (OPN) and collagen type I in dental tissues and alveolar bone of the neonatal rat. *Matrix.* Sep 1993; **13(5)**: 415-25.
- Hilibrand AS, Blackmore LC, Loder RT et coll. The role of melatonin in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996; **21**: 1140-1146.

- Hijiya N, Setoguchi M, Matsuura K, Higuchi Y, Akizuki S, Yamamoto S. Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter. *Biochem J*. Oct 1994; **303 ( Pt 1)**: 255-62.
- Ichikawa H, Itota T, Nishitani Y, Torii Y, Inoue K, Sugimoto T. Osteopontin-immunoreactive primary sensory neurons in the rat spinal and trigeminal nervous systems. *Brain Res*. Apr 2000; **863(1-2)**: 276-81.
- Iizuka K, Murakami T, Kawaguchi H. Pure atmospheric pressure promotes an expression of osteopontin in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, May 2001; **283(2)**: 493-8.
- Inoue M, Minami S, Nakata Y, Kitahara H, Otsuka Y, Isobe K, Takaso M, Tokunaga M, Nishikawa S, Maruta T, Moriya M. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis. *Spine*, November 1, 2002; **27(21)**: 2357-62.
- Iwata M, Awaya N, Graf L, Kahl C, Torok-Storb B. Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which down-regulates Notch1 gene expression in CD34<sup>+</sup> cells. *Blood* Jun 2004; **103**: 4496 - 4502.
- Jimenez-Jorge S, Jimenez-Caliani AJ, Guerrero JM, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Osuna C, Molinero P. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *J Pineal Res*. Aug 2005; **39(1)**: 77-83.
- Jin X, Von Gall C, Pieschl RL, Gribkoff VK, Stehle JH, Reppert SM, Weaver DR. Targeted Disruption of the Mouse Mel<sub>1b</sub> Melatonin Receptor. *Mol Cell Biol*. Feb 2003; **23**: 1054-1060.
- Justice CM, Miller NH, Marosy B, et al. Familial idiopathic scoliosis: evidence of an X-linked susceptibility locus. *Spine* 2003; **6**: 589-594.
- Ju WK, Kim KY, Cha JH, Kim IB, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, Chun MH. Ganglion cells of the rat retina show osteopontin-like immunoreactivity. *Brain Res*, Jan 2000; **852(1)**: 217-20.
- Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, Chikuma S, Yagita H, Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF, Uede T. CD44 Variants but not CD44s Cooperate with  $\beta$ 1-containing Integrins to Permit Cells to Bind to Osteopontin Independently of Arginine-glycine-aspartic Acid, thereby Stimulating Cell Motility and Chemotaxis. *Cancer Res*. Jan 1999; **59**: 219 - 226.

- Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M, Fukase M, Kumegawa M, Chihara K. Retinoic acid induces osteoclast-like cell formation by directly acting on hemopoietic blast cells and stimulates osteopontin mRNA expression in isolated osteoclasts. *Life Sci.* Jan 1995; **56(22)**: 1903-13.
- Keessen W, Crowe A, Hearn M. Proprioceptive accuracy in idiopathic scoliosis. *Spine* Feb 1992; **17(2)**: 149-155.
- Kerr JM, Fisher LW, Termine JD, Young MF. The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin. *Gene* Dec 1991; **108(2)**: 237-43.
- Kiefer MC, Bauer DM, Barr PJ The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. *Nucleic Acids Res.* Apr 1989; **17**: 3306.
- Kikuchi K, Tanaka A, Miyakawa H, Kawashima Y, Kawaguchi N, Matsushita M, Gershwin ME. Eta-1/osteopontin genetic polymorphism and primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* 2003; **26**: 87-90.
- King EC, Sarwark JF. A look at scoliosis. Site du Journal of Children's Memorial Hospital of Chicago [The Child's Doctor]. Disponible sur: <http://www.ama-assn.org/special/hiv/ethics>. Données extraites le 30 août 2005.
- Klein DC, Weller JL, Moore RY. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971; **68(12)**: 3107-10.
- Klein DC, Weller JL. Rapid light-induced decrease in pineal serotonin N-acetyltransferase activity. *Science* 1972; **177**: 532-533.
- Kohri K, Nomura S, Kitamura Y, Nagata T, Yoshioka K, Iguchi M, Yamate T, Umekawa T, Suzuki Y, Sinohara H. Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *J Biol Chem.* Jul 1993; **268**: 15180-15184.
- Klein D, Weller JL. Adrenergic-adenosine 3',5'-monophosphate regulation of serotonin N-acetyltransferase activity and the temporal relationship of serotonin N-acetyltransferase activity synthesis of 3H-N-acetylserotonin and 3H-melatonin in the cultured rat pineal gland. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973 Sep; **186(3)**: 516-527.
- Kubota T, Zhang Q, Wrana JL, Ber R, Aubin JE, Butler WT, Sodek J. Multiple forms of Sppl (secreted phosphoprotein, osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations: regulation by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 1989; **162(3)**: 1453-1459.

