

MEMOIRE MASTER 2 Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologie

Spécialité Neurobiologie

**Analyse des déformations musculo-squelettiques
induites par une asymétrie vestibulaire durant
l'embryogénèse dans un modèle amphibien :
*Xenopus laevis***

MOYA-PLANA Antoine

Laboratoire de Neurobiologie des Réseaux Sensorimoteurs, Centre National de
la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR 8194) –
Université Paris Descartes, 75006 Paris, France.

CERFAP, Genopole, Université d'Evry, CNRS, Genavenir 3, Genopole Campus 3,
1 rue Pierre Fontaine, 91058 Evry Cedex, France.

1. INTRODUCTION

La scoliose idiopathique de l'adolescent est caractérisée par des déformations sévères du rachis dans les trois plans de l'espace, ayant pour conséquences une rotation vertébrale responsable d'une gibbosité et une modification de l'équilibre sagittal du tronc. Sa prévalence est de 4,6% dans la population générale. Parmi les enfants atteints, 20% auront recours à une chirurgie lourde au cours de la prise en charge de cette pathologie (*Khoury et al. 2004*). L'éthiopathogénie de la scoliose idiopathique de l'adolescent reste aujourd'hui inconnue. Devant la gravité potentielle de cette maladie, des recherches ont été entamées depuis plusieurs années par de nombreuses équipes dans le monde afin de tenter d'élucider les mécanismes physiopathologiques responsables. Parmi les multiples pistes explorées (génétique, endocrinienne, calmoduline, mélatonine...), l'hypothèse vestibulaire semble la plus prometteuse.

La présence d'un déficit vestibulaire chez ces patients est connue depuis de nombreuses années (*Rousie et al. 1999*; *Sahlstrand et al. 1979*; *Wiener-Vacher & Mazda 1998*) mais il n'est pas établi si cette pathologie vestibulaire est la cause du syndrome scoliotique ou bien une conséquence tardive de cette anomalie squelettique et posturale. L'hypothèse d'une origine vestibulaire a été testée chez *Xenopus laevis* en réalisant une labyrinthectomie unilatérale en pré-métamorphique (*Lambert FM, Malinvaud D et al. 2009*). L'évaluation post-métamorphique en imagerie 2D et 3D du squelette a mis ainsi en évidence des déformations comparables à celles observées chez les patients scoliotiques. Il s'agissait là de la première démonstration du lien de causalité entre une asymétrie vestibulaire et la genèse d'une scoliose. Nous avons alors tenté d'expliquer les mécanismes physiopathologiques mis en jeu pour obtenir un tel résultat.

Une labyrinthectomie unilatérale provoque une asymétrie vestibulaire centrale qui se répercute dans les voies vestibulaires descendantes, et est responsable d'un syndrome postural et locomoteur. Chez les vertébrés terrestres, ce syndrome postural initial récupère en quelques jours, c'est la compensation vestibulaire (*Curthoys 2000*). Ce phénomène est dépendant essentiellement des entrées proprioceptives (notamment liées à la pesanteur). En milieu aquatique, ces informations sont absentes. Ainsi, l'asymétrie induite dans les voies vestibulo-spinales descendantes persiste, avec pour résultante un tonus musculaire asymétrique de part et d'autre du rachis. En conséquence, le squelette cartilagineux des têtards de grenouilles se déforme progressivement et conduit, après ossification des corps vertébraux, aux déformations scoliotiques. Ce défaut d'informations proprioceptives en milieu aquatique est l'élément qui permet de relier ce modèle animal à la pathologie humaine en considérant qu'un phénomène comparable se déroule in utero pendant la gestation. La permanence d'une asymétrie dans les voies descendantes vestibulo-spinales observée dans notre modèle animal *Xenopus laevis* (art.in prep) pourrait donc être à l'origine des anomalies observées chez les adolescents scoliotiques.

On peut alors imaginer qu'une rééducation précoce vestibulaire, facilitant le processus de compensation, permettrait de réduire l'action de ce déséquilibre nerveux sur les muscles paravertébraux, et pourrait limiter l'évolution des déformations osseuses. Une telle action n'est théoriquement possible qu'à un stade précoce du développement, lorsque les vertèbres ne sont pas encore totalement calcifiées, et à condition que les anomalies neurophysiologiques vestibulo-spinales n'aient pas engendré une asymétrie musculaire et vertébrale irrémédiable.

Au-delà des asymétries constatées au niveau des voies vestibulo-spinales (Gratacap M, 2010), nous proposons dans ce travail de nous intéresser aux anomalies anatomiques squelettiques, musculaires et osseuses, induites par une stimulation nerveuse asymétrique au cours de l'embryogenèse.

Les objectifs de recherche de ce travail ont été définis de la manière suivante :

- Quantifier précisément les déformations musculo-squelettiques (au stade osseux et cartilagineux) induites par une asymétrie vestibulaire. Pour cela :
 - o suivi de la croissance cartilagineuse des têtards en post-labyrinthectomie, in vivo, par un marquage en calcéine
 - o après ossification, réalisation de radiographies 2D par Faxitron (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris), de scanner 3D (Microscanner, Lariboisière) et holotomographie 2D et 3D (Synchrotron, ESRF, Grenoble)
- Par ailleurs, le « modèle de labyrinthectomie unilatérale » n'est pas exactement transposable en pathologie humaine. En effet, l'étude de jeunes adolescents scoliotiques montre un pourcentage élevé d'asymétrie vestibulaire avec des organes vestibulaires intacts sur le plan anatomique et fonctionnels, au moins partiellement (Sahlstrand et al. 1979; Wiener-Vacher 1998). Pour cela :
 - o Réalisation de lésions sélectives labyrinthiques unilatérales afin d'analyser leurs conséquences respectives sur le développement musculo-squelettique
- Enfin, nous formulons l'hypothèse d'une contraction asymétrique de la musculature axiale en réponse à cette asymétrie des voies vestibulo-spinales descendantes. Nous supposons que cette contraction musculaire asymétrique induit les déformations rachidiennes. De plus, il a été montré qu'une labyrinthectomie bilatérale chez le furet nouveau-né pouvait entraîner une altération quantitative (diminution du diamètre et de la vitesse de contraction) et qualitative (altération de la myogenèse) des fibres musculaires (Van Cleave et al. 2007). Pour cela, après labyrinthectomie unilatérale chez *Xenopus laevis* :
 - o Evaluation quantitative du volume des masses musculaires paravertébrales en holotomographie

- Evaluation qualitative de la composition des muscles paravertébraux par marquage musculaire de différents types de myosine en immunohistochimie

2. MATERIEL ET METHODES

A. Labyrinthectomie totale unilatérale et lésion sélective vestibulaire:

Le stade développemental a été identifié selon un atlas du développement pré- et post-embryonnaire chez *Xenopus laevis* (Nieuwkoop et Faber, 1994). Les animaux ayant atteint un stade compris entre 55 et 57 ont été anesthésiés dans une solution de MS-222 0,05% (acide 3-aminobenzoïque éthyl ester) préparée dans une solution de Ringer (NaCl : 75mM ; NaHCO₃ : 25mM ; CaCl₂ : 2mM ; KCl : 2mM ; MgCl₂ : 0,5mM ; glucose : 11mM ; pH 7,4). Toutes les labyrinthectomies et les dissections ont été réalisées dans une solution de Ringer oxygénée, sous microscope opératoire. Les labyrinthectomies unilatérales ont été pratiquées du côté gauche par convention. Après incision cutanée et levée d'un lambeau rectangulaire à charnière supérieure, la capsule otique est ouverte et l'ensemble du labyrinthe membraneux est retiré à l'aide d'une pince. Après rinçage, le lambeau cutané est rabattu sur le site d'incision pour favoriser la cicatrisation. Un syndrome postural et locomoteur apparaît dès le réveil de l'animal.

Concernant les lésions sélectives, les ablations du canal latéral ou de l'utricule ont été réalisées par le même abord chirurgical. Les structures labyrinthiques membraneuses étant étroitement connectées les unes aux autres, il apparaît extrêmement difficile de retirer sélectivement un organe otolithique en conservant intact le reste du vestibule. Le canal latéral reste la structure la plus accessible à une ablation partielle (résection de la portion la plus grande possible aux microciseaux coudés). Dans ce cas également, un syndrome vestibulaire statique et cinétique est visible au réveil.

Enfin, un dernier groupe contrôle a été opéré au même stade embryonnaire avec une ouverture seule de la capsule otique sans lésion du labyrinthe membraneux a priori.

L'ensemble des expérimentations animales a été réalisé sur des grenouilles *Xenopus laevis* dans le respect absolu des règles éthiques internationales, définies dans le texte « *Principles of Animal Care* » (publication No. 86-23, revised 1985, of the *National Institutes of Health*).

B. Analyse des déformations musculo-squelettiques induites :

1. *Marquage calcéine des cartilages in vivo*

Le marquage à la calcéine permet une visualisation non invasive et reproductible des tissus cartilagineux et osseux (Du et al, 2001) au cours du développement pré- et post-métamorphique. Dans notre étude, la calcéine (Sigma) a été directement dissoute dans l'eau filtrée à une concentration de 0,2% (pH 7,4). Les larves de *Xenopus laevis* du stade 55 à 66 étaient maintenues dans cette solution pendant 2 heures puis abondamment rincées. La visualisation des cartilages était ensuite réalisée grâce à une loupe binoculaire à fluorescence. Un premier marquage de référence est réalisé à J0 (à un stade compris entre 55 et 58) puis, après avoir réalisé une labyrinthectomie totale gauche, un suivi régulier est effectué jusqu'en post-métamorphique (J0, S1, S2, S3, S4, S8) afin de dépister des déformations squelettiques précoces dès le stade cartilagineux.

2. *Radiographies 2D par Faxitron (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris)*

Un contrôle radiographique est réalisé sur les Xénopes en post métamorphique afin de vérifier la présence de déformations vertébrales évocatrices de scoliose. En effet, Lambert et al. (2009)

ont montré qu'une fois la métamorphose passée, les vertèbres s'ossifient ce qui permet aux déformations squelettiques de devenir visibles radiologiquement.

