

Université de Montréal

Étude du rôle des gènes TGF- β 1 et HSP-70 lors du processus de régénération du membre chez l'axolotl

par

Mathieu Lévesque

Département de biochimie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor*
en biochimie

Août 2008

© Mathieu Lévesque, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude du rôle des gènes TGF- β 1 et HSP-70 lors du processus de régénération du membre
chez l'axolotl

présentée par :

Mathieu Lévesque

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Alain Moreau Ph.D., président-rapporteur
Dr. Stéphane Roy Ph.D., directeur de recherche
Dr. Florina Moldovan M.D. Ph.D., membre du jury
Dr. Jean-Jacques Lebrun Ph.D., examinateur externe
Dr. Philippe Crine Ph.D., représentant du doyen de la FES

Résumé

Les urodèles amphibiens, dont fait partie l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*), ont la capacité de régénérer leurs organes et membres suite à une amputation, tout au long de leur vie. La patte est l'organe dont le processus de régénération est le mieux caractérisé et ce dernier est divisé en deux phases principales. La première est la phase de préparation et commence immédiatement suite à l'amputation. Elle renferme des étapes essentielles au processus de régénération comme la guérison de la plaie et la formation d'une coiffe apicale ectodermique. Par la suite, les fibroblastes du derme et certaines cellules musculaires vont revenir à un état pluripotent via un processus appelé dédifférenciation cellulaire. Une fois dédifférenciées, ces cellules migrent et s'accumulent sous la coiffe apicale pour former le blastème. Lors de la phase de redéveloppement, les cellules du blastème se divisent puis se redifférencient pour régénérer la partie amputée. Fait intéressant, la régénération d'un membre ou la guérison d'une plaie chez l'axolotl ne mène jamais à la formation d'une cicatrice. Afin d'en apprendre plus sur le contrôle moléculaire de la régénération, les gènes *Heat-shock protein-70 (Hsp-70)* et *Transforming growth factor- β 1 (Tgf- β 1)* ont été sélectionnés. Ces gènes jouent un rôle important dans la réponse au stress et lors de la guérison des plaies chez les mammifères. HSP-70 est une chaperonne moléculaire qui est produite pour maintenir l'intégrité des protéines cellulaires lorsqu'un stress se présente. TGF- β 1 est une cytokine produite suite à une blessure qui active la réponse inflammatoire et qui stimule la fermeture de la plaie chez les amniotes. Les

résultats présentés dans cette thèse démontrent que *Hsp-70* est exprimé et régulé lors du développement et de la régénération du membre chez l'axolotl. D'autre part, nos expériences ont mené à l'isolation de la séquence codante pour *Tgf- β 1* chez l'axolotl. Nos résultats montrent que *Tgf- β 1* est exprimé spécifiquement lors de la phase de préparation dans le membre en régénération. De plus, le blocage de la voie des *Tgf- β* avec l'inhibiteur pharmacologique SB-431542, lors de la régénération, mène à l'inhibition du processus. Ceci démontre que la signalisation via la voie des *Tgf- β* est essentielle à la régénération du membre chez l'axolotl.

Mots-clés : Régénération, axolotl, salamandre, urodèle, guérison, Hsp-70, Tgf- β 1, développement, membre, morphogenèse.

Abstract

Urodele amphibians, such as the axolotl (*Ambystoma mexicanum*), have the unique ability, among vertebrates, to perfectly regenerate many parts of their body throughout their life. Among the complex structures that can be regenerated, the limb is the most widely studied. Limb regeneration is divided in two main phases. The preparation phase, which begins right after amputation, includes wound healing and the formation of an apical ectodermal cap. During this phase, dermal fibroblasts and muscle cells will lose their characteristics and become pluripotent through a process called cellular dedifferentiation. The dedifferentiated cells migrate and accumulate under the apical ectodermal cap to form the blastema. During the redevelopment phase, the cells in the blastema proliferate and redifferentiate to regenerate the lost structures. It is interesting to highlight the fact that regeneration never leads to scar formation in the axolotl. In order to learn more about the molecular control of limb regeneration, the genes *Heat-shock protein-70 (Hsp-70)* and *Transforming growth factor- β 1 (Tgf- β 1)* were selected for their important roles in stress response and wound healing in mammals. HSP-70 is a molecular chaperone which is produced to protect cellular proteins when the cell faces a stress. TGF- β 1 is a cytokine produced after wounding that activates the inflammatory response and stimulates wound closure in amniotes. Results presented in this thesis show that *Hsp-70* is expressed and regulated during limb development and regeneration in the axolotl. We were also able to isolate the cDNA coding for axolotl *Tgf- β 1* and our results show that this gene is expressed

specifically during the preparation phase of limb regeneration. Treatment of regenerating axolotls with a specific inhibitor of *Tgf-β* signalling, SB-431542, led to complete inhibition of regeneration. This directly implies that *Tgf-β* signalling is essential for limb regeneration in axolotl.

Keywords : Regeneration, axolotl, salamander, urodele, wound healing, Hsp-70, Tgf-β1, development, limb, morphogenesis.

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1 Quelques statistiques.....	1
1.2 La régénération : d’hier à aujourd’hui	1
1.3 Les capacités limitées de régénération de l’humain et des autres mammifères.....	6
1.4 Histoire de l’étude de la régénération	14
1.5 Les différents modèles d’étude de la régénération.....	17
1.5.1 La régénération chez les invertébrés.....	18
1.5.1.1 L’hydre.....	18
1.5.1.2 Le vers planaire.....	19
1.5.1.3 Les autres invertébrés.....	20
1.5.2 La régénération chez les vertébrés	23
1.5.2.1 Le poisson-zèbre	24
1.5.2.2 Les amphibiens	25
1.5.2.2.1 Les anoures	25
1.5.2.2.2 Les urodèles	28
1.5.2.2.2.1 L’axolotl (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	30
1.6 Le processus de régénération	32
1.6.1 Phase de préparation	39
1.6.1.1 Amputation et guérison de la plaie	39
1.6.1.2 Formation du blastème.....	42
1.6.2 Phase de redéveloppement.....	48
1.7 Immunotolérance chez les urodèles	50
1.8 Gènes d’intérêt pour l’étude de la régénération	53
1.8.1 Transforming Growth Factor- β 1	55
1.8.2 Heat-shock protein-70.....	68
1.9 Le futur de l’étude de la régénération	72
2. Chapitre 1 – Article 1	75

2.1	Mise en contexte	76
2.2	Contribution des auteurs	77
2.3	Texte de l'Article - Expression of Heat-shock protein 70 during limb development and regeneration in the axolotl.....	79
2.3.1	Abstract	80
2.3.2	Introduction	81
2.3.3	Results	84
2.3.3.1	<i>In situ analysis of Hsp-70 expression during embryogenesis and limb development</i>	84
2.3.3.2	<i>Analysis of Hsp-70 expression in limb regeneration</i>	87
2.3.3.3	<i>RT-PCR analysis of Hsp-70 expression in various organs</i>	93
2.3.3.4	<i>Heat shock induction of the axolotl Hsp-70</i>	96
2.3.4	Discussion	102
2.3.5	Experimental procedures.....	107
2.3.5.1	<i>Animal maintenance/Cell culture</i>	107
2.3.5.2	<i>RT-PCR</i>	107
2.3.5.3	<i>Whole-mount in situ hybridization</i>	108
2.3.5.4	<i>Northern blots</i>	109
2.3.5.5	<i>Western blots</i>	110
2.3.5.6	<i>In situ hybridization on tissue sections</i>	110
2.3.5.7	<i>Heat-shock</i>	112
2.3.6	Acknowledgments.....	113
2.4	Commentaires	114
3.	Chapitre 2 – Article 2.....	121
3.1	Mise en contexte	122
3.2	Contribution des auteurs	123
3.3	Texte de l'Article - Transforming growth factor – β signaling is essential for limb regeneration in axolotls.....	125

3.3.1 Abstract	126
3.3.2 Introduction	128
3.3.3 Results	132
3.3.3.1 Identification of axolotl TGF- β 1	132
3.3.3.2 Expression of TGF- β 1 mRNA during axolotl limb regeneration	135
3.3.3.3 Presence of TGF- β receptors in axolotl cells	138
3.3.3.4 Activation of TGF- β 1 target genes in axolotl cells	142
3.3.3.5 Inhibition of axolotl limb regeneration by SB-431542	143
3.3.3.6 Histological analysis of SB-431542 effect on limb regeneration.....	147
3.3.3.7 Cell proliferation analysis in SB-431542 treated limbs.....	150
3.3.3.8 Measurement of TGF- β 1 target genes expression in SB-431542 treated limbs	151
3.3.4 Discussion	157
3.3.5 Materials and Methods.....	163
3.3.5.1 Animal maintenance and treatments	163
3.3.5.2 Cloning of axolotl TGF- β 1 cDNA	163
3.3.5.3 Whole-mount in situ hybridization	165
3.3.5.4 Northern blots	165
3.3.5.5 Affinity labeling of axolotl cells	166
3.3.5.6 UV irradiation of axolotl cells and Western blot analysis	167
3.3.5.7 Treatments of axolotl cell line with TGF- β 1 protein and SB-431542.....	167
3.3.5.8 RT-PCR	168
3.3.5.9 Histology	170
3.3.5.10 BrdU incorporation assay.....	170
3.3.6 Acknowledgments.....	172
3.4 Commentaires	173
4. Chapitre 3 - Expériences supplémentaires	175
4.1 Présentation.....	175

4.2 Matériel et méthodes	176
4.2.1 Manipulations des animaux	176
4.2.2 Immunobuvardage Western	176
4.2.3 Hybridation <i>in situ</i> sur coupes	177
4.2.4 Blessure de la peau chez l'axolotl	179
4.2.5 Coloration au Trichrome de Masson	180
4.3 Résultats	182
4.3.1 Expression des protéines de la famille des TGF- β lors de la régénération du membre chez l'axolotl	182
4.3.2 Expression de l'ARNm de <i>Tgf-β1</i> dans le membre en régénération	185
4.3.3 Étude du processus de guérison de l'épiderme chez l'axolotl	188
4.4 Recettes des solutions	200
4.4.1 Hybridation <i>in situ</i> sur coupes	200
4.4.2 Trichrome de Masson	201
5. Discussion	203
5.1 Analyse et mise en contexte des résultats	203
5.2 Perspectives	217
5.3 Applications chez l'humain	221
6. Conclusion	226
7. Bibliographie	228
Annexe 1	I
Expériences effectuées afin d'isoler la séquence codante pour <i>Tgf-β3</i> chez l'axolotl	I
Annexe 2	V
Liste des prix et bourses obtenus pendant mes études supérieures	V
Liste des présentations effectuées au cours de mes études supérieures	VI
Annexe 3	IX
Articles sous forme publiée	IX

Liste des tableaux

Tableau 1 - Amorces utilisées pour les expériences de PCR dans l'article 2.....169

Tableau 2 - Amorces utilisées pour tenter d'isoler la séquence de *Tgf-β3* par PCRIII

Tableau 3 - Expériences de criblage de librairie d'ADNc d'axolotl effectuées pour tenter d'isoler la séquence de *Tgf-β3*.....IV

Liste des figures

Figure 1 - La régénération dans la mythologie grecque	3
Figure 2 - Régénération d'un doigt humain	12
Figure 3 - Modèles animaux pour l'étude de la régénération	21
Figure 4 - Parties du corps de l'axolotl pouvant régénérer	33
Figure 5 - Stades de régénération du membre chez l'axolotl, <i>Ambystoma mexicanum</i> , selon Tank, 1976	35
Figure 6 - Stades de régénération du membre du triton, <i>Notophthalmus viridescens</i> , selon Iten et Bryant, 1973	37
Figure 7 - Représentation d'un blastème de régénération	44
Figure 8 - Cascade de signalisation des TGF- β	59
Figure 9 - Whole-mount <i>in situ</i> hybridization of <i>Hsp-70</i> and cartilage staining in developing embryos	85
Figure 10 - Whole-mount <i>in situ</i> hybridization of <i>Hsp-70</i> in regenerating forelimbs	88
Figure 11 - Regulation of <i>Hsp-70</i> mRNA and protein expression during axolotl limb regeneration	91

Figure 12 - Representative <i>In situ</i> hybridization for <i>Hsp-70</i> expression in limb sections ..	94
Figure 13 - RT-PCR analysis of the expression of <i>Hsp-70</i> in various axolotl organs	97
Figure 14 - Heat-shock induction of <i>Hsp-70</i> in axolotl cells and embryos	100
Figure 15 - Détection des protéines tubuline, α -calnexine et GAPDH aux différents stades de régénération du membre chez l'axolotl par immuno-buvardage Western	117
Figure 16 - RT-PCR contrôle montrant l'expression spécifique du gène <i>Hsp-70</i> dans l'estomac et lors de la régénération chez l'axolotl	119
Figure 17 - Axolotl TGF- β 1 protein sequence and domains	133
Figure 18 - Expression of TGF- β 1 during axolotl limb regeneration	136
Figure 19 - Detection of TGF- β receptors and target genes in axolotl cells	139
Figure 20 - Inhibition of limb regeneration by SB-431542	145
Figure 21 - Histological analysis of regenerating limbs treated with SB-431542	148
Figure 22 - Inhibition of cellular proliferation in regenerating limbs treated with SB-431542	152
Figure 23 - Inhibition of TGF- β 1 target genes expression in regenerating limbs treated with SB-431542	155

Figure 24 - Détection des protéines TGF- β 1 et SMAD3 aux différents stades de régénération du membre chez l'axolotl par immuno-buvardage Western	183
Figure 25 - Détection de TGF- β 1 par hybridation <i>in situ</i> dans le membre en régénération chez l'axolotl	186
Figure 26 - Guérison d'une blessure de la peau en moins de huit heures chez l'axolotl ...	189
Figure 27 - Analyse histologique du processus de guérison des blessures chez l'axolotl, 1h et 4h après avoir fait la blessure	192
Figure 28 - Analyse histologique du processus de guérison des blessures chez l'axolotl, 8h et 24h après avoir fait la blessure	194
Figure 29 - Expression des gènes <i>Tgf-β1</i> , <i>Krox-24</i> , <i>Msx-1</i> et <i>Hsp-70</i> durant le processus de guérison des plaies chez l'axolotl	197

Liste des sigles et abréviations

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine tri-phosphate

a.v. J.-C. : avant Jésus-Christ

cm : centimètre

e.g. : *exempli gratia*, signifie « par exemple »

et al. : *et alii*, signifie « et d'autres »

i.e. : *id est*, signifie « c'est-à-dire »

mm : millimètre

mm³ : millimètre cube

PCR: polymerase chain reaction

® : registered

sp. : espèce

Nomenclature de l'écriture des gènes et protéines

Gène ou ARNm : exemple *Tgf-β1*

Protéine : exemple TGF-β1

Glossaire

Allogénique : type de greffe effectuée entre un donneur et un receveur appartenant à la même espèce

Blastème : masse de cellules non-différenciées qui en proliférant puis en se redifférenciant vont mener à la régénération de l'organe ou du membre amputé

Dédifférenciation : processus par lequel les cellules vont perdre leurs caractéristiques propres et revenir à un état pluripotent

Fibrose : accumulation de matrice extra-cellulaire dans un tissu suite à une blessure, un traumatisme ou une maladie

Hépatectomie : opération chirurgicale consistant à amputer une partie du foie

Hyperplasie : Augmentation de volume d'un tissu ou d'un organe due à une augmentation du nombre de ses cellules

Knockout : animal chez lequel un gène est inactivé en étant remplacé par un gène artificiel ou non-fonctionnel

Métamorphose : processus par lequel certains animaux subissent plusieurs changements physiologiques pour passer du stade larvaire au stade adulte

Morpholino : molécule synthétique, dérivée des acides nucléiques, qui peut bloquer l'expression d'un gène en empêchant la traduction de son ARNm

Myotubes : cellule musculaire multinucléée

Néoténie : état d'un animal adulte ayant conservé des caractères juvéniles ou larvaires

Pancréatectomie : opération chirurgicale consistant à amputer une partie du pancréas

Puce à ADN : (en anglais *DNA chip* ou *micro-array*) plaque de verre sur laquelle sont fixés les ARNm extraits d'une cellule ou d'un organisme. Cet outil permet de comparer l'expression de gènes dans deux conditions différentes. Par exemple, les gènes exprimés différemment dans une cellule normale versus ceux exprimés dans une cellule cancéreuse

*À mes parents, qui m'ont toujours soutenu
dans tout ce que j'ai entrepris.*

*«If there were no regeneration there could be
no life. If everything regenerated there would
be no death. All organisms exist between
these two extremes.»*

Richard J. Goss 1969

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherches, Stéphane Roy, pour m'avoir introduit au fascinant monde de la régénération. Au cours de mes études, Stéphane a toujours su répondre à mes questions scientifiques et ainsi m'amener vers une meilleure compréhension de mon projet et de la science en général. Durant les six dernières années, j'ai acquis beaucoup d'expérience en tant que chercheur mais aussi en tant que personne et Stéphane y est pour quelque chose. Pour m'avoir fait découvrir la recherche, pour m'avoir permis de voyager et de participer à des conférences internationales, pour les multiples et agréables moments où nos conversations ont abordé des sujets n'ayant aucun lien avec la science et pour tout le soutien, merci.

En second lieu, je voudrais remercier mes parents, Carole et Jean-Charles, pour m'avoir encouragé à ne jamais lâcher, tout au long de mes études. Vous avez toujours été là pour m'aider, sans jamais douter de moi. En m'encourageant à l'école dès mes premières années, toutefois sans jamais me mettre de pression, vous m'avez fait comprendre l'importance d'obtenir une bonne éducation. Ceci m'a permis de choisir un domaine fascinant à l'université, celui de la biologie et des sciences de la vie. Je vous remercie pour m'avoir guidé à travers ces neuf années universitaires qui auraient été beaucoup plus difficiles (moralement et monétairement!) si vous n'aviez pas été là. Je vous aime beaucoup.

Je m'en voudrais de ne pas remercier mon frère Jean-Marc. Il est toujours fascinant de discuter avec toi et tes encouragements au fil des années ont été très appréciés. Merci beaucoup.

Il a été très agréable de travailler en compagnie des autres membres du laboratoire de Stéphane au cours de toutes ces années. J'aimerais dire merci à Mireille Pilote avec qui j'ai partagé mes deux premières années au laboratoire. Tu es celle qui m'a donné confiance au laboratoire, tant sur le plan technique que sur le plan personnel. J'ai eu un plaisir immense à travailler et à rire avec toi. Il ne faut pas oublier tous ces moments où nous avons déballé des boîtes contenant des dizaines de béchers et de cylindres gradués, au tout début du laboratoire, ou encore le minable bureau d'étudiants que nous avions au deuxième étage! Je veux remercier Éric Villiard, que j'ai connu en étant démonstrateur dans son cours de biologie, avec qui j'ai partagé plusieurs bons moments. Je pense à notre voyage dans l'ouest canadien, après le congrès à Calgary, aux nombreux spectacles de musique auxquels nous avons assisté, ou aux interminables soirées passées à jouer à « *Magic* ». Tu m'as aussi initié à la pratique d'un instrument de musique, ce que je ne croyais pas être capable de faire. Ta capacité à ne pas tout prendre « au pied de la lettre » s'imprègne peu à peu en moi. Merci à Jean-Charles Guimond pour avoir été celui qui m'ait fait découvrir le plaisir de boire un bon café. Merci aussi pour avoir souvent pris le temps de jaser avec moi lorsque ça n'allait pas. Merci pour toutes les niaiseries du genre « pas eu peur, pas eu de ticket » qui

ont fait que notre laboratoire était le plus drôle et agréable de toute l'université. En gardant l'œil sur l'objectif, tout devient possible. Nous sommes des guerriers et rien ne peut nous arrêter. Je tiens à remercier Cara Hutchison pour l'encouragement qu'elle m'a donné. Tu es la personne qui m'a montré qu'il ne fallait jamais abandonner ses rêves pour aucune raison. Je voudrais sincèrement remercier Sophie Desmeules pour son soutien au cours de toutes ces années. Ton énergie fulgurante nous atteint et nous motive tous et je retiens ton sens de la justice. Tu m'as appris que, parfois, il fallait crier, soit pour dénoncer quelque chose, soit juste pour crier. Ça fait du bien. Je n'ai jamais vu quelqu'un rire autant pour une histoire de grand-père malade ou de graine de lin. Un énorme merci à Samuel Gatién pour son aide, son appui et son humour. Ta détermination est inébranlable. Tu m'as montré qu'il fallait toujours se fier à notre instinct et suivre nos propres idées ou ambitions pour arriver à nos buts. En faisant cela, on est certain de réussir. Encore une fois : Allo Sam! Vous êtes, tous et chacun, des personnes extraordinaires que j'ai adoré côtoyer au cours de mes études doctorales.

Je veux remercier tous les étudiants d'été et les stagiaires qui sont venus au laboratoire : Volong Dao, Olivier Béchar, Pierre-Luc Michaud, Manh Khoa Tran, Rebecca Pétrin, Gabriel Rossi, Hadrian D'Amour-Bergeron, Audrey Kerloc'h, Julie Salicco, Delphine Rémillard-Labrosse, Jérémie Berdugo, Hien Nguyen. Votre travail a été grandement apprécié.

Je tiens à remercier les professeurs Gerardo Ferbeyre du département de biochimie de l'Université de Montréal et Anie Philip du département de chirurgie de l'Université McGill pour avoir formé mon comité de supervision de thèse. Les idées qu'ils ont suggérées, leur aide et leurs critiques m'ont grandement aidé à accomplir mes expériences et à atteindre mes objectifs scientifiques. Les avoir sur mon comité de thèse fut un atout pour moi et me permis d'acquérir une meilleure compréhension de mon projet et de la recherche en science.

Je tiens aussi à remercier mes amis de longue date Alexis Matteau, Lisa De Granpré, Olivier Chauveau, Sabrina Fortier, Alexandre Cadieux, Steve Poirier, Jean-François Fournel et Marie-Claire Binet. Votre amitié m'est très chère.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes avec que j'ai côtoyées, qui ne faisait pas partie de notre laboratoire. Le professeur Jean Barbeau et toute son équipe : Annie Leduc, Jacinthe Séguin, Daniel Chartrand, Cristina Irimés, Jean-François Ross et Sabrina Gravel. Le professeur Antonio Nanci et toute son équipe : Charles E. Smith, Sylvia Francis Zalzal, Rima Wazen, Karine Sellin. Je tiens à remercier particulièrement Micheline Fortin pour toute l'aide qu'elle m'a donné pour les expériences d'histologie. Je remercie aussi Pierre Moffatt. Le professeur Gerardo Ferbeyre et son équipe : Frédérick-Antoine Mallette et Marie-France Gaumont-Leclerc. Le professeur Anie Philip et son équipe : Kenneth Finsson, Albane Bizet et Joshua Vorstenbosch. Le professeur Gilles Lavigne et

son équipe : Christiane Manzini, Nelly Huynh et Pierre Rompré. Le professeur Arlette Kolta et Louise Beaudriault. Mathieu St-Louis, Jean-François Paradis, Jordan Volpato, Xavier Mascle, Patricia Estephan, Sacha Blain, le professeur Muriel Aubry et le professeur Luc Desgroseillers. Merci à tous.

Je voudrais remercier le Réseau de recherche en santé buccodentaire et osseuse du Québec pour m'avoir octroyé une bourse de doctorat et quelques autres petites bourses. Ces dons d'argent ont été bien appréciés!

Je voudrais aussi remercier Valérie Scotto et Patrick Bériault de la compagnie Invitrogen. Vous êtes des personnes tout à fait sympathiques et j'ai apprécié travailler pour la compagnie au cours de toutes ces années.

Je ne peux terminer mon doctorat en biochimie sans remercier Sylvie Beauchemin, technicienne en gestion des dossiers étudiants, au département de biochimie. Je ne sais plus combien de fois je suis allé voir Sylvie pour lui poser une question à propos des cours, des séminaires étudiants, des règles du département concernant les étudiants au doctorat, du comité de thèse, de l'examen pré-doctoral et de la dite thèse de doctorat. À chaque fois, Sylvie a su répondre à ma question! Je te remercie mille fois Sylvie.

En tout dernier lieu, un « merci » tout spécial à Maude Joyal-Legault, pour son amour, son soutien moral, son humour et pour avoir corrigé ma thèse. Un gros merci à Maude et à sa famille.

J'ai sincèrement apprécié chacun de vous et je ne vous oublierai jamais.

1. Introduction

1.1 Quelques statistiques

Chaque année aux États-Unis, environ 185 000 personnes subissent l'amputation d'un membre supérieur ou inférieur. Le nombre de personnes amputées dépasse maintenant les deux millions chez nos voisins du sud (Amputee Coalition of America, données 2007). Dans un même ordre d'idées, de 1995 à 2004 au Canada, le nombre de transplantations d'organes est resté stable avoisinant les 1 800 opérations par an. Par contre, le nombre de patients toujours en attente d'un organe à la fin d'une année est passé de 2592 à 4013 pour cette même période (Canadian Institute for Health Information, données 2005). De plus, 224 personnes sont décédées en attente d'un don d'organe, au pays en 2004. Cette demande accrue d'organes et le phénomène de vieillissement général de la population nous amènent à considérer de nouvelles avenues menant au remplacement d'organes et de tissus endommagés ou malades chez l'humain.

1.2 La régénération : d'hier à aujourd'hui

Depuis longtemps, l'humain est fasciné par la vie éternelle. Un moyen d'atteindre cette vie éternelle serait d'avoir la capacité de régénérer constamment tous les tissus de notre corps, de manière à contrecarrer les effets du vieillissement. Lorsqu'on analyse son

étymologie, le mot *régénération* vient de la combinaison des mots *re* (latin, de nouveau) et *genesis* (latin et grec, genèse). En termes simples : la régénération consiste en la formation d'une partie manquante par un organisme [1]. Il est peu probable que nous soyons capables de vivre éternellement, d'ici quelques années ou même quelques siècles, mais il est possible que nous puissions améliorer notre capacité à régénérer notre corps en étudiant la régénération.

En fait, les anciens grecs faisaient déjà mention de la régénération dans quelques-unes de leurs légendes (Fig. 1, p. 3). Par exemple, lors de sa deuxième épreuve, Hercules fit face à une hydre géante qui avait le pouvoir de régénérer de multiples têtes lorsque ce dernier lui en coupait une [2]. De son côté, le dieu Prométhée fut puni par Zeus pour avoir remis le feu, symbolisant la connaissance, aux humains. Comme châtiment, il fut attaché au sommet d'une montagne où un aigle de grande envergure lui dévorait le foie tous les jours. Une fois la nuit tombée, son foie se régénérait complètement [2-4]. Personne ne sait si cela tient du hasard, mais l'hydre est un animal invertébré qui a la capacité de se régénérer, et le foie de l'être humain possède aussi cette capacité. Cela indique néanmoins que la régénération fascine l'humain depuis très longtemps.

De nos jours, les humains tentent maintenant de créer des applications concrètes à partir de leurs connaissances sur la régénération. La médecine régénératrice est une branche

Figure 1 – La régénération dans la mythologie grecque. A) Représentation du combat d'Hercules contre l'hydre de Lerne. Auteur : Antonio del Pollaiolo, v. 1460. B) Représentation du supplice de Prométhée. Auteur : Gustave Moreau, v. 1869. Images tirées du domaine public (internet).



de la médecine moderne qui vise à combiner les résultats obtenus dans plusieurs domaines scientifiques comme la biologie, la biochimie, la chimie, la physique et le génie biomédical afin de développer de nouveaux traitements. Ces nouveaux traitements, une fois développés, laissent envisager la possibilité de renouveler, remplacer et régénérer les différents organes, tissus et structures du corps humain qui sont blessés ou affectés par une maladie [5]. Dans les quelques dernières décennies, des progrès immenses ont été accomplis dans plusieurs domaines sous-jacents à la médecine régénératrice. Tout d'abord, la première transplantation d'organe réussie entre deux personnes, effectuée par Joseph Murray en 1954, a permis à plusieurs patients de prolonger leur vie suite à l'acquisition d'un organe sain [6]. Cette première expérience a même mené récemment à la greffe allogénique d'un visage par une équipe française en 2005 [7]. D'autres groupes de recherche ont décidé de se concentrer, non pas sur les greffes d'organes, mais sur le développement d'organes artificiels. De nos jours, il est maintenant possible de remplacer une structure simple comme la hanche [8] ou un organe complexe comme le cœur [9] par un organe artificiel. Quant à elle, la compagnie québécoise Victhom travaille avec plusieurs groupes de recherche d'universités du Québec au développement d'une jambe bionique permettant aux personnes amputées de marcher et même de monter un escalier (www.victhom.com). Finalement, en ce qui concerne la guérison des plaies, plusieurs tissus (*i.e.* épiderme, derme, épiderme+derme...) sont maintenant cultivés en laboratoire et greffés à des patients ayant subi de graves brûlures ou ayant des ulcères chroniques qui ne guérissent pas [10].

Toutes les approches mentionnées dans le précédent paragraphe contribuent sans aucun doute à améliorer la condition des patients traités. Malheureusement, toutes ces approches ne permettent pas encore le remplacement exact de la fonction et de la structure de l'organe ou du membre blessé ou amputé. Le but ultime de la médecine régénératrice est de permettre la régénération des tissus endommagés du corps humain.

1.3 Les capacités limitées de régénération de l'humain et des autres mammifères

Tout comme les autres vertébrés, les mammifères ont la capacité de renouveler différentes composantes de leur corps comme le sang, les cheveux, les ongles, la peau et la paroi de certains organes internes comme la cavité buccale et la muqueuse intestinale. Cette capacité à renouveler tous ces tissus découle du fait, qu'à la base de chacun d'eux, réside une population de cellules-souches prêtes à se diviser pour contribuer au tissu tout en se renouvelant elles-mêmes [11,12]. Toutefois, suite à une blessure qui traverse la peau (épiderme jusqu'au derme) une cascade d'événements impliquant plusieurs mécanismes immunitaires et cellulaires est alors déclenchée [13,14]. Ce processus de guérison se déroule pendant quelques jours, voire semaines, pour habituellement mener à la formation d'une cicatrice. Si la blessure est plus grave (*i.e.* l'amputation d'un membre entier), le processus de cicatrisation prend place, mais aucune régénération des tissus n'a lieu.

Nous pouvons penser qu'il sera très difficile d'activer la régénération tissulaire chez l'espèce humaine, car nos membres ne possèdent pas la capacité de régénérer suite à une amputation complète. Heureusement, certains de nos organes et membres disposent toutefois d'une capacité de guérison ressemblant à la régénération. Ceci laisse entrevoir que des progrès scientifiques dans le domaine pourraient nous permettre d'étendre cette capacité aux autres organes et membres qui ne peuvent pas régénérer présentement.

Chez les vertébrés supérieurs, le foie est un des organes qui possède une grande capacité de régénération. En fait, chez le rat, la souris ou l'humain, suite à une hépatectomie pouvant aller jusqu'à 90% de la masse du foie, on observe une régénération de l'organe. Il est important de préciser que, lorsqu'on parle de régénération hépatique, il n'y a pas de formation de blastème ni présence de dédifférenciation cellulaire qui sont habituellement signes d'une régénération tissulaire [15,16]. Dans le cas du foie, on parle habituellement d'hyperplasie compensatoire [15]: une fois l'hépatectomie effectuée, les cellules de la partie restante du foie vont se diviser jusqu'à ce que cette partie atteigne le volume original du foie [15,17]. Les hépatocytes forment le type cellulaire qui contribue le plus à la régénération hépatique, mais il a été démontré que tous les types cellulaires présents dans le foie prolifèrent aussi lors du processus [17]. Il semblerait qu'il n'y ait aucune contribution évidente des cellules ovales (cellules souches du foie) lors de l'hyperplasie compensatoire suite à l'hépatectomie [18]. À la fin du processus qui dure de

une à deux semaines chez les rongeurs et de un à deux mois chez l'humain, le foie « régénéré » occupe le même volume que l'original [19]. Pareillement, le pancréas est un autre organe avec des fonctions endocrines et exocrines qui peut régénérer par hyperplasie compensatoire chez les mammifères [20]. Suite à une pancréatectomie pouvant aussi aller jusqu'à 90% de sa masse, les cellules β productrices d'insuline vont commencer à proliférer [20-22]. À l'aide de techniques de marquage de cellules et de souris transgéniques, il a été montré que seules les cellules β participent à la régénération du pancréas et qu'aucune cellule-souche n'est impliquée dans le processus [21,22]. Dans le cas du foie et du pancréas, le processus d'hyperplasie compensatoire n'est pas équivalent à une régénération parfaite, puisque l'organe final n'est pas identique à l'original.

Le muscle squelettique fait aussi partie des tissus qui peuvent régénérer suite à une blessure chez les mammifères. Ce tissu est composé majoritairement de deux types cellulaires : les fibres musculaires multinucléées, qui se contractent pour donner le mouvement, et les cellules satellites, cellules-souches du muscle [23]. En temps normal, la majorité des cellules du muscle sont en quiescence [23], mais si le muscle est endommagé (suite à divers traitements comme un effort soutenu, une ischémie, une brûlure par le froid, un dommage mécanique ou chimique) une réponse régénératrice va être induite [23,24]. Une fois les débris cellulaires récupérés par les cellules immunitaires [25], les cellules satellites associées aux fibres vont proliférer pour générer une population de myoblastes mononucléés [23,24]. Ces myoblastes vont se multiplier puis fusionner entre eux ou avec

les fibres musculaires existantes pour réparer le tissu [23,24,26]. L'activité mitotique des cellules satellites semble être suffisante pour la régénération du muscle [27] et peut mener à la formation de nouvelles fibres multinucléées (aussi appelées myotubes) quatre jours après un traumatisme [28]. Le degré de la réponse régénératrice du muscle est influencé par l'innervation mais aussi par l'âge de l'animal [28,29]. Le muscle est un des tissus qui présente une des plus grandes capacités à régénérer chez les mammifères. Une réponse régénératrice peut même être observée suite à la réinsertion d'un muscle disséqué en pièces de 1 mm³ à l'endroit original, chez le rat [24,30]. Toutefois, la régénération musculaire n'est pas parfaite et l'apparition de fibrose peut, dans certains cas de blessure grave, empêcher le muscle de retrouver complètement sa fonction [31].