- Lam KS, Mehdiian H. The importance of an intact abdominal musculature mechanism in maintaining spinal sagittal balance. Case illustrations in prune-belly syndrome. *Spine* 1999; **24**: 719-722.
- Lammi J, Hupponen J, Aarnisalo P. Regulation of the Osteopontin Gene by the Orphan Nuclear Receptor NURR1 in Osteoblasts. *Mol Endocrinol.* 2004; **18**: 1546 - 1557.
- Langenskiold A, Michelsson JE. Experimental progressive scoliosis in the rabbit. *J Bone Joint Surg.* 1969; **43B**: 116-120.
- Lerner AB, Case JD et Takahashi Y. Isolation of melatonin, a pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc.* 1958; **80**: 2587.
- Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BLM. Altered Wound Healing in Mice Lacking a Functional Osteopontin Gene (*spp1*) *J Clin. Invest.* Apr 1998; **101**: 1468-1478.
- Lin YH, Huang CJ, Chao JR, Chen ST, Yen JJ et al. Coupling of osteopontin and its cell surface receptor CD44 to the cell survival response elicited by interleukin-3 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Mol Cell Biol.* 2000; **20**: 2734-2742.
- Low, WD, Chew LS, Kung, HTC, Hsu LCS Leong JCY. Ultrastructures of nerve fibers and muscle spindles in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop Relat Res.* Apr 1983; **174**: 217-221.
- Lotufo CM, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH et Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol.* 2001; **430(2-3)**: 351-357.
- Machida M, Dubousset J, Imamura T et coll. An experimental study in chickens for the pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Spine* 1993; **18**: 1609-1615.
- Machida M, Dubousset J, Imamura Y et coll. Melatonin: a possible role in pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 1996; **21**: 1147-1152.
- Machida M, Murai I, Miyashita Y, Dubousset J, Yamada T, Kimura J. Pathogenesis of idiopathic scoliosis. Experimental study in rats. *Spine* Oct 1999; **24(19)**: 1985-1989.
- Maisenbacher MK, Han JS, O'Brien ML, Tracy MR, Erol B, Schaffer AA, Dormans JP, Zackai EH, Kusumi K. Molecular analysis of congenital scoliosis: a candidate gene approach. *Hum Genet.* Apr 2005; **116(5)**: 416-419.