3. *Synchrotron et holotomographie (ESRF, Grenoble)*

3.1 Principes d'un synchrotron :

Les 3 plus grands synchrotrons du monde



APS, USA



ESRF, Grenoble



Spring-8, Japon

a) L'ESRF :

L'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) est un projet européen impliquant 19 pays, débuté en 1994 et dont le site est à Grenoble. Sa fonction est celle d'un « supermicroscope », en effet, la lumière synchrotron extrêmement brillante de l'ESRF possède des propriétés inégalées pour l'exploration des biomolécules, nanomatériaux, catalyseurs en action, fossiles ou objets précieux du patrimoine. La lumière synchrotron est produite lorsque des électrons de haute énergie, circulant dans un anneau de stockage, sont déviés par des champs magnétiques. Elle correspond à un faisceau de rayons X de très forte brillance (1000 milliards de fois plus brillant que le faisceau de rayons X produit par un appareil de radiographie hospitalier classique).

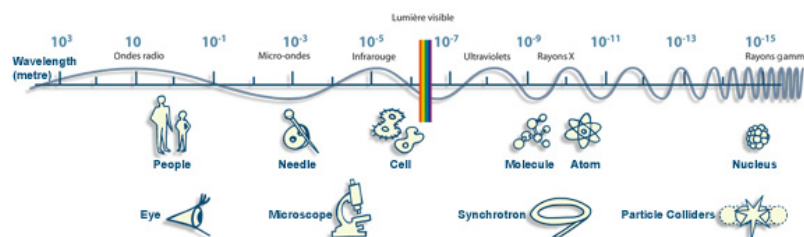


Tableau 1 : Les différents rayonnements et les structures biologiques qu'ils permettent de visualiser.

b) Fonctionnement du synchrotron :

Les électrons sont d'abord émis par un canon à électrons puis accélérés dans un accélérateur linéaire (ou linac) où ils sont regroupés sous forme de "paquets", et progressivement accélérés par un champ électrique, à l'intérieur d'une chambre à vide. Ils atteignent ainsi rapidement une vitesse très proche de celle de la lumière. Ils sont alors transmis à un accélérateur circulaire (booster synchrotron) de 300 mètres de circonférence. En effet, avant d'entrer dans l'anneau de stockage, les électrons doivent

atteindre leur énergie finale, 6 milliards d'électronvolts (GeV), ce qu'ils réalisent en 50 millisecondes. Le booster contient des cavités accélératrices ainsi que des aimants de courbure. Les aimants forcent les électrons à suivre une trajectoire courbe. La force du champ magnétique doit être augmentée progressivement de façon synchronisée avec la montée en énergie des électrons, ce qui explique le nom de "synchrotron" donné à ce type d'accélérateur. Ces électrons de haute énergie sont ensuite injectés dans un anneau de stockage (844m de circonférence) où ils circulent à l'intérieur d'un tube dans lequel règne l'ultravide (environ 10^{-9} mbar), à vitesse constante (celle de la lumière), pendant plusieurs heures.. Ce faisceau est ensuite utilisé au niveau des lignes de lumière (42 fonctionnant 24heures/24, 7jours/7) qui jalonnent l'anneau de stockage.

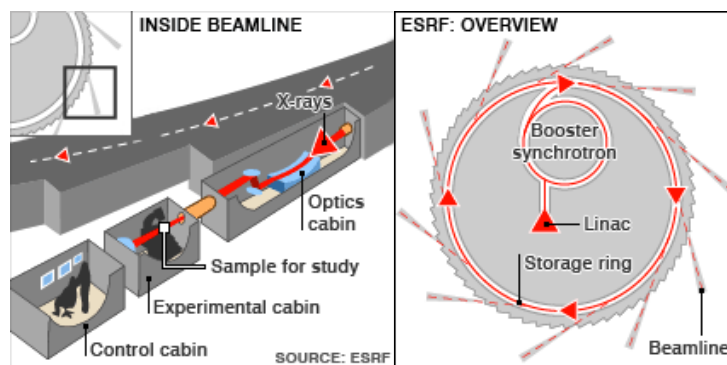


Tableau 2 : Fonctionnement du synchrotron

2. Principes de l'holotomographie :

L'indice de réfraction pour les rayons X durs (longueur d'onde $\lambda=0,69\text{\AA}$ sur la ligne de lumière ID19 de l'ESRF) est très proche de 1. De plus, la phase optique d'un faisceau est affectée par son passage à travers un objet. Si le faisceau est cohérent (particules de même énergie avec une direction commune), des images de phase peuvent ainsi être obtenues en mesurant la propagation de celui-ci au travers d'un objet donné. Cependant, contrairement à l'absorption, la phase n'est pas liée simplement à la composition atomique de l'objet mais à la présence d'interphase entre des milieux d'indice de réfraction différent.

La lumière synchrotron permet ainsi d'obtenir des images en absorption correspondant à une radiographie classique en 2D, mais également d'obtenir une tomographie quantitative de phase (ou holotomographie) dont le signal est proportionnel à la densité d'électrons et peut aboutir à des reconstructions en 3 dimensions. La procédure de reconstruction holographique combine des images prises à différentes distances de l'objet ce qui permet d'obtenir une cartographie quantitative de phase et, par association à une reconstruction 3D, l'holotomographie, on obtient une cartographie 3D complet de la densité de l'objet.

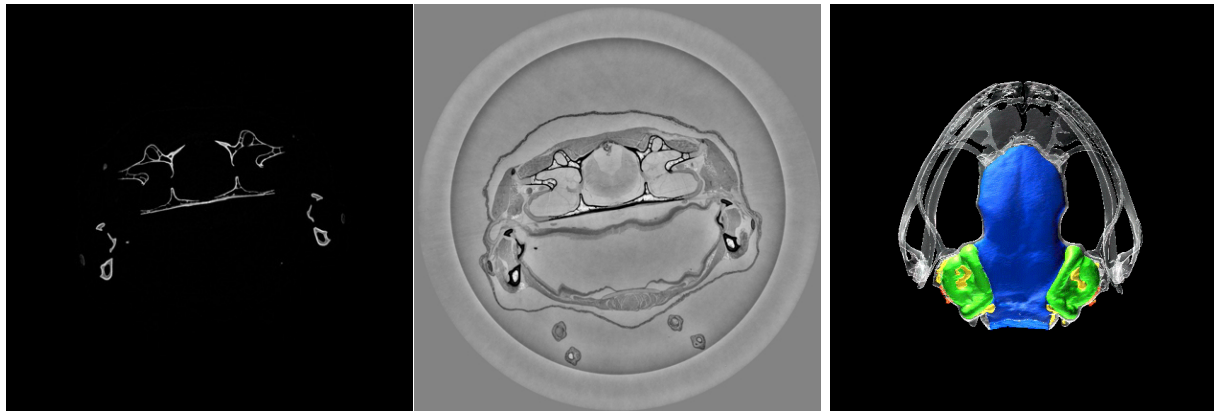
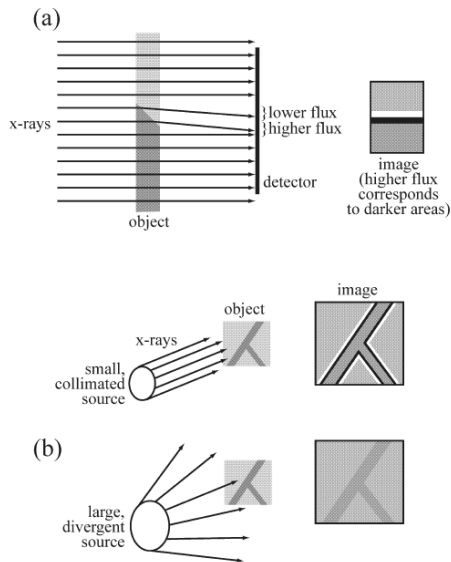


Tableau 3 : Visualisation en holotomographie d'une tête de grenouille en absorption (à gauche), en phase (au centre) et après reconstruction 3D (à droite)



One of the very first comparisons of 'absorption' (sample to detector distance = 6 mm) and 'phase contrast' (same distance = 1 m) images of a human vertebra, recorded on BM05, at 19 keV, in 1994 (P. Cloetens, M. Salomé *et al*, Highlights 1994/1995).

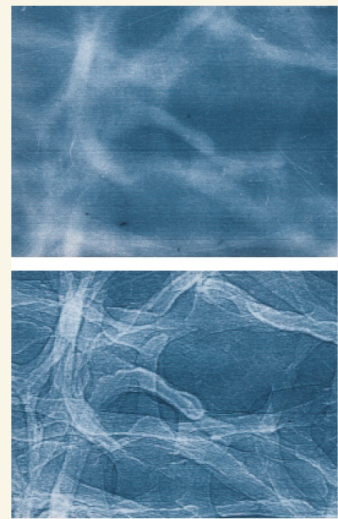


Tableau 4 : Principe de l'holotomographie : visualisation par un détecteur de la déviation d'un faisceau de rayons X après passage au travers d'un objet (a) et première images publiées de travées osseuses en absorption (en haut) et contraste de phase (en bas) (Cloetens, 1994).

3. Réalisation des holotomographies :

Dans le cadre de l'expérience MD633, nous avons amené à l'ESRF vingt-quatre grenouilles de type *Xenopus laevis*, toutes fixées dans le paraformaldéhyde (PFA) 4% et repertoriées. Parmi celles-ci, quatre témoins non opérés non tordus (codés XLCO) et vingt xénopes ayant subi une hémilabyrinthectomie gauche non sélective (codés HLX). Pour chaque xénope, il a été réalisé une tomographie en absorption puis en phase à 2 distances fixées arbitrairement à 10 cm (distance 1) et 1 mètre (distance 2). Chaque échantillon était fixé dans le PFA 4% dans un tube plastique transparent non radio-opaque, ce tube étant scellé sur le plateau de rotation à la sortie de la ligne de lumière ID19. Nous avons réalisé, par ailleurs, des tomographies d'un tube dit « Fantôme » permettant d'assurer l'étalonnage des mesures d'absorption et de contraste de phase.

4. Analyse des données :

A. Rendre les données exploitables : ImageJ

Le volume de données à analyser dépassant plusieurs teraoctets, il n'a pas été possible de les rapatrier physiquement depuis l'ESRF. Le rapatriement des fichiers s'est effectué en les téléchargeant directement depuis un serveur de stockage sécurisé de l'ESRF (protocole SSH).