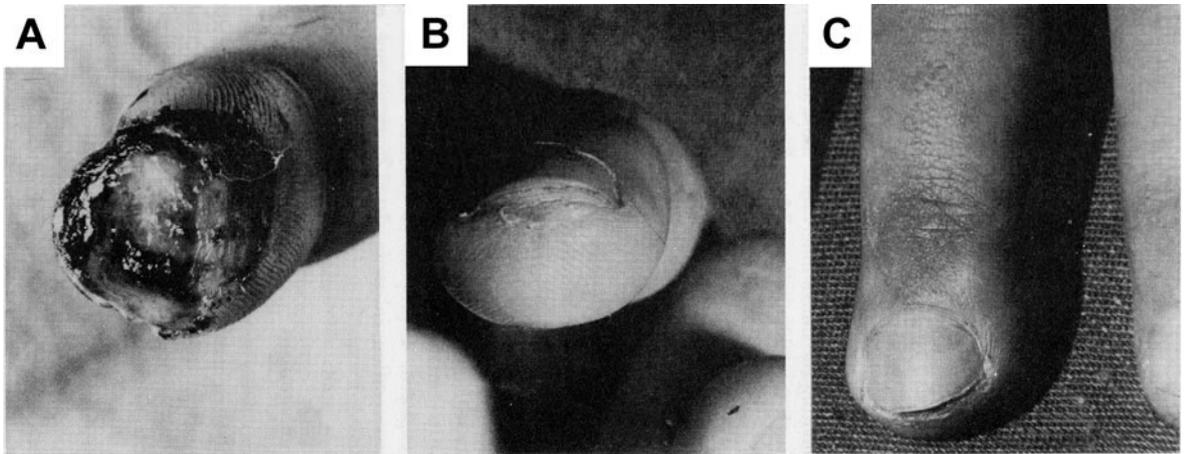
Contrairement aux muscles, les capacités de régénération des nerfs sont plutôt limitées. Les nerfs périphériques peuvent régénérer s'ils sont écrasés ou si les deux extrémités de leur axone sont ligaturées suite à une coupure. Par contre, une blessure plus grave qui mène à une perte d'une partie de l'axone d'un nerf périphérique aura pour effet de déclencher une dégradation de l'axone en aval de la blessure par les cellules de Schwann et les macrophages [32]. La réponse régénératrice est modérée si la partie perdue est plus courte que deux centimètres et quasi-absente si cette partie mesure plus de quatre centimètres [33]. La régénération de l'axone, la ré-innervation de l'axone par des nerfs avoisinants ou le remodelage des circuits nerveux au niveau du système nerveux central sont les trois moyens disponibles pour récupérer la fonction perdue suite à la blessure. Il va

sans dire que ces réponses sont très limitées chez les amniotes [32]. Si l'axone en amont de la blessure réussit à croître pour rejoindre l'ancien tube endoneural, il y aura régénération du nerf [34]. Après quelques jours, la croissance de l'axone peut atteindre une vitesse d'environ deux à trois millimètres par jour [32]. Suite à la régénération, les connexions nerveuses sont parfois erronées et les axones qui n'ont pas rejoint leur cible sont éliminés [35,36]. Le processus de régénération des nerfs périphériques est souvent imparfait et les axones qui ont régénéré sont plus petits et transmettent souvent moins bien l'influx nerveux que les originaux [37,38].

Un dernier exemple qui démontre le potentiel limité, mais bien présent, que possèdent les mammifères à régénérer une partie amputée est la régénération du bout des doigts. Plusieurs rapports de cas cliniques et expériences menées en laboratoire montrent que la régénération d'un doigt peut avoir lieu si l'amputation se déroule dans la dernière phalange, et ce, chez la souris, le singe et l'humain (Fig. 2, p. 12) [39-45]. Si l'amputation est faite dans la deuxième phalange, la régénération n'a pas lieu [39,42]. Pour qu'il y ait régénération, la plaie doit être traitée de manière conservatrice, en y apposant seulement un pansement qu'on change régulièrement [40,42]. La fermeture de la plaie par des points de suture inhibe le processus de régénération et mène à la formation d'une cicatrice, tout comme la greffe d'une pièce de peau mature sur le bout du doigt [40,42]. Il est soupçonné que les cellules-souches à la base de l'ongle ont un rôle inducteur sur la régénération du bout du doigt, parce qu'aucune régénération ne se produit si le moignon a complètement

perdu le tissu générateur de l'ongle [39,42]. Suite à cette découverte, une équipe a montré que la transplantation d'un ongle, incluant sa base, au bout d'une phalange proximale amputée (qui ne régénère habituellement pas) peut induire la formation d'os [46]. D'autre part, Reginelli *et al.* ont démontré qu'une amputation du bout de doigt effectuée dans la région où le gène *Msx-1* est exprimé chez l'embryon de souris mène dans 100% des cas à la régénération de la partie amputée [43]. Cette expression de *Msx-1* couvre la partie la plus distale du bout du doigt et correspond à la région couverte par l'ongle et la base de l'ongle (où se trouvent les cellules-souches de l'ongle) [43]. Pendant la régénération, l'expression de *Msx-1* couvre complètement le bout du doigt chez l'embryon, mais est restreinte aux cellules du mésenchyme sous l'ongle chez la souris nouveau-né [41,47]. L'expression du gène *Msx-1* a aussi été observée lors de la régénération de bouts de doigts d'embryons humains, cultivés *in vitro*, appuyant un rôle important pour ce gène dans le processus de régénération [48]. Chez l'humain, la majorité des cas de régénération du bout des doigts rapportés concernent des enfants entre un an et 12 ans, et le processus de régénération dure environ 30 jours peu importe l'âge de l'enfant [40,42]. Dans la majorité des cas, la morphologie de la partie régénérée est acceptable à la fin du processus, même si certains doigts sont plus courts que l'original et présentent parfois un ongle déformé [39,41,45,49]. Dans son ouvrage intitulé « Regenerative biology and medicine » l'auteur David L. Stocum rapporte le cas d'un homme de 76 ans dont les bouts de trois doigts, amputés lorsque ce dernier avait 29 ans, auraient régénérés. Ce cas représente la limite d'âge supérieure à laquelle la régénération d'un bout de doigt aurait été observée [4]. Ce dernier cas appuie le

Figure 2 – Régénération d'un doigt humain. A) Amputation d'un doigt dans la dernière phalange, chez une enfant âgée de 5 ans. B) et C) Le bout du doigt est régénéré 12 semaines après l'accident. Figure adaptée de Illingworth, 1974 [42].



fait que le potentiel de régénération du bout des doigts diminue avec l'âge chez l'humain [40]. Dans les années 1990, Lee *et al.* ont développé un traitement pour stimuler la guérison/régénération du bout des doigts qui consiste à envelopper le bout amputé d'une enveloppe de chitine [49]. La chitine est un polysaccharide retrouvé dans la carapace de plusieurs crustacés (*e.g.* crevettes, crabes, homards) et insectes (*e.g.* fourmis, scarabées, papillons). Bien que ce traitement améliore grandement la guérison de blessures graves aux doigts, il ne permet toutefois pas la régénération d'une phalange amputée [49].

Le potentiel de régénération chez les vertébrés supérieurs est extrêmement limité et restreint aux organes mentionnés ci-haut (*i.e.* foie, pancréas, muscles, nerfs périphériques, bout du doigt). Dans la majorité des cas énumérés, la structure et la fonction de l'organe suivant la guérison ne sont pas identiques à celles de l'organe original. Pour ces raisons, il devient important de combiner le développement de nouveaux traitements avec les recherches basées sur l'étude d'animaux qui ont de grandes capacités de régénération. Ces animaux peuvent être utilisés comme modèles de recherche afin d'expérimenter pour mieux comprendre les différentes cascades biologiques qui régulent la régénération. Ainsi, peut-être un jour sera-t-il possible d'activer le processus de régénération pour tous les organes et membres chez l'humain.

1.4 Histoire de l'étude de la régénération

Aristote (384-322 a.v. J.-C.) semble avoir été le premier à noter ses observations des différents modes de régénération utilisés par les animaux [2]. Il remarque entre autres, la capacité qu'ont certains lézards à régénérer le bout de leur queue et note que les bois des chevreuils repoussent chaque année. C'est par contre René-Antoine Ferchaud de Réaumur (1683-1757) qui a été le premier à réellement étudier le phénomène de la régénération. En 1712, il présente à l'Académie Française un traité dans lequel il décrit le processus de régénération de la patte de l'écrevisse, suite à l'amputation ou à l'autotomie de celle-ci [2,3,50]. Un peu plus tard, en 1744, Abraham Trembley (1710-1784) publie un recueil de ses expériences sur la régénération intitulé *Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce à bras en forme de cornes* [51]. Dans ce mémoire, il fait part de ses observations sur ce polype, qu'il nomme hydre, comme le monstre légendaire, car ce dernier possède la capacité de régénérer plusieurs têtes [2]. Trembley utilise une approche expérimentale plus raffinée afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à ses observations, ce qui lui vaut parfois le titre de «père de la zoologie». En 1745, le naturaliste suisse Charles Bonnet (1720-1793), qui se dit un «élève spirituel» de Réaumur, publie son traité d'insectologie [2]. Il parle, dans ce traité, de divers sujets comme la reproduction des insectes, mais aussi de la régénération chez certaines espèces de vers. Fait intéressant, suite à leurs observations, Réaumur et Bonnet deviennent d'ardents défenseurs de la théorie préformationniste. Suite aux expériences de Trembley, Bonnet modifia sa théorie préformationniste pour l'accommoder avec les capacités qu'avaient certains animaux à régénérer. Il supposa que les animaux qui pouvaient régénérer certaines parties de leur

corps possédaient des «germes préformés», distribués dans leur corps en entier, qui étaient activés lors de la régénération [2]. Bonnet fit part des modifications apportées à sa théorie à son bon ami, le scientifique italien Lazzaro Spallanzani [2]. Spallanzani (1729-1799) fut le premier à observer les capacités de régénération des urodèles amphibiens, communément appelés salamandres. Dans son essai sur la reproduction animale, il décrit de manière détaillée le processus de régénération de la patte, de la queue et de la mâchoire chez la salamandre [52]. Il est donc le premier scientifique à étudier le processus de régénération chez les vertébrés, mais aussi le premier à établir une comparaison entre un membre en développement et un membre en régénération [3].

Le développement des techniques en science et en biologie au cours du 19^e siècle ainsi que l'élaboration de la théorie cellulaire ont amené les scientifiques à regarder la régénération d'un nouvel œil. Vers la fin de ce siècle, Thomas Hunt Morgan (1866-1945) redonne un nouvel élan aux recherches dans le domaine. Il tente alors d'expliquer la régénération en considérant les réactions chimiques et physiologiques se produisant dans chaque organisme. Il mène des expériences détaillées sur plusieurs modèles animaux parmi lesquels on retrouve différentes espèces de vers, de crustacés, de poissons et de salamandres. Il tire plusieurs conclusions importantes de ses expériences. Entre autres, il détermine que la quantité de nourriture ingérée par un animal influence le rythme auquel ce dernier peut régénérer ses organes, mais aussi que les tissus déjà différenciés doivent conserver une capacité à perdre leur différenciation pour pouvoir régénérer une partie

amputée [53]. Morgan discute aussi de l'importance de la régénération lors de l'évolution des espèces en fonction de la théorie de Darwin [54]. La contribution majeure de Thomas Morgan au domaine de la régénération est sans doute la définition des termes «morphollaxique» et «épimorphique» pour désigner deux différents types de régénération [55,56]. La régénération morphollaxique implique le réarrangement des tissus sans prolifération cellulaire, tandis que la régénération épimorphique requiert une croissance cellulaire active pour régénérer la partie amputée [55,56].

De nos jours, l'étude de la régénération ne se déroule plus au niveau macroscopique, mais bien à un niveau moléculaire. Les chercheurs tentent de découvrir quels gènes ou molécules contrôlent les différentes étapes cellulaires menant à la régénération. Les techniques expérimentales ont bien évolué depuis le temps de Réaumur, mais les animaux utilisés en laboratoire comme modèles d'étude ont, quant à eux, peu changé.

1.5 Les différents modèles d'étude de la régénération

La capacité de régénération est très répandue chez les eucaryotes. Dans presque tous les *phyla*, on retrouve des animaux ayant la capacité de régénérer une partie perdue [57]. Les eucaryotes unicellulaires présentent la forme la plus simple de la régénération. En exemple, si la paramécie *Bursaria sp.* est coupée en deux parties, les deux parties se refermeront et les organelles internes perdues seront régénérées pour ainsi reformer deux

organismes entiers. Cette forme très simple de la régénération peut s'apparenter au mode de reproduction asexuée, nécessitant la fission de *Bursaria sp.*, qui donne aussi naissance à deux organismes [57].

Chez les organismes plus complexes, la régénération implique généralement le déroulement de trois étapes essentielles suite à une blessure ou amputation : 1- une étape de guérison nécessitant la fermeture de la plaie, 2- une étape impliquant la génération d'une population de cellules destinées à régénérer la partie amputée, et 3- une étape de morphogenèse pendant laquelle cette population de cellules se divisera et/ou se différenciera pour régénérer la partie amputée [58]. Bien que ces trois étapes soient indispensables au bon déroulement du processus de régénération, les mécanismes cellulaires menant à la régénération chez les différents organismes, invertébrés et vertébrés, sont très variés. L'étude de plusieurs modèles ayant la capacité de régénérer est nécessaire à la compréhension des différents mécanismes de régénération.

1.5.1 La régénération chez les invertébrés

1.5.1.1 L'hydre

L'hydre est un animal invertébré multicellulaire simple, composé de seulement deux couches germinales de cellules (animal diploblaste), soit l'ectoderme et l'endoderme [59]. Le corps de l'hydre est composé de trois régions : le pied, le tronc et la tête formée d'une bouche autour de laquelle on retrouve les tentacules (Fig. 3 A, p. 21). Les cellules de l'hydre possèdent une capacité plastique inégalée, car une fois dissociées, ces cellules ont la capacité de se réassocier et de former un animal complet [60]. L'hydre est le parfait exemple d'un animal qui utilise le mode de régénération par morphallaxie. Suite à une amputation ou blessure, une partie de l'hydre, qui contient seulement quelques centaines de cellules, peut se réarranger et former un animal entier de plus petite taille [59]. Cette capacité de régénération inégalée découle du fait que les cellules du tronc sont en constante division chez l'hydre [61,62] et qu'il existe un gradient positionnel qui détermine la position de la tête et du pied de l'hydre [63]. Il est important de souligner qu'il n'y a aucune prolifération cellulaire lors de la régénération des tissus amputés, chez l'hydre, dans les heures qui suivent l'amputation [59,61,64,65]. L'hydre est le modèle le plus simple pour l'étude de la régénération mais il se prête bien aux techniques modernes comme la transgénèse [66] et l'interférence par l'ARN (RNAi). Ceci en fait un modèle invertébré très intéressant pour l'étude du rôle de différents gènes lors de la régénération morphallaxique [67,68].

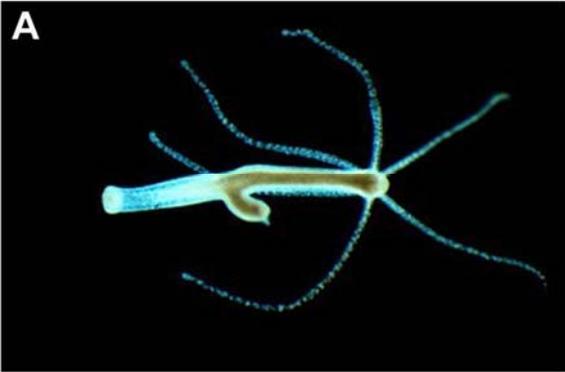
1.5.1.2 Le vers planaire

Le vers planaire est un invertébré triploblaste bilatéral qui n'a pas de cœlome ni de système respiratoire ou circulatoire (Fig. 3 B) [69]. Il possède par contre un axe antéro-postérieur défini. Une caractéristique unique au vers planaire est la présence d'une population de cellules souches, appelées néoblastes, distribuées dans l'organisme [70-72]. Le processus de régénération qu'utilise le vers planaire combine la morphallaxie et l'épimorphose. Suite à l'amputation, la plaie est recouverte par un épithélium de guérison [71,73]. Par la suite, les néoblastes près du site d'amputation migrent et se divisent pour former un amas de cellules appelé blastème de régénération [74]. Cette première phase correspond à l'aspect épimorphique de la régénération chez le planaire. Fait intéressant, il est possible de régénérer un vers planaire complet avec seulement une petite partie d'un animal mature, la condition minimale étant que la partie contienne des néoblastes. Le vers reformé est, par contre, plus petit que l'original, parce que les tissus se sont réarrangés pour former un animal de plus petite taille [55,69,71]. Ceci correspond à la régénération morphallaxique du planaire [55]. Tout comme l'hydre, le vers planaire est un modèle invertébré intéressant, car il se prête bien aux approches expérimentales modernes tout en renfermant un type cellulaire unique [75-77].

1.5.1.3 Les autres invertébrés

Il existe plusieurs autres invertébrés qui possèdent la capacité de régénérer leurs tissus. Parmi ceux-ci, on retrouve entre autres les échinodermes (étoiles de mers,

Figure 3 – Modèles animaux pour l'étude de la régénération. A) L'hydre. B) Le vers planaire. C) Le criquet. D) le poisson-zèbre. E) Le têtard de grenouille. F) Le triton *Notophthalmus viridescens*. Images tirées du domaine public (internet).



concombres de mers) [78-81], la coquerelle [82], l'araignée-loup [83], certaines espèces de vers [84-86] et le criquet [87,88]. Mentionnons deux faits intéressants. Le concombre de mer dispose d'un mécanisme de défense particulier qui lui permet d'expulser sa cavité gastrique en guise de leurre pour ses prédateurs. Dans une période d'environ 30 jours suivant son expulsion, cet organe interne sera régénéré [89]. Par contre, ce même concombre de mer ne peut régénérer une blessure superficielle découlant d'une incision qui traverse l'épiderme et le derme et forme une cicatrice [90]. De son côté, le criquet est un excellent modèle pour l'étude de la régénération épimorphique chez les insectes (Fig. 3 C). Il régénère sa patte en passant par le développement d'un blastème de régénération et se prête aussi à la technique d'interférence par ARN [87]. Finalement, l'étude de la régénération chez des modèles invertébrés, qui présentent souvent une organisation tissulaire plus simple que les vertébrés, promet de livrer des résultats importants pour le développement de la médecine régénératrice.

1.5.2 La régénération chez les vertébrés

En général, la capacité à régénérer les tissus endommagés ou amputés est beaucoup plus rare chez les animaux vertébrés. On ne sait trop pourquoi certains animaux vertébrés possèdent une capacité limitée à régénérer leurs organes (*i.e.* poissons et mammifères) tandis que d'autres peuvent facilement régénérer plusieurs organes et membres s'ils sont endommagés (*i.e.* les amphibiens tels les têtards de grenouille et salamandres). Selon

Morgan, il n'existe aucune corrélation entre la probabilité qu'un animal subisse des blessures et sa capacité de régénérer [54]. Par exemple, une salamandre qui peut régénérer n'est pas plus exposée au danger qu'une souris qui ne peut régénérer ses membres, si on les prend chacun dans leur habitat naturel. Morgan suggère aussi que la régénération n'aurait pas été «sélectionnée» puis graduellement acquise lors de l'évolution des espèces. Il appuie ses dires en affirmant qu'il n'aurait pas été très utile pour certains animaux de pouvoir régénérer des organes incomplets avant de pouvoir régénérer des organes complets, car la forme intermédiaire ne serait d'aucune utilité. Il suppose aussi qu'un animal blessé qui a régénéré l'organe perdu ne devrait pas avoir plus de facilité à se reproduire qu'un animal qui n'a jamais été blessé [54]. Il pourrait n'y avoir eu aucune pression sélective sur la capacité de régénération, certaines espèces auraient conservé cette capacité tandis que d'autres l'auraient perdue [57]. Chez les animaux à sang chaud, l'obligation de fermer rapidement la plaie pour éviter d'être contaminés par des bactéries ou parasites suite à une blessure pourrait aussi expliquer pourquoi la régénération aurait été perdue au dépend de la guérison avec cicatrice [58]. Malgré le fait qu'il existe peu de vertébrés capables de régénérer parfaitement leurs tissus, certains sont des modèles très intéressants pour l'étude de la régénération en laboratoire.

1.5.2.1 Le poisson-zèbre

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) a la capacité de régénérer plusieurs parties de son corps suite à une amputation, incluant le bout de sa nageoire, sa moelle épinière, son nerf optique, sa rétine et l'apex de son cœur (Fig. 3 D) [91-95]. La nageoire et le cœur sont les deux organes les plus étudiés en ce qui concerne leur capacité de régénération. L'amputation de la nageoire du poisson-zèbre est rapidement suivie par la formation d'un épiderme de guérison [91,96]. Ensuite, les cellules du mésenchyme se détachent de la matrice et migrent vers le site d'amputation pour former le blastème [91,96]. Le processus de régénération de la nageoire dure environ 10 jours chez le poisson-zèbre adulte et il est influencé par la température de l'eau [91,97]. Le poisson-zèbre est aussi un des seuls vertébrés à pouvoir régénérer parfaitement son cœur suite à une amputation partielle. Suite à l'ablation de l'apex du cœur (correspondant à 20% du myocarde ventriculaire), il faut environ 60 jours au poisson-zèbre pour régénérer cette partie amputée [95]. La régénération du cœur chez le poisson-zèbre implique la réactivation du cycle cellulaire chez les cardiomyocytes de l'animal [94,98]. Étant donné qu'il est possible de réaliser des analyses génétiques à grande échelle chez cet animal, le poisson-zèbre est un modèle très attrayant et promet de révéler des informations déterminantes pour l'amélioration des capacités de régénération des vertébrés supérieurs.

1.5.2.2 Les amphibiens

1.5.2.2.1 Les anoures

Chez les anoures, ordre comprenant les grenouilles et crapauds, la régénération est restreinte à la période où l'animal est sous forme de têtard [1]. Le têtard est la forme aquatique que les anoures prennent, suite à la sortie de l'œuf, tout au long de leur développement juvénile (Fig. 3 E). Au moment de la métamorphose, le têtard perd sa queue, développe ses pattes avant et ses poumons et subit plusieurs changements physiologiques pour prendre une forme adulte amphibie [99]. Suite à l'amputation de la queue ou des pattes arrière du têtard (qui se développent un peu avant la métamorphose) la structure amputée sera régénérée, et ce chez la plupart des espèces étudiées [100-103]. Mais, il faut souligner que les grenouilles perdent graduellement la capacité de régénérer leurs membres plus le moment de la métamorphose approche. Plusieurs auteurs ont en fait démontré, en effectuant une amputation de la patte arrière à différents stades du développement, que les grenouilles de genre *Rana* [101], *Bufo* [102] et *Xenopus* [100] voient leur habileté à régénérer leurs pattes diminuer à partir du stade 53. Cette diminution de la capacité à régénérer est aussi observée pour le cristallin chez *Xenopus laevis* [104]. Une amputation de la patte aux stades 54, 55, 56 et 57 mène à la régénération d'une patte malformée qui présente un nombre de doigts inférieur à la normale, et ce plus on approche du stade 57 (moment de la métamorphose) [100-102]. Le processus de régénération est presque complètement inhibé chez les grenouilles métamorphosées. Chez les grenouilles du genre *Bufo* et *Rana*, aucune régénération du membre n'est observée chez l'adulte et la patte amputée forme un moignon [101,102]. Michael *et al.* ont même montré que cette réponse

n'est pas influencée par le niveau de l'amputation (*i.e.* proximal ou distal) chez *Bufo viridis* [105]. Chez les grenouilles du genre *Xenopus* et *Hymenochirus*, une amputation d'une patte chez l'adulte mène à la formation d'un pic cartilagineux au site d'amputation [100,106,107]. Des analyses histologiques ont montré qu'il n'y a pas de muscle dans cette structure et qu'elle est seulement composée de cartilage [100].

Suite à l'amputation de la queue ou de la patte chez les têtards de grenouilles, un épithélium de guérison est formé pour couvrir la plaie. Il ne semble pas y avoir de prolifération cellulaire lors de la formation de l'épithélium qui se résume à la migration de cellules de la peau sur la plaie [101]. Ensuite, une accumulation de cellules présentant une forte activité mitotique se produit sous cet épithélium [108]. Cette masse de cellules s'apparente au blastème de régénération retrouvé lors de la régénération d'un membre, chez les urodèles (voir plus bas) [1,108]. Plusieurs auteurs affirment que la régénération d'une patte, même si elle mène à la formation d'un pic cartilagineux chez *Xenopus laevis*, est de type épimorphique [108-110]. Cette théorie est contestée par Gargioli *et al.* qui a analysé la régénération de la queue chez le têtard [111]. À l'aide de greffes de tissus d'animaux transgéniques exprimant la *green fluorescent protein* (GFP) sur des animaux normaux, l'auteur a montré que chacun des tissus de la queue (*i.e.* moelle épinière, notochorde et muscle) régénère via un procédé spécifique à chaque tissu (*e.g.* la moelle régénère la moelle) [111]. L'auteur démontre aussi que les muscles sont régénérés par l'activité mitotique de cellules satellites et non par la prolifération de cellules dédifférenciées comme

chez les urodèles [111-113]. Suite à ces expériences, les auteurs proposent le terme de « bourgeon de régénération » plutôt que de blastème, qui identifie une masse de cellules non-différenciées, pour le processus de régénération de la queue chez le têtard de *Xenopus* [111]. Pour revenir à la patte, plusieurs auteurs ont montré que des gènes associés au processus de dédifférenciation cellulaire chez les urodèles sont exprimés lors de la régénération chez *Xenopus*. Par exemple, le gène *Msx-1*, reconnu pour jouer un rôle important dans le processus de dédifférenciation cellulaire [41,114], est exprimé près du site d'amputation de la patte, chez le têtard et la grenouille adulte [109,115]. Les données moléculaires mentionnées ici, jumelées aux données histologiques de Goss et Forsyth [101,110], amènent souvent les experts de la régénération de la patte chez les grenouilles à parler de blastème et de dédifférenciation cellulaire bien qu'aucune preuve tangible n'ait été apportée pour prouver la présence d'un tel processus. Néanmoins, la grenouille, particulièrement du genre *Xenopus*, demeure un modèle très utile pour l'étude de la régénération, car il est possible de comparer à l'intérieur d'une même espèce, un animal juvénile qui peut régénérer avec un animal adulte qui ne possède pas cette capacité.

1.5.2.2.2 *Les urodèles*

Les urodèles amphibiens, communément appelés salamandres, représentent le modèle de choix pour l'étude de la régénération épimorphique. Ces amphibiens à corps long et à queue, qui sont parfois terrestres ou aquatiques, possèdent une capacité à

régénérer leurs tissus qui est inégalée chez les autres vertébrés. Après les anoures, ils forment le deuxième plus grand ordre d'amphibiens, le troisième ordre étant celui des gymnophiones (aussi appelés apodes, amphibiens sans membre) [99]. Il existe plusieurs familles d'urodèles mais deux sont particulièrement dignes de mention, car elles renferment les espèces d'urodèles les plus utilisées en recherche. La première est celle des *Ambystomatidae* dont les salamandres *Ambystoma maculatum*, *Ambystoma tigrinum* et *Ambystoma mexicanum* (i.e. l'axolotl) font partie. La deuxième est celle des *Salamandridae* qui renferme les trois principales espèces de tritons (en anglais « newt ») étudiées en laboratoire, soit *Notophthalmus viridescens* (Fig. 3 F), *Cynops pyrrhogaster* et *Pleurodeles waltl* [1]. Au début du vingtième siècle, les urodèles étaient les modèles de choix en biologie du développement et en embryologie étant donné la facilité avec laquelle il était possible de manipuler leurs œufs [116]. Peu de gens le savent, mais c'est en faisant des greffes entre des œufs de deux espèces de tritons (*Triturus taeniatus* et *Triturus cristatus*) que Hans Spemann a découvert les propriétés inductrices d'une région de l'œuf qu'il a nommé « organisateur ». Les résultats de Spemann et de son étudiante Hilde Mangold, publiés en 1924, le menèrent à l'obtention du prix Nobel de physiologie/médecine en 1935 [99,116]. Quelques 156 ans avant la publication des travaux de Spemann et Mangold, Lazzaro Spallanzani montra aussi un intérêt scientifique pour les urodèles, et ce pour une toute autre raison. En fait, en publiant son « *Prodromo sa un Opera da Imprimersi sopra le Riproduzioni animali* », Spallanzani devint le premier chercheur à publier un ouvrage scientifique sur les capacités de régénération des salamandres [1,2,52,117].

1.5.2.2.2.1 L'axolotl (*Ambystoma mexicanum*)

Les résultats présentés dans cette thèse ont tous été obtenus suite à des expériences effectuées en utilisant l'axolotl comme modèle expérimental. Pour cette raison, la prochaine section qui présente le processus de régénération en détails sera particulièrement appuyée par les expériences effectuées chez l'axolotl. Par contre, plusieurs expériences réalisées chez les autres espèces de salamandres ou de tritons seront mentionnées lorsque nécessaire. Il faut dire que le processus de régénération entre les diverses espèces d'urodèles est très similaire et que les différences entre les mécanismes utilisés seront aussi soulignées.

L'axolotl est une salamandre originaire du Mexique, plus particulièrement des lacs Xochimilco et Chalco, tout près de Mexico [118,119]. Depuis très longtemps, les Aztèques connaissaient l'axolotl et l'utilisaient même pour se nourrir. On dit que l'axolotl pourrait avoir obtenu son nom en référence au dieu aztèque *Xolotl*, dieu responsable de surveiller les morts et ressuscités ainsi que les jeux et les monstres [118]. C'est au général Forey, membre d'une mission française d'exploration au Mexique, en 1863, qu'on doit le début de la carrière scientifique de cet urodèle. Il envoya par bateau, en direction du Musée d'histoire naturelle à Paris, 33 axolotls « noirs » (type sauvage) et un axolotl « blanc » (albinos). Auguste Duméril acquit sept de ces spécimens pour les étudier. On peut croire

que les axolotls utilisés en recherche aujourd'hui sont, en partie, les descendants de ces animaux [118,119]!

L'axolotl garde un mode de vie aquatique toute sa vie. Les branchies externes, de chaque côté de sa tête, lui permettent de respirer sous l'eau. Cette salamandre ne se métamorphose pas, comme le fait la majorité des autres salamandres, et cela lui vaut parfois le qualificatif « néoténique » ou « paedomorphe » [99]. Une espèce « paedomorphe » atteint la maturité sexuelle sans passer par une étape de métamorphose [99]. L'axolotl atteint sa maturité sexuelle autour de l'âge d'un an [118,119], mais subit les mêmes changements biochimiques de son hémoglobine et des protéines de son sang que son espèce sœur, *Ambystoma tigrinum*, qui elle se métamorphose au même âge [120]. En captivité, l'axolotl peut vivre plus de 10 ans et se reproduit plus facilement que les autres espèces d'urodèles [16,118]. Un projet de séquençage de gènes exprimés (EST, Expressed Sequence Tags) a été amorcé il y a quelques années par deux équipes internationales, soit celle du Dr. Elly M. Tanaka, au Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics à Dresden, en Allemagne et celle du Dr. S. Randall Voss, à University of Kentucky à Lexington, aux États-Unis [121,122]. Ces deux projets combinés ont déjà rendu accessibles plus de 23 000 séquences différentes et ont fait entrer l'axolotl dans l'ère de la génomique. Il est possible d'accéder aux séquences du groupe du Dr. Voss via le site internet *Sal-Site* à l'adresse suivante : <http://www.ambystoma.org/> [123] et la majorité des séquences identifiées par les deux groupes sont maintenant disponibles dans GenBank :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>. Ces projets de séquençage à grande échelle ont déjà mené au développement de puces à ADN pour l'axolotl. Cette technologie est très récente dans le domaine de la régénération et il n'existe présentement qu'une seule puce à ADN qui contient 4 844 séquences provenant de l'axolotl [124]. Cet outil très utile a déjà mené à quelques analyses de l'expression de gènes dans divers processus comme le développement embryonnaire, l'induction de la métamorphose et la régénération [124-126].

1.6 Le processus de régénération

L'axolotl possède la capacité de régénérer plusieurs de ses organes tout au long de sa vie (Fig. 4, p. 33) [1,127]. Suite à une amputation, la partie amputée sera régénérée complètement et il n'y aura pas de cicatrice entre le moignon et cette nouvelle partie. L'axolotl peut régénérer ses pattes, sa queue, sa moelle épinière, ses branchies, sa mâchoire, l'apex de son cœur et la partie antérieure de son cerveau suivant une amputation {Schnapp, 2005 #286; Wallace, 1981 #61; Flink, 2002 #619; Vargas- Gonzalez, 2005 #620; Jones, 1993 #621; McHedlishvili, 2007 #622; Wenk, 1971 #623; Graver, 1974 #624}. Le processus de régénération du membre est celui qui a été le mieux décrit au fil du temps, car la patte de l'axolotl est très facile à manipuler. De plus, il est possible de suivre la régénération du membre selon trois axes : l'axe proximo-distal, l'axe dorso-ventral et

Figure 4 – Parties du corps de l'axolotl pouvant régénérer. Image adaptée, tirée du domaine public (internet).