- Malyankar UM, Almeida M, Johnson RJ, Pichler RH, Giachelli CM. Osteopontin regulation in cultured rat renal epithelial cells. *Kidney Int.* Jun 1997; **51(6)**: 1766-73.
- Mark MP, Prince CW, Gay S, Austin RL, Butler WT. 44-kDal bone phosphoprotein (osteopontin) antigenicity at ectopic sites in newborn rats: kidney and nervous tissues. *Cell Tissue Res.* Jan 1988; **251(1)**: 23-30.
- Martin J, Rodriguez-Blanco C, Eguren-Hernandez EM, Diaz-Polegre R, de Leon Garcia F, Pedrosa-Guerra AI [Family prevalence of idiopathic scoliosis] *An Esp Pediatr.* Feb 1997; **46(2)**: 148-50.
- McInnes E, Hill DL, Raso J, Chetner B, Greenhill BJ, Moreau M. Vibratory response in adolescent who have idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Am.* 1992; **17**: 149-155.
- McKee MD, Nanci A. Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical studies on bone and its interfaces. *Cells Mater.* 1993; **3**: 219-243.
- Mess S, Rékasi Z, Ghosh M, Csernus V. Regulation of pineal melatonin secretion: comparison between mammals and birds. *Acta Biologica Hungarica* 1996; **47(1-4)**: 313-322.
- Miller NH, Sponseller PD, Bell J, et coll. X chromosome analysis in adolescent idiopathic scoliosis. In research into spinal deformities 2: Proceeding of the 2<sup>nd</sup> biannual meeting of the international research society of spinal deformities. Burlington, VT, June 28-July 1, 1998. Amsterdam, IOS Press, 1998.
- Miller NH, Justice CM, Marosy B, Doheny KF, Pugh E, Zhang J, Dietz 3<sup>rd</sup> H, Wilson AF. Identification of candidate regions for familial idiopathic scoliosis. *Spine* May 2005; **30(10)**: 1181-7.
- Misol S, Ponseti IV, Samaan N, Bradbury JT. Growth hormone blood levels in patients with idiopathic scoliosis. *Clin Orthop.* 1971; **81**: 122-125.
- Miyazaki Y, Setoguchi M, Yoshida S, Higuchi Y, Akizuki S, Yamamoto S. The mouse osteopontin gene. Expression in monocytic lineages and complete nucleotide sequence. *J Biol Chem.* Aug 1990; **265**: 14432-14438.
- Morcuende JA, Minhas R, Dolan L, Stevens J, Beck J, Wang K, Weinstein SL, Sheffield V. Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* Sep 2003; **28(17)**: 2025-2029.

- Moore MA, Gotoh Y, Rafidi K, Gerstenfeld LC. Characterization of a cDNA for chicken osteopontin: expression during bone development, osteoblast differentiation, and tissue distribution. *Biochemistry*, Mar 1991; **30(9)**: 2501-2508.
- Moore RY. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res*. 1996; **73(1-2)**: 125-130.
- Moreau A, Wang DS, Forget S, Azeddine B, Angeloni D, Fraschini F, Labelle H, Poitras B, Rivard C-H, Grimard G. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. *Spine* 2004; **29(16)**: 1772-1781.
- Moye E, Barraclough R, West C, Rudland PS. Osteopontin expression correlates with adhesive and metastatic potential in metastasis-inducing DNA-transfected rat mammary cell lines. *Br J Cancer*, May 2004; **90(9)**: 1796-802.
- Murray MP, Sepic, SB. Normal postural stability and steadiness: quantitative assessment. *J Bone Joint Surg Am*. 1975; **57**: 510-516.
- Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, Pearl RG, Leung LLK. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, a Potential Regulator of Vascular Inflammation. *J Biol Chem*. Dec 2003; **278**: 51059-51067.
- Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol*. 2003; **136**: 125-129.
- Noda M, Denhardt DT. Regulation of osteopontin gene expression in osteoblasts. *Ann NY Acad Sci*, Apr 1995; **760**: 242-248.
- Nordwall A, Willner S. A study of skeletal age and height in girls with idiopathic scoliosis. *Clin Orthop*. 1975; **110**: 6-10.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrangé P, Canet E et Boutin JA. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*. 2000; **275(40)**: 31311-31317.
- Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrangé P, Canet E, Boutin JA. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol*. 2001 Jun 1; **61(11)**: 1369-1379.
- O'Brien ER, Garvin MR, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in

- primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Oct 1994; **14**: 1648-1656.
- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and Sequence Analysis of Rat Bone Sialoprotein (Osteopontin) cDNA Reveals an Arg-Gly-Asp Cell-Binding Sequence *PNAS.* Dec 1986; **83**: 8819-8823.
- O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goestchkes M, Mulligan N, Berman JS. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 1999; **162**: 1024-1031.
- Palmeirim I, Henrique D, Ish-Horowicz D, Pourquie O. Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 1997; **91**: 639-648.
- Panda D, Kundu GC, Lee BI, Peri A, Fohl D, Chackalaparampil I, Mukherjee BB, Li XD, Mukherjee DC, Seides S, Rosenberg J, Stark K, Mukherjee AB. Potential roles of osteopontin and  $\alpha_v\beta_3$  integrin in the development of coronary artery restenosis after angioplasty. *PNAS.* Aug 1997; **94**: 9308-9313.
- Papaioannou S, Tumber AM, Meikle MC, McDonald F. G-protein signaling pathways and oestrogen: a role of balanced maintenance in osteoblast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; **1449**: 284-292.
- Perdrini VA, Ponseli IV, Dohrman SC. Glycoaminoglycans of intervertebral disc in idiopathic scoliosis. *J Lab Clin Med.* 1973; **82**: 938-950.
- Pévet P, Pitrosky B, Vuillez P, Jacob N, Teclémariam-Mesbah R, Kirsch R, Vivien-Roels B, Lakhdar-Ghazal N, Canguilhem B, and Masson-Pévet M. The suprachiasmatic nucleus: the biological clock for all seasons, in Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms. *Progress in Brain Research.* 1996; **111**: 369-384.
- Pincott JR, Taffs LF. Experimental scoliosis in primates: a neurological cause. *J Bone Joint Surg Br.* 1982; **64**: 5030-5037.
- Prince CW, Oosawa T, Butler WT, Tomana M, Bhowan AS, Bhowan M, Schrohenloher RE. Isolation, characterization, and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol. Chem.* Feb 1987; **262**: 2900-2907.
- Proske U, Wise AK, Gregory JE. The role of muscle receptors in the detection of movements. *Prog Neurobiol.* Jan 2000; **60(1)**: 85-96.

- Provinciali M, Di Stefano G, Bulian D, Tibaldi A, Fabris N. Effect of melatonin and pinealectomy grafting on thymocyte apoptosis in aging mice. *Mech Ageing Dev.* 1996; **90**: 1-19.
- Reamy BV, Slankey, JB, Adolescent idiopathic scoliosis: Review and current concepts. *Am Fam Physician.* 2001; **64(1)**: 111-116.
- Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* Jan 1995; **18(1)**: 1-11.
- Reuber M, Schultz A, McNeill T, Spencer D. Trunk muscle myoelectric activities in idiopathic scoliosis. *Spine* 1983; **8(5)**: 447-56.
- Ricardo SD, Franzoni DF, Roesener CD, Crisman JM, Diamond JR. Angiotensinogen and AT<sub>1</sub> antisense inhibition of osteopontin translation in rat proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* May 2000; **278**: 708-716.
- Riseborough E et Wynne-Davies R. A genetic survey of idiopathic scoliosis in Boston, Massachusetts. *J Bone Joint Surg Am.* 1973; **55**: 974-983.
- Rivard CH, Labelle P, Simoneau R, Duhaime M, Poitras B, Simard P. Moderate hypobaric hypoxia used as an inducer of congenital vertebral malformation in mouse embryo. *Chir Pediatr.* Jan 1982; **23(1)**: 65-67.
- Roach JW Adolescent idiopathic scoliosis. *Orthop Clin North.* 1999; **30(3)**: 353-365.
- Roth JA, Kim BG, Lin WL et Cho MI. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem.* 1999; **274(31)**: 22041-22047.
- Sahlstrand T, Ortengen R, Nachemson A. Postural equilibrium in adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Orthop. Scand.* 1978; **49**: 354-365.
- Sahlstrand T, Petrusen B, Ortengen R. Vestibulospinal reflex activity in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Orthop Scand.* 1979; **50**: 275-281.
- Sahlstrand T, Petrusen B. A study of labyrinthine function in patients with adolescent idiopathic scoliosis. *Acta Orthop Scand.* 1979; **50**: 759-769.
- Sahlstrand T. An analysis of lateral predominance in adolescent idiopathic scoliosis with special reference to the convexity of the curve. *Spine* 1980; **6**: 512-518.