Chaque scanner rapatrié est composé de 7 fichiers de volumes (depuis l'extrémité rostrale à l'extrémité caudale de l'animal) dont la taille du pixel est de 7,6 μm . Les données sont codées en « vfloat », c'est-à-dire avec des valeurs décimales, en 32 octets. Ces valeurs intermédiaires « vfloat » ont nécessité un recadrage en « vraw », 8 octets par l'intermédiaire du logiciel ImageJ. Ce recadrage en fichiers « .raw » permet d'avoir un format plus adapté aux logiciels de visualisation et de reconstruction tels qu'Amira®. Dans un second temps, une diminution de la taille du fichier « .raw » est nécessaire afin de permettre une utilisation optimale d'Amira 5.2® avec des temps de calcul acceptables.

A partir d'ImageJ :

- a) Visualiser le fichier
 - Import > Raw > sélectionner le fichier
 - Menu Image > Type : 32bit signed => 8bit
 - Little-endian-byte order
 - Préciser la taille du fichier (2048/2048)
- b) Réduction de taille du fichier
 - Sélectionner 256 images
 - Menu Image > Scale > Edit > x = 0,5 y = 0,5 z = 0,5
 - Interpolation > Bilinear
 - Puis Save as > Raw data

On obtient ainsi des fichiers « .raw » en 1024 par 1024 comptant 128 images. Chaque scanner de xénope est composé de 7 fichiers qu'il faut concaténer afin de pouvoir utiliser le scanner « corps entier » dans Amira® pour les reconstructions. Pour cela, après avoir ouvert et réduit des 7 fichiers « .raw » dans ImageJ® :

- Menu Image > Stacks > Tools > Concatenate (dans un ordre cohérent)

On obtient, alors, des fichiers « .raw » 1024 par 1024 comptant 788 images correspondant à un scanner « corps entier » en absorption ou en phase.

B. Analyse qualitative et quantitative des données : ImageJ et Amira®

a) *Mesure de la « densité minérale osseuse » : ImageJ*

- Sélectionner l'image dans ImageJ® (à partir de scanner d'absorption uniquement)
- Sélectionner la région osseuse de mesure avec la « baguette »

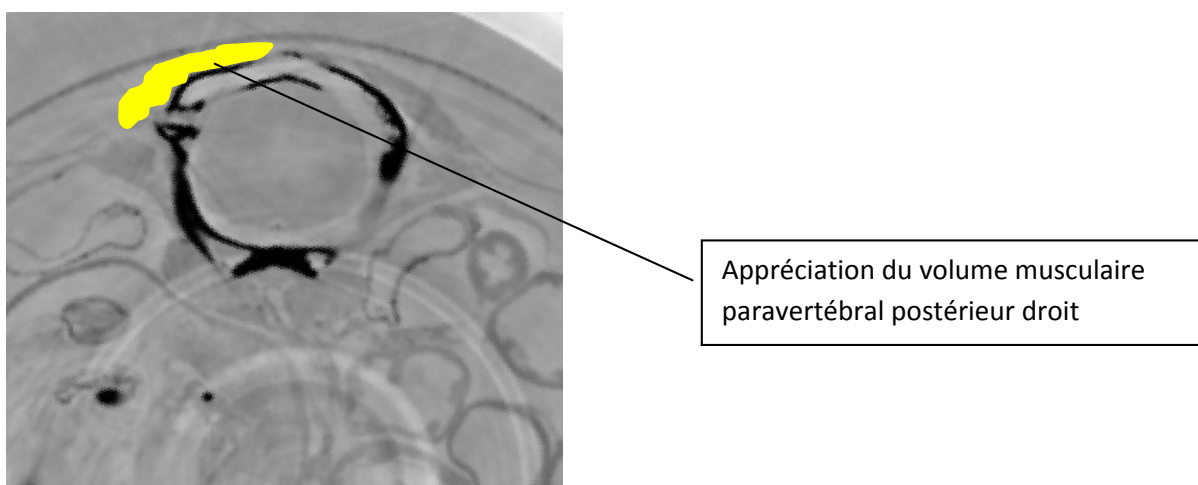
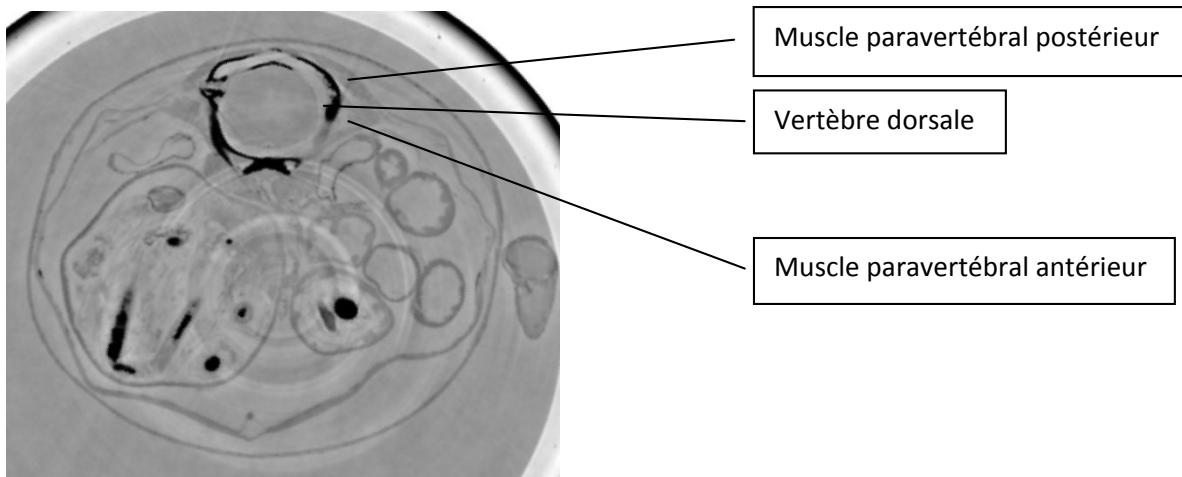
- Menu Sets Measurements > Area (calculée en pixel carré) + Min Max Gray Value + Integrated density

Le module « Integrated Density » réalise le calcul de deux valeurs : « IntDen » soit le produit de Area (en pixel carré) par Mean Gray Value et « RawIntDen » soit la somme des valeurs des pixels de la surface sélectionnée. La « densité minérale osseuse » (DMO) correspond au produit de « RawIntDen » par « Area ». Cependant, ce calcul n'est pas réalisable sur les clichés d'holotomographie. En effet, afin d'obtenir une meilleure définition des tissus mous en holotomographie, la valeur zéro a été attribuée arbitrairement à l'os. Le calcul de cette « DMO » n'est alors réalisable que sur les scanners d'absorption.

Par ailleurs, pour chaque sujet, la DMO est mesurée à deux localisations différentes : l'angle mandibulaire et le corps vertébral. Ceci permet de comparer un os « périphérique » a priori sain à un os « central » potentiellement impliqué dans la déformation squelettique rachidienne.

b) Mesure du volume musculaire paravertébral : ImageJ®

Sur des scanner d'holotomographie en coupes axiales, on mesure les volumes musculaires paravertébraux.



Cependant, les artéfacts d'absorption dus à l'os vertébral hyperdense rendent difficiles l'appréciation exacte des limites des faisceaux musculaires que l'on doit contourner pour en apprécier le volume. Ceci entraîne une approximation trop importante des mesures et n'est pas compatible avec une comparaison statistique du volume musculaire paravertébral entre les animaux lésés et les témoins. Il faut ainsi se contenter d'une étude qualitative et non quantitative des volumes musculaires.

c) *Etude qualitative des déformations squelettiques : Amira®5.2*

L'utilisation du logiciel Amira®5.2 permet de réaliser une analyse 3D des scanners d'holotomographie selon différentes méthodes.

Dans Amira®5.2 :

- Open Data > choisir le scanner
- Choisir les paramètres Read complete volume into memory
Data type : byte 1
Dimensions : 1024 x 1024 x 788
- Puis 3 outils sont utilisables = Orthoslice xy / xz / yz (dans les 3 plans de l'espace)
Isosurface
Vortex

« *Orthoslice* » permet une visualisation 3D en extrayant, de manière arbitraire, une coupe axiale, frontale ou sagittale du volume étudié. Les données sont ici codées en niveaux de gris. La technique de visualisation consiste à utiliser une échelle linéaire de gris bordée par deux valeurs seuils.

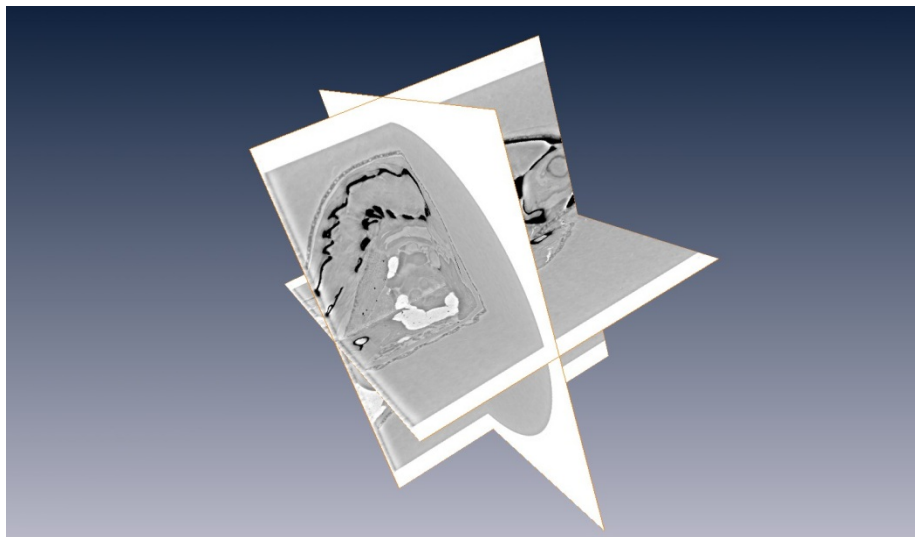


Tableau 5 : Orthoslice

« *Isosurface* » est un module calculant une isosurface (ou courbes de niveaux des voxels de même valeur) à l'intérieur d'un champ scalaire 3D avec des coordonnées cartésiennes. Les données haute résolution sont « *downsampled* » pour réduire le nombre de polygones produits. De plus, une méthode interne de réduction de polygone permet de fusionner jusqu'à 50% des triangles issus de la triangulation originale, diminuant ainsi le nombre de polygones.