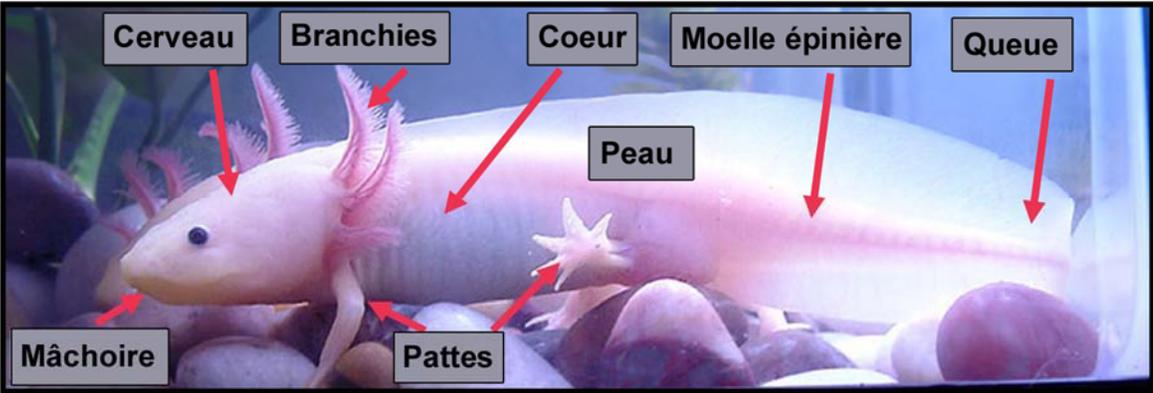


Figure 5 – Stades de régénération du membre chez l'axolotl, *Ambystoma mexicanum*, selon Tank, 1976 {Tank, 1976 #150}. En ordre : A) formation de l'épiderme de guérison (*wound healing*), B) dédifférenciation cellulaire (*dedifferentiation*), C) bourgeon primaire (*early bud*), D) bourgeon moyen (*medium bud*), E) bourgeon tardif (*late bud*), F) palette (*palette*), G) différenciation des doigts (*digital outgrowth*) et H) membre complètement régénéré. Figure adaptée de Tank, 1976 [128].

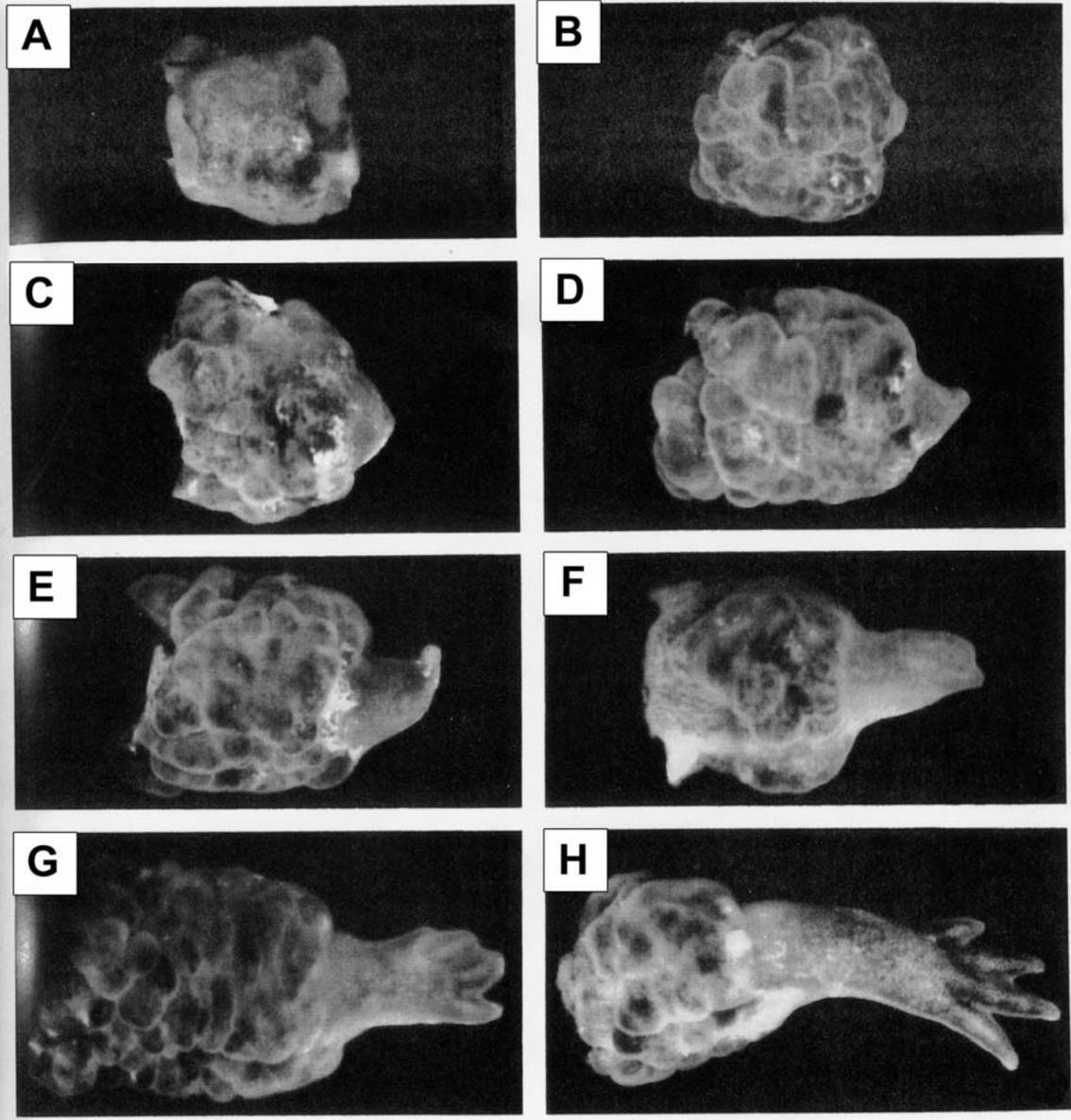
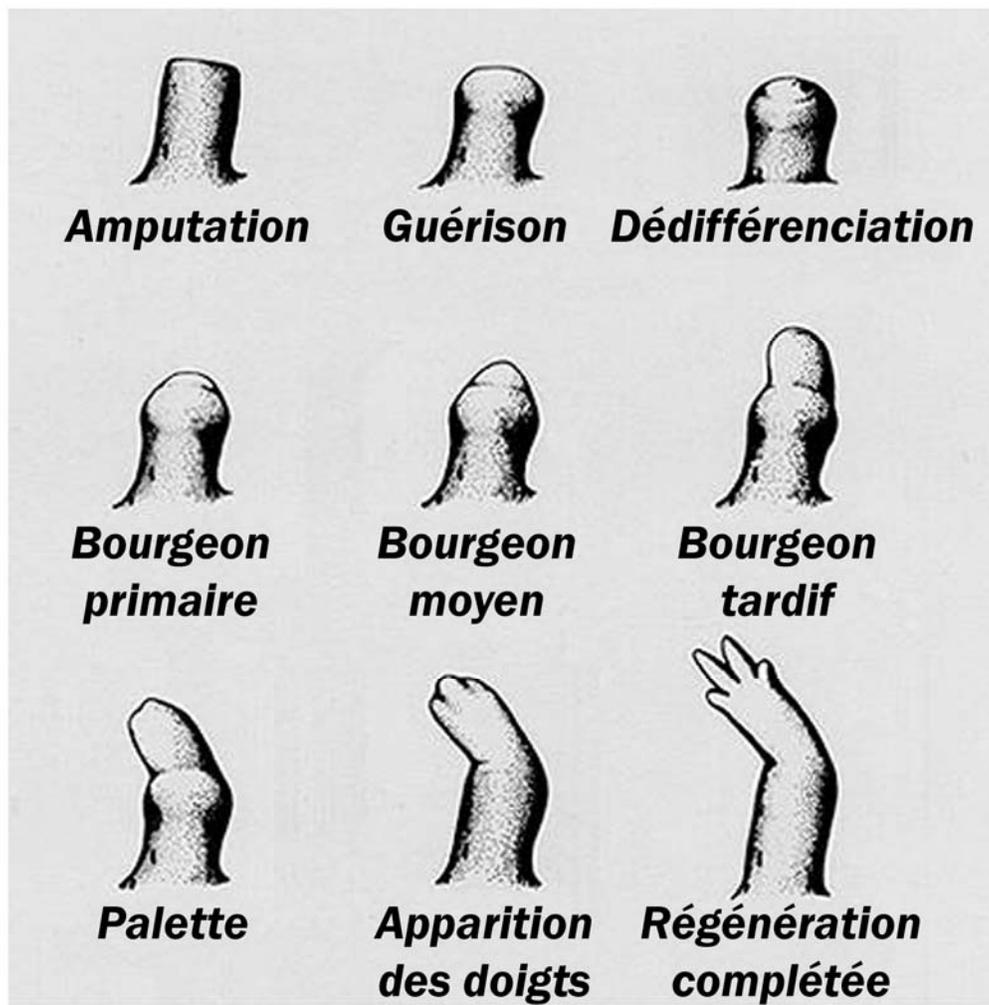


Figure 6 – Stades de régénération du membre du triton, *Notophthalmus viridescens*, selon Iten et Bryant, 1973 [129]. En ordre : amputation du membre (*amputation*), formation de l'épiderme de guérison (*guérison*), dédifférenciation cellulaire (*dédifférenciation*), bourgeon primaire, bourgeon moyen, bourgeon tardif, palette, apparition des doigts et membre complètement régénéré (*régénération complétée*). Figure adaptée de Iten, 1973 [129].



l'axe antéro-postérieur. La régénération du membre chez les urodèles est classiquement séparée en deux phases principales, soit la phase de préparation et la phase de redéveloppement [130]. Pour faciliter et uniformiser l'étude de la régénération du membre, Tank *et al.* et Iten *et al.* ont identifié et nommé les stades de régénération du membre, chez l'axolotl et le triton respectivement (Fig. 5 et 6, p. 35 et 37) [128,129]. Les stades de régénération du membre utilisés dans cette thèse et par la majorité des chercheurs dans le domaine sont les suivants : guérison de la plaie (*wound healing* WH), dédifférenciation cellulaire (*dedifferentiation*, DD), bourgeon primaire (*early bud*, EB), bourgeon moyen (*medium bud*, MB), bourgeon tardif (*late bud*, LB), palette (*pallette*, PAL) et différenciation des doigts (*early differentiation*, ED) (Fig. 5 et 6) [128,129].

1.6.1 Phase de préparation

1.6.1.1 Amputation et guérison de la plaie

Le processus de régénération du membre chez les urodèles est initié dès qu'il y a amputation. Suite à ce traumatisme, un épithélium de guérison est formé pour refermer la plaie. Cette étape est essentielle au bon déroulement des étapes subséquentes du processus. Si on empêche l'établissement de l'épithélium de guérison soit en l'enlevant de manière chirurgicale répétée ou en introduisant le membre amputé dans la cavité abdominale de l'animal, la régénération est inhibée [131,132]. Ce sont les cellules de l'épiderme, placées

en bordure du site d'amputation, qui vont migrer pour refermer la plaie. Hay et Fishman ont été les premiers à démontrer ceci de manière expérimentale [133]. En marquant les tissus de *Triturus viridescens* à la thymidine tritiée, ils ont montré que la majorité (plus de 95%) des cellules de la peau qui migrent pour former l'épithélium de guérison ne présentent aucune activité mitotique, dans les 48 premières heures suivant l'amputation [133]. Cette migration des cellules de la peau sur la plaie, est aussi à la base du processus de guérison des blessures cutanées chez l'axolotl [134]. À l'aide de la microscopie électronique, Repesh et Oberpriller ont montré que les cellules qui migrent sont souvent aplaties et qu'elles présentent des pseudopodes qui leur permettent de s'attacher au substrat majoritairement composé de fibrine [135]. Chez l'axolotl, il faut moins de deux heures pour que la plaie au bout d'un membre amputé se referme, pour des animaux de cinq centimètres de longueur [136]. Plus l'animal est gros, plus le processus de formation de l'épithélium de guérison est long.

Dans les jours suivant l'amputation, l'épithélium de guérison s'épaissit pour former la coiffe apicale ectodermique (CAE) [1]. Cette coiffe est, en quelque sorte, l'homologue de la crête apicale ectodermique présente au bout du membre en formation chez le poulet ou les mammifères [137]. L'épaississement de la coiffe résulte aussi d'un processus de migration des cellules de l'épiderme [133]. La CAE présente des caractéristiques morphologiques bien définies : elle a une épaisseur qui varie entre 5 et 18 cellules, elle n'a pas de membrane basale (tout comme l'épithélium de guérison) et renferme une population

de cellules en colonne à sa base, aux stades plus avancés [1,133,137]. Il semble que ce soit l'interaction épithélio-mésenchymateuse entre la CAE et le mésenchyme sous-jacent qui dirige ensuite le processus de régénération du membre. En fait, l'ablation de la CAE et sa transplantation à la base du blastème, mène à la régénération de la CAE originale et à la formation de membres comptant des doigts surnuméraires, chez l'axolotl [138]. Si un bout de peau mature est greffé sur le site d'amputation, ceci empêche la formation de la CAE et bloque la régénération [1].

Plusieurs gènes sont exprimés de manière caractéristique lors de la guérison et de la formation de la coiffe apicale ectodermique chez les urodèles. Le gène *Msx-2* est un facteur de transcription dont l'expression est très rapide, soit une heure seulement, après l'amputation [136]. Bien que l'expression de *Msx-2* soit associée à la région du doigt qui peut régénérer chez la souris [43], aucun rôle précis n'a encore été déterminé pour ce gène durant la régénération chez la salamandre. Son expression rapide dans la peau en périphérie du site d'amputation du membre, et au site d'une blessure au flanc, suggère un rôle dans la conversion de l'épiderme mature en épiderme permissif à la régénération [136]. L'expression de la fibronectine, dans la couche de cellules la plus basale de la CAE, pourrait aussi être associée à cette fonction permissive de la coiffe [137]. Il est connu que cette protéine extra-cellulaire peut stimuler la prolifération et la migration de plusieurs types cellulaires [139,140]. Plusieurs autres protéines d'intérêt sont sécrétées par les cellules de la CAE. Parmi celles-ci se trouvent les métalloprotéases qui ont pour rôle de

dégrader la matrice extra-cellulaire afin de permettre le réarrangement des tissus et la migration cellulaire lors de la régénération. *Matrix metalloproteinase-9 (Mmp-9)* est celle dont l'expression est la plus rapide, soit 5 heures après l'amputation, et sa production est influencée par la présence des nerfs [141]. Plusieurs autres *Mmp* sont exprimées dans la CAE et dans le blastème lors de la régénération chez l'axolotl et le triton [142-144]. La fonction des MMP s'est révélée essentielle au processus de régénération, car le traitement de membres en régénération avec un inhibiteur pharmacologique spécifique aux MMP cause l'arrêt du processus et la formation d'une cicatrice [145].

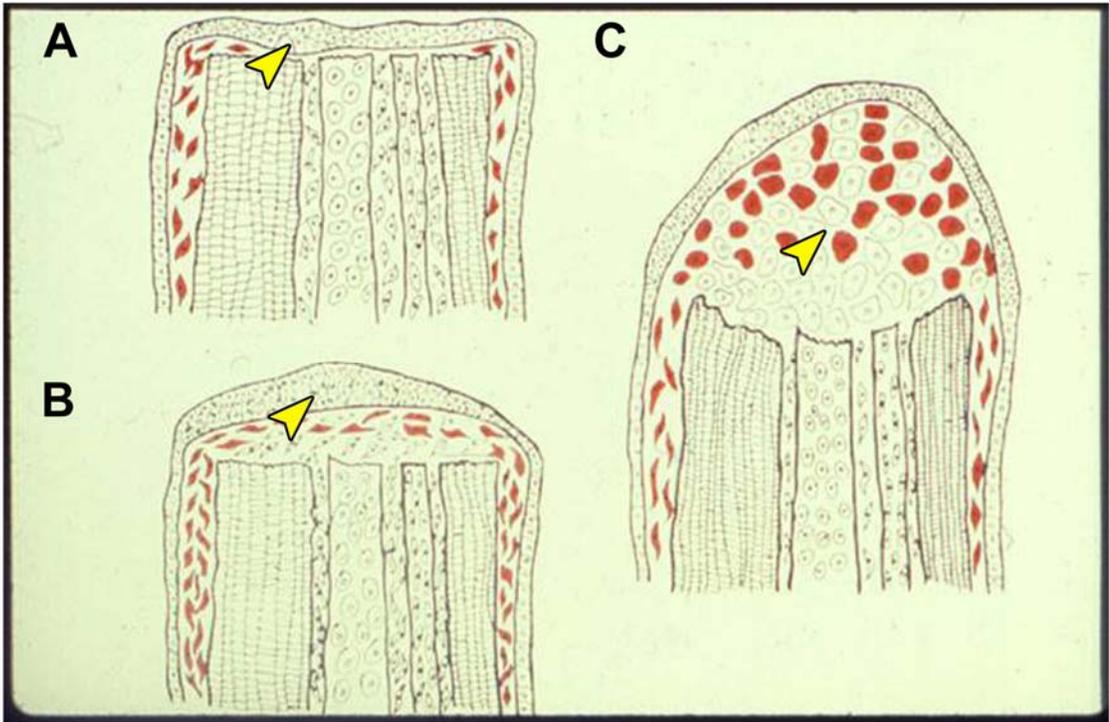
1.6.1.2 Formation du blastème

Une fois la coiffe apicale ectodermique établie, cette dernière dirige la formation du blastème, une structure unique au processus de régénération (Fig. 7, p. 44). Il a été démontré que les cellules qui contribuent au blastème proviennent d'une zone s'étendant sur deux millimètres seulement sous le site d'amputation [1,133,146,147]. Ce ne sont pas tous les types cellulaires qui contribuent également au blastème. Par exemple, les cellules de l'épiderme ne participent seulement qu'au processus de guérison (formation de l'épithélium de guérison) et ne contribuent pas au blastème [133,148]. Ce sont majoritairement les cellules musculaires et les fibroblastes du derme qui participent à la formation du blastème de régénération. Ce sont Dunis et Namenwirth qui ont montré que les fibroblastes du derme contribuent à la régénération de plusieurs tissus (*e.g.* cartilage,

vaisseaux sanguins, tissu conjonctif, tendons, etc) [149]. L'expérience consistait à amputer une patte irradiée (qui ne peut plus régénérer) d'un animal diploïde sur laquelle ils avaient fait une greffe de peau venant d'un animal triploïde non-irradié. Au bout de quelques semaines, dans la majorité des cas, la patte avait régénéré et avait une morphologie normale à l'exception qu'elle ne renfermait aucun muscle [149]. Cette expérience a aussi été répétée par Nigel Holder. Ce dernier montra que même les tendons de la main étaient positionnés au bon endroit dans ces pattes sans muscle [150]. Quelques années plus tard, Muneoka a montré que le derme forme environ 19% du tissu mature de la patte, mais qu'il contribue à 43% des cellules du blastème de régénération [151]. Ces données, appuyées par la faible contribution du cartilage au blastème (entre 0% et 3%), suggèrent fortement que les deux principaux tissus qui contribuent à la régénération chez les urodèles sont le derme (fibroblastes) et le muscle [1,148,149,151].

Durant les quelques jours qui suivent l'amputation, les cellules musculaires et les fibroblastes vont perdre leurs caractéristiques propres pour ensuite se détacher de la matrice qui les entoure et migrer sous la coiffe apicale pour former le blastème [1]. Le processus par lequel ces cellules reviennent à un état non-différencié se nomme dédifférenciation cellulaire. Morphologiquement, les cellules qui se dédifférencient adoptent une forme ronde et présentent un noyau élargi [133]. Les expériences de Dunis et Holder montrent bien que les fibroblastes du derme se dédifférencient pour régénérer tous les tissus de la patte à l'exception du muscle [149,150]. Par contre, beaucoup plus de données ont été obtenues en

Figure 7 – Représentation d'un blastème de régénération. A) Après l'amputation, un épiderme de guérison est formé sur la plaie suite à la migration des kératinocytes. La flèche jaune identifie l'épiderme de guérison. B) Dans les deux premiers jours suivant l'amputation, l'épiderme de guérison épaissit et se transforme en coiffe apicale ectodermique, identifiée par la flèche jaune. Au cours de ces deux premiers jours débute aussi le processus de dédifférenciation cellulaire. Ceci est observable par la perte de marqueurs de différenciation des fibroblastes et cellules musculaires (cellules en rouge), dans le membre. Ces cellules migrent ensuite sous la coiffe apicale. C) Au cours du processus de régénération, les cellules dédifférenciées s'accumulent pour former le blastème (identifié par la flèche jaune). Les cellules dédifférenciées formant le blastème vont proliférer puis se redifférencier pour régénérer la partie amputée.



étudiant le muscle, en ce qui concerne la biologie cellulaire et moléculaire de la dédifférenciation. Lo *et al.* ont été les premiers à observer la cellularisation de myotubes de triton (*N. viridescens*), cultivés *in vitro* et marqué au rhodamine-dextran, après leur injection dans une patte en régénération [152]. Il faut préciser que la cellularisation des myotubes n'est qu'un indice de leur dédifférenciation et ne constitue pas une preuve. Echeverri et Tanaka ont, quant à eux, observé la cellularisation *in vivo* de myotubes injectés au rhodamine-dextran, suite à l'amputation de la queue chez l'axolotl [153]. Les cellules mononucléées provenant de ces myotubes adoptent une morphologie stellaire typique de cellules du blastème, migrent et prolifèrent pour contribuer jusqu'à 29% des cellules du blastème [153]. Il a été suggéré que la dédifférenciation des myotubes chez la salamandre serait reliée à leur capacité à réintégrer le cycle cellulaire une fois différenciés [154]. Une des molécules qui est essentielle à l'activation du cycle cellulaire lors de la régénération est la thrombine [155,156]. Ce facteur pourrait agir en coopération avec d'autres molécules présentes dans le sérum chez les salamandres, pour activer la dédifférenciation cellulaire. En effet, l'exposition de myotubes de souris et de triton à un extrait de patte en régénération induit leur dédifférenciation *in vitro* [157]. Ceci suggère qu'une blessure ou amputation chez la salamandre mène à l'activation de gènes pro-régénération et que ces mêmes gènes ne s'activent pas chez les mammifères [157]. Un des gènes les plus susceptibles de diriger la dédifférenciation cellulaire chez les urodèles est *Msx-1*. Ce gène est exprimé dans tout le blastème au stade de bourgeon primaire [158]. Il est aussi possible de détecter, *in vitro*, l'expression de *Msx-1* dans les cellules musculaires activées de membre d'axolotl, avant

leur cellularisation [159]. L'inhibition de la transcription de *Msx-1* par morpholinos dans ces cellules empêche leur cellularisation et suggère que l'activité de *Msx-1* est essentielle à la dédifférenciation cellulaire chez les urodèles [159]. Les résultats obtenus par Odelberg *et al.* appuient cette affirmation, puisqu'une surexpression de *Msx-1* dans des myotubes murins C2/C12 induit leur cellularisation [114]. De plus, la surexpression de *Msx-1* dans ces cellules inhibe l'expression des marqueurs myogéniques, les ramenant à un état non-différencié [114]. Les auteurs démontrent aussi qu'en conditions propices, ces cellules peuvent se redifférencier en divers types cellulaires allant de cellules adipeuses, chondrocytaires, ostéogéniques à myogéniques. Ceci démontre l'état pluripotent des cellules dédifférenciées [114]. En ce qui concerne le muscle, un autre groupe a montré que les cellules satellites présentes dans ce tissu peuvent aussi participer à la régénération [160].

Dans certains autres contextes, incluant la régénération du cristallin et des cellules ciliées de l'oreille interne, les cellules du tissu amputé peuvent contribuer au processus par transdifférenciation [161-164]. Cette transformation implique la perte de caractéristiques propres par un type cellulaire puis sa différenciation immédiate en un autre type cellulaire précis [164]. Ceci a été observé chez l'axolotl, lors de la régénération de la queue. Echeverri *et al.* ont démontré que, suite à l'amputation de la queue, certaines cellules gliales contenues dans la moelle épinière de l'animal pouvaient se transdifférencier et participer à la régénération de plusieurs autres tissus [165]. Parmi ces tissus on retrouve le muscle, les neurones, le cartilage et les mélanocytes [165]. Les différents processus

cellulaire énumérés ci-haut montrent bien la plasticité étonnante retrouvée chez les différents tissus des urodèles amphibiens. C'est cette plasticité unique qui fait d'eux les seuls vertébrés à pouvoir régénérer un membre complexe après une amputation. Une fois le blastème de régénération établi, les cellules dédifférenciées vont proliférer (jusqu'au stade de bourgeon moyen) puis se redifférencier. Ceci marque le début de la phase de redéveloppement.

1.6.2 Phase de redéveloppement

La phase de redéveloppement de la régénération débute au stade de bourgeon tardif et partage plusieurs processus communs avec le développement du membre chez l'embryon [130,166]. Par contre, plusieurs différences notables existent entre la phase de préparation et la phase de redéveloppement.

Un premier exemple illustrant ces différences est la dépendance à la présence des nerfs. Si on dénerve une patte lors de la phase de préparation, la guérison de la plaie et la dédifférenciation cellulaire se déroulent normalement mais la régénération est inhibée [1,167]. Ceci mène à la régénération d'un membre tronqué, sans doigt [167]. La dénervation d'une patte durant la phase de redéveloppement ne bloque pas la régénération [1,167]. Une autre différence observable entre les deux phases de la régénération est le patron d'expression des gènes responsables de l'établissement des structures selon les

différents axes du membre. Le gène Sonic Hedgehog (*Shh*) qui détermine l'axe antéro-postérieur du membre et de la main est exprimé en un point postérieur bien spécifique durant la phase de redéveloppement [168,169]. Ce domaine d'expression est identique à celui observé durant le développement, chez l'axolotl et d'autres vertébrés [168,170]. Les gènes *Hox-A9* et *Hox-A13*, responsables de l'établissement du patron proximo-distal du membre, présentent aussi des patrons différents dans les deux phases. Les deux gènes ont un patron d'expression qui couvre tout le blastème aux stades de bourgeon primaire et moyen [171]. Au stade de bourgeon tardif, au début de la phase de redéveloppement, l'expression de *Hox-A13* devient restreinte à la partie la plus distale de la patte [171]. L'expression de ces gènes durant la deuxième phase de la régénération est identique à celle observée lors du développement du membre, chez la souris, le poulet et l'axolotl [171-173]. Les patrons d'expression des gènes *Hox-A9* et *Hox-A13* durant la régénération supportent deux aspects importants. D'abord, la phase de redéveloppement montre une réactivation du programme génétique qui régule le développement du membre chez l'embryon. De plus, les structures distales sont spécifiées en premier pendant la régénération, ce qui appuie un mode de régénération par intercalation [171]. C'est-à-dire que les gènes *Hox-A9* et *Hox-A13* déterminent la partie la plus distale en premier lieu, lors de la régénération. Ensuite, leurs patrons d'expression se distinguent et les structures intermédiaires sont régénérées. Finalement, une fois la phase de redéveloppement terminée, la patte est complètement régénérée. Le processus de régénération est « parfait » : tous les tissus à l'intérieur du

membre sont régénérés, ce qui permet à la nouvelle patte d'avoir une structure et une fonction identiques à l'originale.

1.7 Immunotolérance chez les urodèles

Le processus de régénération des urodèles peut être influencé par plusieurs facteurs physiologiques, chimiques ou biologiques. Plusieurs auteurs ont supposé que le système immunitaire des salamandres présente des caractéristiques uniques qui pourraient favoriser la régénération [13,174,175]. Il est connu que la plupart des vertébrés comme les poissons, les mammifères, les oiseaux et les reptiles forment une cicatrice suite à une blessure. Plusieurs indices laissent croire que la réponse immunitaire engendrée suite à l'induction de la blessure peut influencer la manière dont celle-ci guérira.

Tout d'abord, les souris de type « nude » ainsi que les souris nulles (*i.e.* knockout , KO) pour le gène PU.1 forment des cicatrices plus superficielles et moins profondes comparativement aux souris normales [176,177]. La souris « nude » et la souris nulle pour le gène PU.1 n'ont respectivement pas de lymphocyte T et de macrophage. Par conséquent, elles présentent une réponse immunitaire diminuée. La guérison des plaies chez ces deux types de souris mène à une peau d'apparence plus mature. Cette dernière est plus solide, plus vascularisée et comporte moins d'accumulation de collagène qu'une cicatrice chez une souris normale [176,177]. Ce type de guérison quasi-parfaite est aussi observé pendant les

deux premiers trimestres de gestation chez le fœtus des mammifères, qui n'a pas encore un système immunitaire très développé à ce moment [14,178]. Il semblerait également que la réponse immunitaire influence la capacité de régénération chez les anoues. Comme mentionné précédemment, les jeunes grenouilles ont la capacité de régénérer leurs membres à l'état de têtard [100-102]. Au moment de la métamorphose, le système immunitaire de la grenouille subit de profonds changements pour devenir beaucoup plus complexe chez l'adulte [174]. C'est à ce même instant que la capacité de régénérer diminue grandement ou disparaît selon l'espèce. Toutes ces données suggèrent une corrélation inverse entre la capacité à régénérer et la complexité du système immunitaire chez une espèce donnée [174].

La majorité des urodèles amphibiens présente une réponse immunitaire diminuée [174,179,180], très semblable à celle observée chez les têtards de grenouilles. Par exemple, l'axolotl n'exprime que trois type d'immunoglobulines (IgM, IgY et IgX), comparativement aux mammifères (IgA, IgD, IgE, IgG et IgM) et aux anoues (IgD, IgF, IgM, IgX et IgY) qui en ont cinq chacun [180]. Les chaînes des récepteurs sur les cellules T et les complexes majeurs d'histocompatibilité, responsables chacun de détecter et de présenter les antigènes, présentent très peu de variabilité chez l'axolotl et la majorité des urodèles [181-183]. Cette réponse immunitaire atténuée est reflétée par une production d'anticorps faible et retardée suite à l'injection d'un antigène chez l'animal [184]. La grande tolérance des urodèles face aux greffes de tissus entre en parfaite corrélation avec

cette réponse immunitaire faible [185,186]. Plusieurs expériences pour comprendre la régénération ont été effectuées en procédant à des greffes de tissus ou de blastèmes, en utilisant une ou deux espèces d'urodèles, et aucun cas de rejet n'a été signalé [151,187-190]. De plus, il a été montré que le nombre de cellules immunitaires circulant dans le sang, chez les urodèles, diminue lors de la phase de préparation de la régénération [175]. Les lymphocytes, les neutrophiles et les macrophages sont moins présents dans le sang pendant la phase de dédifférenciation cellulaire et au stade de bourgeon primaire puis reviennent à un niveau normal au stade de bourgeon moyen [175]. Ces données chez la salamandre, couplées aux données obtenues chez l'embryon humain ou chez les souris PU.1 ou « nude » suggèrent fortement qu'une réponse immunitaire diminuée favorise la régénération.

L'immunotolérance observée chez les urodèles n'est certainement pas la seule raison qui explique le fait que ces animaux puissent régénérer. Contrairement aux amniotes, les membres des urodèles apparaissent tardivement lors du développement embryonnaire et ils ne sont pas induits par une structure temporaire (*i.e.* mésoderme de la plaque latérale). Cette « autonomie » du membre chez les urodèles pourrait former une hypothèse qui expliquerait pourquoi leurs membres peuvent régénérer tandis que ceux des mammifères ne peuvent pas [191]. Il est possible que, suite à une amputation, la faible réponse immunitaire des urodèles couplée à la réactivation des signaux responsables de la dédifférenciation cellulaire et du développement du membre soient la clé du processus de régénération [13].

Néanmoins, la compréhension totale de tous les mécanismes essentiels à ce processus est encore loin de nous.

1.8 Gènes d'intérêt pour l'étude de la régénération

La biologie moléculaire s'avère être un outil fondamental pour étudier le rôle précis des gènes lors de la régénération. Ce sont les actions combinées de tous les gènes d'un organisme qui régissent son développement embryonnaire, sa croissance, son homéostasie, sa résistance aux maladies, *etc.* Afin de comprendre comment est régulé le processus de régénération chez l'axolotl, une analyse du rôle de plusieurs gènes, lors du processus, est essentielle.

Les résultats présentés dans cette thèse sont centrés autour de l'étude de deux gènes, soit *Transforming growth factor- β 1* (*Tgf- β 1*) et *Heat-shock protein-70* (*Hsp-70*). Les résultats présentés au chapitre 2 et 3 constituent, dans les deux cas, la toute première analyse de l'expression et du rôle de ces gènes dans le processus de régénération du membre chez les urodèles. Ces gènes ont été choisis parce qu'ils influencent, à plusieurs niveaux, la régulation des processus de guérison des plaies et de réponse au stress chez les vertébrés.