- Sahlstrand T, Lidstrom J. Equilibrium factors as predictors of the prognosis in adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop*. 1980; **152**: 232-236.
- Salehi LB, Mangino M, De Serio S, et al. Assignment of a locus for autosomal dominant idiopathic scoliosis (IS) to human chromosome 17p11. *Hum Genet*. 2002; **111**: 401-404.
- Salger UT, Hsu JD. Morphometry and pathology of the paraspinoius muscles in idiopathic scoliosis. *Acta Orthop Scand*. 1986; **52**: 749-752.
- Sanchez-Barcelo RJ, Cos S, Fernandez R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr Relat Cancer* 2003; **10**: 153-159.
- Santoro C, Mermod N, Andrews C, Tijan R. A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* 1988; **334**: 218-224.
- Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF-KappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol* 1998; **141**:1083-1093.
- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H MT<sub>1</sub> Melatonin Receptor in the Human Retina: Expression and Localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Mar 2002; **43**: 889-897.
- Schüle R, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Bolado J, Pike JW, Evans RM. Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell*, May 1990; **61**(3): 497-504.
- Shohat M, Shohat T, Nitzan M, Mimouni M, Kedem R et Danon YL. Growth and ethnicity in scoliosis. *Acta Orthop Scand*. 1988; **59**(3): 310-313.
- Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*. 2003 Jun; **55**(2): 325-95.
- Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R, Li JIW, Kim RH. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann NY Aca. Sci*. Apr 1995; **760**: 223-241.
- Sodhi CP, Phadke SA, Battle D, Sahai A. Hypoxia and high glucose cause exaggerated mesangial cell growth and collagen synthesis: role of osteopontin. *Am J Physiol Renal Physiol*, Apr 2001; **280**: 667-674.

- Spencer GS, Eccles MJ. Spinal muscle in scoliosis. Part 2. The proportion and size of type 1 and type 2 skeletal muscle fibres measured using a computer-controlled microscope. *J Neurol Sci.* 1976 Nov; **30(1)**: 143-54.
- Stirling AJ, Howel D, PETER A. Millner PA, Sadiq S, DAVID Sharples D, and ROBERT A. Dickson RA. Late-Onset Idiopathic Scoliosis in Children Six to Fourteen Years Old. A Cross-Sectional Prevalence Study. *J Bone Joint Surg Am.* Sep 1996; **78**: 1330-1336.
- Stokes, IAF. How vicious is the vicious cycle? Présentation orale lors de la 28<sup>ème</sup> réunion de la Société Scoliose Québec (Québec) 2003.
- Takemoto M, Yokote K, Yamazaki M, Ridall AL, Butler WT, TARO Matsumoto T, Tamura K, Saito Y, Mori S. Enhanced Expression of Osteopontin by High Glucose: Involvement of Osteopontin in Diabetic Macroangiopathy. *Ann NY Acad Sci.* May 2000; **902**: 357-363.
- Taylor TK, Ghosh P, Bushell Gr. The contribution of the intervertebral disk to the scoliotic deformity. *Clin Orthop.* 1981; **156**: 79-90.
- Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet.* 2003 Aug; **4(8)**: 638-649.
- Thillard MJ. Deformations de la colonne vertébrale consécutives à l'épiphyséctomie chez le poussin. *Extrait de comptes rendus de l'Association des Anatomistes* 1959 : 751-758.
- Turnpenny PD, Whittock N, Duncan J, Dunwoodie S, Kusumi K, Ellard S. Novel mutations in *DLL3*, a somitogenesis gene encoding a ligand for the Notch signalling pathway, cause a consistent pattern of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis. *J Med Genet.* May 2003; **40**: 333-339.
- Uno Y, Horii A, Umemoto M, Hasegawa T, Doi K, Uno A, Takemura T, Kubo T. Effects of hypergravity on morphology and osteopontin expression in the rat otolith organs. *J Vestib Res.* Jan 2000; **10(6)**: 283-289.
- Vanacker JM, Delmarre C, Guo X, Laudet V. Activation of the osteopontin promoter by the orphan nuclear estrogen receptor related  $\alpha$ . *Cell growth Differentiation* 1998; **9**: 1007-1014.
- VandenBos T, Bronckers AL, Goldberg HA, Beertsen W. Blood circulation as source for osteopontin in acellular extrinsic fiber cementum and other mineralizing tissues. *J Dent Res.* Nov 1999; **78**: 1688-1695.

- Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H. Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res.* 1987; **435(1-2)**: 359-62.
- Wang ED, Drummond DS, Dormans JP, Moshang T, Davidson RS, Grussio D. Scoliosis in patients treated with growth hormone. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 1997; **17**: 708-711.
- Weaver DR, Reppert RM. The Mella melatonin receptor gene is expressed in human suprachiasmatic nuclei. *Neuroreport* Dec 1996; **8(1)**: 109-112.
- Weintraub As, Schnapp LM, Lin X, Taubman MB. Osteopontin deficiency in rat vascular smooth muscle cells is associated with an inability to adhere to collagen and increased apoptosis. *Lab Invest.* 2000; **80**: 1603-1615.
- Veldhuizen AG, Wever DJ, Webb PJ. The aetiology of idiopathic scoliosis: biomechanical and neuromuscular factors. *Eur Spine J.* 2000; **9(3)**: 178-84.
- Venn G, Mehta MH, Manson RM. Solubility of spinal ligament collagen in idiopathic scoliosis and secondary scoliosis. *Clin Orthop.* 1983; **177**: 297-301.
- Willner S. Adolescent Idiopathic Scoliosis. Etiology in Weinstein S.L.(ed): *The Pediatric Spine: Principles and Practices.* New-York, Raven Press, 1994 : 445-462
- Willner S. A study of growth in girls with adolescent idiopathic scoliosis. *Clin Orthop.* 1974; **101**: 129-135.
- Wise, CA, Barnes, R, Gillum J, Herring, JA, Bowcock AM, Lovett M. Localization of susceptibility to familial idiopathic scoliosis. *Spine* 2000; **25(18)**: 2372-2380.
- Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestine S et Melan MA. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci.* 2003; **72(20)**: 2183-2198.
- Woolf AD, Akesson K. Preventing fractures in elderly people. *BMJ.* 2003; **327**: 89-95.
- Wrana JL, Zhang Q, Sodek J. Full length cDNA sequence of porcine secreted phosphoprotein-I (SPP-I, osteopontin). *Nucleic Acids Res.* 1989; **17**: 10119.
- Wyatt MP, Barrack RL, Mubarak SJ, Whitecloud TS, Burke SW. Vibratory response in adolescent idiopathic scoliosis. *J Bone Joint Surg Br.* 1986; **68**: 714-718.
- Wynne-Davies R. Familial (idiopathic) scoliosis. *J Bone Joint Surg.* 1968; **50B**: 24-30.

- Xiong B, Sevastik J, Hedlund R, Sevastik B. Sagittal configuration of the spine and growth of the posterior elements in early scoliosis. *J Orthop Res.* 1994; **12**: 113-118.
- Yamada K, Yamamoto H, Nakagawa Y, Tezuka A, Tamura T, Kawata S. Etiology of idiopathic scoliosis. *Clin Orthop.* 1984; **184**: 50-57.
- Yamada K, Yamamoto H, Ikata T. A neurological approach to the etiology and therapy of scoliosis. *J Bone Joint Surg Am.* 1971; **53**: 197-198.
- Yamamoto S, Hijiya N, Setoguchi M, Matsuura K, Ishida T, Higuchi Y, Akizuki, S. Structure of the osteopontin gene and its promoter. *Ann NY Acad Sci.* 1995; **760**: 44-58.
- Yamate T, Tsuji H, Amasaki N, Igushi M, Kurita T, Kohri K. Analysis of osteopontin DNA in patients with urolithiasis. *Urol Res.* 2000; **28**: 159-166.
- Yarom R, Robin GC. Studies on spinal and peripheral muscles from patients with scoliosis. *Spine* 1979; **4(1)**: 12-21.
- Yu XQ, Fan J-M, Nikolic-Paterson DJ, Yang N, Mu W, Pichler R, Johnson RJ, Atkins RC, Lan HY. IL-1 Up-Regulates Osteopontin Expression in Experimental Crescentic Glomerulonephritis in the Rat. *Am. J. Pathol.* Mar 1999; **154**: 833 - 841.
- Zawilska JB, Nowak JZ. Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem Int.* 1992; **20**: 23-36.
- Zaleske DJ, Ehrlich MG et Hall JE. Association of glycoaminoglycan depletion and degradative enzyme activity in scoliosis. *Clin Orthop.* 1980; **148**: 177-181.
- Zetterberg C, Bjork R, Ortengen R, Andersson GBJ. Electromyography of the paravertebral muscles in idiopathic scoliosis. *Acta Orth Scand.* 1984; **55**: 304-309.
- Zhang Q, Wrana JL, Sodek J. Characterization of the promoter region of the porcine opn (osteopontin, secreted phosphoprotein 1) gene. Identification of positive and negative regulatory elements and a 'silent' second promoter. *Eur. J. Biochem.*, Jul 1992; **207**: 649-659.