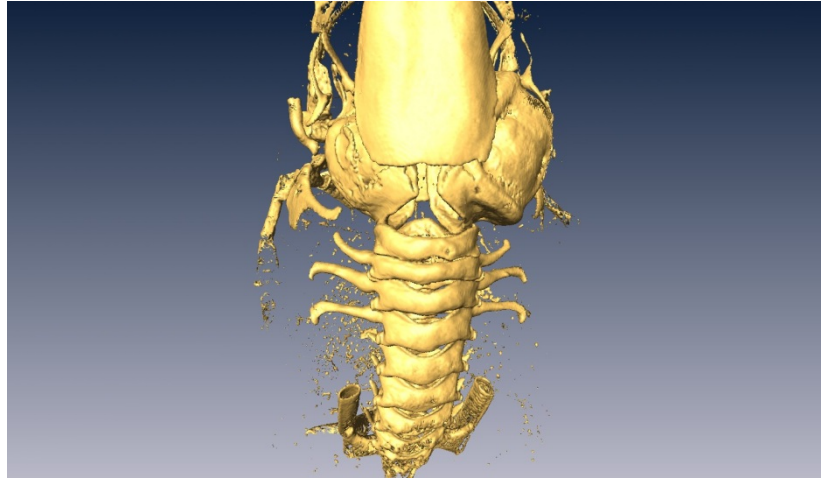


Tableau 6 : Isosurface

« *Voltex* » ou « Direct Volume Rendering » est une méthode de visualisation 3D de champs scalaires. Chaque point du volume étudié est supposé émettre et absorber de la lumière. La quantité et la couleur de la lumière émise ainsi que le degré d'absorption est déterminé sur une échelle de couleurs. La projection résultant du volume étudié est ainsi calculé.

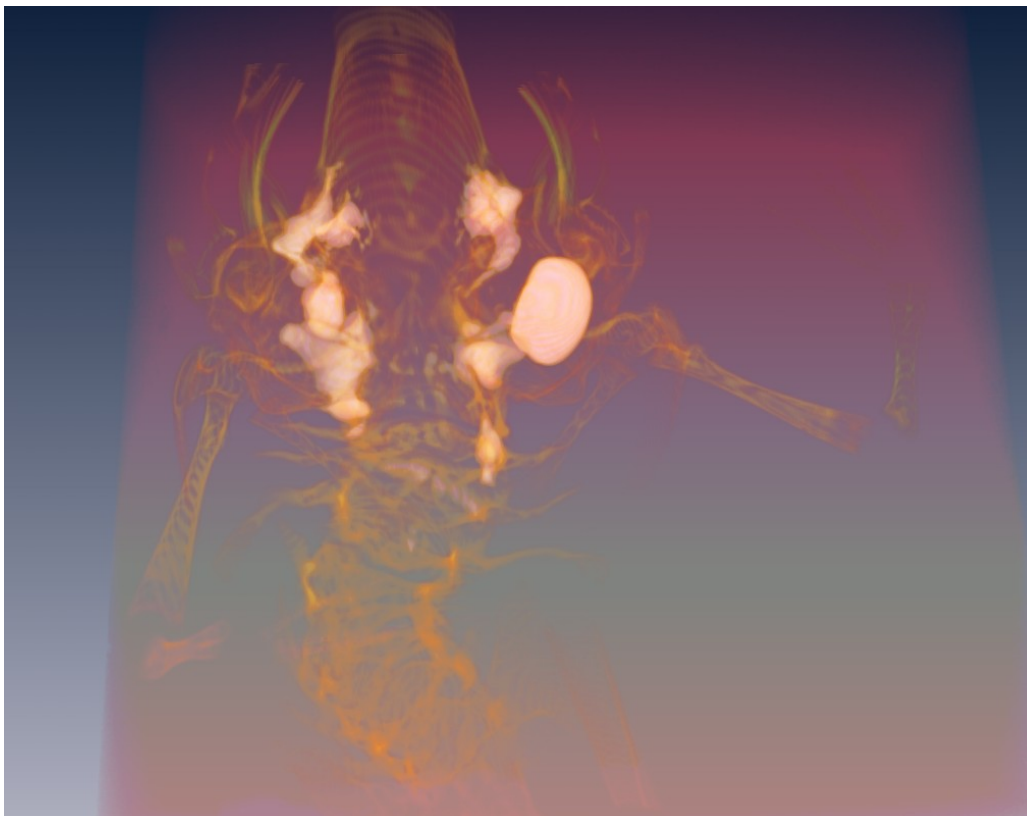


Tableau 7 : Voltex

4. Marquage musculaire des muscles paravertébraux

Prélèvements et coupe des tissus. Les animaux sont sacrifiés à 6 semaines post-chirurgie. Les 10 premiers segments de la queue (future colonne vertébrale chez l'adulte) sont prélevés et fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4%. Après déshydratation progressive dans des bains d'éthanol (70°, 95°, 100°) le tronçon de queue est inclus dans un bloc de ParaPlaste. Les coupes axiales de queue d'une épaisseur de 10µm sont effectuées le long de l'axe rostro-caudal à l'aide d'un microtome.

Immunohistochimie. La répartition gauche/droite des différents types de fibre musculaire des myotomes a été étudiée par marquage avec les anticorps S58 (fibres lentes de chaînes lourdes myosine) et F59 (fibres rapides de chaînes lourdes de myosine) dilués au 1/100. Ainsi, les coupes axiales de queue sont déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de toluène et d'éthanol (100° puis 95°). On réalise ensuite le démasquage des épitopes dans un bain d'acide citrique (à pH=2) chauffé à plusieurs reprises au micro-onde (à 600W). L'incubation avec l'anticorps primaire, pendant une nuit à température ambiante, est effectuée après une saturation par un mélange PBS/BSA à 1%. On rajoute alors l'anticorps secondaire (Alexa 488 goat anti-mouse). La révélation peut être faite après 45 minutes, 3 lavages dans le PBS et un montage avec Vectashield® ou un mélange moviol/DAPI. Par ailleurs, on réalise un témoin n'ayant reçu que l'anticorps secondaire afin d'identifier le « bruit de fond » éventuel dû à Alexa 488 goat anti-mouse.

3. RESULTATS

A. Lésions et radiographies :

Les larves de Xénopes présentent toutes, après labyrinthectomie radicale ou lésion sélective vestibulaire, un syndrome vestibulaire postural (cf figure) et locomoteur au réveil.



Tableau 8: Réalisation d'une labyrinthectomie gauche chez un têtard de *Xénopus laevis* au stade 57 (photos du haut) et syndrome vestibulaire postural post-opératoire (photo du bas).

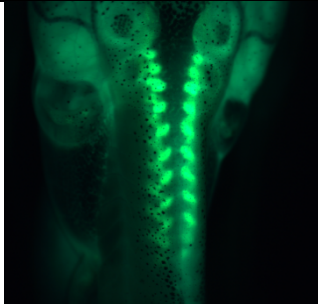
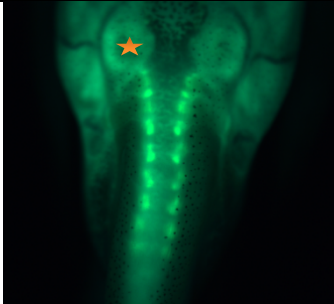
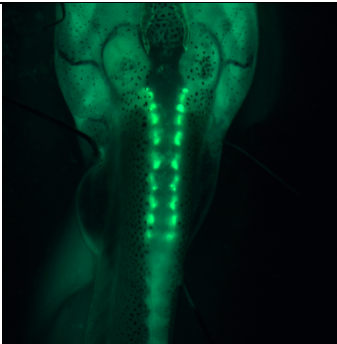
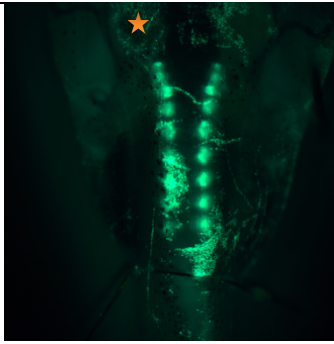
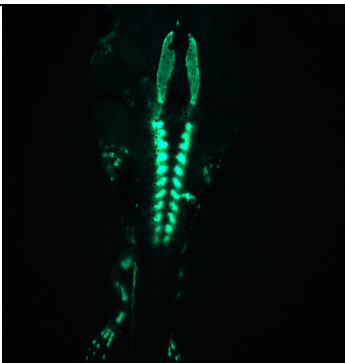
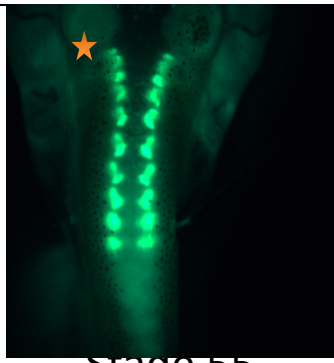
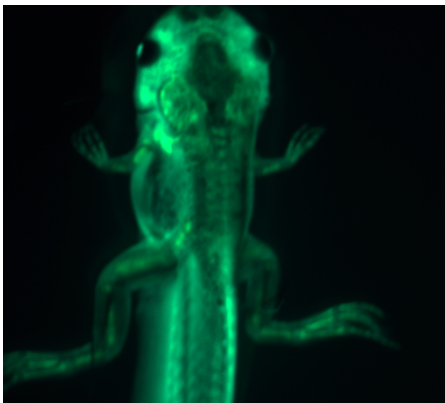

L'ensemble des expériences aux différents temps post-lésionnels a été réalisé sur les têtards présentant les syndromes vestibulaires les plus prononcés. Un contrôle radiographique a été effectué pour tous les Xénopes en post-métamorphique afin de mettre en évidence et de confirmer la présence de déformations vertébrales typiques. En effet, une fois la métamorphose passée, les vertèbres s'ossifient et les déformations rachidiennes deviennent visibles radiologiquement (Lambert, Malinvaud et al. 2009). Dans notre étude, certaines séries de Xénopes opérés présentaient un taux de scoliose proche de 100%, alors que d'autres séries ne montraient qu'un faible pourcentage de déformation (10%). Il faut noter également qu'une part non négligeable des têtards décède pendant la métamorphose, ceci étant prévenu au maximum en opérant dans une période comprise entre les stades 55 et 58.

Concernant les lésions sélectives réalisées (exérèse sub-totale du canal semi-circulaire latéral gauche ou lésion utriculaire), bien qu'un syndrome vestibulaire ait été observé systématiquement en post-opératoire, aucune déformation scoliotique n'a été mise en évidence en post-métamorphique. Par ailleurs, le caractère sélectif des lésions ne peut être affirmé du fait des liens anatomiques étroits entre les différentes structures du labyrinthe membraneux. D'autres procédures doivent être développées (canal-plug...).