Chez l'axolotl, il n'y a jamais de cicatrice résultante suite à la guérison d'une plaie ouverte ou après la régénération d'un membre. Cependant, la phase de préparation du processus de régénération renferme tout de même plusieurs mécanismes communs à la guérison d'une plaie chez les mammifères (*e.g.* présence d'inflammation, formation d'un caillot sanguin, activation des fibroblastes, production de matrice extra-cellulaire), et *Tgf- β 1* est connu pour réguler plusieurs de ces étapes [127,192-194]. Ainsi, *Tgf- β 1* pourrait avoir un rôle à jouer lors de la régénération du membre chez l'axolotl, puisqu'il régule plusieurs de ces mécanismes durant la guérison des plaies chez les mammifères. De plus, *Tgf- β 1* est un de gènes les plus étudiés par les scientifiques qui étudient la guérison des plaies. Étant donné qu'il existe des différences notables entre le processus de cicatrisation retrouvé chez les mammifères et la régénération tissulaire observée chez les salamandres, nous avons donc choisi de caractériser l'expression et le rôle de *Tgf- β 1* lors du processus de régénération du membre chez l'axolotl.

D'autre part, l'amputation d'un membre est un traumatisme important pour un animal. Une blessure de cette envergure génère plusieurs stress qui peuvent affecter les cellules, et leurs composantes, au site de l'amputation (*e.g.* tension mécanique, ischémie, relâchement de radicaux-libres, présence de pathogènes). Chez les mammifères plusieurs de ces stress stimulent la production de la chaperonne HSP-70 [195-197]. Cette protéine a pour rôle de protéger les composantes internes des cellules pour leur permettre de maintenir leurs activités. Nous avons donc voulu vérifier si la chaperonne HSP-70 était produite lors

du processus de régénération du membre de l'axolotl. Il est aussi intéressant de souligner que, dans certains contextes précis, la production de HSP-70 peut-être régulée par TGF- β 1.

La prochaine section aborde en détails les fonctions connues de *Tgf- β 1* et *Hsp-70*, tant chez les mammifères que chez quelques autres modèles. Puisque ces deux gènes ont plusieurs fonctions variées, seuls leurs rôles qui sont d'intérêt pour une étude de la régénération tissulaire seront abordés.

1.8.1 Transforming Growth Factor- β 1

En 1978, Joseph E. De Larco et George J. Todaro ont isolé des facteurs de croissance aux propriétés étonnantes dans le milieu de culture de cellules transformées par le virus du sarcome murin Moloney (Moloney MuSV) [198]. Ces peptides avaient pour propriété de favoriser la croissance en suspension de fibroblastes normaux et ont été nommés « facteurs de croissance transformant » (*i.e. transforming growth factors, TGF*) [199]. Après plusieurs analyses, il apparaît aujourd'hui que ces extraits contenaient à l'origine plusieurs facteurs de croissance dont TGF- α , un membre de la famille de EGF, et certains TGF- β , dont TGF- β 1 [200-203]. TGF- β 1 a été le premier membre d'une large famille de protéines à être isolé et caractérisé [204]. La famille des TGF- β compte aujourd'hui plus de trente membres chez l'humain dont les *bone morphogenetic proteins* (BMP), *nodal*, *anti-Mullerian hormone* (AMH), les *activins beta* (*Act- β*), les *growth and*

differentiation factors (GDF) et les *transforming growth factors beta 1, 2 et 3* (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) [205,206]. Tous ces facteurs sont sécrétés par la cellule et exercent une action autocrine, paracrine ou endocrine dans divers processus allant du développement embryonnaire et de la régulation de l'homéostasie jusqu'à la guérison des plaies [207-212]. Tout dépendant du contexte et de l'auteur, TGF- β 1 est souvent considéré comme une cytokine, un facteur de croissance ou une hormone peptidique. De manière générale, les études portant sur la régulation du système immunitaire et la guérison des plaies parlent de TGF- β 1 en tant que cytokine, celles portant sur l'influence de cette protéine sur le comportement des cellules et des tissus parlent de TGF- β 1 en tant que facteur de croissance et celles ayant un aspect d'ordre systémique en parle en tant qu'une hormone.

Pratiquement toutes les cellules du corps ont la capacité de produire ou de répondre aux TGF- β [208]. Chez l'humain, TGF- β 1 est d'abord synthétisé en une chaîne peptidique de 391 acides aminés qui comporte une région appelée « pro-domaine » et une région appelée « domaine TGF- β mature » [204]. Une fois synthétisé, TGF- β 1 se retrouve dans l'appareil de Golgi où la convertase furine clive la chaîne pour séparer le pro-domaine du domaine mature [213]. Par la suite, il y a dimérisation, puis association du pro-domaine avec le domaine mature via la formation de ponts disulfures, ce qui forme le complexe TGF- β 1 inactif [214,215]. Ce complexe s'associe à une des protéines de type LTBP (*latent TGF- β binding protein*), aussi par formation de ponts disulfures, puis le tout est sécrété hors de la cellule [214,215]. Ce large complexe inactif demeure associé à la matrice

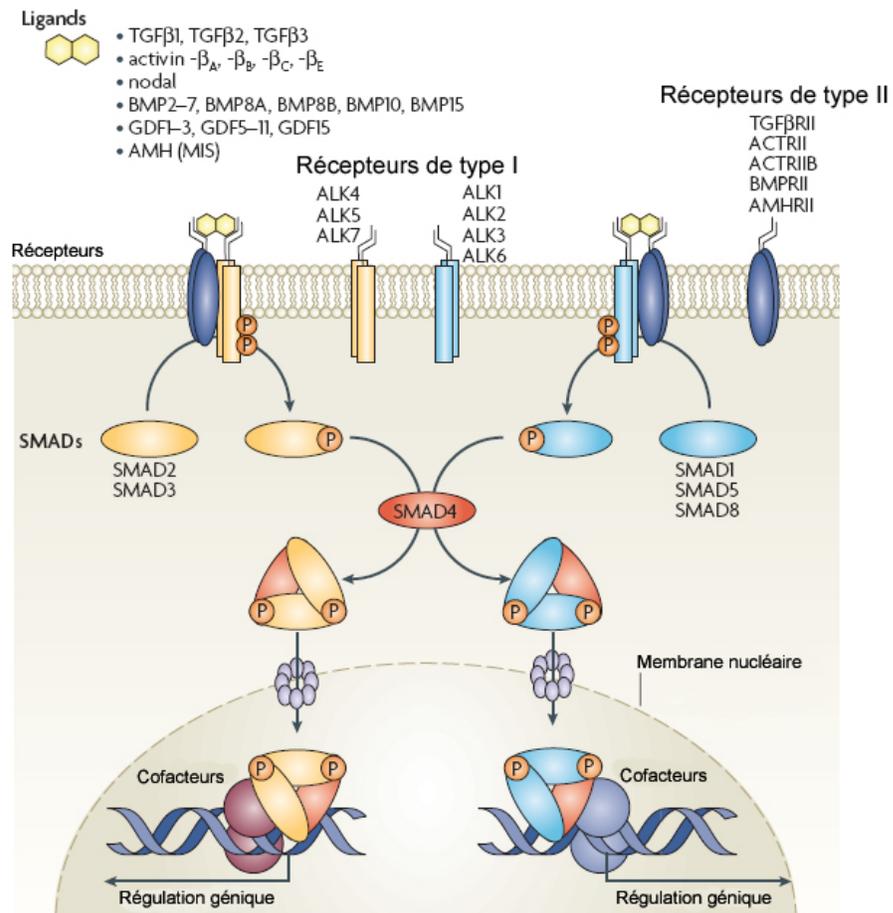
extracellulaire jusqu'à l'activation, habituellement causée par un traumatisme [214,215]. En plus d'être présent de manière inactive dans la majorité des tissus, TGF- β 1 est retrouvé en grande quantité dans les plaquettes sanguines, ce qui permet une relâche rapide au site d'une blessure [216]. L'activation de TGF- β 1 peut être effectuée par des protéases (plasmin, MMP-2, MMP-9) qui coupent le peptide, ou par l'association à des protéines de la membrane cellulaire comme la thrombospondine-1 ou l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ [217-220]. La relâche de TGF- β 1 lui permet ensuite de se lier à ses récepteurs et de déclencher une réponse cellulaire.

Pour effectuer son action, TGF- β 1 doit se lier à deux récepteurs transmembranaires de type sérine/thréonine kinase nommés récepteur des TGF- β de type I (T β R-I aussi appelé *activin-like kinase 5*, ALK-5) et récepteur des TGF- β de type II (T β R-II) (Fig. 8, p.59) [205,207]. La liaison du ligand se fait d'abord au T β R-II et peut être favorisée par la liaison à deux récepteurs accessoires, soit le récepteur des TGF- β de type III (T β R-III aussi appelé betaglycan) et l'endogline [205,221]. Une fois la liaison au T β R-II effectuée, il se produit une hétéro-tétramérisation des récepteurs T β R-I et T β R-II (2 T β R-II + 2 T β R-I). Ensuite, T β R-II phosphoryle T β R-I sur son domaine intra-cellulaire [206,222]. Cette phosphorylation active alors le recrutement des SMAD 2 et 3, les médiateurs de la réponse des TGF- β au noyau (appelés *Receptor-SMAD* ou R-SMAD), par T β R-I [206,207,222]. Suivant leur phosphorylation, les R-SMAD forment un trimère avec SMAD 4 puis se dirigent vers le noyau où ils jouent leur rôle d'activateurs de la transcription [222,223]. Une

fois dans le noyau, les SMAD interagissent avec plusieurs co-facteurs dont CBP/p300, p53, c-Jun, Runx2 et FAST-1 [222]. L'interaction avec ces nombreux partenaires est souvent déterminante de la réponse aux TGF- β dans un type cellulaire donné [224].

TGF- β 1 est reconnu pour être un facteur de croissance qui inhibe la prolifération des cellules épithéliales, immunitaires et endothéliales [208,212]. Dans la majorité de ces cellules, la prolifération est inhibée, car TGF- β 1 cause l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1 [208,212]. TGF- β 1 stimule entre autres, la transcription des gènes p15 et p21 qui sont des inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes (*cyclin dependent kinase, cdk*) qui se lient habituellement aux cyclines et font progresser le cycle cellulaire [209,225]. La liaison de p15 et de p21 aux cdk empêche la formation des complexes cdk-cyclines [208,209,212,225]. Le cycle cellulaire est ainsi bloqué, car les cdk-cyclines ne peuvent phosphoryler la protéine Rb, qui demeure liée à E2F, l'empêchant ainsi de stimuler la transcription de gène favorisant la prolifération cellulaire [208]. L'activation de p15 favorise aussi p27 à se lier à d'autres complexes cdk-cyclines pour lui aussi bloquer le cycle cellulaire [226]. D'autre part, TGF- β 1 bloque la transcription du proto-oncogène c-myc, ce qui empêche aussi la prolifération de plusieurs types cellulaires [209,227]. Les effets que TGF- β 1 a sur les fibroblastes sont à l'inverse de son effet inhibiteur sur les cellules immunitaires, endothéliales et épithéliales. En effet, TGF- β 1 est un activateur puissant des processus de migration et de prolifération chez les fibroblastes

Figure 8 – Cascade de signalisation des TGF- β . Les membres de la superfamille des TGF- β sont classiquement divisés en deux groupes quant à leur signalisation. D'un côté on retrouve les TGF- β , les activines et nodal qui activent la voie SMAD2/SMAD3 et de l'autre on retrouve les BMP, les GDF et AMH qui activent la voie SMAD1/SMAD5/SMAD8. Le ligand extracellulaire agit toujours sous forme de dimère (losanges jaunes) et se lie d'abord au récepteur de type II (ovales bleu foncé). Ensuite, il y a tétramérisation des récepteurs de type II avec les récepteurs de type I (rectangles jaunes ou bleu clair), puis phosphorylation des récepteurs de type I par les récepteurs de type II. Les récepteurs de type II phosphorylent ensuite les SMAD associés au récepteurs (R-SMAD : SMAD1, 2, 3, 5 et 8, ovales jaunes ou bleu clair) qui vont former un trimère avec le SMAD commun aux deux voies SMAD4 (ovale rouge). Ce trimère pénètre le noyau de la cellule et s'associe avec des co-facteurs (ronds violets ou gris) pour activer la transcription de gènes cibles. En exemple : TGF- β 1 se lie au récepteur de type II TGF- β RII qui s'associe ensuite avec ALK-5. Suite à sa phosphorylation, ALK-5 phosphoryle à son tour SMAD2 et/ou SMAD3. SMAD2/3 se lie à SMAD4 et migrent vers le noyau puis s'associent ensuite à des co-facteurs comme CBP/p300 pour activer la transcription d'un gène cible, par exemple *connective tissue growth factor (Ctgf)*. Adaptée de Schmierer 2007 [206].



impliqués dans les processus de guérison des plaies ou qui mènent à l'apparition de fibrose [192,228]. Par exemple, il a été démontré que TGF- β 1 stimule la prolifération de fibroblastes de l'aorte du lapin, en inhibant des gènes tels que p16 et en activant la voie des Smad et celle des MAPK [228]. De plus, dans plusieurs pathologies comme la fibrose pulmonaire, TGF- β 1 active la transition épithélio-mésenchymateuse qui mène les cellules épithéliales à perdre leur adhérence et à prendre une allure de fibroblaste [229].

Les trois isoformes de TGF- β , et plus particulièrement TGF- β 1, exercent une action inhibitrice sur la prolifération des cellules de type épidermiques, hématopoïétiques et endothéliales [208,219,230,231]. Il est donc facile de comprendre pourquoi plusieurs cancers sont caractérisés par une mutation dans un des récepteurs aux TGF- β , une délétion d'un allèle codant pour un des SMAD ou une surproduction de TGF- β par la cellule [209,212,232]. Par exemple, le gène codant pour *Smad 4* a été initialement nommé *Dpc 4* (*deleted in pancreatic carcinoma locus 4*), car ce gène est muté ou supprimé dans près de 50% des cancers du pancréas [233]. Des mutations affectant les récepteurs endogline et ALK-1 sont, quant à elles, responsables de la télangiectasie hémorragique familiale (*hereditary hemorrhagic telangiectasia*, HHT) [234,235]. Cette maladie est caractérisée par de multiples déformations du système vasculaire qui causent des saignements au niveau du nez et du tube digestif. Cette maladie peut mener à la mort si les saignements apparaissent dans le cerveau ou les poumons [208]. Ceci montre que la cascade des TGF- β est impliquée

dans l'angiogenèse, le contrôle de la prolifération cellulaire et la résistance au cancer. Toutefois son rôle est aussi déterminant dans le processus de guérison des plaies.

Chez les mammifères, suite à une lésion de la peau, TGF- β 1 peut être relâché par les plaquettes sanguines ou peut se détacher de la matrice extra-cellulaire au site de la blessure [236,237]. En quantité minime, de l'ordre de la femtomole, TGF- β 1 exerce une chimiotaxie qui attire plusieurs cellules incluant les neutrophiles, les lymphocytes, les macrophages et les fibroblastes [237-241]. Une fois sur le site, les macrophages peuvent eux aussi sécréter TGF- β 1 et ce dernier peut amplifier cette réponse immunitaire en s'auto-induisant [242-245]. La protéine TGF- β 1 est présente presque instantanément au site de la lésion et l'expression de l'ARN messager (ARNm) survient dans les heures suivant le traumatisme [246]. L'expression de *Tgf- β 1* est très élevée au site de la blessure durant les trois premiers jours, mais diminue graduellement pour revenir à un niveau basal après environ deux semaines [246,247].

Les effets de TGF- β 1 sur la guérison des plaies sont multiples et très complexes, mais quelques-uns méritent d'être soulignés. On sait que TGF- β 1 a un effet inhibiteur sur les cellules épidermiques, mais pourtant on retrouve une grande quantité de TGF- β 1 dans les kératinocytes situés aux abords de la blessure. Il semble que TGF- β 1 stimule la migration de ces kératinocytes et induit la production des intégrines α_v et α_5 associées à la migration de ces cellules [247,248]. Chez une souris transgénique chez qui *Tgf- β 1* est

surexprimé dans les kératinocytes, la ré-épithélialisation d'une plaie superficielle est plus rapide, tandis que celle d'une plaie profonde est plus lente que chez les animaux contrôles [249]. TGF- β 1 exerce aussi un effet stimulateur sur la vascularisation de la plaie et sur la prolifération des fibroblastes du derme [194]. Plusieurs des fibroblastes qui infiltrent le tissu granuleux de la plaie se transforment en myofibroblastes [250,251]. Ces myofibroblastes sont caractérisés par la présence de fibres d'actine α du muscle lisse (*alpha smooth muscle actin*, α -SMA) [251]. TGF- β 1 peut fortement induire la production de α -SMA chez les fibroblastes du derme et ainsi favoriser leur transformation en myofibroblastes [252]. Chez les vertébrés supérieurs, une blessure qui traverse l'épiderme et le derme mène inévitablement à la formation d'une cicatrice [253]. Les myofibroblastes sont les principaux responsables de cet aboutissement, car ils vont sécréter d'énormes quantités de collagène et aussi se contracter activement pour fermer la plaie [14,192,254]. Une fois le processus de ré-épithélialisation terminé, une grande partie des myofibroblastes présents au site de la blessure vont être éliminés par apoptose [255]. À ce moment, la guérison est terminée et le processus de réorganisation de la matrice extra-cellulaire (*i.e.* du tissu cicatriciel) débute. Ce processus peut s'étendre sur plusieurs années [253].

La régulation des trois isoformes de TGF- β , soit TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, lors de la guérison des plaies est cruciale. Chez la souris, l'expression de *Tgf- β 1* est très élevée dans les cinq premiers jours suivant la blessure tandis que *Tgf- β 2* ne semble pas vraiment être régulé et que *Tgf- β 3* est exprimé plus fortement à partir du jour 5 [246]. Ce patron

d'expression est légèrement différent lors de la guérison des plaies chez l'humain et le porc, mais suggère aussi que les isoformes jouent des rôles variés lors du processus de guérison [256,257]. Effectivement, il semble que les niveaux d'expression/synthèse de TGF- β 1 versus ceux de TGF- β 3 soient importants pour initier et terminer le processus. Shah *et al.* ont montré, en injectant des anticorps contre TGF- β 1 et 2 immédiatement après avoir causé une blessure chez le rat, que ces deux isoformes ont un effet pro-fibrose sur la cicatrisation [258,259]. La peau des animaux traités avec l'anticorps présente un contenu en collagène diminué et une force de tension plus élevée que les contrôles, sept jours après la blessure [258]. Par contre ces mesures rejoignent celles des contrôles 14 jours après le traitement [258]. L'architecture du derme et l'alignement des fibres de collagène dans la peau des animaux traités avec l'anticorps sont très semblables à ceux d'une peau normale, ce qui résulte en une cicatrice quasi-invisible après 28 jours [258,259]. Shah *et al.* ont complété leur étude en ajoutant du TGF- β 3 au site d'une blessure sur le dos de rats et ont pu observer une architecture du derme améliorée et une cicatrisation nettement réduite comparativement aux contrôles [260]. Le derme des animaux traités avec TGF- β 3 comportait moins d'accumulation de fibronectine et de collagène et un arrangement des fibres de collagène semblable à la peau normale [260]. De plus, Shah *et al.* ont constaté une diminution de l'infiltration de la plaie par les macrophages chez les animaux traités avec les anticorps contre TGF- β 1 et 2 [258]. Le blocage de l'action de TGF- β 1 a aussi été effectué à l'aide d'un peptide-antagoniste chez le porc. Dans cette étude, les résultats montrent qu'une inhibition de TGF- β 1 accélère la ré-épithélialisation, diminue la contraction et la

cicatrisation de la blessure, confirmant ainsi les résultats obtenus par Shah *et al.* [261]. Le cumul de ces données indique que TGF- β 1 agit en augmentant la réponse immunitaire par chimiotaxie, en favorisant la contraction de la plaie par les myofibroblastes et en induisant une ré-épithélialisation rapide tandis que TGF- β 3 favorise plutôt la différenciation cellulaire et une meilleure organisation tissulaire au site de la blessure. Il est facile de comprendre pourquoi tant de maladies comme la sclérodermie ou la glomérulonéphrite, où on observe une fibrose incontrôlée, présentent un dérèglement dans la voie de signalisation des TGF- β [192,237,262,263].

La souris chez laquelle le gène codant pour *Tgf- β 1* est inactivé s'est révélée être un outil tout aussi utile pour mieux définir la fonction de *Tgf- β 1* pendant le processus de guérison des plaies. La souris KO pour *Tgf- β 1* est viable et normale, mais meurt à l'âge de trente (30) jours suite à une réaction auto-immune très prononcée [264,265]. Les principaux organes touchés sont le cœur, les poumons et le foie. Cette réaction est caractérisée par la présence marquée de cellules immunitaires, d'inflammation et de nécrose ainsi que par une expression accrue de gènes pro-inflammatoires [264,265]. Le phénotype de cette souris corrèle bien avec la fonction inhibitrice que TGF- β 1 exerce sur la prolifération d'une variété de cellules immunitaires [231,264-266]. Deux approches novatrices ont été utilisées pour outrepasser la réaction immunitaire excessive observée chez les souris *Tgf- β 1* KO : soit le traitement de ces souris avec la drogue immunosuppressive rapamycine ou le croisement de ces souris avec les souris immuno-compromises Scid [194]. Dans le premier

cas, les souris *Tgf-β1* KO traitées à la rapamycine démontrent une guérison des plaies plus rapide et une cicatrisation moins importante que les souris normales [267]. Par contre, ces souris présentent aussi une peau plus mince, ce qui pourrait favoriser une cicatrisation améliorée [194]. Les souris *Tgf-β1* *-/-* / *Scid* *-/-* présentent quant à elles un délai majeur dans le processus de guérison, comparativement aux souris contrôles [268]. Dans ce cas-ci, le résultat indique que la réponse immunitaire, ou du moins que TGF-β1, peut exercer un rôle bénéfique sur la guérison des plaies [194]. Ces données compilées indiquent que le rôle de TGF-β1 lors de la guérison des plaies est très complexe et est régulé de manière systémique [194]. Le phénotype de la souris *Smad 3* KO montre également que la voie canonique TGF-β1/Smad 3 agit sur plusieurs aspects de la guérison [269,270]. La souris *Smad 3* KO montre une guérison améliorée comparativement aux souris normales : chez ces souris une blessure est complètement refermée et présente très peu de fibrose après cinq jours [269]. De plus, très peu de macrophages sont présents au site de la blessure, chez ces souris, ce qui contribue directement à l'amélioration de la guérison et à la diminution de l'apparition de fibrose chez ces animaux [269]. L'addition de TGF-β1 exogène sur une plaie chez cette souris déclenche tout de même la production de matrice extra-cellulaire, signifiant que ce procédé est en partie indépendant de la voie TGF-β/SMAD [269].

L'effet qu'a TGF-β1 sur le déroulement des mécanismes cellulaires à la base du processus de guérison est aussi dépendant du contexte. On sait que les embryons de mammifères ont un procédé de guérison des plaies qui ressemble beaucoup plus à un

processus de régénération qu'à un processus de guérison [178]. Un des aspects majeurs de la guérison chez les embryons est qu'elle n'est pas accompagnée par une réponse inflammatoire, et ce jusqu'à la fin du deuxième trimestre de gestation pour certaines espèces [271]. Contrairement à l'adulte, où les cellules migrent à l'aide de lamellipodes sur la plaie, un câble d'actine reliant toutes les cellules en bordure de la plaie se resserre pour fermer la blessure chez l'embryon [271,272]. Ce phénomène est autant observé chez la drosophile que chez le poulet ou la souris [271]. L'absence d'inflammation et la fermeture de la plaie via le câble d'actine mènent à une guérison sans cicatrice chez l'embryon. Pertinemment, on détecte un fort ratio TGF- β 3 / TGF- β 1 lors de la guérison chez l'embryon et ce ratio semble inversé chez l'adulte [178,211,273]. La production de TGF- β 1 est aussi très rapide et de courte durée chez l'embryon, comparativement à l'adulte [246,274,275]. On suppose qu'une expression rapide et temporaire de TGF- β 1 pourrait faciliter la fermeture de la plaie chez l'embryon sans mener à l'apparition de fibrose. Récemment, Rolfe *et al.* ont montré qu'il existe des différences notables pour la réponse à TGF- β 1 entre les fibroblastes embryonnaires et adultes [276,277]. TGF- β 1 étant seulement capable d'induire l'activation de gènes menant à la fibrose chez les cellules provenant d'adultes [276,277]. De plus, selon le contexte, d'autres voies moléculaires, comme celle des MAP kinases ou des WNT par exemple, peuvent affecter le comportement des cellules et moduler l'action des SMAD au noyau [278,279]. La voie des TGF- β interagit avec une multitude d'autres protéines, dont HSP-70. Par exemple, TGF- β 1 induit l'expression de *Hsp-70* dans des fibroblastes de peau humains [280]. À l'opposé, un choc thermique qui

active l'expression de *Hsp-70* empêche TGF- β 1 d'activer l'apoptose dans des hépatocytes en culture [281]. Plus de détails sur les différents rôles de HSP-70 sont décrits dans la prochaine section.

1.8.2 Heat-shock protein-70

Le terme « chaperonne moléculaire » a été proposé par John Ellis en 1987 pour définir le rôle de protéines veillant au bon repliement d'autres protéines de la cellule [282]. La famille des protéines de réponse au choc thermique (*heat-shock proteins*, HSP) constitue une des familles de chaperonnes moléculaires les plus conservées à travers l'évolution [196,283]. Cette famille renferme plusieurs membres aux fonctions similaires comme HSP-110, HSP-90, HSP-70, HSP-60 et HSP-27 [196,284]. C'est Ferruccio Ritossa qui observa pour la première fois, en 1962, que des gènes spécifiques étaient induits suite à un choc thermique chez la drosophile [285]. Les HSP doivent leur nom au choc thermique, qui provoque leur induction, mais on sait maintenant que ces chaperonnes peuvent être induites par plusieurs autres stress. Entre autres, une exposition des cellules à des métaux lourds, des toxines, des dérivés d'acides aminés, des oxydants, l'ischémie, l'éthanol et à des infections virales ou bactériennes peut induire l'expression et la production des HSP [195-197,286,287]. Une fois activées, ces protéines ont pour rôle de préserver les activités normales de la cellule en se liant aux protéines qui ont été endommagées [196]. Ensuite, les différentes HSP peuvent aider au bon repliement d'une protéine dénaturée et la guider vers

un compartiment cellulaire ou bien mener une protéine instable vers la dégradation [284,288].

La chaperonne HSP-70 est une protéine de 70 kDa qui comporte un domaine N-terminal à haute affinité pour l'ATP et un domaine C-terminal qui peut lier les peptides ou protéines [196]. La capacité qu'a HSP-70 de lier les protéines et d'aider à leur repliement est dépendante de la présence d'ATP et de plusieurs cofacteurs [283,289]. En temps normal, HSP-70 se retrouve en quantité équivalente dans le cytosol et le noyau de chaque cellule [290]. La fonction principale de HSP-70 est de prévenir l'agrégation des protéines, ce qui pourrait nuire à l'activité cellulaire [291]. Cette chaperonne a aussi pour autres fonctions d'aider au repliement des protéines nouvellement synthétisées et de mener certaines protéines vers les organelles de la cellule [289,292,293]. HSP-70 permet le repliement d'environ 20% des protéines synthétisées chez la bactérie, et ce chiffre pourrait être plus élevé chez les eucaryotes [291]. Lorsqu'un stress affecte la cellule, HSP-70 est rapidement localisée au noyau, plus particulièrement au nucléole [196,286,294]. Zeng *et al.* ont démontré que cette localisation est aussi dépendante de l'activité ATPase chez HSP-70 [290]. Suite à un stress, HSP-70 peut se lier à plusieurs protéines du noyau comme le facteur de transcription p53 et ainsi lui permettre de jouer son rôle, ou bien au contraire, pour empêcher la cellule d'entrer en apoptose [284,295]. HSP-70 peut aussi bloquer l'apoptose en empêchant l'activation de plusieurs facteurs pro-apoptotiques comme JNK/p38, Apaf-1 et la caspase 3 [284,296,297]. Une inhibition de la transcription de *Hsp-*

70 par la méthode d'oligonucléotides antisens a d'ailleurs montré que cette protéine est essentielle pour la prolifération de cellules cancéreuses [298]. Son blocage résulte en une induction de l'apoptose et de la mort cellulaire [298].

Hsp-70 joue un rôle important lors du développement embryonnaire animal. Chez la drosophile, chez qui la modulation de l'expression de gènes par un choc thermique a été observée pour la première fois, seulement les embryons ayant atteint le stade de blastoderme ont la capacité de répondre au choc thermique [299]. Les embryons à des stades précoces du développement chez les amphibiens et les mammifères ont aussi une sensibilité accrue au stress thermique [196,300-302]. Chez *Xenopus laevis*, le moment où on peut induire *Hsp-70* par choc thermique correspond au moment d'activation des gènes du zygote, lors du développement [303]. La réponse au choc thermique chez *Pleurodeles waltl*, une salamandre, ressemble beaucoup à celle observée chez la grenouille [304]. La thermotolérance est importante chez l'embryon, puisqu'une importante quantité de protéine est synthétisée à chaque stade du développement. L'agrégation de ces protéines pourrait nuire au développement et mener à la mort de l'embryon. Lors du développement, *Hsp-70* est induit dans différents organes, chez plusieurs espèces de vertébrés suite à un choc thermique [305,306]. Ceci indique peut-être que cette protéine joue un rôle dans la régulation du développement embryonnaire chez différentes espèces. *Hsp-70* n'est pas largement associé avec le développement d'organes ou de structures spécifiques chez l'embryon. Néanmoins, Loones *et al.* ont publié un article dans lequel la présence de HSP-

70 a été détectée lors du processus d'ossification endochondrale chez la souris [307]. D'autre part, le groupe de Patrick Krone a démontré que l'expression de *Hsp70-4*, chez le poisson-zèbre, est spécifiquement associée au développement du cristallin [308]. L'inhibition de l'expression du gène à l'aide d'ARN interférant mène au développement d'un œil atrophié, ce qui supporte un rôle actif de *Hsp70-4* dans le processus [308]. En plus de jouer un rôle protecteur lors du développement embryonnaire, les protéines de réponse au choc thermique peuvent aussi influencer la guérison des plaies et la réponse au stress physique chez les vertébrés.

Tout comme une exposition à la chaleur, une blessure représente un stress auquel l'organisme doit faire face. Le milieu de la blessure comporte plusieurs facteurs qui peuvent induire les protéines de réponse au stress (*e.g.* déshydratation de la plaie, diminution de l'apport en nutriments, baisse de la présence d'oxygène, diminution du pH). Il n'est donc pas surprenant de voir l'expression de *Hsp-70* associée à la guérison des blessures. Chez l'humain il existe une corrélation entre la présence de HSP-70 dans les tissus d'une blessure et le potentiel de guérison de cette dernière [309]. Les tissus provenant de blessures chroniques n'ont peu ou pas de HSP-70 [309]. Laplante *et al.* ont, en effet, démontré que plusieurs protéines de la famille des HSP sont exprimés lors de la guérison des plaies chez la souris [310]. L'expression, des *Hsp* et particulièrement de *Hsp-70* semble avoir un effet positif sur le devenir d'une plaie. La souris KO pour *Hsp-70.1* présente une sensibilité accrue aux lésions induites par les rayons ultraviolets (UV) [311]. La peau de

cette souris a une morphologie différente de celle des souris normales [311]. Suite à l'exposition aux UV, les lésions de la peau chez cette souris comptent une quantité importante de cellules apoptotiques dans le derme et présentent une désorganisation des fibres de collagène [311]. Une induction préventive des *Hsp*, avant une opération a aussi des effets positifs sur la guérison de la plaie. Cet effet a été démontré chez le lapin, en augmentant la température du corps en entier ou de la patte droite uniquement, de 3,5 °C, avant une opération au tendon *flexor digitorum* [312,313]. Dans les deux cas, les tendons des lapins prétraités montrent une surexpression de *Hsp-70*, une diminution de l'infiltration par les cellules immunitaires et une morphologie améliorée, une fois guéris, comparativement au contrôle [312,313]. Le pré-conditionnement a aussi eu un effet bénéfique sur la guérison d'incisions, après une chirurgie, chez le porc [314]. Pareillement, une incision de la peau au laser, qui induit un choc thermique, mène à une guérison améliorée et à une cicatrisation diminuée comparativement à une incision faite avec une lame métallique [315]. On peut déduire que les effets bénéfiques de HSP-70 sur la guérison d'une plaie, soit après avoir été administrée directement ou après avoir été induite par un traitement, sont multiples [315-317]. La majorité de ces effets découlent soit de l'inhibition de l'apoptose ou de la modulation du système immunitaire par les HSP [284,316-318].

1.9 Le futur de l'étude de la régénération

Le futur est très prometteur pour la médecine régénératrice. De nombreuses équipes de recherche à travers le monde utilisent différentes approches afin d'arriver un jour, au but ultime : l'induction de la régénération épimorphique chez l'humain. Certains tentent de contrôler la différenciation des cellules souches [5,11,319], tandis que d'autres essaient d'utiliser des extraits de matrice extra-cellulaire pour favoriser la régénération de certains tissus [320]. De plus, le développement rapide de tissus artificiels a déjà mené à la commercialisation de plusieurs produits, notamment Apligraf® et Dermagraft®, qui sont des substituts de peau humaine [321]. L'utilisation de ces tissus générés en laboratoire sur des blessures chroniques donne déjà des résultats encourageants [321]. Aussi, l'an dernier, deux équipes de chercheurs ont réussi à transformer des cellules somatiques adultes en cellules souches en insérant quatre gènes spécifiques dans ces dernières à l'aide d'un vecteur viral [322,323]. Ceci constitue un grand pas, puisque cette manipulation de cellules humaines donne un résultat qui nous ramène à un mécanisme cellulaire qui survient à l'état naturel chez la salamandre : la dédifférenciation cellulaire.

Les résultats présentés dans cette thèse apportent, maintenant, un peu plus de lumière sur notre compréhension des divers mécanismes qui contrôlent la régénération chez l'axolotl. L'étude de gènes impliqués dans le contrôle de la guérison des plaies (TGF- β 1) et dans la réponse au stress (Hsp-70) est importante afin de mieux comprendre le processus de la régénération, qui ne mène pas à la formation de cicatrice chez les urodèles. L'habileté naturelle qu'ont les salamandres à régénérer leurs tissus mérite d'être encore plus étudiée.

En étant combinée aux autres domaines d'étude, l'étude du processus de régénération épimorphique de la salamandre ouvre une porte qui nous permettra peut-être un jour, d'induire la régénération tissulaire parfaite chez l'humain.

2. Chapitre 1 – Article 1

Titre: Expression of Heat-Shock Protein 70 During Limb Development and Regeneration in the Axolotl

Auteurs: Mathieu Lévesque, Jean-Charles Guimond, Mireille Pilote, Séverine Leclerc, Florina Moldovan et Stéphane Roy

Journal : Developmental Dynamics, vol. 233, pages 1525-1534, 2005.

2.1 Mise en contexte

L'amputation d'un membre représente un traumatisme important pour un organisme. Suite à l'amputation, les cellules du moignon font face à plusieurs éléments qui peuvent compromettre leur survie (*e.g.* exposition à l'air ambiant, présence de pathogènes, présence de radicaux libres, hypoxie, etc). Notre article montre pour la première fois l'activation d'un facteur de réponse au stress, de la famille des *Heat-shock proteins*, dans le membre en régénération de l'axolotl. Nos résultats montrent que *Hsp-70* est exprimé dans le membre lors du développement embryonnaire de l'animal. De plus, à l'aide de plusieurs techniques, nous avons démontré que *Hsp-70* est exprimé dès 24h après l'amputation de la patte de l'axolotl, puis tout au long du processus de régénération. Notre article suggère que les protéines de réponse au stress jouent un rôle important lors de la régénération tissulaire et ouvre ainsi la porte sur un nouvel aspect du contrôle de la régénération.

2.2 Contribution des auteurs

Ces auteurs ont conçu les expériences : Mathieu Lévesque et Stéphane Roy.

Ces auteurs ont effectué les expériences : Mathieu Lévesque, Jean-Charles Guimond, Mireille Pilote et Séverine Leclerc.

Ces auteurs ont analysé les données : Mathieu Lévesque, Florina Moldovan et Stéphane Roy.

Ces auteurs ont fourni du matériel et des réactifs : Florina Moldovan et Stéphane Roy.

Ces auteurs ont écrit l'article : Mathieu Lévesque et Stéphane Roy.

John Wiley & Sons, Inc.

Publishers Since 1807



WILEY

GLOBAL RIGHTS DEPARTMENT
111 River Street, 4-02
Hoboken, NJ 07030-5774

July 16, 2008

Mathieu Levesque
University of Montreal
2900 Edouard-Montpetit
Montreal, Quebec H3T 1J4
mathieu.levesque@umontreal.ca

VIA FACSIMILE: 514.343.2233

Dear Mr. Levesque

RE: Your July 14, 2008 request for permission to republish *Developmental Dynamics* 2005; 233, 1525-1534. This material will appear in your forthcoming thesis to be published by University of Montreal.

1. Permission is granted for this use. No rights are granted to use content that appears in the Material or the Work with credit to another source.
2. Permitted use is limited to your edition described above, and does not include the right to grant others permission to photocopy or otherwise reproduce this material except for versions made for use by visually or physically handicapped persons. Up to five copies of the published thesis may be photocopied by a microfilm company.
3. Appropriate credit to our publication must appear on every copy of your thesis, either on the first page of the quoted text, in a separate acknowledgment page, or figure legend. The following components must be included: Title, author(s) and /or editor(s), journal title (if applicable), Copyright © (year and owner). Reprinted with permission of Wiley-Liss, Inc. a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc.
4. This license is non-transferable. This license is for non-exclusive English language print rights and microfilm storage rights by University of Montreal only, throughout the world. This license does not extend to selling our content in any format. *For translation rights, please reapply for a license when you have plans to translate your work into a specific language. For Internet/Intranet rights, please reapply for a license when you have the URL where our material would be posted.*

Sincerely,

Brad Johnson
Permissions Assistant
201.748.6786
201.748.6008 (fax)
bjohns@wiley.com

Levesque071608

2.3 Texte de l'Article - Expression of Heat-shock protein 70 during limb development and regeneration in the axolotl

Mathieu Lévesque¹, Jean-Charles Guimond¹, Mireille Pilote¹, Séverine Leclerc²,
Florina Moldovan² and Stéphane Roy^{1,2*}.

1- Department of Biochemistry, 2- Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Québec,
Canada

* To whom correspondence should be addressed:

Department of Stomatology, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville,
Montréal, QC, Canada, H3C 3J7

Fax: (514) 343-2233

Email: stephane.roy@umontreal.ca

2.3.1 Abstract

Urodele amphibians (e.g. axolotls) have the unique ability, among vertebrates, to perfectly regenerate many parts of their body following amputation. The limb has been the most widely studied regenerating structure in these organisms and provides an ideal model in which to understand how vertebrates can regenerate complex tissues. The present study focuses on *Hsp-70*, a member of the stress related *heat-shock protein family*. This protein is normally induced following a stress or trauma such as heat-shock, UV irradiation or wounding. Thus, studying its expression during axolotl limb regeneration, a response to an important traumatic event (amputation), is of great interest to further understand how the regenerative process is mediated. Using molecular biology and biochemical techniques, we have characterized both the spatio-temporal and quantitative expression patterns of *Hsp-70* in axolotl development and regeneration. Our results show that *Hsp-70* is expressed and regulated during axolotl development as in other vertebrates. Our data also demonstrate an upregulation of the RNA transcript for *Hsp-70* during limb regeneration as early as 24 hours post amputation that is maintained up to early differentiation. We also demonstrate a similar pattern of expression for the protein during regeneration. Finally, we show that axolotl *Hsp-70* is induced 3 fold following heat-shock as observed in other vertebrates.

Keywords: Axolotl, regeneration, Hsp-70, limb, urodele, amphibian, salamander, heat-shock, stress response.

2.3.2 Introduction

Vertebrate limb regeneration is of particular interest when one considers the problems caused by injuries such as amputation of a finger, arm or leg. Urodele amphibians, such as the axolotl (*Ambystoma mexicanum*), have the unique ability, among vertebrates, to regenerate perfectly many parts of their bodies throughout their life. Among the complex structures that can be regenerated in salamanders, the limb is the most widely studied [1]. Limb regeneration represents an elaborate process in which wound healing, cellular dedifferentiation, tissue remodeling and patterning occur to replace the amputated appendage. Understanding urodele limb regeneration could be helpful in the design and development of novel therapies in regenerative medicine. Until recently, regeneration studies in urodeles focused primarily on the description of physiological and cellular events such as apical ectodermal cap (AEC), blastema formation and cell migration [1]. The advent of molecular biology techniques has allowed us to look specifically at the many genes involved in the regeneration process. Some of the genes that have been studied so far have roles in determining limb patterning [171,324];[325], the cell cycle [154], epithelio-mesenchymal interactions [167], and finally cellular dedifferentiation [136,158]. Although the number of genes that have been described in regenerating tissues is constantly

increasing, there are still many families of genes that have never been studied in the context of regeneration. Therefore, considering the enormous stress caused by the amputation (wound healing, inflammation, swelling, etc) and the availability of the gene encoding for the *heat shock protein 70* in axolotls (Genbank access # [AY029210](#)), it became an obvious choice as a protein family with potential interest to better understand the process of regeneration.

Heat shock proteins are molecular chaperones, acting in normal and/or stress conditions, facilitating folding, assembly and transport of nascent proteins and proteolysis of abnormal proteins [196]. They are mainly recognized for providing thermotolerance to organisms or cells [196], but recent observations have shown they have multiple roles in embryogenesis, development and aging in organisms such as *Xenopus*, zebrafish, *drosophila* and mice [326]. This study, focuses on *Heat-shock protein-70* (*Hsp-70*) an ATP-dependent molecular chaperone expressed in various species from *E. coli* to mammals [196] and the principal member of the heat shock protein family. Its role in thermotolerance was first studied in the *Xenopus laevis* frog where it was shown to be constitutively expressed in oocytes [327]. In fact the regulation of *Hsp-70* is very important in thermotolerance, but also in other processes like wound healing [315]. *Hsp-70* was shown to be expressed in skin wound healing in rats, during laser-assisted treatments of scars [315]. Capon and Mordon, in the same paper, point out the importance of genes like transforming growth factor beta (*TGF-β*) 1, 2 and 3 in skin wound closure. *TGF-βs* have

many roles in wound healing including cellular proliferation and differentiation, extracellular matrix formation and cellular migration and scarring [211]. Interestingly, *TGF- β* has been shown to regulate *Hsp-70* expression, therefore linking *Hsp-70* to a potential role in wound healing [280,281]. Evidence of such a role became obvious in the *Hsp-70* knockout (KO) mouse. KO mice irradiated with UVs displayed diminished skin wound healing ability compared to their normal littermates [311].

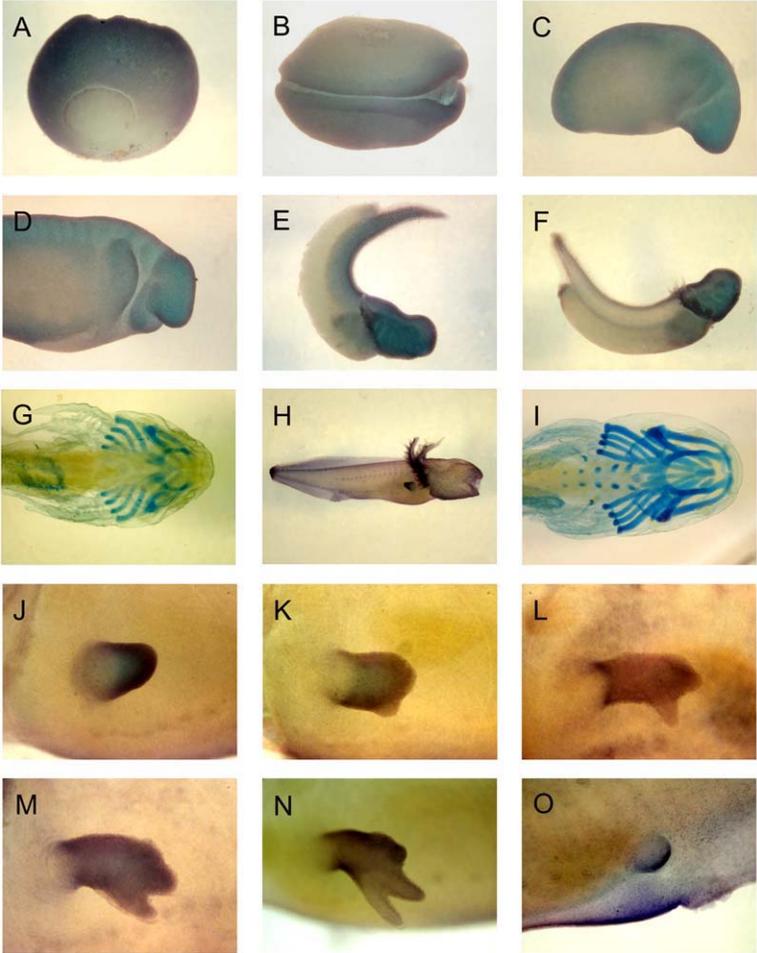
Knowing that *Hsp-70* is playing an important role in protein folding and degradation, and in wound healing, has led us to investigate its expression patterns during development and limb regeneration in the axolotl. Patruno et al. have shown that *Hsp-70* is expressed during arm regeneration in echinoderms, invertebrate starfishes that regenerate by going through a blastema state similar to salamanders [328], therefore providing further incentive to investigate *Hsp-70* expression in a regenerating vertebrate model. In this paper, we present results which show that *Hsp-70* is expressed and regulated during development and limb regeneration in axolotl.

2.3.3 Results

2.3.3.1 In situ analysis of Hsp-70 expression during embryogenesis and limb development

We used whole-mount *in situ* hybridization to characterize the expression of *Hsp-70* during development of the axolotl embryo, from stages 10,5 to 52 (Fig. 9 A-I, p. 85) according to Armstrong and Malacinski [118]. *Hsp-70* was first detected at stage 10,5 (gastrula) in the ectoderm of the axolotl embryo (Fig. 9 A). Expression of *Hsp-70* was intense on the dorsal side and weaker in the ectoderm closest to the yolk plug. At stage 17 (neurula), *Hsp-70* expression was concentrated in the neural folds of the closing neural tube (Fig. 9 B). This expression was strongest in the anterior part of the embryo but was also present in the posterior part of the neural folds. At stage 26, the expression was more intense in the prospective head region but was still present in the dorsal tissues (Fig. 9 C). We detected the expression of *Hsp-70* at stage 31, in the developing head, branchial arches and in the somites (Fig. 9 D). At stage 38, the expression pattern of *Hsp-70* was more specific: the head, the neural tube and the dorsal region showed strong signal compared to the ventral side in which we did not detect any more signal at this stage (Fig. 9 E). At stages 41, *Hsp-70* expression was detected only in the head, gills, and torso, no more signal was detectable in the dorsal tissues of the embryo (Fig. 9 F). In the final stages, from 46 to 53, where the limb buds appeared, the expression pattern was

Figure 9: Whole-mount *in situ* hybridization of *Hsp-70* and cartilage staining in developing embryos. For whole-mounts, blue/purple staining defines the expression domain of *Hsp-70*. (A) Stage 10,5 embryo. (B) Stage 17 embryo. (C) Stage 26 embryo. (D) Stage 31 embryo. (E) Stage 38 embryo. (F) Stage 41 embryo. (G, I) Victoria blue cartilage staining for stage 44 and 47 embryos respectively. (H) Stage 46 embryo. (J-O) Limb development stages. (J) Forelimb stage 46. (K) Forelimb stage 47. (L) Forelimb stage 48. (M) Forelimb stage 50. (N) Forelimb stage 52. (O) Hindlimb bud stage 52.

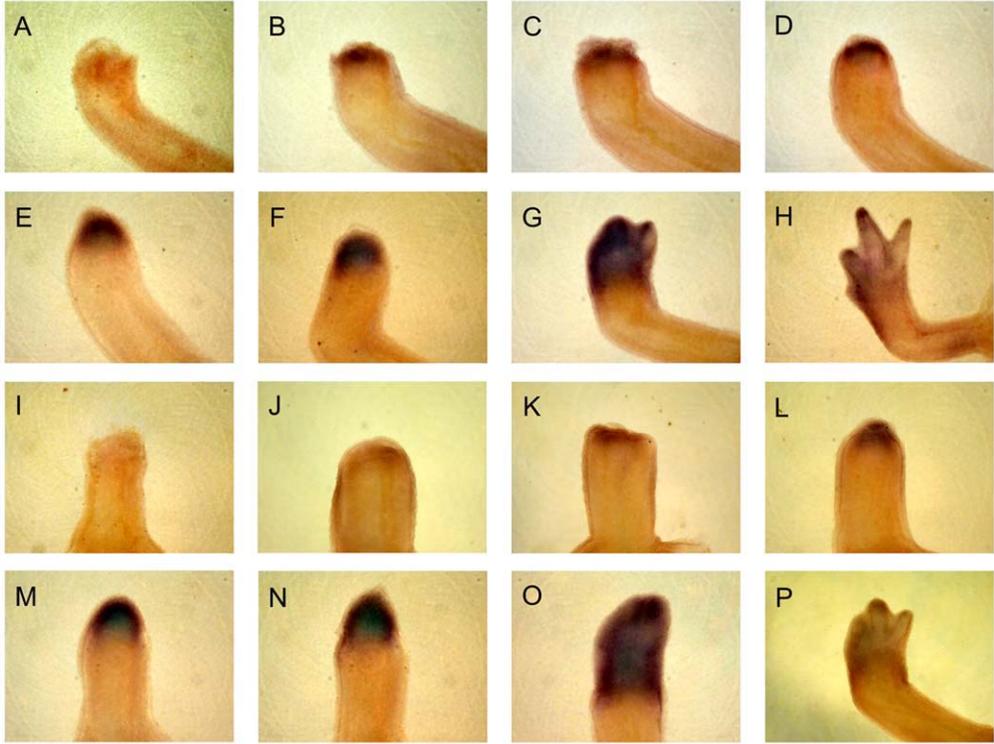


very similar at each stage. *Hsp-70* was detected mainly in the gills, tail fins, lateral lines and limb buds (Fig. 9 H). Limb development stages were classified following the classification of Nye et al. [329]. We characterized *Hsp-70* expression during limb development starting at stage 46 when the limb bud extends proximo-distally. At this stage the signal was intense and covered the entire limb buds, from the body to the tip (Fig. 9 J). At stages 47, 48 and 50, the signal was weaker but still covered the entire limb bud and the developing fingers (Fig. 9 K-M). At stage 52, the expression pattern still covered the entire bud, but was stronger on the posterior side of the limb bud and at the tip of the second finger and in the developing third finger (Fig. 9 N). At this stage we could also detect *Hsp-70* expression in the developing hindlimb bud (Fig. 9 O).

2.3.3.2 Analysis of Hsp-70 expression in limb regeneration

The expression pattern of *Hsp-70* was studied in regenerating limbs for both distal and proximal level of amputations. In forelimbs, we detected a very weak signal in the stump cells just under the amputation site (Fig. 10 B, J, p. 88). At 48 hours post-amputation, the expression of *Hsp-70* had increased above the level detected at 24 hours and covered the entire tip of the limb stump (Fig. 10 C, K). At the early bud stage, when the blastema is formed and the dedifferentiation process is at its maximum, the signal for *Hsp-70* expression was very intense and covered the whole blastema for both distal and

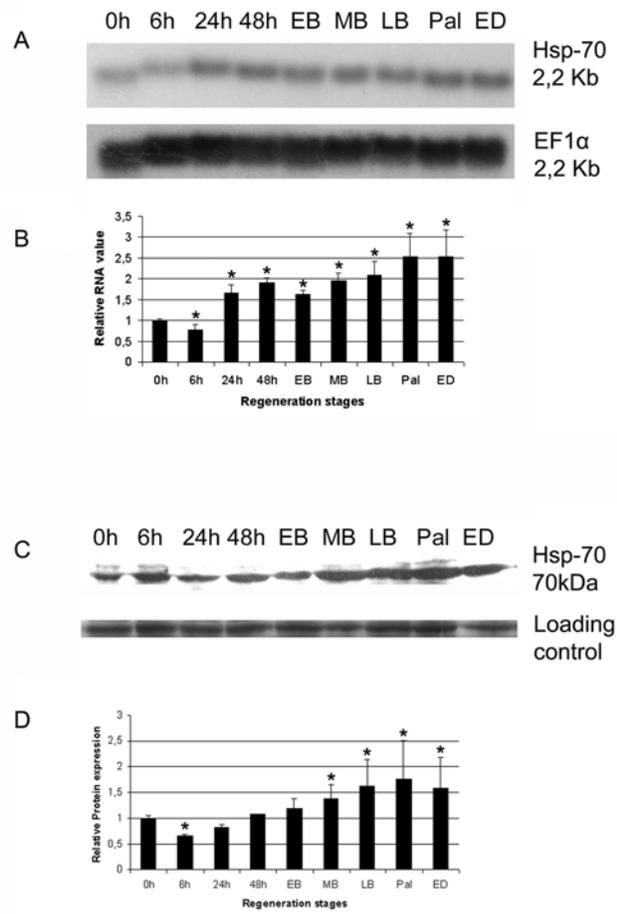
Figure 10: Whole-mount in situ hybridization of *Hsp-70* in regenerating forelimbs. (A-H) Distal amputations through radius and ulna. (A) 6 h. post-amputation. (B) 24 h. post-amputation. (C) 48 h. post-amputation. (D) Early bud stage. (E) Medium bud stage. (F) Late bud stage. (G) Palette stage. (H) Early differentiation stage. (I-P) Proximal amputations through humerus. (I) 6 h. post-amputation. (J) 24 h post-amputation. (K) 48 h post-amputation. (L) Early bud stage. (M) Medium bud stage. (N) Late bud stage. (O) Palette stage. (P) Early differentiation stage.



proximal amputations (Fig. 10 D, L). At medium and late bud stages, when cellular dedifferentiation stops and proliferation peaks, the expression for *Hsp-70* was still present in the entire blastema and very intense (Fig. 10 E, M and F, N). At palette stage, *Hsp-70* expression was maintained in the entire blastema (Fig. 10 G, O). At early differentiation stage, when fingers began to form, the expression was diminished in the anterior part of the limb, where the tissues to be regenerated were almost complete, although *Hsp-70* was still intensely expressed at the tips of the first two fingers and on the posterior side (Fig. 10 H, P). The expression of *Hsp-70* in hindlimb regeneration was identical with that of forelimbs (data not shown).

Hsp-70 RNA transcript was detected as a single band of approximately 2,2 Kb on Northern blot analysis of RNA isolated from regenerating limb blastemas (Fig. 11 A, p. 91). We detected a weak signal in the control lane, which corresponds to non regenerating mature limb tissue. This result indicates the presence of low level constitutive expression of *Hsp-70* in the axolotl limb tissues. A 1.5 to 2 fold statistically significant increase in expression (Fig. 11 B) was observed at 24h and 48h corresponding to the beginning of the cellular dedifferentiation phase and peaked at palette stage (2.5 fold). The increase in expression was maintained throughout the formation of the blastema and until the latter phases of the regeneration process (Fig. 11 B). Similar results were observed in regenerating hindlimb (data not shown).

Figure 11: Regulation of *Hsp-70* mRNA and protein expression during axolotl limb regeneration. (A) Northern blot analysis showing the temporal expression and regulation of *Hsp-70* transcript during forelimb regeneration. 0h represents mature non-regenerating limb tissue. A 2,2 Kb transcript corresponding to the axolotl *Hsp-70* mRNA was detected which is similar to the transcript length of other species. *EF1- α* transcript was used as a control for loading. (B) Quantitation of multiple Northern blot analysis (n=3) showing relative RNA expression value for each stage calculated from the ratio of *Hsp-70/EF1- α* . (C) Western blot analysis showing the temporal expression and regulation of *Hsp-70* protein during forelimb regeneration. 0h represents mature non-regenerating limb tissue. Results obtained with the anti-Hsp-70 polyclonal antibody are shown. Coomassie blue staining of the proteins on the membrane was used for loading control. (D) Quantitation of multiple Western blot analysis (n=4) showing relative protein expression value for each stage calculated from the ratio of *Hsp-70/loading control*. The 0h time point was assigned an arbitrary value of one (1) as a reference for densitometric analysis in panels B and D. (* Student T-test statistical analysis with a significant $p < 0.05$ compared to time 0h). EB: early bud, MB: medium bud, LB: late bud, Pal: palette, ED: early differentiation.

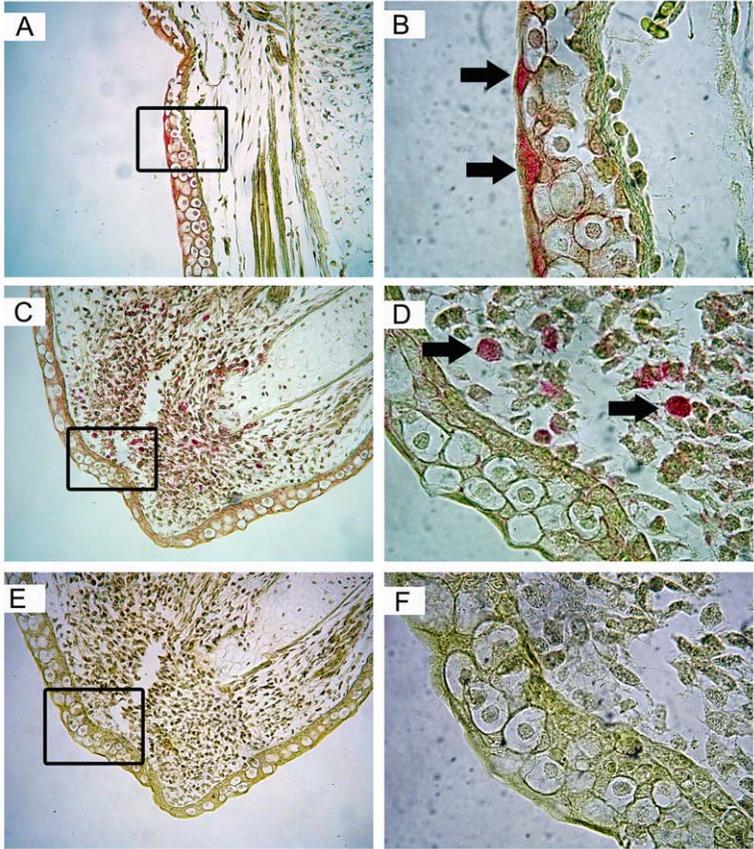


Using monoclonal and polyclonal antibodies raised against the human and *E. coli* *Hsp-70* proteins respectively, we were able to detect a band corresponding to *Hsp-70* of approximately 70 kDa during forelimb and hindlimb (data not shown) regeneration. Figure 11 C shows Western blot results with the polyclonal antibody for forelimb regeneration (results obtained with the monoclonal antibody were identical, data not shown). As with the Northern blot analysis, we detected a signal for *Hsp-70* in non regenerating mature tissue. Our results indicate that the expression patterns for *Hsp-70* protein and RNA were similar for limb regeneration with a slight delay in protein induction which reached statistical significance at medium bud (Fig. 11 B & D).

Northern blot results were further confirmed by *in situ* hybridization on mature and regenerating limb sections. This approach provided a higher resolution for gene expression at the cellular level than whole-mount and allowed us to establish the expression pattern of *Hsp-70* more accurately in mature tissues. In mature non-regenerating tissues, we detected a few skin cells expressing *Hsp-70* RNA transcript (Fig. 12 A, B, p. 94) which account for the transcript and protein detected at 0h (non regenerating mature tissue) with Northern and Western blot analyses (Fig. 11 A & C). In medium bud blastemas, we detected many positive cells, mostly found in the mesenchyme (Fig. 12 C, D). Control sense probe did not yield any signal (Fig. 12 E, F).

2.3.3.3 RT-PCR analysis of Hsp-70 expression in various organs

Figure 12: Representative *In situ* hybridization for *Hsp-70* expression in limb sections. (A) 10X view of mature limb tissue showing few cells positive for *Hsp-70* mRNA (red cells are positive). (B) 40X magnification of the boxed region in A. Positive cells are mostly found in the skin and are identified by arrows. (C) 10X view of regenerating medium bud blastema showing multiple positive cells. (D) 40X magnification of the boxed region in C. Positive cells are identified by arrows and are predominantly found in the mesenchyme. (E) 10X view of regenerating medium bud blastema hybridized with sense RNA probe showing no signal. (F) 40X magnification of the boxed region in E.

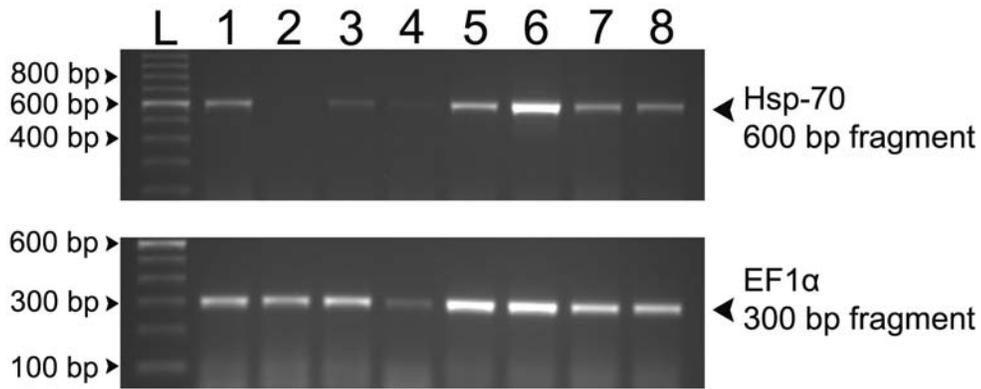


The relative gene expression of *Hsp-70* in various organs was determined by RT-PCR and results are depicted in figure 13 (Fig. 13, p. 97) where a band of the expected size (600 bp) is observed in each of the organs tested except in the eyes (lane 2), where no signal was detected. A very faint band was observed in heart and liver tissues indicating low levels of constitutive *Hsp-70* expression in those organs. *EF1- α* loading control was also very weak for the liver, which could indicate that the signal in this organ may be stronger. Although this is unlikely since we have repeated these experiments multiple times (6 times) and we always observe lower *EF1- α* level in the liver compared to other organs. It may be that *EF1- α* is not expressed consistently in every organ and tissue as confirmed by Northern blot analysis (unpublished data). Similar observations were also reported for actin expression in Newt tissues and organs by Beauchemin et al. [330]. Stomach, spleen, gonads and brain tissues presented a mid-intensity signal for *Hsp-70*, as the intestine expressed the transcript very strongly.

2.3.3.4 Heat shock induction of the axolotl Hsp-70

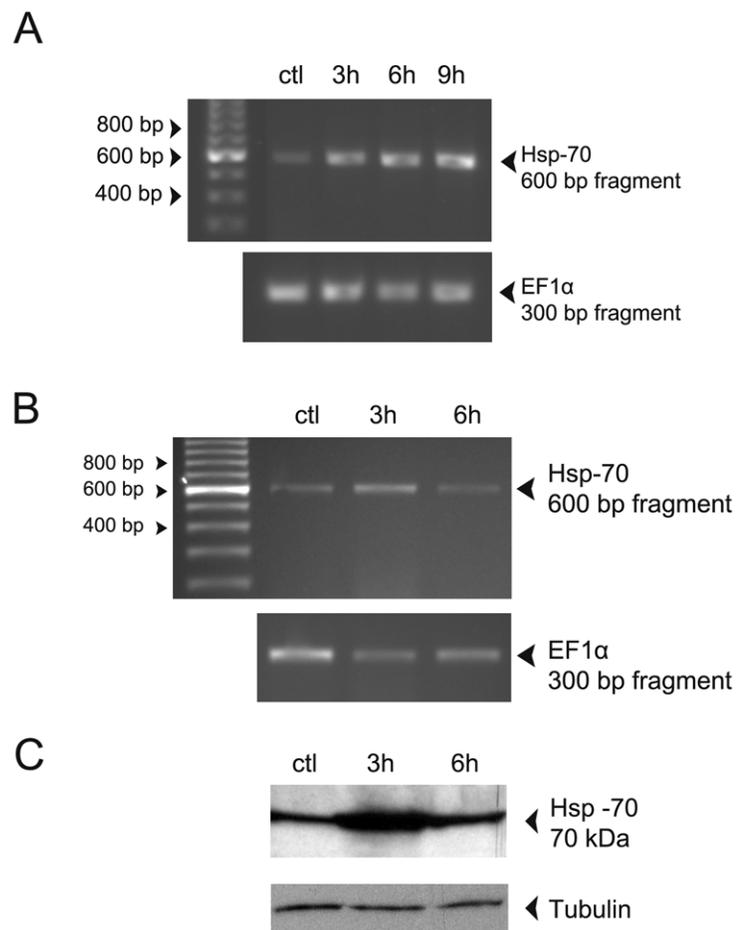
To verify if the axolotl *Hsp-70* responded to heat shock as observed in other species, we exposed an axolotl fibroblast cell line to heat shock. The heat shocked cells showed a 2-3 folds increase in *Hsp-70* expression following exposure to 42°C compared to the control cells. The level of *Hsp-70* expression increased as early as 3 hours and was maintained at 6

Figure 13: RT-PCR analysis of the expression of *Hsp-70* in various axolotl organs. We detected a band of 600 base pairs for each organ except lane 2, concordantly with the cDNA length expected with primers AFH56 and ARH657 (see materials and methods). Lane description: L: DNA ladder, 1: stomach, 2: eyes, 3: heart, 4: liver, 5: gonads, 6: intestine, 7: spleen, 8: brain. *EFl- α* was used as a control.



and 9 hours following heat-shock (Fig. 14 A, p. 100). In stage 36 embryos, the pattern of expression of *Hsp-70* following heat-shock was different. The expression of *Hsp-70* in embryos fixed 3 hours post-heat-shock was increased about 2-3 folds compared to controls (Fig. 14 B, compare *Hsp-70* band with *EF1- α* band for control, 3h and 6h-post heat-shock). In embryos fixed 6 hours following heat-shock, *Hsp-70* expression of had gone back down to control levels, presenting a faster time course of *Hsp-70* recovery to basal levels in whole embryos than in cultured cells. We confirmed the expression of *Hsp-70* in embryos after heat shock by Western blotting (Fig. 14 C). Protein level at 3h post-heat shock was about 3 times higher than control. Embryos fixed 6h post-heat shock showed a band intensity similar to control, while tubulin detection confirmed equal loading of proteins in each lane.

Figure 14: Heat-shock induction of *Hsp-70* in axolotl cells and embryos. (A) RT-PCR experiment showing *Hsp-70* induction in axolotl cell line following heat-shock at 42 °C. Control lane is amplification on RNA collected from cells with no heat-shock. Other lanes are amplification on RNA collected from cells exposed to a 20 minutes heat-shock and collected 3, 6 and 9 hours following heat exposure. (B) RT-PCR experiment showing *Hsp-70* induction in axolotl stage 36 embryos following heat-shock at 37 °C. *Control lane is amplification on RNA collected from embryos with no heat-shock. Other lanes are amplification on RNA collected from embryos exposed to a 20 minutes heat-shock and collected 3 and 6 hours following heat exposition. EF1- α was used as a control in A and B.* (C) Western blot analysis showing *Hsp-70* protein expression and regulation in stage 36 embryos. Control lane proteins come from embryos with no heat-shock. Other lanes are signals from embryos exposed to a 20 minutes heat-shock and collected 3 and 6 hours following heat exposure.