B. Suivi précoce des déformations squelettiques en calcéine :

Le marquage des cartilages par la calcéine chez les têtards opérés a permis de mettre en évidence la survenue précoce de déformations rachidiennes dès 10 jours post-opératoires. Ces déformations évoluant à l'âge adulte vers une pathologie scoliotique caractéristique. Ce suivi précoce met également en évidence un retard de croissance significatif et systématique chez tous

les têtards opérés. Une perturbation de l'homéostasie calcique en post-opératoire pourrait être une explication possible. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

	Témoins	HLX
Jo Stade 55		
	ANESTHESIE	ANESTHESIE+CHIRURGIE
S1	 Stade 55	 Stade 55
S2	 Stade 57	 Stade 55
S3		


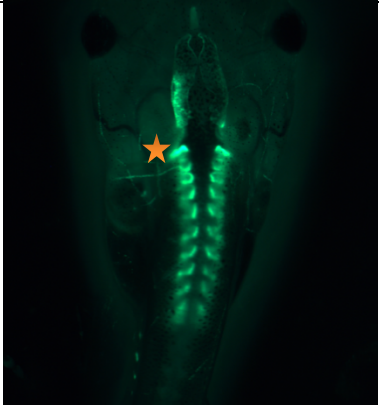
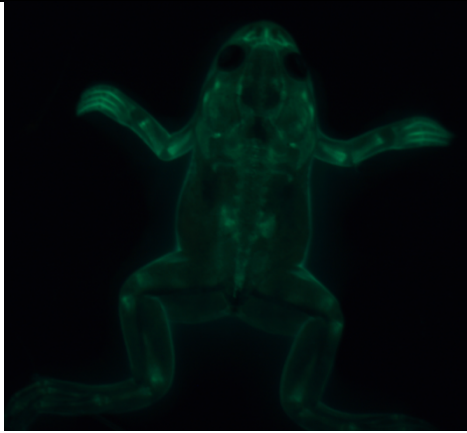
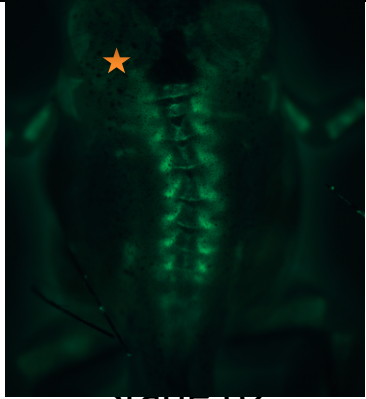
	Stade 61	Stade 56
S4	 <p>Stade 63</p>	 <p>Stade 57</p>
S8	 <p>Adulte</p>	 <p>Stade 62</p>

Tableau 9: Suivi de l'apparition précoce de déformation rachidienne au stade cartilagineux pré-métamorphique après labyrinthectomie gauche. A gauche, têtard-témoin ayant été simplement anesthésié dans du MS-222 pendant 20 minutes. A droite, têtard opéré d'une labyrinthectomie gauche (★) puis suivi en calcéine.

C. Confirmation des déformations osseuses rachidiennes en radiographie 2D (Faxitron) :

Le suivi en calcéine des déformations rachidiennes trouve ses limites en post-métamorphique où l'épaisseur et la pigmentation cutanée ainsi que le mauvais signal en calcéine de l'os rendent difficile l'appréciation correcte de la statique rachidienne. Une évaluation « classique » du squelette rachidien en radiographie standard permet alors de confirmer la scoliose au stade adulte.

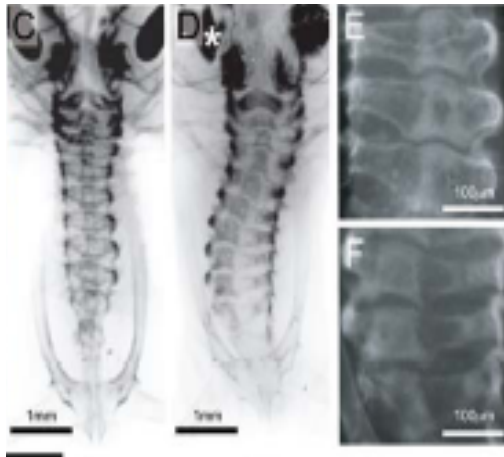


Tableau 10 : clichés Faxitron d'un sujet témoin (à gauche) et opéré scoliotique (à droite)

D. Analyse en holotomographie des déformations rachidiennes post-labyrinthectomie unilatérale:

a) Etude qualitative :

	TEMOIN	HLX
EXTREMITE CEPHALIQUE	<div data-bbox="193 1357 424 1413" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Capsule otique</div> <div data-bbox="531 1357 815 1413" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Organe otolithique</div>	<div data-bbox="938 1323 1449 1413" style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Reliquat otolithique avec lésion post-chirurgicale de la capsule otique</div>
CAPSULE OTIQUE		

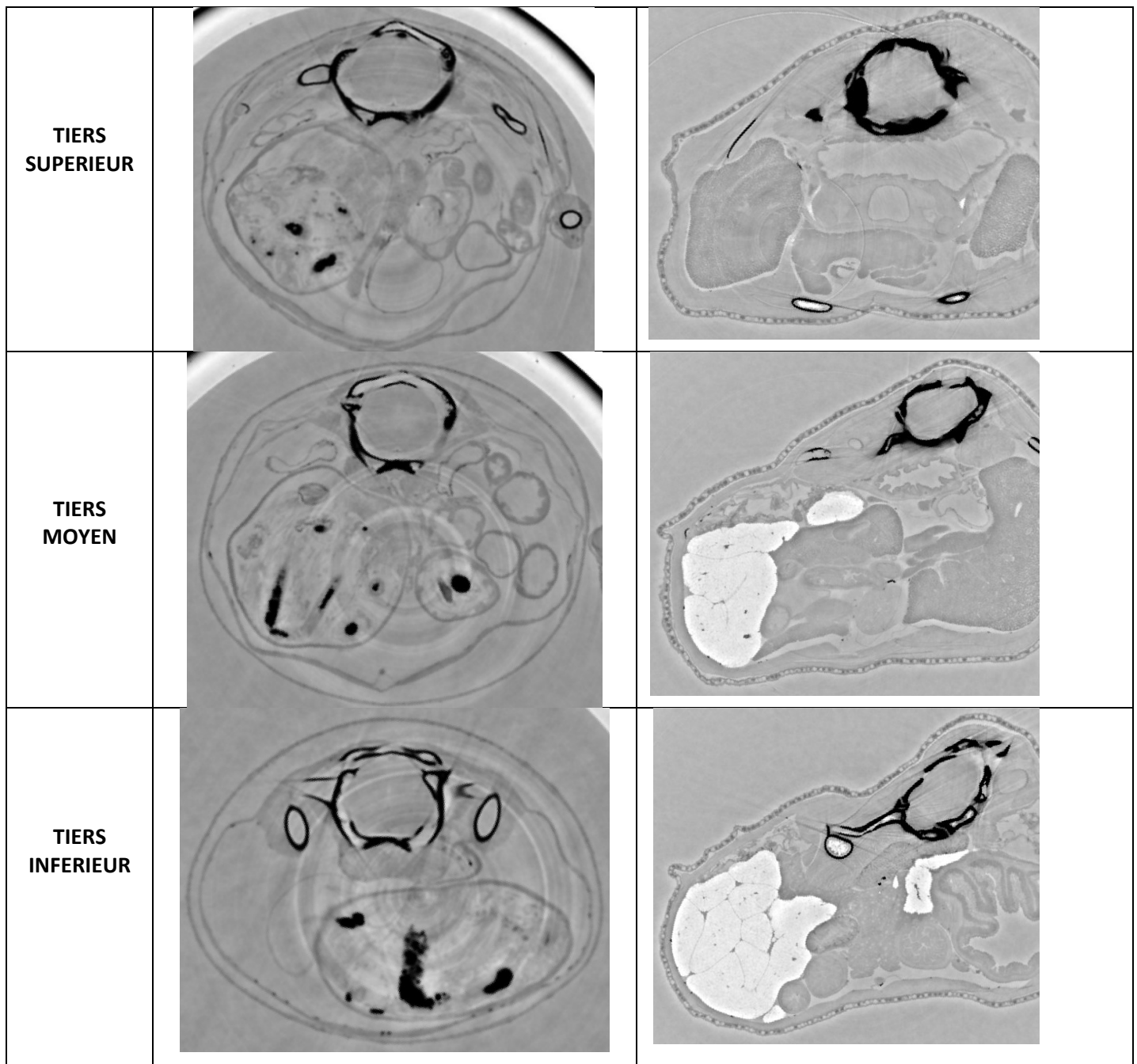


Tableau 11 : Evaluation en holotomographie des déformations rachidiennes chez un sujet-témoin (à gauche) et chez un sujet opéré d'une labyrinthectomie gauche (à droite). On observe ainsi la lésion labyrinthique gauche et la déformation musculo-squelettique qui en résulte chez le sujet opéré.

On observe ainsi en holotomographie, en coupes axiales, des images d'un rendu quasi-histologique permettant une analyse précise des différentes structures anatomiques du Xénope. L'holotomographie est ainsi particulièrement indiquée pour les tissus mous (muscle, viscères...) tandis que les séquences en absorption semblent les plus adaptées à l'étude des structures à fort potentiel d'absorption telles que l'os et les organes otolithiques.

Pour chaque sujet, une étude qualitative est réalisée recherchant une asymétrie droite-gauche éventuelle au niveau de la morphologie de l'oreille interne (capsule otique et otolithes), du volume musculaire paravertébral et de la statique rachidienne. Cette étude s'appuie sur les holotomographies et les reconstructions 3D qui en résultent.