2.3.4 Discussion

In this paper, we present data showing that the axolotl *Hsp-70* gene is regulated during both development and limb regeneration that may suggest a role for this chaperone in tissue regeneration. Heat-shock proteins have been shown to be expressed during the development of many organisms. In *Xenopus* development, *Hsp-70* mRNA transcripts are detected in oocytes and thus provide the eggs with a source of *Hsp-70* protein in case a stress occurs that could put in peril the developmental process [300,327]. The presence of *Hsp-70* could potentially serve two roles in oocyte development: it could prevent aggregation or misfolding of proteins following a stress or it could bind proteins to prevent their premature activation [331]. In mice, *Hsp-70* expression is associated with cartilage and bone development [307]. Our expression data during axolotl development, where *Hsp-70* expression covers the entire head, corresponds to the appearance of cartilage (Fig. 9 F-I, p. 85) and correlates with the results observed in mice. Limb development is another process that involves cartilage formation where *Hsp-70* is also expressed in axolotl. To our knowledge, this is the first study to look at *Hsp-70* expression in a limb development model. Again, protection or promotion of protein interactions during development may be the reason for the intense expression of *Hsp-70* in developing limbs.

Oberringer et al. presented results showing that *Hsp-70* was up-regulated in human tissues from patients with good healing capacities and down-regulated in tissues from

patients with chronic wounds [309]. It was also shown that knockout mice for *Hsp-70.1* displayed impaired skin wound healing following UV light exposure compared to normal littermates [311]. These latter studies present different experiments demonstrating the presence of *Hsp-70* in skin wound healing which links this chaperone to many functions related to wound healing. Oberringer et al. also suggested that *Hsp-70* may be involved in endothelial cells proliferation by promoting assembly of molecules required for this process [309]. Studies have also demonstrated that wounding induces a *Hsp-70* response similar to other stresses like heat, chemicals or UV light exposure [310]. Interestingly, recent findings have shown that distinct stimuli (e.g. heat-shock and sodium arsenite) can activate *Hsp-70* expression via different pathways [197]. Amputation or wounding could represent a distinct stress causing an *Hsp-70* response as UV, heat-shock or some chemicals do. One of the most important roles of *Hsp-70* during wound healing may be its interactions with proteins that are key regulators of proliferation and apoptosis. Recently, in a study looking at apoptosis during limb development and regeneration in newts (*Notophthalmus viridescens*), TUNEL experiments revealed few apoptotic cells in the regenerates as a whole. There were extensive TUNEL positive cells, indicative of high apoptosis level, 24h post-amputation. However, at 1 week post-amputation, only a few positive cells (1-2%) were observed and by 2 to 3 weeks post-amputation no detectable TUNEL signal remained [332]. Our data indicate that *Hsp-70* expression increases throughout blastema formation from 48h to palette at which point a peak of expression is reached and maintained at early differentiation as confirmed by Northern and Western blots (Fig 11 B & D, p. 91). This

data correlates with an anti-apoptotic function for this chaperone during regeneration. Therefore, *Hsp-70* expression could be up-regulated during axolotl limb regeneration to prevent programmed cell death and to protect blastemal integrity.

We also investigated the extent of *Hsp-70* expression in various organs of the axolotl. We observed high levels of expression in intestine, where *Hsp-70* could be required to transport proteins or to provide protection to cells constantly being renewed in order to maintain the gut epithelium (Fig. 13 lane 6, p. 97). Other organs like stomach, heart, liver, gonads, spleen and brain presented low to moderate levels of *Hsp-70* expression (Fig. 13 lanes 1, 3, 4, 5, 7 and 8 respectively). *Hsp-70* could perform many roles of transport, protection and degradation of cellular proteins in these tissues as well [196,333-336]. No expression of *Hsp-70* was detected in the eyes (Fig. 13 lane 2). This latter point is of particular interest since axolotls cannot regenerate their eye lens while newts are able to [337]. It would therefore be interesting to look at *Hsp-70* expression following lentectomy in the axolotl and in the newt to compare if *Hsp-70* is expressed in the regenerating lens.

We finally characterized the heat-shock response in an axolotl cell line and in whole embryos in order to correlate our findings with what has been observed in other species. RT-PCR and Western blot results provided evidence that heat-shock response was also present in whole embryos heat shocked at 37°C for 20 min (Fig. 14 B and C, p. 100) (42°C heat-shock was lethal to embryos). The time course for the regulation of *Hsp-70* expression

following heat-shock in embryos was faster than in cells with a peak of expression at 3 hours post-heat-shock that was down regulated to normal levels by 6 hours. This time-course confirms previous work in urodeles (including the extent of induction) and solidifies the fact that heat-shock response is conserved between amphibians and mammals [304,338]. The effects of heat shock, as administered to embryos, was also tested on regenerating limbs at two different time points (6h post-amputation and medium bud) and no apparent differences in the time course and integrity of the regenerates were observed with size matched controls (data not shown). The up-regulation of *Hsp-70* during the regenerative process could therefore be responsible for conferring the observed resistance to heat-shock. In fact, multiple studies have demonstrated that the presence of elevated *Hsp-70* protein level prior to heat-shock confers a marked resistance to thermal stress [196,286,288,296,297,339]. Therefore the upregulation of *Hsp-70* in the blastema could represent an adaptive response to prevent environmental stresses from disturbing the molecular interactions necessary for regeneration.

In conclusion, this is the first study to present results showing that the expression of the molecular chaperone *Hsp-70* is regulated during development and regeneration in axolotls. Our data supports the possibility that *Hsp-70* may be implicated in the formation of head structures and cartilage during axolotl development. *Hsp-70* is also expressed in the developing limb and could promote cell growth and proliferation in this structure. In regenerating tissues, *Hsp-70* could promote cell proliferation and prevent programmed cell

death. The similarity in the expression pattern of *Hsp-70* during limb development and regeneration (Fig. 9 & 10) supports the hypothesis that the axolotl ability to heal and regenerate its tissues perfectly is by reverting to a pseudo-embryonic like state and that the regenerative process is in part a recapitulation of development [130]. Amputation and wounding are important traumas that cause cell stress and therefore induce production of *Hsp-70* similar to heat shock. Future investigations on the exact functions of *Hsp-70* during wound healing and regeneration will be needed to fully understand how this chaperone influences cellular activity in those two complex processes. Interestingly, recent advances in electroporating spinal cord cells during regeneration [340] and the generation of transgenic Japanese newts (*Cynops pyrrhogaster*) [341] provide promising avenues to directly test the function of genes during limb regeneration.

2.3.5 Experimental procedures

2.3.5.1 Animal maintenance/Cell culture

Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) embryos and larvae were purchased from the Indiana University Axolotl colony (Bloomington, IN). Larvae were maintained in 20% Holtfreter's solution at 19-22 °C on a 12 hours of light, 12 hours of darkness cycle. Animals were anesthetized in 0,1% MS222 (Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) for amputations. Animals of 3 to 5 cm in length were used for proximal (through humerus or femur) and distal (through radius / ulna or tibia / fibula) amputations. Axolotl cells grown in culture were maintained at a constant temperature of 27°C without CO₂ in Leibovitz's L-15 medium (L-15 60,0% with 1X L-glutamine, 1X antibiotic-antimycotic, 1X insulin-transferrin-selenium and 5% Fetal Bovine Serum) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). Animal care and experiments were done in accordance with the Université de Montréal animal care committee's guidelines.

2.3.5.2 RT-PCR

Total RNA was extracted from axolotl larvae, organs and cells using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Reverse transcription reactions were done at 50 °C using

Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). A cDNA fragment encoding axolotl *Hsp-70* was amplified by RT-PCR from larvae total RNA (with primers AFH56 (Axolotl forward *Hsp-70* 56) 5'ATGTCGAAAGGACCATCAGTG 3' and ARH657 (Axolotl reverse *Hsp-70* 657) 5' CCAAGGTCAAAGATCAACACG 3') using the sequence originally cloned by Ordonez et al. (Genbank accession number AY029210). PCR product was cloned in pCR II-TOPO plasmid (Invitrogen) and sequenced with M13 reverse primer at the sequencing facility of the Université de Montréal Biochemistry department. The cloned fragment was 602 base pairs and corresponded to *Hsp-70* when blasted in GenBank. To amplify *Hsp-70* in organs and axolotl cells, PCR was done using the aforementioned primers AFH56 and ARH657. *EF1- α* control PCR was amplified using primers *EF1- α -1* (5' AACATCGTGGTCATCGGCCAT 3') and *EF1- α -2* (5' GGAGGTGCCAGTGATCATGTT 3'). RT-PCR reactions were performed on at least 3 separate RNA preparations.

2.3.5.3 Whole-mount in situ hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed as described in Gardiner et al. [171] with a few modifications. Digoxigenin labeled antisense and sense RNA probes were synthesized using either SP6 or T7 RNA polymerase (Invitrogen) and DIG RNA labeling mix (Roche Diagnostics, Laval, Canada). The pCR II-TOPO vector containing the 602bp *HSP-70* fragment was linearized with either EcoRV or SacI restriction enzymes and used

as template for probe synthesis. For tissue permeabilization, limbs were incubated with 30µg/ml proteinase K for 30-60 minutes on ice and then at 37°C for 45-60 minutes with the time adjusted for blastema size. Embryos, above stage 30, were incubated with 20µg/ml proteinase K 15 minutes on ice and 5 minutes at 37°C. Embryos under stage 30 were not permeabilized. Probe hybridization was 72 hours for limbs and 24 hours for embryos. Prehybridization and hybridization temperature was 65°C. For alkaline-phosphatase reaction, BM purple (Roche) was used as the enzyme substrate for the colorimetric reaction. No signal was detected at any stage when the sense probe was used for in situ hybridization (data not shown). Whole-mount *in situ* hybridization was performed on at least 5 separate samples for each stage of development and regeneration presented in this paper.

2.3.5.4 Northern blots

Limb regeneration stages were determined using Tank [128] and Iten [129] staging systems. Total RNA was extracted from blastemas at each stage as described above. Messenger RNA was extracted using GenElute mRNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich). 20 µg of total RNA or 5 µg of mRNA were loaded per lane on a 1% agarose-6,9% formaldehyde gel. RNA was transferred from the gel to a nylon membrane (Pall, USA) by capillary transfer. A cDNA probe coding for the axolotl *Hsp-70* was amplified from the pCR-II-TOPO plasmid. The membranes were hybridized with this cDNA probe labeled

with [α - 32 P]deoxy-CTP by the random hexamer method as in Roy et al.[342]. Northern blots were repeated 3 times with different RNA samples for each regeneration stage.

2.3.5.5 Western blots

Total proteins were extracted by sonicating the tissues (blastemas, cells or whole embryos) in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer and denatured in boiling water 5 minutes before electrophoresis on 12% polyacrylamide-SDS gels according to the method of Laemmli [343]. Fifty micrograms of proteins were loaded per lane. The proteins were transferred electrophoretically onto PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA). Two antibodies, which have been previously characterized to recognize specifically *Hsp-70* [344], were used to detect the axolotl *Hsp-70*: a rabbit polyclonal antibody raised against *E. coli* purified heat shock protein (DnaK) (Lab Vision/Neomarkers, Fremont, CA), and a monoclonal antibody raised against purified *Hsp-70* from HeLa cells (Calbiochem, San Diego, CA). Immunodetection of primary antibodies was visualized using the ECL Western blotting kit according to the manufacturer's directions (Amersham biosciences, Piscataway, NJ). Western blot experiments were repeated 4 times with different protein samples for each regeneration stage.

2.3.5.6 In situ hybridization on tissue sections

Axolotl limbs were fixed as for whole-mounts and embedded in paraffin. Ten-micron thick sections were prepared on Superfrost slides (Fisher). After dewaxing and rehydration, slides were treated in 0,3% Triton X-100 in 1X PBS for 15 minutes, permeabilized with proteinase K for 30 minutes at 37 °C, post-fixed in 4% paraformaldehyde for 5 minutes at 4°C and acetylated with 0,25% acetic anhydride in 0,1M triethanolamine 10 minutes at room temperature. Sections were prehybridized in 4X SSC with 50% formamide 1 hour at 46°C in a humidified chamber. Slides were hybridized overnight with denatured RNA probe diluted at 1 µg/mL in hybridization solution (4X SSC, 50% formamide, 1X Denhardt's, 5% dextran-sulfate, 0,5 mg/mL salmon sperm DNA, 0,25 mg/mL yeast tRNA) at 46°C. Slides were then washed with 2X SSC for 15 minutes at room temperature. Treatment with RNase A (20µg/mL RNase A diluted in 500mM NaCl, 10mM Tris and 1 mM EDTA) was then performed to remove non-specific signal. Slides were washed with 1X SSC and 0,1X SSC both 15 minutes at room temperature. The slides were then washed in buffer 1 (100mM Tris, 150 mM NaCl) for 10 minutes and blocked for 1 hour with buffer 1 containing 10% normal horse serum. After blocking, slides were incubated at 4°C overnight with anti-digoxigenin alkaline-phosphatase conjugated antibody diluted 1/500 in buffer 1 containing 1% normal horse serum and 0,3% Triton X-100. After rinsing in buffer 1 for 15 minutes and buffer 3 (100 mM Tris, 100 mM NaCl and 50 mM MgCl₂, pH 9,5) for 15 minutes, colorimetric detection of RNA-RNA hybrids was performed using Fast-Red (DakoCytomation, Mississauga, Ontario). Slides were

counterstained with Methyl green. Sections were mounted with Aquatex (EMD Chemicals, NJ). *In situ* hybridization was performed at least 3 times for each stage.

2.3.5.7 Heat-shock

Axolotl cells grown in culture and embryos, stage 36, were subjected to heat-shock to measure the induction of *Hsp-70*. Axolotl cells grown at 27°C were incubated at 42°C for 20 minutes to induce heat shock and were put back at 27°C for recovery. Cells were collected 3, 6 and 9 hours following heat-shock. Total RNA was extracted as described above and RT-PCR was performed to measure *Hsp-70* induction. Embryos normally kept at room temperature, were immersed in 37°C Holtfreter's for 20 minutes to induce heat shock. They were sacrificed at 3 and 6 hours after heat-shock and total proteins and RNA were extracted as described above. RT-PCR and Western blots analyses were done as described above on 3 different series of animals.

2.3.6 Acknowledgments

The authors would like to thank Drs SV Bryant and DM Gardiner from the University of California Irvine for providing the axolotl cell line. This research was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research, the Fond de Recherche en Santé du Québec and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to S Roy. Mathieu Lévesque is supported by a Ph.D. scholarship from the Réseau de Recherche en Santé Buccodentaire du Québec and Jean-Charles Guimond is supported by a Ph.D. scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. Stéphane Roy is a Chercheur Boursier Junior 1 from the FRSQ.

2.4 Commentaires

Le contrôle utilisé pour l'immunobuvardage Western à la figure 11 C consiste en une coloration de la membrane au bleu de Coomassie. Des anticorps spécifiques pour des protéines contrôles, couramment utilisées pour la quantification, incluant la tubuline, l' α -calnexine et la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) ont été utilisés afin de pouvoir quantifier le signal détecté pour HSP-70 par Western. Malheureusement, l'expression de toutes ces protéines, détectée par Western, est modulée lors de la régénération et ne permet pas une quantification adéquate (Fig. 15, p. 117). Il faut réaliser que le blastème de régénération est une structure en constante évolution au cours du processus de régénération et qu'il renferme plusieurs types de cellules actives. Ces cellules vont se multiplier rapidement pour atteindre un plateau de prolifération aux stades de bourgeon primaire (EB) et bourgeon moyen (MB), puis vont se redifférencier. La densité de cellules est aussi très grande dans le blastème, comparativement à une patte mature où la densité cellulaire est moindre et où on détecte beaucoup plus de matrice extra-cellulaire. Il est donc normal de voir l'expression de gène de structure cellulaire (tubuline, α -calnexine) ou liés au métabolisme (GAPDH) varier au cours de la régénération.

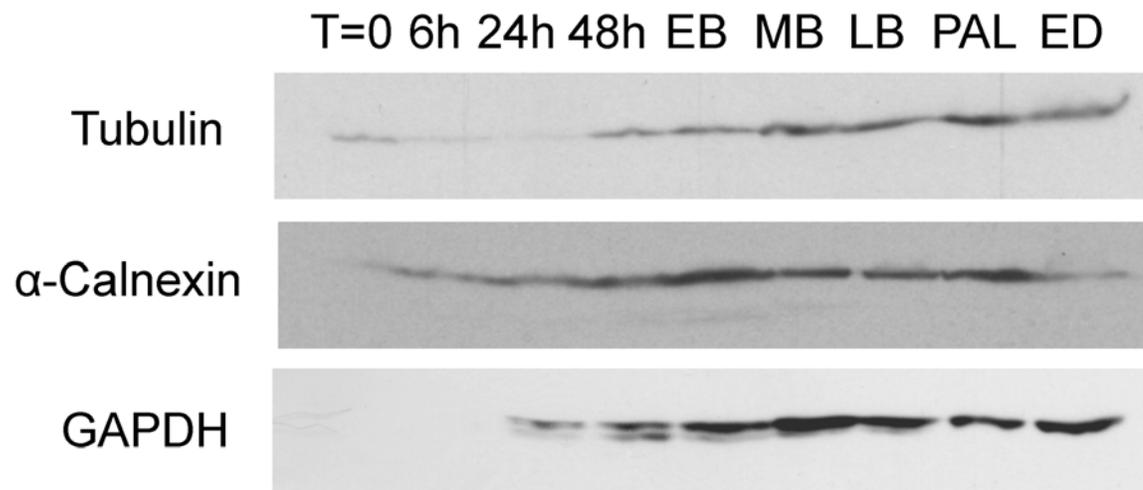
Nous avons détecté l'expression de Hsp-70 par RT-PCR dans différents organes de l'axolotl (Fig. 13) et suite à l'activation par choc-thermique dans des cellules en culture (Fig. 14 A) et chez des embryons de stade 36 (Fig. 14 B). Il est important de souligner que cette technique est semi-quantitative et qu'il est impossible de réellement quantifier le niveau d'expression de Hsp-70 à l'aide de celle-ci. Il serait intéressant de répéter l'expérience en utilisant la méthode de PCR en temps réel afin de réellement quantifier le niveau d'expression de Hsp-70 dans les différents organes et suites à un choc-thermique chez l'axolotl. Une figure a été ajoutée dans le but de montrer que les bandes détectées par PCR dans l'article n'étaient pas le résultat d'artéfacts, mais bien d'une réelle amplification de l'ARN messager correspondant à Hsp-70 (Fig. 16 A, p. 119).

La figure 16 B présente une nouvelle exposition d'une hybridation Northern montrant l'expression du gène EF1- α lors du processus de régénération du membre chez l'axolotl. Malheureusement, le stade de bourgeon moyen (MB) est manquant sur cette membrane.

Finalement, il faut mentionner qu'une tentative a été effectuée afin de bloquer l'activation de Hsp-70 lors de la régénération du membre chez l'axolotl. Des cellules d'axolotl en culture ainsi que des animaux en régénération ont été traités avec le flavonoïde quercétin. Quelques articles montrent que la quercétin ajoutée à des cellules de mammifères

en culture peut inhiber l'induction de plusieurs protéines de la famille des Hsp, dont Hsp-70, suite à un choc thermique [345-347]. Les traitements à la quercetin que nous avons fait, autant sur les cellules que sur les animaux, se sont révélés inefficaces. La quercetin n'a pas bloqué l'induction de Hsp-70 dans la lignée cellulaire de fibroblastes que nous possédons. De plus, une dose non-létale de quercetin n'a eu aucun effet sur le processus de régénération du membre chez l'axolotl.

Figure 15 : Détection des protéines tubuline (Tubulin), α -calnexine (α -Calnexin) et GAPDH (glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase) aux différents stades de régénération du membre chez l'axolotl par immuno-buvardage Western. On peut voir que l'expression de ces protéines est modulée lors de la régénération du membre chez l'axolotl. Une coloration de la membrane utilisée lors de l'expérience au bleu de Coomassie a été ajoutée afin de montrer que la quantité de protéine est égale dans chaque puits. (T=0 (patte mature), 6h, 24h, 48h, EB (bourgeon primaire), MB (bourgeon moyen), LB (bourgeon tardif), Pal (Palette), ED (différenciation des doigts)).



Bleu de coomassie

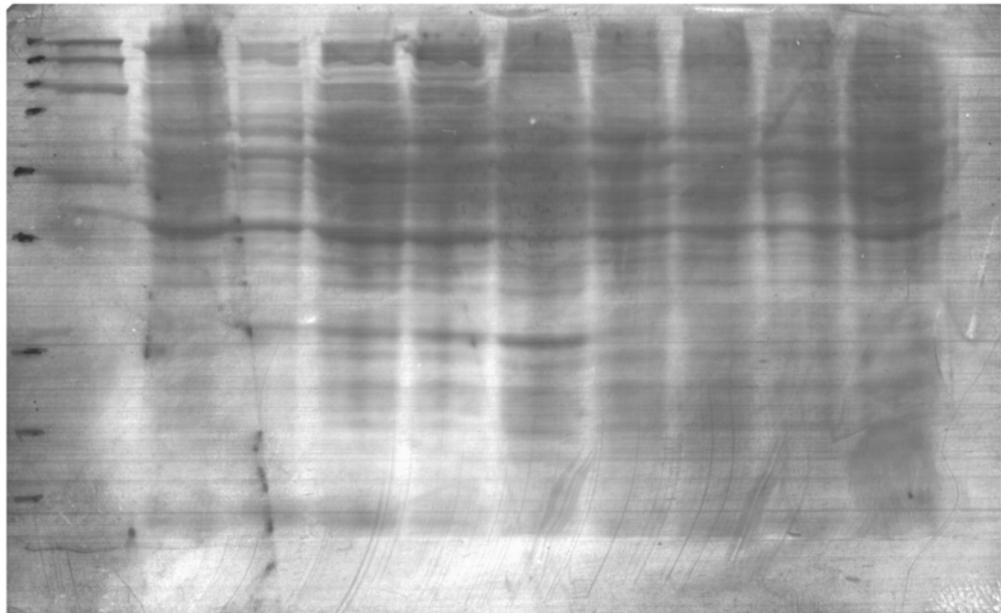
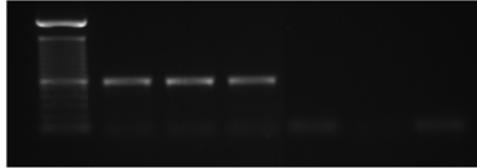


Figure 16 - RT-PCR contrôle montrant l'expression spécifique du gène Hsp-70 dans l'estomac et lors de la régénération chez l'axolotl A – RT-PCR : Réaction de RT-PCR contrôle montrant l'amplification d'une bande spécifique à Hsp-70 sur des échantillons d'ARN extraits d'estomac d'axolotl (E) et de membre en régénération au stade de bourgeon moyen (MB) et bourgeon tardif (LB). WB : Réaction de RT-PCR contrôle montrant l'absence de bande amplifiée lorsque l'eau est utilisée comme matrice de départ (WB, *water blank*). RT- : Réaction de RT-PCR contrôle montrant l'absence de bande amplifiée lorsque l'enzyme *reverse transcriptase* (RT) n'est pas ajoutée lors de la réaction de transcription inverse. B – Northern blot montrant l'expression de EF1- α lors du processus de régénération chez l'axolotl (T=0 (patte mature), 6h, 24h, 48h, EB (bourgeon primaire), LB (bourgeon tardif), Pal (Palette), ED (différenciation des doigts). Le stade de bourgeon moyen (MB) est manquant sur cette membrane.

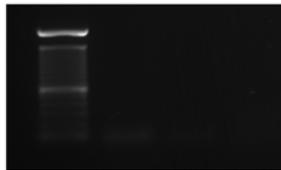
A

Hsp-70

RT-PCR			WB		
E	MB	LB	E	MB	LB

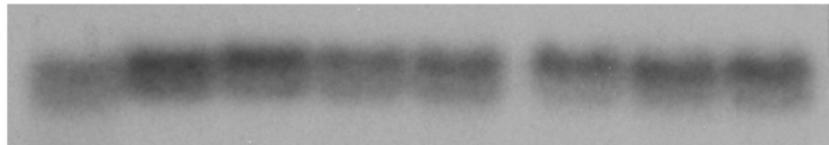


RT-		
E	MB	LB



B

T=0	6h	24h	48h	EB	LB	Pal	ED
-----	----	-----	-----	----	----	-----	----



3. Chapitre 2 – Article 2

Titre: Transforming Growth Factor- β Signaling Is Essential for Limb Regeneration in Axolotls

Auteurs: Mathieu Lévesque, Samuel Gatién, Kenneth Finnsen, Sophie Desmeules, Éric Villiard, Mireille Pilote, Anie Philip et Stéphane Roy

Journal : PLoS ONE, vol. 2, numéro 11, e1227, 2007.

3.1 Mise en contexte

Chez les amniotes (*i.e.* reptiles, poissons et mammifères), les processus de guérison qui sont activés, lorsqu'une blessure survient, mènent habituellement à la formation d'une cicatrice. Une des familles de gènes les plus étudiées pour ses rôles lors de la guérison des plaies chez les mammifères est celle des *Transforming growth factors- β* , et plus particulièrement *Tgf- β 1*. Les résultats présentés dans notre article montrent pour la première fois, l'expression de *Tgf- β 1* dans un contexte de régénération tissulaire parfaite chez une salamandre. Nous avons démontré que *Tgf- β 1* est exprimé lors de la première phase de la régénération du membre de l'axolotl. C'est durant cette phase que la coiffe apicale ectodermique se forme, que la dédifférenciation cellulaire se produit et que le blastème est établi. De plus, à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique spécifique à la voie de signalisation des *Tgf- β* , il a été possible de bloquer le processus de régénération chez l'axolotl. Ceci démontre que la voie de signalisation des *Tgf- β* est essentielle au processus de régénération et que *Tgf- β 1* pourrait être régulé/interprété différemment par les cellules de l'axolotl pour mener à la régénération plutôt qu'à la formation de cicatrices.

3.2 Contribution des auteurs

Ces auteurs ont conçu les expériences : Mathieu Lévesque, Anie Philip et Stéphane Roy.

Ces auteurs ont effectué les expériences : Mathieu Lévesque, Samuel Gatien, Kenneth Finnson, Sophie Desmeules, Éric Villiard et Mireille Pilote.

Ces auteurs ont analysé les données : Mathieu Lévesque, Kenneth Finnson, Anie Philip et Stéphane Roy.

Ces auteurs ont fourni du matériel et des réactifs : Anie Philip et Stéphane Roy.

Ces auteurs ont écrit l'article : Mathieu Lévesque, Anie Philip et Stéphane Roy.

PLoS ONE

Open-Access License

No Permission Required



The Public Library of Science (PLOS) applies the [Creative Commons Attribution License](#) (CCAL) to all works we publish (read the [human-readable summary](#) or the [full license legal code](#)). Under the CCAL, authors retain ownership of the copyright for their article, but authors allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles in PLOS journals, so long as the original authors and source are cited. **No permission is required from the authors or the publishers.**

www.plosone.org

3.3 Texte de l'Article - Transforming growth factor – β signaling is essential for limb regeneration in axolotls

Mathieu Lévesque¹, Samuel Gatién¹, Kenneth Finnsón³, Sophie Desmeules², Éric Villiard²,
Mireille Pilote¹, Anie Philip³ and Stéphane Roy^{1,2 *}

1- Department of Biochemistry, 2- Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montréal (Québec), Canada, 3- Department of Surgery, Faculty of Medicine, McGill University, Montréal (Québec), Canada.

* To whom correspondence should be addressed:

Department of Stomatology, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville,
Montréal, QC, Canada, H3C 3J7

Fax: (514) 343-2233

Email: stephane.roy@umontreal.ca

3.3.1 Abstract

Axolotls (urodele amphibians) have the unique ability, among vertebrates, to perfectly regenerate many parts of their body including limbs, tail, jaw and spinal cord following injury or amputation. The axolotl limb is the most widely used structure as an experimental model to study tissue regeneration. The process is well characterized, requiring multiple cellular and molecular mechanisms. The preparation phase represents the first part of the regeneration process which includes wound healing, cellular migration, dedifferentiation and proliferation. The redevelopment phase represents the second part when dedifferentiated cells stop proliferating and redifferentiate to give rise to all missing structures. In the axolotl, when a limb is amputated, the missing or wounded part is regenerated perfectly without scar formation between the stump and the regenerated structure. Multiple authors have recently highlighted the similarities between the early phases of mammalian wound healing and urodele limb regeneration. In mammals, one very important family of growth factors implicated in the control of almost all aspects of wound healing is the transforming growth factor-beta family (TGF- β). In the present study, the full length sequence of the axolotl TGF- β 1 cDNA was isolated. The spatio-temporal expression pattern of TGF- β 1 in regenerating limbs shows that this gene is up-regulated during the preparation phase of regeneration. Our results also demonstrate the presence of multiple components of the TGF- β signaling machinery in axolotl cells. By using a specific pharmacological inhibitor of TGF- β type I receptor, SB-431542, we show that TGF- β

signaling is required for axolotl limb regeneration. Treatment of regenerating limbs with SB-431542 reveals that cellular proliferation during limb regeneration as well as the expression of genes directly dependent on TGF- β signaling are down-regulated. These data directly implicate TGF- β signaling in the initiation and control of the regeneration process in axolotls.

3.3.2 Introduction

Urodele amphibians, such as the axolotl (*Ambystoma mexicanum*), have the unique ability, among vertebrates, to perfectly regenerate many parts of their body throughout their life. Among the complex structures that can be regenerated in the axolotl, the limb is the most widely studied [1,3,127]. Limb regeneration represents an elaborate process in which wound healing, cellular dedifferentiation, tissue remodeling and patterning occur to replace the amputated appendage. Understanding urodele limb regeneration could be helpful in the design and development of novel therapies in regenerative medicine. It is therefore interesting to highlight the fact that following limb amputation, the axolotl will regenerate its limb without any residual scar between the stump and the regenerated structure [1,127]. The vast majority of adult vertebrates including mammals, birds, fishes, anuran amphibians and reptiles are incapable of regenerating complex structures such as limbs or tail. In those species, wound healing results in scarring. Thus, scarring, or fibrosis, seems to be a universal response to wounding that spans the 3 layers (epidermis, dermis and hypodermis) of the skin in vertebrates. The similarities between regeneration and wound healing have been discussed by many authors [13,14,127,348] and it has become apparent that a proper understanding of both similarities and differences is essential to help us better comprehend how regeneration is achieved in urodeles but not in mammals.

Axolotl limb regeneration is considered by many to be divided in two main phases [127,130,171]. The first phase is referred to as the preparation phase and begins immediately following amputation with the formation of a wound epithelium (WE) over the amputation plane. Cellular dedifferentiation and migration, which will eventually lead to the formation of a regeneration blastema, also take place in this phase. In the second phase of limb regeneration, referred to as the redevelopment phase, blastema cells stop proliferating and start to redifferentiate to regenerate the lost part [1,130].

The preparation phase of regeneration in urodeles shares many similarities with wound healing in mammals [127,174,349]. Both regeneration and wound healing are triggered by a trauma (amputation or wounding) which is followed by the up-regulation of many stress signals, inflammation and the formation of a blood clot [14,174]. These events all occur within minutes after the trauma and are followed shortly by the formation of a wound epithelium [1,350-352]. The WE is usually formed within 2-6 hours post-amputation in urodeles and between 12-48 hours post-wounding in mammals [14,136,349]. If formation of the WE is prevented, regeneration does not proceed and wound healing is retarded significantly [1,137,167,349,350]. During the preparation phase, following WE formation, there is extensive remodelling of the extracellular matrix (ECM) through the action of matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitors of metalloproteinases as for wound healing in mammals [141,144,145,353,354]. Inhibitors of MMPs, such as

GM6001, have been shown to inhibit limb regeneration and to cause the appearance of a scar-like layer of skin with collagen deposits on the stump of amputated limbs [145].

As stated above, many cellular and physiological processes are common to both axolotl limb regeneration and mammalian wound healing. An important regulator of many of the aforementioned events during wound healing is the transforming growth factor-beta (TGF- β) signaling pathway. The TGF- β super-family contains more than 30 structurally related growth and differentiation factors including TGF- β s, BMPs, activins, inhibins, and GDFs [207,355]. TGF- β 1 is the most studied member of this family for its roles in wound healing processes and immune response in mammals [192,193,209,211,266]. TGF- β 1 signals through two transmembrane serine/threonine kinase receptors [TGF- β type I receptor (also called ALK 5) and TGF- β type II receptor] that phosphorylate the SMADs (SMAD 2 and 3) which activate target genes in the nucleus. TGF- β 1 has been shown to induce proliferation of skin fibroblasts and to promote the migration of fibroblasts and keratinocytes during wound healing [238,239,247,356,357]. The participation of dermal fibroblasts in salamander limb regeneration was first reported in 1954 and later confirmed by other groups [1,146,151,358]. TGF- β 1 also activates many target genes implicated in wound healing and ECM production including connective tissue growth factor (CTGF) and fibronectin, which were both shown to be expressed in salamander regenerating tissues [137,192,359].