	Capsule otique	Otolithes	Masses musculaires		Déformations rachidiennes
			Déformation	Reste du corps	
HLX 121D	Hypotrophie G	Résiduels G	Hypertrophie D	G=D	Convexité +++ gauche et gibbosité
HLX 123Abis	G=D	G = D	Hypertrophie D	G=D	Convexité +++ gauche et gibbosité
HLX 123B	G=D	G=D	Hypertrophie modérée D	G=D	Convexité + gauche Pas gibbosité
HLX 124A	Hypotrophie G	Résiduels G	Hypertrophie modérée G	G=D	Convexité + droite Pas gibbosité
HLX 124B	Hypotrophie G	Résiduels G	Hypertrophie D	G=D	Convexité +++ gauche et gibbosité
HLX 124C	Hypotrophie G	Quasi-absence d'otolithes G	G=D	G=D	Pas de scoliose
HLX 124D	G=D	G=D	G=D	G=D	Pas de scoliose
HLX 124E	Hypotrophie G	Résiduels G	Hypertrophie D	G=D	Convexité +++ gauche et gibbosité
HLX 124F	G=D	Résiduels G	G=D	G=D	Convexité + gauche Pas gibbosité
HLX 124G	G=D	G=D	G=D	G=D	Convexité + gauche Pas gibbosité
HLX 124H	Hypotrophie G	Résiduels G	G=D	G=D	Pas de scoliose

Tableau 12 : Etude qualitative de la déformation rachidienne, du volume musculaire paravertébral au niveau ou non de la déformation, de la morphologie de l'oreille interne et du volume otolithique chez des Xénopes opérés scoliotiques ou non.

Les sujets opérés, lorsqu'ils sont tordus, présentent une déformation scoliotique typique dans les trois plans de l'espace (cf figure). Ceux-ci ont une hypotrophie importante de la capsule otique gauche avec quelques reliquats otolithiques à l'intérieur au maximum (cf figure). L'appréciation qualitative du volume musculaire paravertébral ne retrouve pas d'asymétrie le long du rachis à l'endroit où il n'y a pas de déformation. Au niveau de la déformation scoliotique, il semble exister une asymétrie du volume musculaire avec la plupart du temps une hypertrophie paravertébrale droite. La déformation rachidienne semble d'autant plus importante que l'asymétrie droite-gauche de développement vestibulaire est prononcée (cf tableau).

Il existe, cependant, quelques cas d'asymétrie vestibulaire patente sans déformation scoliotique associée (cf tableau).

On note, également, la persistance du sac endolymphatique chez les sujets opérés quand bien même le reste de l'oreille interne est hypotrophe.

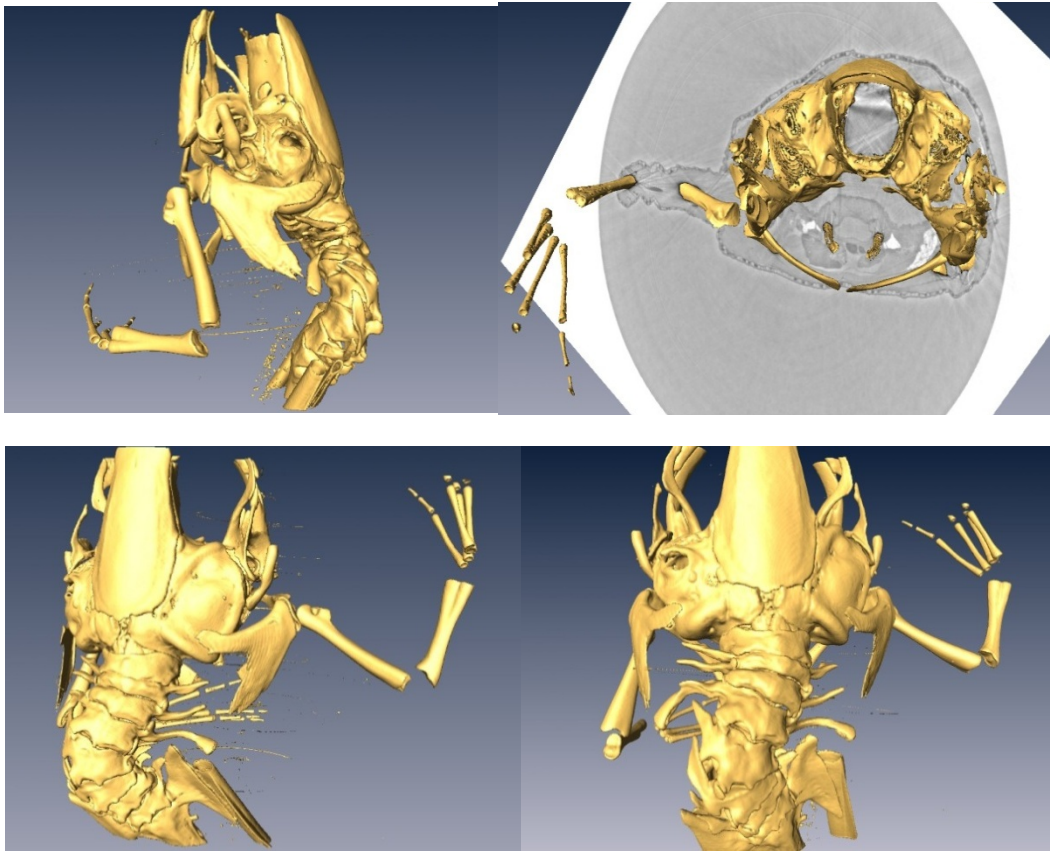


Tableau 13 : Reconstruction trois dimensions du Xénope HLX121D. Mise en évidence de la déformation rachidienne dans les trois plans de l'espace après labyrinthectomie gauche.

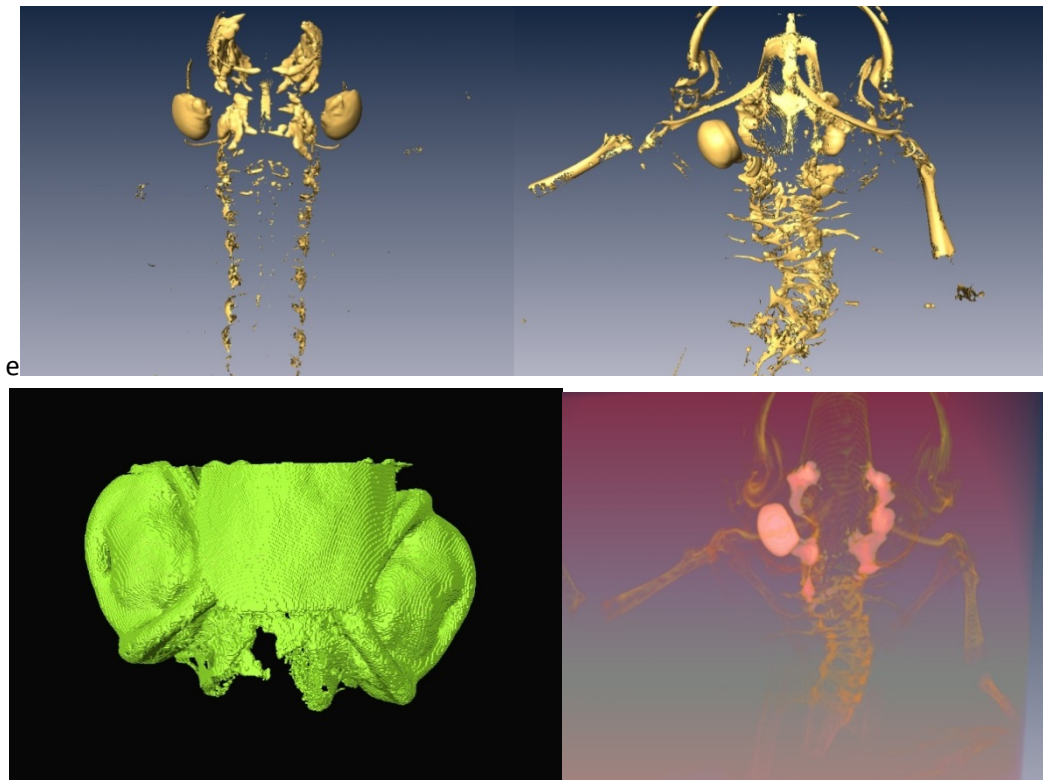


Tableau 14 : En haut => étude des otolithes en contraste de phase 3D montrant, à gauche, un sujet-témoin et, à droite, un sujet opéré et scoliotique présentant une asymétrie otolithique évidente avec une quasi-absence d'otolithes à gauche. En bas => reconstruction 3D de la capsule otique d'un sujet témoin (à gauche) et mise en contraste des otolithes chez un sujet opéré et scoliotique en Voltex.

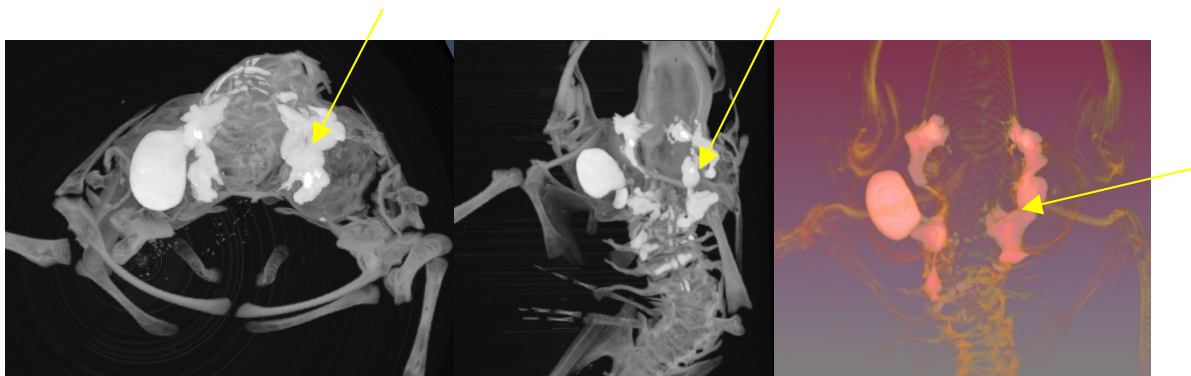


Tableau 15 : Mise en évidence du sac endolymphatique (→) dont le développement ne semble pas affecté par la labyrinthectomie gauche.

b) Etude quantitative :

- Mesure des volumes musculaires paravertébraux (en holotomographie) => en raison d'artéfacts dus à l'absorption osseuse importante des rayons X au niveau vertébral, il apparaît impossible de contourer avec précision les masses musculaires paravertébrales de manière à obtenir des mesures fiables exploitables sur le plan statistique.
- Mesure de la densité minérale osseuse (en contraste de phase)