By combining PCR and cDNA library screening techniques, we isolated the full length cDNA sequence of the axolotl TGF- β 1. We demonstrate that the TGF- β 1 mRNA is up-regulated during the preparation phase of limb regeneration and then down-regulated during the redevelopment phase. These data are suggestive of a role for TGF- β 1 in the initiation and control of the regeneration process. To address the requirement of TGF- β during regeneration, a specific inhibitor of TGF- β signaling, SB-431542, was used [360]. The ease of administration of small pharmacological inhibitors makes them powerful tools to address the role of specific signaling/molecular pathways, such as the TGF- β pathway, in complex *in vivo* physiological processes such as limb regeneration. Recent publications on tissue regeneration present interesting results using such inhibitors [145,361]. Many studies have used SB-431542 to specifically block TGF- β signaling and TGF- β 1 mediated effects [360,362-366]. Our results show that SB-431542 blocks limb regeneration in axolotls thus suggesting that TGF- β signaling is essential for limb regeneration.

3.3.3 Results

3.3.3.1 Identification of axolotl TGF- β 1

Of the three mammalian TGF- β isoforms (i.e. TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3), TGF- β 1 is recognized as the most important in events related to wound healing processes and scar formation [211,237,367]. By using a combination of cDNA library screening, RT-PCR and RACE-PCR, a 1179 nucleotide cDNA sequence corresponding to the axolotl TGF- β 1 was isolated (GenBank accession number EU147783). This fragment encodes a protein of 393 amino acids. As observed in other species, the sequence contains a pro-domain and a TGF- β domain (Fig. 17, p. 133). The pro-domain of the axolotl protein aligns with the pro-domains of the human and mouse proteins as 43% of the amino acid residues are identical between the three sequences. The pro-domain, also called the LAP (latency associated peptide, which is cleaved but remains associated with the TGF- β domain until activation [214]), is identified by a red box (Fig. 17). The mature TGF- β domain of the axolotl protein (identified by a green box, Fig. 17) is well conserved with 85% identity in amino acids compared to the human and mouse domains. The axolotl TGF- β 1 sequence was also compared with *Xenopus laevis* TGF- β 5. The axolotl TGF- β 1 protein has 44% residue identity in the pro-domain and 80% identity within the TGF- β domain of *Xenopus laevis* TGF- β 5, which is comparable with that of the human and mouse TGF- β 1. In addition, nine conserved cysteines which are considered essential for TGF- β dimerization

Figure 17 – Axolotl TGF- β 1 protein sequence and domains. Alignment of axolotl (*Ambystoma mexicanum*) TGF- β 1 amino acid sequence with TGF- β 1 sequences of human (*Homo sapiens*), mouse (*Mus musculus*) and TGF- β 5 of Xenopus (*Xenopus laevis*). In blue are residues of the axolotl sequence that are conserved in the other three sequences. In red are the 9 conserved cysteine residues found in every TGF- β 1 sequence. The red box identifies the pro-domain of the protein. The green box identifies the mature TGF- β domain of the protein. doi:10.1371/journal.pone.0001227.g001

```

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      10      20      30      40      50      60      70      80
1 MEIP--RALLLLPL-FLHCLS--VALALSTCRTLDMEMVKKRRIEAIKQILSKLKLDPPEVEGDVPP--VPPEIMV Ambystoma mexicanum tgf-beta1
1 MPPSGRLRLLPLLLPLWLLVLTGPRPAAGLSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPP-SQGEVPPGPLEAVLA Homo sapiens tgf-beta1
1 MPPSGRLRLLPLLLPLWLLVLTGPRPAAGLSTCKTIDMELVKKRRIEAIKQILSKLRLASPP-SQGEVPPGPLEAVLA Mus musculus tgf-beta1
1 ----MEVLWMLLVLLVHLSS--LAMSLSCKAVDMEEVKKRRIEAIKQILSKLKLDPDSEKMT--VPSEAIK Xenopus laevis tgf-beta5

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      90      100     110     120     130     140     150     160
73 LYNSTLELIQ-ETHQPET--YETPEDEYFAKEVKKFNMMME-EKEI PRNCDHRKNDVIMFNASKLRESITSEALLHRAE Ambystoma mexicanum tgf-beta1
80 LYNSTRDRVAGESAEPE----PEPEADYYAKEVTRVLMVETHNEIYDKFKQSTHSIYMFNTSELREAVPEPVLLSRAE Homo sapiens tgf-beta1
80 LYNSTRDRVAGESADPE----PEPEADYYAKEVTRVLMVDRNNAIYEKTKDISHSIYMFNTSDIREAVPEPVLLSRAE Mus musculus tgf-beta1
71 LYNSTLEVIKREKATREEEHVGHQNTQDYIAKQVYRFESIT-----ELEDHEPKFKFNASHVRENVGMNSLLHRAE Xenopus laevis tgf-beta5

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      170     180     190     200     210     220     230     240
148 LRMLQLSSNNVDRNVEQRVELYQCEGGDR--PPRFLGSKFVRADMSHDVWLSFDVTETVKQWLSRDKVETLKLSLACS Ambystoma mexicanum tgf-beta1
155 LRLRLRLKLK-----VEQHVELYQKYSNN--SWRYLSNRLLAPSDSPE-WLSFDVTGVVRQWLSRGGIEGFRLSAHCS Homo sapiens tgf-beta1
155 LRLQLRLKSS-----VEQHVELYQKYSNN--SWRYLGNRLLTPTDTP-EWLSFDVTGVVRQWLNQGDGIQGFSAHCS Mus musculus tgf-beta1
142 LRMYKQTKDKN----MDQRMELFWKYQENGTHSRYLESKYITPVTDEE-WMSFDVTKTVNEWLKRAEENEQFGLQPACK Xenopus laevis tgf-beta5

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      250     260     270     280     290     300     310     320
226 NGSREDIKLNIAFES-KRGDMASISKKSONSPYLLVMSTPAERADHLQNSRRKRALDVEICASQEKNCVRRLYINE Ambystoma mexicanum tgf-beta1
225 CDSRDNTLQVDINGFTTGRRGDLATIHG--MNRPFLLMATPLERAQHLQSSRRRALDNTNYCFSSTEKNCVRRQLYIDF Homo sapiens tgf-beta1
225 CDSKDKLHVEINGISPKRRGDLGTIHD--MNRPFLLMATPLERAQHLHSSRRRALDNTNYCFSSTEKNCVRRQLYIDF Mus musculus tgf-beta1
217 CFTP-QAKDIDIEGFPA-LRGDLASLSSKENTKPYLIMTSPAERIDTIVTSRKRKGQVEYCFGNNGPNCCVQPLYINE Xenopus laevis tgf-beta5

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      330     340     350     360     370     380     390     400
305 RQDLGWKWIHEPKGYANVCMGPCPYIWSLDNNQYTRVLALYNQHNPASASPCCVQVLEPLPIVYYLGRTPKVEQLSN Ambystoma mexicanum tgf-beta1
303 RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT-QYSKVLALYNQHNPASAAPCCVPALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSN Homo sapiens tgf-beta1
303 RKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDT-QYSKVLALYNQHNPASASPCCVPALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSN Mus musculus tgf-beta1
295 RKDLGWKWIHEPKGYEANYCLGNCPYIWSMDT-QYSKVLALYNQHNPASISPCCVQVLEPLPIIYYVGRKAKVEQLSN Xenopus laevis tgf-beta5

-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
385 MIVRSCCKS Ambystoma mexicanum tgf-beta1
382 MIVRSCCKS Homo sapiens tgf-beta1
382 MIVRSCCKS Mus musculus tgf-beta1
374 MIVRSCCKS Xenopus laevis tgf-beta5

```

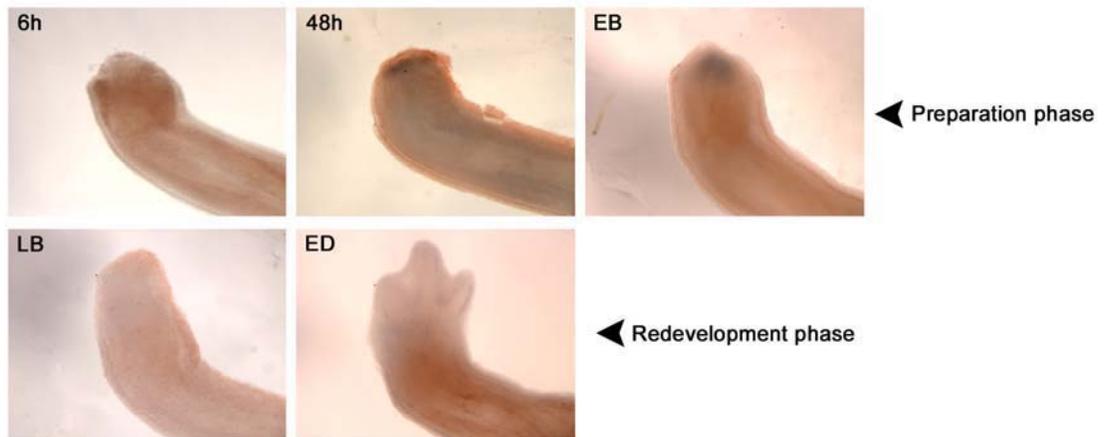
and transport were identified in the TGF- β domain of the axolotl sequence (cysteines are identified in red, Fig. 17) [368].

3.3.3.2 Expression of TGF- β 1 mRNA during axolotl limb regeneration

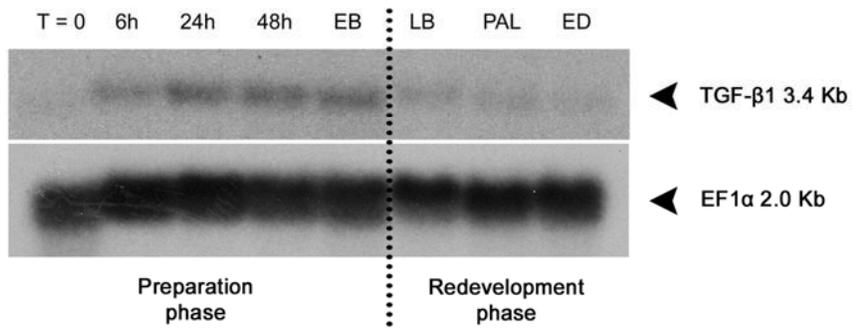
Whole-mount *in situ* hybridization was performed to verify if TGF- β 1 was expressed during the regeneration process. Figure 18 presents the spatio-temporal expression pattern of the TGF- β 1 mRNA during limb regeneration. Expression of TGF- β 1 was detected as early as 6 hours post-amputation. Although the expression at 6 hours post-amputation is hardly visible in whole-mount samples (Fig. 18 A, p. 136), it was detectable by Northern blot analysis (Fig. 18 B). At 48 hours post-amputation, a strong up-regulation of TGF- β 1 mRNA was detected in whole-mounts (Fig. 18 A). A few days later, at the EB stage, TGF- β 1 was still strongly expressed and covered most of the blastema. The first 3 time points of Figure 18 A are part of the preparation phase of regeneration. During the redevelopment phase of limb regeneration, expression of TGF- β 1 mRNA was very diffuse and barely visible in the blastema from late bud to early differentiation stage, in whole-mount samples (Fig. 18 A). Very weak bands could be detected on the Northern blots at these stages (Fig. 18 B). Each lane on the Northern blot represents a pool of mRNA collected from about 30 regenerating blastemas per stage, thus making this technique more sensitive than whole-mount *in situ* hybridizations which are individual blastema. Together,

Figure 18 - Expression of TGF- β 1 during axolotl limb regeneration. A) Expression of TGF- β 1 determined by whole-mount *in situ* hybridization in axolotl forelimbs. Limbs were amputated distally through radius/ulna. Samples were fixed at various times after amputation: 6 hours (6 h), 48 hours (48 h), early bud (EB), late bud (LB) and early differentiation (ED) stage. TGF- β 1 expression is found as a dark purple precipitate. The 3 stages on the upper row are part of the preparation phase of limb regeneration. The 2 stages on the lower row are part of the redevelopment phase of limb regeneration. B) Northern blot showing expression of TGF- β 1 at various stages of forelimb regeneration. TGF- β 1 was detected as a 3.4 Kb transcript. RNA was extracted from regenerating blastemas at various times after amputation: 6 hours (6 h), 24 hours (24 h), 48 hours (48 h), early bud (EB), late bud (LB), palette (PAL) and early differentiation (ED) stage. T = 0: RNA was extracted from an unamputated mature limb. The dotted line marks a distinction between regeneration stages included in the preparation phase and those included in the redevelopment phase of regeneration. doi:10.1371/journal.pone.0001227.g002

A



B



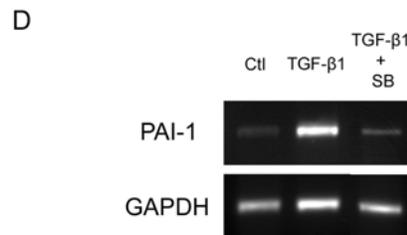
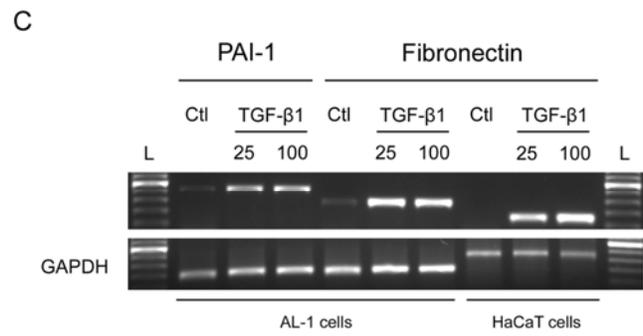
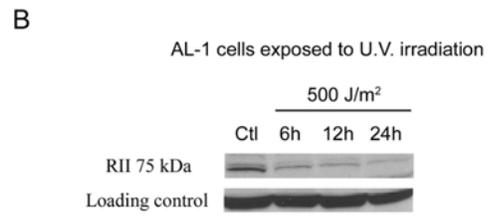
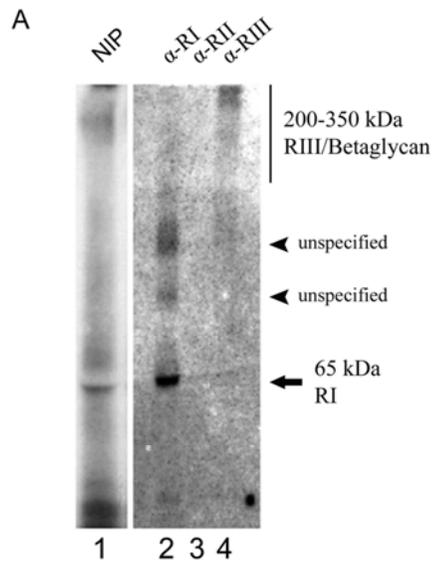
these results show that TGF- β 1 mRNA is expressed and regulated during limb regeneration in the axolotl.

3.3.3.3 Presence of TGF- β receptors in axolotl cells

The presence of the TGF- β signaling machinery such as the type I, II and III receptors were determined in our model using standard biochemical approaches. First, affinity labeling using [125 I]-labeled human TGF- β 1 was performed on the AL-1 cell line, a fibroblast cell line derived from the dermis of an axolotl limb [325]. This technique involves covalent cross-linking of radioactively labeled TGF- β 1 to the receptors at the surface of the cell membrane [369]. After cell lysis, the three main receptors for TGF- β signaling: TGF- β type I receptor, TGF- β type II receptor and TGF- β type III receptor, also called betaglycan [205], were immuno-precipitated. Figure 19 A (p. 139) presents the results of the immuno-precipitations. In lane 2, a band of 65 kDa corresponding to TGF- β type I receptor can be observed. Subtracting the molecular weight of the cross-linked monomeric TGF- β 1 (12,5 kDa) results in the expected size for TGF- β type I receptor, 53 kDa [370]. Two other bands corresponding to unspecified proteins can also be seen in lane 1. It was not possible to immuno-precipitate any labeled proteins with the anti-TGF- β type II receptor antibody used (Fig. 19 A, lane 3). This could simply be due to non-immuno-reactivity of the antibody with the axolotl receptor under these conditions. The band in lane 4 corresponds to betaglycan, its high molecular weight (200-350 kDa) and diffuse

Figure 19 - Detection of TGF- β receptors and target genes in axolotl cells. A) Presence of TGF- β receptors after affinity labeling of axolotl AL-1 cell line with [125 I]- TGF- β 1. Lane 1: (NIP): Cell lysates were not immuno-precipitated. A band corresponding to TGF- β RI around 65 kDa can be observed. Lane 2: Proteins were immuno-precipitated with anti-TGF- β RI antibody. A band corresponding to TGF- β RI at 65 kDa is also observed in this lane. Two other bands were observed in this lane. These bands correspond to unspecified proteins that co-immuno-precipitated with TGF- β RI. Lane 3: Proteins were immuno-precipitated with anti-TGF- β RII antibody. No band was detected. Lane 4: Proteins were immuno-precipitated with anti-TGF- β RIII/betaglycan antibody. A diffuse band of high molecular weight (200–350 kDa) corresponding to TGF- β RIII/betaglycan was detected. B) Western blot experiment showing the presence of TGF- β RII in axolotl AL-1 cells. Ctl lane represents TGF- β RII protein expression in control axolotl cells not exposed to U.V. light. Other lanes present diminished expression of TGF- β RII in axolotl cells exposed to 500 J/m² U.V. and collected after 6 h, 12 h and 24 h. Expression of TGF- β RII in control cells at 6 h, 12 h and 24 h was stable (data not shown). Loading control (tubulin) confirms equal loading of protein samples. C) RT-PCR results of PAI-1 and fibronectin expression in AL-1 cells after stimulation with human recombinant TGF- β 1. Strong upregulation of both genes was observed after stimulating cells with 25 or 100 pM TGF- β 1. Up-regulation was detected 3 h and 72 h after stimulation for PAI-1 and fibronectin respectively. The human keratinocyte cell line (HaCaT) was used as a positive control for fibronectin induction at 72 h. Ctl: control cells treated only with 4 mM HCl, 0,1% bovine serum albumin buffer (TGF-

β 1 carrier solution) . L: 100 base-pair DNA ladder with the most intense band at 600 bp. GAPDH was used as a control gene. D) RT-PCR results showing PAI-1 expression in AL-1 cells after stimulation with DMSO, human recombinant TGF- β 1 and human recombinant TGF- β 1 in the presence of SB-431542. The TGF- β 1 stimulated expression of PAI-1 was significantly inhibited by SB-431542. doi:10.1371/journal.pone.0001227.g003



migration pattern are identical to that of betaglycan previously shown in mammalian cell types [221,371]. Having not succeeded in identifying TGF- β type II receptor by immunoprecipitation, an alternative approach was used to determine whether or not it was present. Western blot analysis was performed on AL-1 cell protein extracts and a band of the expected size (75 kDa) was observed (Fig. 19 B). In order to confirm that this band was the type II receptor, the ability of UV irradiation to reduce the expression of the specific band detected on the Western blot was tested. A previous study had reported that UV irradiation of human skin fibroblasts and mink lung epithelial cells caused a decrease in TGF- β type II receptor protein expression [372,373]. When axolotl cells were irradiated with high levels of UVs (500 J/m²), the expression of the band corresponding to the TGF- β type II receptor protein was down-regulated, as previously described [372,373] (Fig. 19 B). These results demonstrate that the two main signaling TGF- β receptors (type I and II) and one important accessory receptor (betaglycan) are present in limb derived axolotl cells. Together with the identification of cDNAs encoding SMAD proteins in the axolotl genome by the group of Voss [122], our data suggest this species possesses the whole TGF- β signal transduction machinery.

3.3.3.4 Activation of TGF- β 1 target genes in axolotl cells

To verify that the TGF- β signaling cascade is functional in axolotl cells, AL-1 cells were treated with human recombinant TGF- β 1 protein and checked for target gene

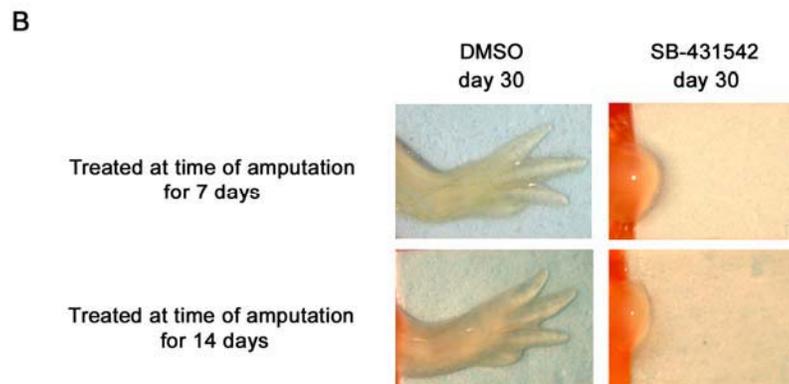
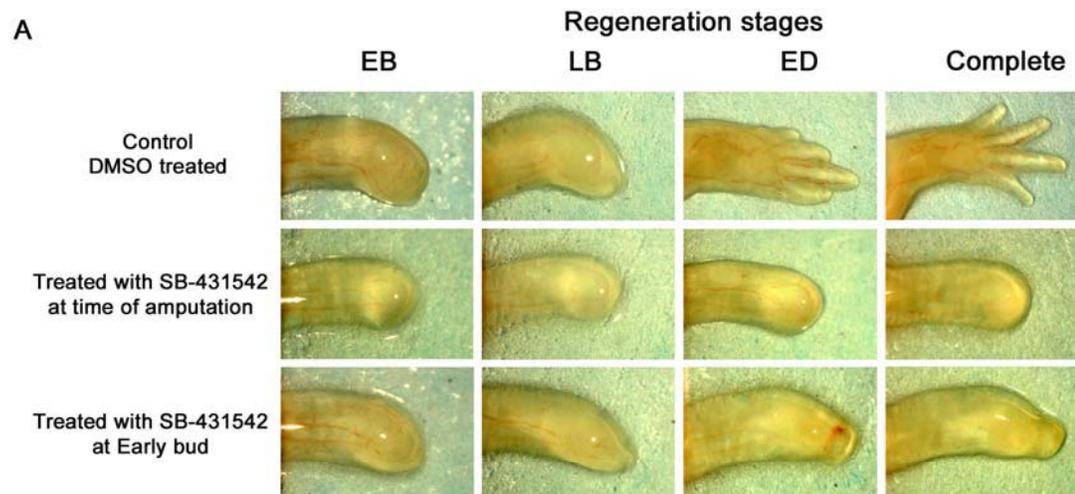
activation. The expression of two TGF- β 1 target genes was examined: plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), an immediate-early gene, and fibronectin, a late response gene. Treatment of axolotl cells with 25 or 100 pM TGF- β 1 resulted in the up-regulation of PAI-1 expression 3 hours after stimulation (Fig. 19 C). This correlates with the early expression observed in other fibroblast cell lines [374]. The stimulation of axolotl cells with TGF- β 1 also resulted in a strong up-regulation of fibronectin expression after 72 hours of treatment (Fig. 19 C), as shown in a previous study in human dermal fibroblasts [375]. To confirm our results, human keratinocytes HaCaT cells were used as a positive control and checked for fibronectin induction after 72 hours of treatment with TGF- β 1. As previously published, HaCaT cells responded to TGF- β 1 by an up-regulation of fibronectin expression (Fig. 19 C) [376]. These results, combined with the presence of the main TGF- β receptors in axolotl cells, confirm that the TGF- β signaling machinery efficiently transduces signal to the nucleus in axolotl cells. The ability of SB-431542 to block TGF- β 1 target gene activation was tested in AL-1 cells. At a final concentration of 25 μ M, SB-431542 efficiently blocked the TGF- β 1-mediated up-regulation of PAI-1 (Fig. 19 D).

3.3.3.5 Inhibition of axolotl limb regeneration by SB-431542

Many studies have shown that SB-431542 can inhibit TGF- β signaling by binding to TGF- β type I receptor thus preventing SMAD phosphorylation [360,362-365]. SB-431542 is highly specific as it blocks TGF- β signaling, but not BMP or SMAD-

independent TGF- β signaling like p38 or ERK [360,362,363,365]. However, SB-431542 can also block activin signaling but with a lower efficiency than TGF- β signaling as reported by the IC_{50} for ALK4 (activin type I receptor, $IC_{50}=140\text{nM}$) and ALK5 (TGF- β type I receptor, $IC_{50}=94\text{nM}$) [360,363]. To investigate whether TGF- β signaling is required for limb regeneration, regenerating axolotls were treated with SB-431542. Results presented in figure 20 (p. 145) show that limb regeneration was completely blocked in axolotls treated with SB-431542 at a final concentration of 25 μM (Fig. 20 A). This concentration represents the lower spectrum of concentrations reported in *in vivo* studies using this inhibitor [377-379]. At 25 μM , SB-431542 was not toxic for the animals as they grew and fed normally. In control animals, DMSO treatment did not prevent limb regeneration (Fig. 20 A). Treatment of axolotls with SB-431542 at lower concentrations provided incomplete blocking of regeneration (data not shown). When axolotls were treated with SB-431542, from the moment of amputation until control animals had regenerated (30 days), regeneration was completely blocked. In these animals, wound epithelium formation was observed but blastema formation was absent (Fig. 20 A). Animals were also treated with SB-431542 starting at early bud (EB) stage until the end of regeneration. When treated at EB, the blastema increased in size for a few days until it reached a final shape/size comparable to a late bud blastema, stopped growing and never regenerated (Fig. 20 A). The effects of SB-431542 treatments on regenerating tissue were also tested to determine whether the observed inhibition was reversible or permanent. Figure 20 B shows that limbs treated daily with SB-431542 for 7 or 14 days post-amputation did not reinitiate the

Figure 20 - Inhibition of limb regeneration by SB-431542. A) Morphology of axolotl regenerating forelimbs treated with SB-431542. Top row: morphology of a regenerating control limb treated with DMSO. All limbs were distally amputated on the same day. Limbs were photographed when control limbs reached each of the stages indicated on top: early bud (EB), late bud (LB), early differentiation (ED). Complete: regeneration of control limb ended after 30 days. Middle row: morphology of an axolotl limb treated with 25 μ M SB-431542 from the time of amputation until the control had regenerated (30 days). Complete inhibition of regeneration and absence of blastema formation were observed in these limbs. Bottom row: morphology of an axolotl limb treated with 25 μ M SB-431542 from early bud stage until the control had regenerated. Growth of the blastema was observed in these limbs until it resembled a late bud blastema. B) Inhibition of regeneration with SB-431542 cannot be rescued after 7 or 14 days of treatment. In this panel, limbs were treated with DMSO or SB-431542 from the moment of amputation for the first 7 or 14 days only. Results show that limbs treated with SB-431542 for the first 7 or 14 days after amputation do not regenerate even if treatment was stopped. Control limbs treated for 7 and 14 days with DMSO regenerated normally. doi:10.1371/journal.pone.0001227.g004

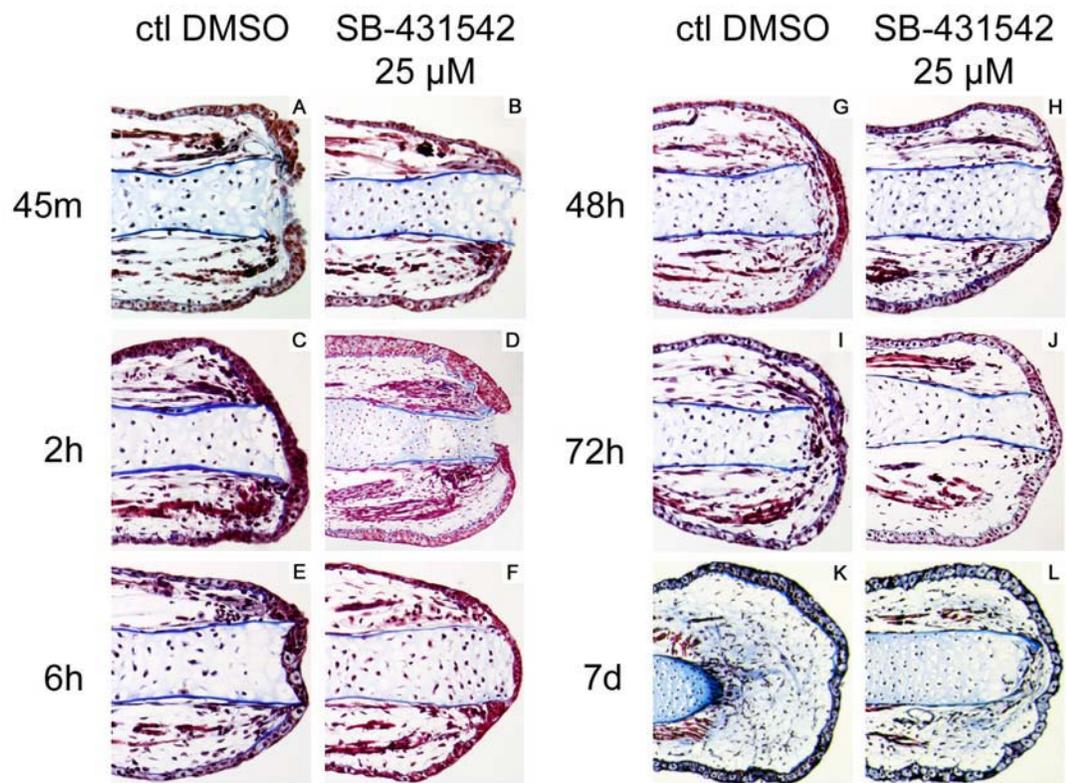


regeneration process when the treatment was stopped. Animals treated with SB-431542 for the first 48 hours post-amputation regenerated their limbs with only a slight delay compared to controls (data not shown).

3.3.3.6 Histological analysis of SB-431542 effect on limb regeneration

Figure 21 (p. 148) shows a time course of regenerating limbs treated with SB-431542 or DMSO (control). Although the wound at the tip of the stump is still open on both control and SB-431542 treated limbs, after forty-five minutes following amputation (Fig. 21 A and B), a slight delay in wound closure can be observed in SB-431542 treated limbs. Two hours after amputation, the WE had completely closed the wound in control limbs (Fig. 21 C) which is in accordance with results reported previously by Carlson *et al.* [136]. In SB-431542 treated limbs, the WE had not completely closed the wound 2h post-amputation (Fig. 21 D). However, at 6h post-amputation, the WE covered the tip of the limbs in both control and SB-431542 treated animals (Fig. 21 E and F). At 48h post-amputation, streams of cells migrating between the end of the bone and the WE can be seen in controls but not in SB-431542 treated limbs (Fig. 21 G and H). At 72h post-amputation, cells are still migrating toward the WE in control limbs (Fig. 21 I). Those cells will accumulate to form the regeneration blastema [1]. In limbs treated with SB-431542, no

Figure 21 - Histological analysis of regenerating limbs treated with SB-431542. Control limbs were treated with DMSO from time of amputation and fixed A) 45 minutes, C) 2 hours, E) 6 hours, G) 48 hours, I) 72 hours and K) 7 days after amputation. Samples treated with 25 μ M SB-431542 from time of amputation were fixed at B) 45 minutes, D) 2 hours, F) 6 hours, H) 48 hours, J) 72 hours and L) 7 days after amputation. Masson's trichrome staining method was used to stain cell cytoplasm in red, collagen in blue and nuclei in black. Note the delayed closure of the wound epithelium in SB-431542 treated limbs at 45 minutes and 2 hours post-amputation. Also note that there is no blastema formation or accumulation of cells between the tip of the bone and the wound epithelium in SB-431542 treated limbs. doi:10.1371/journal.pone.0001227.g005



cellular accumulation at the end of the limb in any of the samples analyzed at 72h could be observed (Fig. 21 J). At 7 days post-amputation, control limbs have reached early/medium bud stage with a prominent blastema (Fig. 21 K). Cells that have migrated and proliferated now occupy a large space between the tip of the bone and the WE. At this stage, the end of the bone in control limbs shows signs of being remodeled as previously reported by Tank *et al.* [128] (Fig. 21 K). In comparison, limbs treated with SB-431542 still show no sign of blastema formation and the tip of the bone did not show any sign of being remodeled as in control limbs at this time point (Fig. 21 L).

3.3.3.7 Cell proliferation analysis in SB-431542 treated limbs

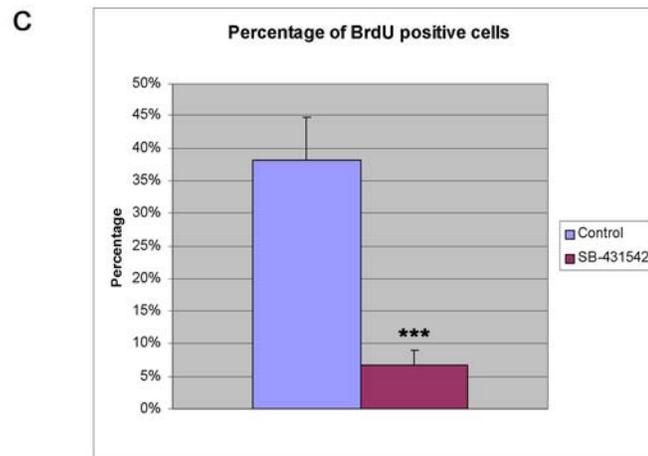
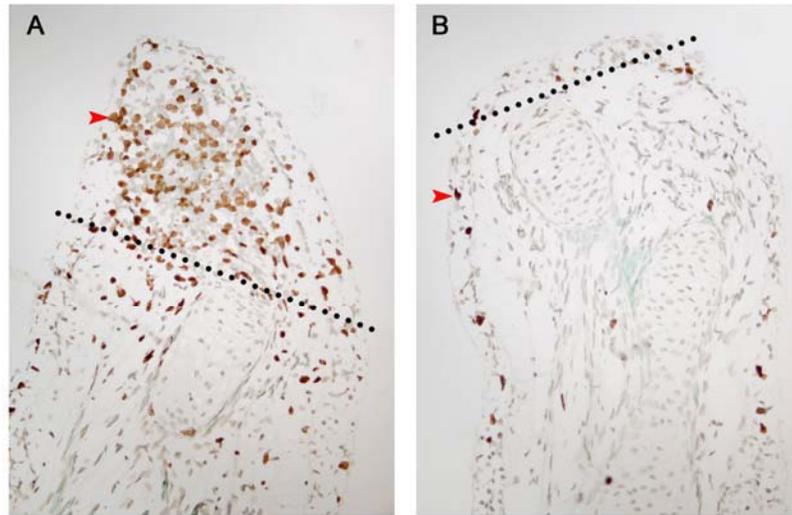
Knowing that TGF- β signaling is important in regulating cell growth, the effect of SB-431542 treatment on cellular proliferation in axolotl limbs was verified. To measure this effect, a BrdU labeling experiment, consisting in injecting BrdU solution intra-peritoneally in control and SB-431542 treated axolotls, was performed 7 days post-amputation. Results presented in figure 22 (Fig. 22, p. 152) show BrdU labeled cells in the regenerating blastema of a control animal (Fig. 22 A) and in the limb of an SB-431542 treated animal (Fig. 22 B). In the control limb, many cells in the blastema are in a proliferative state as determined by the presence of BrdU labeled cells (Fig. 22 A). In comparison, a very small number of cells, excluding a few skin cells, are labeled for BrdU in SB-431542 treated limbs (Fig. 22 B). The graph presented in figure 22 C shows a

significant difference in the percentage of BrdU positive cells between the blastema region in controls and the tip of the limb in SB-431542 treated animals. These results indicate that SB-431542 blocks cellular proliferation in axolotls and suggest that TGF- β signaling controls cellular proliferation during limb regeneration.