	Localisation	Area	Mean	Min	Max	IntDen	RawIntDen	DMO
HLX SCOLIOTIQUES								
HLX121D	mandibule	79	128,582	60	147	10158	10158	128,582
	vertèbre	104	115,481	77	130	12010	12010	115,481
	otolithe	2928	221,646	192	235	648980	648980	221,646
HLX123ABis	mandibule	30	132.300	79	144	3969	3969	132.300
	vertèbre	28	103.929	70	125	2910	2910	103.929
	otolithe	3016	229,422	190	252	691937	691937	229,422
HLX124B	mandibule	72	121,25	89	132	8730	8730	121,25
	vertèbre	160	86,662	38	1311	13866	13866	86,662
	otolithe	1428	228,466	191	244	326250	326250	228,466
HLX NON SCOLIOTIQUES								
HLX124C	mandibule	28	103,071	36	124	2886	2886	103,071
	vertèbre	42	89,976	57	110	3779	3779	89,976
	otolithe	2745	227,101	195	246	623391	623391	227,101
HLX124D	mandibule	72	113,653	75	123	8183	8183	113,653
	vertèbre	72	110,514	88	127	7957	7957	110,514
	otolithe	2624	230,743	210	242	605470	605470	230,743
TEMOINS								
XLCO0410B	mandibule	45	112,044	102	119	5042	5042	112,044
	vertèbre	50	84,8	53	101	4240	4240	84,8
	otolithe	1175	231,477	197	241	271986	271986	231,477
XLCO1110A	mandibule	45	86,911	77	97	3911	3911	86,911
	vertèbre	60	65,417	51	85	3925	3925	65,417
	otolithe	792	233,051	194	247	184576	184576	233,051
XLCO1110Bbis	mandibule	42	92	47	112	3864	3864	92
	vertèbre	55	68,145	53	83	3748	3748	68,145
	otolithe	1560	238,067	204	248	371384	371384	238,067

Tableau 16 : Mesure des différents paramètres sur des clichés de contraste de phase permettant d'apprécier la « DMO » au niveau vertébral, mandibulaire et otolithique dans trois groupes de Xénopes : opérés et scoliotiques, opérés non scoliotiques et témoins (non opéré non scoliotique).

	VERTEBRE	MANDIBULE	OTOLITHE
HLX tordus	102,024	127,38	226,511
HLX non tordus	100,245	108,362	228,922
Témoins	79,952	96,985	234,19

Tableau 17 : Mesure de la densité minérale osseuse (DMO) moyenne dans les trois groupes : opérés et scoliotiques, opérés non scoliotiques et témoin (non opérés, non scoliotiques).

On observe, chez les sujets opérés et tordus, une DMO moyenne au niveau vertébral nettement supérieure à celle des sujets témoins. Cette observation est également valable pour l'os mandibulaire. La valeur de la DMO moyenne otolithique semble, quant à elle, peu variée entre les groupes. Au cours de la procédure chirurgicale, labyrinthectomie totale gauche, la poche crayeuse (réserve importante de calcium pour la métamorphose) est retirée en totalité. Il semble produire, en réponse à cette perturbation majeure du métabolisme calcique pré-métamorphique, une redistribution du calcium avec une « hyperossification » à la fois du squelette central (vertèbre) et périphérique (mandibule). Les valeurs retrouvées chez les sujets opérés et non tordus, sont intermédiaires (supérieures aux témoins et inférieures aux scoliotiques) ce qui suggère une implication de l'intervention chirurgicale dans la redistribution calcique avec une « hyperossification » plus importante en cas de scoliose.

E. Marquage musculaire des muscles paravertébraux en immunohistochimie:

La possibilité d'une asymétrie gauche-droite dans l'expression de deux types de chaînes lourdes de myosines (F59, fibre adulte rapide ; S58, fibre adulte lente) a été étudiée par histologie immuno-histochimique au niveau des masses musculaires paravertébrales. Le niveau d'expression de ces chaînes lourdes de myosines a été ainsi quantifié en appréciant le signal fluorescent de l'anticorps secondaire (Alexa 488 goat anti-mouse) dans les myotomes gauches et droits sur les coupes transversales de queue de têtards.

L'analyse qualitative de l'intensité de marquage différentielle gauche-droite n'a pas révélé d'asymétrie significative dans l'expression de ces deux types de myosines à 6 semaines post-lésionnelles. Cependant, il semble exister une asymétrie des aires des myotomes au niveau du maximum de déformation rachidienne, ce qui corrobore les observations réalisées en holotomographie.

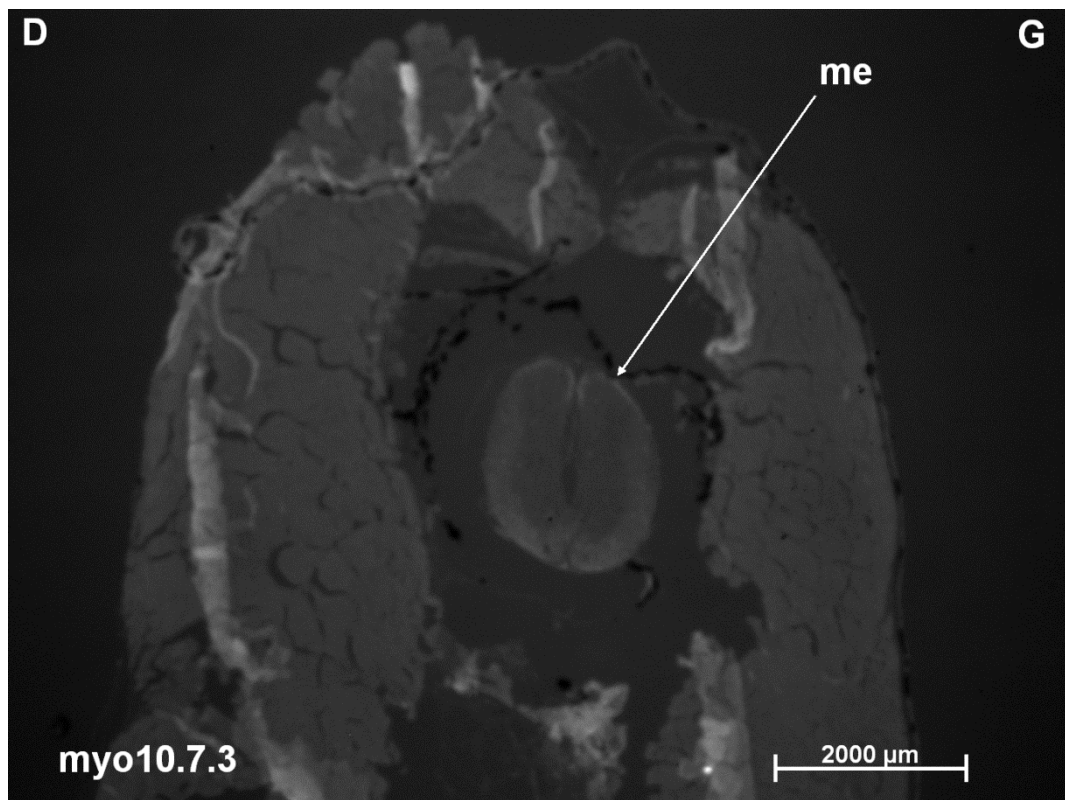


Tableau 18 : Marquage de myotomes paravertébraux au niveau de la déformation rachidienne avec asymétrie de volume musculaire droite-gauche sans asymétrie de signal (xénope opéré d'une labyrinthectomie gauche, à six semaines post-opératoire).

4. DISCUSSION (et perspectives)

Il a été montré chez *Xenopus laevis* qu'une asymétrie vestibulaire au stade pré-métamorphique entraîne des déformations squelettiques similaires à celles observées dans la scoliose idiopathique humaine (Lambert et al, 2009). La relation causale entre asymétrie vestibulaire et déformations squelettiques signifie qu'un tonus vestibulo-spinal descendant symétrique et équilibré est nécessaire au développement symétrique du corps durant le développement post-embryonnaire tardif. Par conséquent, une activité asymétrique persistante dans l'ensemble des voies vestibulo-spinales descendantes induisant une contraction asymétrique des muscles paravertébraux, pourrait être le mécanisme physiopathologique à l'origine de ces déformations musculo-squelettiques. Les objectifs de ce travail étaient :

- Quantifier précisément ces déformations musculo-squelettiques aux stades osseux et cartilagineux
- Réaliser des lésions sélectives des différentes structures vestibulaires afin de préciser le rôle de chacune
- Etudier de manière précise les masses musculaires paravertébrales tant sur le plan volumique (holotomographie) que histologique (immunohistochimie)

Le suivi précoce de la croissance des têtards opérés, par le marquage des cartilages en calcéine, a mis en évidence des anomalies précoces de la statique rachidienne dès 10 jours post-opératoires. Ceci démontre l'influence précoce d'une défaillance du système vestibulaire sur la statique rachidienne dès le stade cartilagineux, au-delà d'un simple syndrome vestibulaire postural. Le suivi régulier de ces sujets a permis de mettre en évidence également un franc retard de croissance. Initialement imputé à des difficultés d'alimentation du fait de leur syndrome vestibulaire, nous pensons actuellement que cette anomalie est plus complexe et probablement en rapport avec le métabolisme phosphocalcique. En effet, la procédure chirurgicale prive l'animal d'une part importante de ces réserves calciques pré-métamorphiques par l'ablation des organes otolithiques (utricle, saccule, lagena) au niveau de l'oreille interne. Les conséquences sur le métabolisme calcique sont probablement majeures et pourraient être à l'origine du retard de croissance important que l'on observe chez tous les têtards labyrinthectomisés. Cette déplétion calcique pourrait ainsi, avoir un effet endocrinien important. Un rôle majeur du calcium a ainsi été montré dans l'action génomique de l'aldostérone chez *Xenopus laevis* dès le début de l'embryogénèse (Schäfer C, Shahin V, et al. 2003). De plus, la perturbation du métabolisme calcique (par antagonistes du calcium et de la calmoduline) chez des têtards en pré-métamorphiques entraîne un retard voir une inhibition totale du climax (Kumar et al.1993). Enfin, chez les anoues au stade larvaire, la prolactine est une hormone hypercalcémisante. Ainsi, une déplétion du stock calcique pourrait induire une hyperprolactinémie responsable d'un retard de croissance. De surcroit, cette carence calcique ne peut être compensée par l'alimentation, car le têtard ne se nourrit pas ou peu durant la phase du climax de la métamorphose. Par ailleurs, lors de cette métamorphose, des enzymes extralysosomiales (actinase, myosinase) stimulées par le calcium sont

impliquées, notamment dans la régression de la queue. Enfin, l'étude holotomographique semble indiquer une variation de la densité minérale osseuse avec une hyperabsorption du calcium par l'os ce qui entraîne une hyperdensité osseuse à la fois rachidienne et de l'os « périphérique » chez les animaux opérés. Ce phénomène semble d'autant plus important que l'animal est tordu. Le petit effectif testé ne permet évidemment pas de conclure sur une quelconque significativité statistique mais invite à élargir la cohorte pour confirmer ces résultats préliminaires. Une étude, en milieu pauvre en calcium, de la croissance des têtards pourrait donner une indication sur une éventuelle implication de la déplétion calcique dans d'éventuelles anomalies vertébrales. Une labyrinthectomie suivie d'un régime riche en calcium pourrait également être envisagée.

Les radiographies 2D au Faxitron ont permis de caractériser la statique rachidienne au stade osseux. Cette évaluation radiographique a confirmé les déformations scoliothiques au stade osseux tout en montrant que des têtards opérés, initialement tordus au stade cartilagineux, peuvent se redresser et ne présenter aucune déformation en post-métamorphique. Le caractère scoliothique, bien qu'anticipé par le marquage cartilagineux en calcéine, ne peut donc être affirmé que sur une radiographie osseuse post-métamorphique. Ainsi, ce phénomène soulève plusieurs questions : s'agit-il d'une récupération sensorielle de type compensation avec influence d'entrées visuelles, corticales ou autres, sans action du système proprioceptif ? Ou bien est-ce un mécanisme adaptatif de type plasticité cérébrale autre ? Ces cas suggèrent la possibilité d'une récupération et donc l'importance de nos travaux dans l'objectif de mettre au point une rééducation proprioceptive ou autre moyen de faciliter la compensation vestibulaire dès la naissance en vue de limiter l'évolution dans le temps des déformations scoliothiques.

L'holotomographie est un outil majeur dans l'évaluation des déformations musculo-squelettiques. En effet, ses différentes séquences (absorption, contraste de phase) permettent une évaluation à la fois des parties molles (notamment musculaires) et des tissus osseux avec une qualité quasi-histologique (pixel : 7,5 μ m). Une évaluation anatomique précise et globale du sujet est ainsi réalisée. On a ainsi mis en évidence, sur les reconstructions 3D, des déformations scoliothiques typiques dans les trois plans de l'espace. L'étude des volumes musculaires paravertébraux n'a pas mis en évidence d'asymétrie évidente droite-gauche. Cependant, l'importance des artéfacts entraînés par le tissu osseux adjacent nous a empêché de réaliser une évaluation volumétrique précise de ces masses paravertébrales et de mettre, peut-être, en évidence une différence statistiquement significative. On peut tout de même supposer que si une asymétrie de volume musculaire était la seule explication à ces déformations, elle serait a priori évidente et visible qualitativement. Par ailleurs, nous avons observé une asymétrie musculaire paravertébrale au niveau du maximum de la déformation avec le plus souvent une hypertrophie paravertébrale droite. Du fait des artéfacts, il est difficile de trancher entre une simple altération de la forme globale du groupe musculaire induit par la déformation rachidienne et une réelle asymétrie quantitative de faisceaux musculaires. Une précision histologique pourrait être utile. Nous y reviendrons.

Il faut, cependant, reconnaître à l'holotomographie une certaine lourdeur de la procédure tant sur le temps d'acquisition des images, l'accès au synchrotron (Grenoble) ou la taille des fichiers à traiter (plusieurs centaines de giga-octets) lors des reconstructions.

L'étude histologique musculaire des masses paravertébrales n'a pas mis en évidence d'asymétrie droite-gauche sur le plan structurel (répartition fibres lente par S58 et rapide par F59). Cependant, les coupes sont effectuées au stade cartilagineux sans certitude absolue du caractère définitif de la scoliose observée alors. Il est également plus simple de repérer le maximum de déformation une fois les vertèbres ossifiées. Un nouveau protocole de marquage, avec décalcification première et repérage du maximum de déformation rachidienne et coupes ciblées à cet endroit, pourrait être intéressant.

La comparaison de nos résultats histologiques à ceux de travaux antérieurs (Gratacap M, 2010) n'ayant pas observé, non plus, d'asymétrie significative avec d'autres anticorps (E3, E19, A7), plaide en faveur d'une structure musculaire conservée au niveau paravertébral. On émet ainsi l'hypothèse d'un défaut de stimulation vestibulo-spinale descendante de masses musculaires paravertébrales « saines ». Une évaluation électromyographique dissociée des groupes paravertébraux droits et gauches est à envisager. Si ces résultats se confirment, on pourrait imaginer une rééducation précoce vestibulaire, facilitant le processus de compensation et comblant ce déficit de stimulation vestibulo-spinale afin de réduire l'action de ce déséquilibre nerveux sur les muscles paravertébraux, et ainsi limiter l'évolution des déformations osseuses. Ceci serait applicable en pathologie humaine en dépistant précocement une asymétrie vestibulaire chez le jeune enfant (protocole en cours) et en mettant en place rapidement une électrostimulation musculaire paravertébrale et des récepteurs proprioceptifs.

Concernant la sélectivité des lésions labyrinthiques réalisées actuellement sous microscope opératoire classique, les instruments de microchirurgie peu adaptés et l'étroitesse des rapports anatomiques entre les différentes structures vestibulaires imposent de nouveaux protocoles. Différentes voies de recherche sont envisagées notamment l'utilisation de laser YAG ou la réalisation de canal-plug, c'est-à-dire l'injection par micro-cathéter d'une substance sclérosante en intra-canalaire ou intra-utriculaire.

Par ailleurs, l'étude holotomographique a montré la persistance du sac endolymphatique après la chirurgie. Cet organe vestibulaire semble important chez la grenouille du moins en terme de volume. Sa fonction exacte vestibulaire est totalement inconnue tant chez l'amphibien que chez l'homme. Il serait intéressant de réaliser des lésions sélectives du sac endolymphatique afin de mettre en évidence un éventuel rôle dans la statique rachidienne.

Enfin, le développement actuel de la chirurgie in utero fait évoquer la possibilité de réaliser des lésions labyrinthiques in utero chez la brebis gestante afin d'avoir un modèle mammifère. Ce projet est en cours d'élaboration avec l'Ecole Vétérinaire de Lyon.

5. CONCLUSION

La scoliose idiopathique de l'adolescent affecte 4,6% de la population générale avec des conséquences parfois sévères sur la qualité de vie. Son étiopathogénie reste, pour le moment, inconnue. Le modèle de labyrinthectomie unilatérale chez *Xenopus laevis* a démontré le lien entre asymétrie vestibulaire induite en pré-métamorphique et déformations rachidiennes de type scoliotique (Lambert et al., 2009). Cette étude a permis d'évaluer plus précisément les conséquences musculo-squelettiques de cette asymétrie vestibulaire induite. Nous avons ainsi montré la précocité d'apparition des déformations dès le stade cartilagineux, la possible récupération de celles-ci avant la métamorphose et le caractère scoliotique typique des déformations rachidiennes induites (holotomographie 3D). Par ailleurs, l'évaluation volumétrique et histologique (immunohistochimie) des muscles paravertébraux semble conclure à une intégrité structurale de ces derniers ce qui est encourageant dans l'optique d'une éventuelle rééducation... Cependant, comme nous l'avons montré, ce modèle n'est pas encore transposable à l'homme. Pour cela, la réalisation de lésion sélective labyrinthique est indispensable mais se heurte pour le moment à des difficultés techniques. De plus, l'altération de l'homéostasie calcique est une conséquence inattendue qu'il faudra explorer.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Cloetens P, Ludwig W et al (1999). Holotomography: quantitative phase tomography with micrometer resolution using hard synchrotron radiation x-rays. *App Phys Lett*, 75;19:2912-14
- Curthoys IS (2000). « Vestibular compensation and substitution ». *Curr Opin Neurol*. Feb;13(1):27-30. Review.
- Gratacap M. (2010). « Plasticité neurale post-lésionnelle après labyrinthectomie unilatérale chez *Xenopus laevis* : pistes physiopathologiques de la scoliose idiopathique » Mémoire Master 2.
- Khoury, N., R. Vialle, et al. (2004). "Scoliose idiopathique. Stratégie diagnostique, physiopathologie et analyse de la déformation. Idiopathic Scoliosis. Strategy, Pathophysiology, and Deformity Analysis." *EMC - Rhumatologie-Orthopédie* 1(1): 17-44.
- Kumar BA, Vinod KR, Paul VF, Pilo B. (1993). "effect of calcium and calmodulin antagonists on metamorphosis in the anuran tadpole, *Rana tigerina*". *Funct Dev Morphol*; 3(4):237-42.
- Lambert, F. M., D. Malinvaud, et al. (2009). "Vestibular asymmetry as the cause of idiopathic scoliosis: a possible answer from *Xenopus*." *J Neurosci* 29(40): 12477-83.
- Nieuwkoop PD, Faber J (1994) Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): a systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. New York: Garland.
- Rousie D, Hache JC et al. (1999). "Oculomotor, postural, and perceptual asymmetries associated with a common cause. Craniofacial asymmetries and asymmetries in vestibular organ anatomy". *Ann NY Acad Sci* 28;871;439-46
- Sahlstrand, T. and B. Petruson (1979). "A study of labyrinthine function in patients with adolescent idiopathic scoliosis. I. An electro-nystagmographic study." *Acta Orthop Scand* 50(6 Pt 2): 759-69.
- Sahlstrand, T., B. Petruson, et al. (1979). "Vestibulospinal reflex activity in patients with adolescent idiopathic scoliosis. Postural effects during caloric labyrinthine stimulation recorded by stabilometry." *Acta Orthop Scand* 50(3): 275-81.
- Schäfer C, Shahin V et al.(2003) Intracellular calcium: a prerequisite for aldosterone action. *J Membr Biol* 1;196(3):157-62
- Van Cleave S, Shall MS (2007). "A critical period for the impact of vestibular sensation on ferret motor development". *J Vest Re*; 16(4-5): 179-86.
- Wiener-Vacher, S. R. and K. Mazda (1998). "Asymmetric otolith vestibulo-ocular responses in children with idiopathic scoliosis." *J Pediatr* 132(6): 1028-32.

7. RESUME