3.3.3.8 Measurement of TGF- β 1 target genes expression in SB-431542 treated limbs

After examining the effects of SB-431542 on cellular growth *in vivo*, the ability of this inhibitor to block the expression of two TGF- β 1 target genes, fibronectin and Runx 2, during limb regeneration was tested. Figure 23 (Fig. 23, p. 155) shows RT-PCR amplification of TGF- β 1 target genes in control and SB-431542 treated limbs. Strong fibronectin and Runx 2 expressions were observed in control limbs 5 days after amputation (Fig. 23 A), which are consistent with the time-frame of studies looking at the expression of these genes in axolotl regenerating limbs [137,380]. In contrast, both fibronectin and Runx 2 were significantly down-regulated in SB-431542 treated limbs (Fig. 23 A). GAPDH expression was not affected by SB-431542, as all other control genes tested (cyclophilin D, beta-actin, EF1- α , data not shown). Densitometric analysis of the PCR bands in figure 23 A shows that fibronectin expression in control limbs was about 3 times higher and Runx 2 expression was about 15 times higher than in SB-431542 treated limbs (Fig. 23 B). These results demonstrate that SB-431542 treatment affects the expression of known TGF- β 1

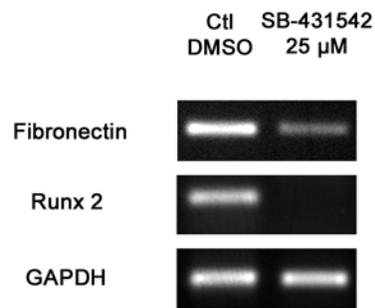
Figure 22 – Inhibition of cellular proliferation in regenerating limbs treated with SB-431542. A) Control regenerating limb treated with DMSO and assessed for BrdU incorporation at 7 days post-amputation (medium bud stage). Red arrowhead marks a cell positive for BrdU. Note the accumulation of BrdU-positive cells in the regenerating blastema. Cells positive for BrdU are also found (at a lower frequency) in the epidermis of the non-regenerating part of the limb. B) SB-431542 treated limb assessed for BrdU incorporation 7 days post-amputation. No accumulation of BrdU-positive cells at the tip of the limb is observed. Only a few positive cells are found mostly in the epidermis of the limb (red arrowhead). Dotted lines in panels A and B represent the level of amputation. C) Graph comparing percentage of BrdU-positive cells in the regenerating blastema of control limbs (n = 3 animals) and in SB-431542 treated limbs (n = 3 animals). A statistically significant difference in the percentage of BrdU positive cells between control ($38\% \pm 6.2\%$) and SB-431542 treated limbs ($7\% \pm 2.1\%$) was observed (***) $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0001227.g006



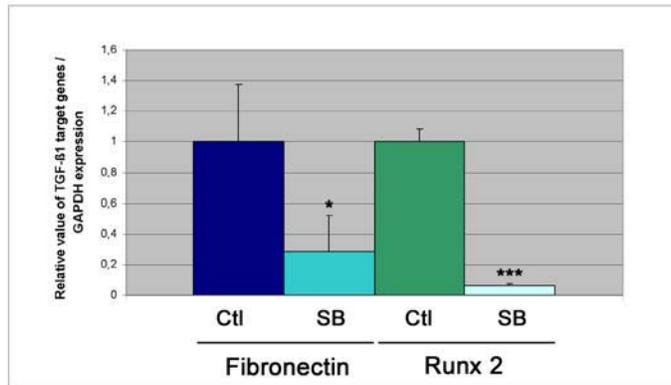
target genes, fibronectin and Runx 2, by down-regulating their expression in regenerating limbs.

Figure 23 - Inhibition of TGF- β 1 target genes expression in regenerating limbs treated with SB-431542. A) RT-PCR showing expression of fibronectin and Runx 2 in axolotl regenerating forelimbs. RT-PCR reactions were performed on at least 4 separate RNA samples extracted from pools of 6 blastemas of animals treated with DMSO or SB-431542. Fibronectin and Runx 2 were strongly expressed in control limbs and significantly down-regulated in limbs treated with SB-431542. GAPDH was used as a control. B) Graph representing the relative value of fibronectin/GAPDH and Runx 2/GAPDH expression in control and SB-431542 treated limbs. Fibronectin and Runx 2 relative expression in control limbs were fixed to 1 ± 0.37 and 1 ± 0.09 respectively. The relative expression values in SB-431542 treated limbs were 0.29 ± 0.23 with a $p < 0.05$ (*) for fibronectin and 0.07 ± 0.01 with a $p < 0.001$ (***) for Runx 2. doi:10.1371/journal.pone.0001227.g007

A



B



3.3.4 Discussion

TGF- β 1 is a multi-functional cytokine implicated in many aspects of mammalian wound healing and scar tissue formation processes [14,211,246,258-260]. Interestingly, urodele amphibians such as the axolotl can regenerate many parts of their body following amputation and never seem to form scar-tissue [1]. Given that mammalian wound healing and axolotl limb regeneration share many similarities in their initial phases [14,127,349], we examined the requirement of TGF- β signaling and TGF- β 1 expression during axolotl limb regeneration.

Isolation of the axolotl TGF- β 1 cDNA and translation of the protein sequence through NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) indicated that the sequence has high homology with mammalian sequences for TGF- β 1 [i.e. very low (E) values (the probability due to chance, that there is another alignment with a greater similarity), the lowest (E) being $7e^{-112}$ and corresponding to *Equus caballus* (horse) TGF- β 1]. These values confirmed that the isolated sequence corresponded to the axolotl TGF- β 1. The sequence also has high homology with the TGF- β 5 sequence of *Xenopus laevis*, an anuran amphibian [(E) value of $1e^{-103}$]. A TGF- β 1 orthologue has never been isolated in *Xenopus laevis* for which over 650 000 EST are available (data from GenBank). However, phylogenetic analyses suggest that the *Xenopus* TGF- β 5 is actually the orthologue of the mammals TGF- β 1 [355].

A rapid up-regulation of TGF- β 1 expression was observed following limb amputation and was maintained at a high level throughout the preparation phase of limb regeneration. As mentioned above, TGF- β 1 is a key regulator of wound epithelium formation, inflammation, blood clot formation, and ECM remodeling in mammalian wound healing processes [14,193,211,247,357]. Axolotl limb regeneration shares many of these processes with mammalian wound healing and most of them are essential for regeneration to take place [127,130]. Fibroblasts participate in both processes: in mammals they invade granulation tissue and mediate wound contraction; in the axolotl they dedifferentiate and provide one of the main sources of blastema cells for the regenerating limb [14,127,151,358]. At the early bud stage, when blastema cells are proliferating rapidly, a strong expression of TGF- β 1 is present in the blastema. It is possible that, in the preparation phase of regeneration, TGF- β 1 could be expressed to promote detachment and migration of mesenchymal cells towards the blastema. Martin *et al.* suggested that TGF- β 1 acts in a similar way to promote mesenchymal cell proliferation during mammalian embryonic wound healing [274]. Mammalian embryos can heal their skin wounds perfectly following injury [381]. In E11.5 mouse embryos, TGF- β 1 is rapidly expressed at the site of injury in response to wounding. TGF- β 1 expression reaches a peak at 3-6 hours after wounding and is quickly down-regulated 18 hours post-wounding, just before the wound has fully closed/healed [274]. Moreover, just as in the axolotl, mammalian embryos present a diminished immune response following injury [14,178,381]. In mammalian adults, TGF- β 1

rapidly promotes inflammation and recruits immune cells like macrophages, leukocytes and lymphocytes, when released at the wound site [237,241,258,382]. Because of its pro-inflammatory effects, prolonging TGF- β 1 expression at the wound site does not benefit wound healing [382]. However, it has been reported that axolotls are immuno-tolerant and exhibit a weak immune response following grafts or injuries [174,182,183]. In fact, very low levels of inflammatory cells are present at the wound site of amputated limbs [383]. It is believed that the reduced immune response following limb amputation could be linked to the regenerative capacity of salamanders [174]. The data presented in this paper demonstrate that TGF- β 1 is expressed during the preparation phase of limb regeneration, when cells of mesenchymal origin dedifferentiate, migrate and divide rapidly to form the regeneration blastema.

In order to functionally analyze the role of TGF- β signaling during axolotl limb regeneration, we treated regenerating axolotls with the pharmacological inhibitor SB-431542. Numerous studies have reported the ability of SB-431542 to inhibit TGF- β signaling by blocking the ALK5 mediated phosphorylation of Smad2/Smad3 in various cell lines [360,362-366,384,385]. Our data demonstrate that SB-431542 blocks axolotl limb regeneration and thus provides the first line of evidence that TGF- β signaling is essential for this process to take place. Histological analysis of SB-431542 treated limbs suggests that TGF- β signaling affects cellular migration during regeneration, since wound healing is delayed and blastema formation is absent in these limbs. TGF- β 1 could be a key player in

regulating this process as it is a potent chemo-attractant of fibroblasts during mammalian wound healing [238,239]. TGF- β signaling also promotes cell growth in regenerating limbs as demonstrated by the very low incorporation of BrdU in SB-431542 treated limbs. The inhibitory effects of SB-431542 on limb regeneration could also in part be due to the down-regulation of fibronectin or Runx 2 expression. Fibronectin, a component of the extracellular matrix which is a target gene of TGF- β 1, has been suggested to play an important role in epithelio-mesenchymal interactions during axolotl limb regeneration [137]. If those interactions do not take place or are reduced, limb regeneration could be inhibited [130,167]. Runx 2, also named *Cbfa-1*, is a transcription factor that regulates mesenchymal condensation, chondrocyte hypertrophy and osteoblast differentiation [386,387]. It is a target gene of TGF- β 1 and was shown to be expressed in regenerating axolotl limbs [380,388]. Inhibition of TGF- β signaling with SB-431542 in axolotl limbs resulted in a down-regulation of Runx 2 mRNA as previously shown in mammalian cells, [389]. Results also show that, beyond a certain point, the effect of SB-431542 treatment on regenerating limbs becomes irreversible. 48 hours of treatment with SB-431542 only slightly delayed limb regeneration (data not shown), but inhibition became irreversible when treatment was sustained for 7 days or more. The reasons why 7 days of treatment become irreversible are not clear at the moment. Histological analysis does not show any sign of scar tissue appearance like those reported by Odelberg's group while blocking MMPs [145]. It could be that the WE lost its permissive abilities due to the lack of mesenchymal cell accumulation to form a blastema. The present results obtained with SB-431542 imply that

TGF- β signaling controls the formation and growth of the regeneration blastema. In mammals, wound healing often results in scar formation which is regulated by TGF- β signaling [211,246,390]. Many studies have reported reduction of scarring in mammals when wounds are treated with chemical inhibitors or specific antibodies aimed at TGF- β isoforms (particularly TGF- β 1) during the healing process [258-260,391-395]. The situation seems to be very different in the axolotl as blocking of TGF- β signaling prevented limb regeneration. Our data show that TGF- β signaling is essential for the regeneration of the axolotl limb, a complex tri-dimensional structure, and suggest a new role for TGF- β signaling in regenerative biology.

Recently, Jazwinska *et al.* used SB-431542 to examine zebrafish fin regeneration and reported that SB-431542 inhibited blastema formation in amputated fins, allowing only WE formation [396]. These results are consistent with our data in axolotls. In their paper, Jazwinska *et al.* demonstrate that SB-431542 blocked cellular proliferation in treated fins, as detected by a reduction of BrdU labeling which we also observe in axolotl limbs. Moreover, in both models, treatment of regenerating appendages at mid-stages of regeneration (4 days post-amputation in zebrafish and early bud stage in the axolotl) completely blocked the process, suggesting that TGF- β /activin signaling is essential to maintain the proliferation of blastema cells. In the present paper, whole-mount *in situ* hybridization and Northern blot results demonstrate that TGF- β 1 is regulated during axolotl limb regeneration. Although Jazwinska *et al.* show that activin- β A (Act- β A) is the only

TGF- β family member strongly regulated during zebrafish fin regeneration, their data also indicate that TGF- β 1 and TGF- β 3 are expressed at significant levels during the regeneration process [396]. Interestingly, their results indicate that TGF- β 1 expression is between 10-40 times higher than that of Act- β A in uninjured fins and at 6h and 24h post-amputation. Considering the fact that SB-431542 has a higher affinity for the TGF- β type I receptor ALK-5 (IC_{50} =94nM) than for the activin type I receptor ALK-4 (IC_{50} =140nM) [360,363], the inhibition of zebrafish fin regeneration observed by Jazwinska *et al.* [396] could in part be due to the inhibition of TGF- β signaling.

In summary, we show that TGF- β 1, a key player in mammalian wound healing, is rapidly up-regulated following amputation and strongly expressed during the preparation phase of axolotl limb regeneration. By blocking limb regeneration with SB-431542, a potent inhibitor of TGF- β type I receptor (ALK-5), we show that TGF- β signaling is essential for limb regeneration. The cellular mechanism by which TGF- β may regulate axolotl limb regeneration is an interesting area for future investigations and will help in understanding the differences and similarities between mammalian wound healing and axolotl tissue regeneration.

3.3.5 Materials and Methods

3.3.5.1 *Animal maintenance and treatments*

Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) embryos and larvae were purchased from the Ambystoma Genetic Stock Center (Lexington, KY). Animals were maintained as previously published by Lévesque *et al.* [397]. SB-431542 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO) was purchased from Cedarlane Laboratories (Burlington, ON) and diluted to a stock concentration of 10mM in DMSO. After limb amputation, animals (2-5 cm) were kept in 5 mL of 20% Holtfreter's solution containing SB-431542 at a final concentration of 25 μ M or DMSO for controls. The Holtfreter's solution containing either SB-431542 or DMSO was changed daily. A minimum of 3 animals were treated for each condition. Animal care and experiments were done in accordance with the Université de Montréal animal care committee's guidelines.

3.3.5.2 *Cloning of axolotl TGF- β 1 cDNA*

Total RNA was extracted from axolotl larvae and cells using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Reverse transcription reactions were done at 50 °C using Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). A 495 base pair cDNA fragment encoding

the axolotl TGF- β 1 was first isolated using RT-PCR from larvae total RNA with primers DFTGFB1 (degenerate forward TGF- β 1) and DRTGFB1 (degenerate reverse TGF- β 1) obtained from Sigma Genosys (Oakville, ON.). This fragment was then used to screen a pre-made axolotl cDNA library (cat. # 937670, Stratagene, La Jolla, CA). This screening resulted in the isolation of a larger fragment corresponding to the axolotl TGF- β 1. To complete the sequence, 5' RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) was done using the BD Smart-RACE kit (cat. # 634914, BD Biosciences, Mississauga, ON.). For this method, axolotl gene-specific primers were designed: ATGFR210 (Axolotl TGF- β 1 reverse 210) and ATGFR367 (Axolotl TGF- β 1 reverse 367). RNA from limb medium bud blastemas was used to synthesize the first strand for the 5' RACE reaction. The RACE and PCRs were performed following the manufacturer's instruction. A PCR was performed to amplify the axolotl TGF- β 1 complete cDNA using the following primer pairs: ATB1F1067 with ATB1R2419 which gave a fragment of 1352 base pairs, and ATB1F1098 with ATB1R2368 which gave a fragment of 1270 base pairs. These fragments were cloned into the PCR II-TOPO vector (Invitrogen). Following sequencing of each fragment at the Genome Québec sequencing Center a BLAST search was performed in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The axolotl TGF- β 1 protein structure domains were also obtained from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). The alignment of TGF- β 1 protein sequences was compiled with the Lasergene program (DNASar, Madison, WI) by using the Clustal W method. Human TGF- β 1 sequence (accession number P01137), mouse TGF- β 1 (accession number NP_035707) and *Xenopus*

laevis TGF- β 5 (accession number AAB64441) were aligned with the axolotl TGF- β 1 sequence (accession number EU147783).

3.3.5.3 Whole-mount in situ hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed as described by Gardiner *et al.* [171] with a few modifications. Digoxigenin labeled antisense RNA probe for TGF- β 1 was synthesized using T3 RNA polymerase (Promega, Madison, WI) and DIG RNA labeling mix (Roche Diagnostics, Laval, QC). The PCR-Script Amp SK+ vector (Stratagene) containing the 495bp TGF- β 1 fragment was linearized with EcoR1 and used as template for probe synthesis. For tissue permeabilization, limbs were incubated with 30 μ g/ml proteinase K for 30-60 minutes on ice and then at 37 °C for 45-60 minutes with the time adjusted for blastema size. Prehybridization and hybridization (72 hours) temperature was 62.5°C. For alkaline-phosphatase reaction, BM purple (Roche) was used as the enzyme substrate for the colorimetric reaction. No signal was detected at any stage when the sense probe was used for *in situ* hybridization (data not shown). A minimum of 3 samples, for each regeneration stage, was used for Whole-mount *in situ* hybridization.

3.3.5.4 Northern blots

Limb regeneration stages were determined as described by Tank [128] and Iten [129]. Total RNA was extracted from blastemas at each stage using Trizol. T=0 corresponds to RNA extracted from mature limb tissue. Messenger RNA was extracted using GenElute mRNA Miniprep kit (Sigma-Aldrich, St-Louis MO). 20 µg of total RNA or 5 µg of mRNA were loaded per lane on a 1% agarose-6.9% formaldehyde gel. RNA was transferred from the gel to a nylon membrane (Pall, USA) by capillary transfer. A cDNA probe coding for the axolotl TGF-β1 was amplified from the PCR-Script amp SK+ vector. The membranes were hybridized with this cDNA probe labeled with [α -³²P]deoxy-CTP by the random hexamer method as in Roy *et al.*[342]. Northern blots were repeated 3 times with different RNA samples for each regeneration stage.

3.3.5.5 Affinity labeling of axolotl cells

Axolotl cells (AL-1 cell line) grown in culture were maintained at a constant temperature of 26°C without CO₂ in 60% Leibovitz's L-15 medium with 2mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin-streptomycin, 1X insulin-transferrin-selenium (diluted from 100X stock solution, Invitrogen) and 5% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Invitrogen). Axolotl cells in culture were labeled with [¹²⁵I]-TGF-β1 human recombinant protein and immuno-precipitations of TGF-β receptors were performed, as described previously [369,376]. Immuno-precipitations of TGF-β receptors were done using the following antibodies: anti-TGF-β RI (V-22) (Santa Cruz biotechnology, CA), anti-TGF-β RII (C-16)

(Santa Cruz biotechnology), anti-betaglycan Get-1 as described in Piek *et al.* [370]. SDS-PAGE was performed under reducing conditions using β -mercaptoethanol. Affinity labeling of axolotl cells was repeated two times.

3.3.5.6 UV irradiation of axolotl cells and Western blot analysis

Axolotl AL-1 cells were irradiated with ultra-violet (UV) light ($500\text{J}/\text{m}^2$) and were harvested 6, 12 and 24 hours post-irradiation. Total proteins were extracted by sonicating cells in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer and heated in boiling water 5 minutes before electrophoresis on 12% polyacrylamide-SDS gels according to the method of Laemmli [343]. Fifty micrograms of proteins were loaded per lane. The proteins were transferred electrophoretically onto PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA). For Western blotting, we used a 1:200 dilution of an anti-TGF- β RII (C-16) #sc-220 antibody (Santa Cruz biotechnology). Immuno-detection of primary antibody was visualized using the ECL Western blotting kit according to the manufacturer's directions (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Experiments were repeated at least 3 times with different protein samples for each experiment.

3.3.5.7 Treatments of axolotl cell line with TGF- β 1 protein and SB-431542

Human recombinant TGF- β 1 protein was used to treat AL-1 cells at a final concentration of 25 or 100 pM. Cells were serum starved and kept in 60.0% Leibovitz's L-15 medium for 48h prior to adding TGF- β 1. Total RNA was collected (using Trizol reagent) from AL-1 cells treated with TGF- β 1 after 3 and 72 hours. HaCaT human keratinocyte cell line was grown in DMEM medium with 2mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin-streptomycin, and 10% FBS and used as control. SB-431542 was added 30 minutes before TGF- β 1 treatment. Each experiment was performed in triplicates.

3.3.5.8 RT-PCR

RT-PCR reactions were done using RNA collected from axolotl cells in culture or regenerating limb blastemas. 30 cycles of PCR amplification were done for each gene. Primers used to amplify each genes are as follows: axolotl plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) APAI1F183 and APAI1R706, axolotl fibronectin AFNF31 and AFNR411, axolotl Runx 2 ARUNX2F66 and ARUNXR295, human fibronectin HFNF87 and HFNR335, axolotl glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) AGDHF90 and AGDHR391 and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase HGAPDH 5' and HGAPDH 3' (See Table 1 for primer sequences (Tableau 1, p. 158)). To measure the effect of SB-431542 on TGF- β 1 target genes expression, animals were treated for 5 days following amputation with DMSO (controls) or SB-431542. RNA was extracted from blastemas or the tip of the limbs of comparable size for SB-431542 treated animals and RT-

Tableau 1 – Amorces utilisées pour les expériences de PCR dans l'article 2

Table 1. Primers used in RT-PCR reactions

Primer	Sequence
DFTGFB1	TGG(G,C)TGTC(C,T)TT(C,T)GA(C,T)GT(C,T)AC
DRTGFB1	C(C,T)GGGTTGTG(A,C)TG(G,C)TT(A,G)TAC
ATGFR210	CGGTGGTCACAGTTACGAGGAA
ATGFR367	CACACTGATACAGCTCCACTCG
ATB1F1067	TCGTTGGCCCTATATTGTCC
ATB1R2419	CTCCATTGCCTTTACTCGT
ATB1F1098	CTCGTTGAGGGAACCTCTG
ATB1R2368	CAGTCCATTGCTTTGACA
APAI1F183	TCCCTCTGACCACCTTGACT
APAI1R706	CTCGAGGAAGGGTTGAGAGA
AFNF31	AGGAGATCTGCACCACCAAC
AFNR411	TCTCCCGCCATAACAGTAG
ARUNX2F66	GCCTCAAGGTGGTAGGTCTC
ARUNXR295	CTGTGGTAGGTGGCTACTTGG
HFNF87	CAGTGGGATAAGCAGCATGA
HFNR335	CTCTGAATCCTGGCATTGGT
AGDHF90	GACAAGGCATCTGCTCACCT
AGDHR391	ATGTTCTGGTTGGCACCTCT
HGAPDH 5'	ACCACAGTCCATGCCATCAC
HGAPDH 3'	TCCACCACCTGTTGCTGTA

doi:10.1371/journal.pone.0001227.t001

PCR was performed. Each sample comes from a reverse transcription reaction made with 6 blastemas from control or SB-431542 treated limbs. Student's T test was performed to confirm statistical significance of fibronectin and Runx 2 expression in control versus SB-431542 treated limbs (4 samples per condition).

3.3.5.9 Histology

Following treatments with SB-431542 or DMSO, axolotls were fixed overnight in Bouin's fixative solution and then rinsed thoroughly with 70% alcohol. Limbs were embedded in paraffin and cut to 10 μ m sections. Slides were deparaffinized through 3 baths of toluene for 5 minutes each. Slides were then rehydrated in a graded series of 100%, 90%, 70% and 50% alcohol and then distilled water for 5 minutes each. For histology, Masson's trichrome staining method was used to stain cell cytoplasm in red, nuclei in black and collagen in blue [398]. A minimum of 3 samples were stained for each time-point.

3.3.5.10 BrdU incorporation assay

Regenerating control and SB-431542 treated axolotls were injected intraperitoneally, 7 days after amputation, with 10 μ L of BrdU stock solution using a ratio of 1-2mL/100g of body weight according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare, #

RPN201). Animals were fixed 12 hours after injection in 4% paraformaldehyde in 0.7x PBS for 24 hours at 4°C. Samples were paraffin embedded, deparaffinized and rehydrated as for histology. For immuno-histochemistry, slides were washed 4x15minutes in PBST (1x PBS with 0,1% Tween 20). They were incubated with 0.8% Pepsin in 0,2N HCl for 10 minutes at 37°C to promote denaturation of DNA. Slides are then washed 3x10minutes in PBST, and incubated in a blocking solution (2% bovine serum albumin, 1% DMSO, 10% sheep serum and 0,1% Triton X-100) at room temperature for one hour. Slides were then incubated overnight at 4°C with an anti-BrdU mouse monoclonal antibody (BrdU Ab-3, Labvision/Neomarkers, Fremont, CA.) diluted 1:50 in blocking solution. PBST washes (4x15minutes) were done before incubating with an anti-mouse secondary antibody coupled to horseradish peroxidase, dilution 1:250, for 2 hours at room temperature (GE Healthcare). Slides were washed again 4x15minutes in PBST before being incubated in DAB (Zymed, Invitrogen) for signal detection. Slides were counterstained with methyl green for 6 minutes (Dako, Mississauga, ON) before being serially dehydrated 2x2minutes each in 90% EtOH, 100% EtOH and 100% Xylene. Slides were mounted with Permount (Fisher scientific, Ottawa, ON). Immunohistochemical detection for BrdU incorporation was done on three different samples. Student's T test was performed to confirm statistical significance of BrdU incorporation in control versus SB-431542 treated limbs (3 samples per condition).

3.3.6 Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Karen Echeverri from the Center for regenerative therapies Dresden and Dr. Elly Tanaka from the Max Planck Institute of molecular cell biology and genetics Dresden for sharing their BrdU labeling protocol. The authors would also like to thank the team of Dr. Antonio Nanci, in the department of stomatology at the Université de Montréal, for help with the histology.

3.4 Commentaires

Les résultats présentés dans cet article ouvrent la porte à une analyse fonctionnelle de la voie de signalisation des TGF- β lors du processus de régénération du membre chez l'axolotl. Plusieurs expériences à réaliser sont décrites dans le chapitre 4. En plus de ces expériences, il serait intéressant de vérifier l'expression de Tgf- β 2 lors de la régénération du membre. Nous n'avons pas déterminé l'expression de ce gène puisque ce dernier ne semble pas être régulé lors de la guérison des plaies chez les mammifères [246]. TGF- β 1 et TGF- β 2 ont souvent des rôles complémentaires chez les mammifères et il faudrait vérifier si Tgf- β 2 est exprimé, tout comme Tgf- β 1, lors de la phase de préparation de la régénération. De plus, quelques expériences supplémentaires pourraient être effectuées afin de mieux caractériser l'interaction des différents récepteurs de la voie des TGF- β identifiés dans l'article. Il faudrait d'abord vérifier quelles sont les protéines qui ont immuno-précipité avec le récepteur de type I à la figure 19 A. Ensuite, il faudrait vérifier si ces récepteurs sont localisés et s'ils sont retrouvés en grande quantité dans les tissus en régénération de l'axolotl. Une immuno-précipitation suivie d'un immuno-buvardage Western permettrait aussi de confirmer les résultats obtenus pour le récepteur de type I et le betaglycan (Fig. 19 A). Il a aussi été démontré que TGF- β 1 peut se lier à ALK-1, un récepteur des BMP, et ainsi contrebalancer la réponse favorisée par le récepteur ALK-5 [399,400]. Il serait très intéressant de déterminer la fonction de chacun de ces récepteurs

lors de la régénération, car leur activation pourrait bien être critique pour le bon déroulement du processus.

De plus, l'absence de prolifération cellulaire détectée dans une patte traitée avec le SB-431542 pourrait seulement être un effet secondaire d'un blocage de la voie de signalisation des TGF- β lors de la régénération. Il pourrait être intéressant de vérifier, par exemple, la présence d'apoptose dans le membre en régénération, avant et après un traitement avec le SB-431542. On pourrait aussi vérifier l'expression et l'activation des régulateurs du cycle cellulaire comme p15, p16, p21 et c-Myc lors de la régénération et vérifier si ces derniers sont affectés par un traitement avec le SB-431542. Ces protéines sont des cibles directes de TGF- β 1 [208].

4. Chapitre 3 - Expériences supplémentaires

4.1 Présentation

Cette section contient des résultats qui n'ont pas été incorporés dans les articles et qui complètent les données publiées. De plus, sont aussi incluses plusieurs données sur la caractérisation du processus de guérison des plaies chez l'axolotl qui feront l'objet d'une publication prochaine.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Manipulations des animaux

Comme mentionné dans les chapitres précédents, les axolotls utilisés ont été achetés au Ambystoma Genetic Stock Center (Lexington, KY). Les animaux étaient gardés dans une solution Holtfreter's 20% dans une pièce fermée, avec un cycle d'éclairage de 12 heures de lumière suivies de 12 heures de noirceur. Avant chaque manipulation (chirurgie, amputation, blessure), les animaux étaient anesthésiés dans une solution de MS-222 0.1% à pH 7,4 (*ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Des animaux de 3-5 cm de longueur ont été utilisés pour les amputations de pattes, tandis que des animaux de 7-10 cm ont été utilisés pour l'induction d'une blessure de la peau.

4.2.2 Immunobuvardage Western

Les protéines totales ont été extraites à partir de blastème de régénération récoltés à chacun des stades suivant l'amputation de la patte. Les blastèmes ont été dissociés par sonication dans un tampon à base de sodium dodecyl sulfate (SDS). Les échantillons ont été dénaturés 5 minutes dans l'eau bouillante avant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS 12%, conformément à la méthode de Laemmli [343]. Cinquante

microgrammes de protéines ont été chargés sur le gel pour chacun des stades. Ensuite, les protéines ont été transférées par électrophorèse sur une membrane de polyvinylidene difluoride (Immobilon-P, Millipore, Bedford, MA). Pour l'immunobuvardage, chaque membrane a été bloquée avec une solution de 5% lait en poudre, *phosphate-buffered saline* (PBS) 1X et 0.5% Tween-20, toute la nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés étaient dilués 1 :200-1 :500 dans la solution de blocage ou dans une solution de PBS 1X, 5% sérum de mouton, 0.2% Tween-20, 0.02% azide de sodium. Les anticorps utilisés sont respectivement anti-TGF- β ((Pan) 1D11 Genzyme corp., Cambridge MA), anti-TGF- β 1 (sc-146, Santa Cruz biotechnology inc, Santa Cruz, CA), anti-Smad 2/3 (sc-8332, Santa Cruz biotechnology inc, Santa Cruz, CA). Dans chaque cas, l'anticorps secondaire (anti-IgG de souris ou anti-IgG de lapin) était dilué 1 :5000. La technique utilisée pour obtenir le signal est *Enhanced Chemo-Luminescence* (ECL) (ECL Western blotting kit, GE Healthcare, Buckinghamshire, Grande-Bretagne).

4.2.3 Hybridation *in situ* sur coupes

Les échantillons ont été prélevés puis fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4%, PBS 0.7X, toute la nuit à 4°C. Les échantillons ont été enrobés de paraffine puis coupés à l'aide d'un microtome à une épaisseur de 10 μ m. Avant de procéder à l'hybridation, les échantillons ont été déparaffinés dans 3 bains consécutifs de toluène, pendant 5 minutes. Les échantillons ont ensuite été réhydratés dans une série de bains

d'éthanol 100%, 90%, 70% et 50% pendant 5 minutes chacun. Par la suite, deux rinçages de cinq minutes à l'eau traitée au DEPC, puis avec du PBS 0.7X ont été effectués. Les coupes ont ensuite été traitées pendant 5 minutes à la protéinase K à 37°C (protéinase K 50µg/mL dans Tris-HCl 0.1M et EDTA 50mM). Il est important de poser une lamelle sur les échantillons à chaque étape d'incubation. Après le traitement à la protéinase K, les échantillons ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4%/PBS 0.7X faite avec de l'eau traitée au DEPC pendant 5 minutes. Après les échantillons ont été rincés dans PBS 0.7X fait avec de l'eau-DEPC. Les échantillons ont ensuite été traités dans une solution de 0.25% *acetic anhydride* dans *triethanolamine* 0.1M pendant 10 minutes. Ensuite, une étape de pré-hybridation a été effectuée en couvrant les échantillons de solution d'hybridation préchauffée et d'une lamelle, pendant une heure à 46°C. Ensuite, l'hybridation des coupes a été faite toute la nuit à 46°C avec la sonde d'ARN antisens de Tgf-β1 diluée à 2X (à partir du stock de 10µg/mL) dans la solution d'hybridation (la sonde doit être dénaturée 10 minutes à 80°C avant l'ajout). Après l'hybridation, les échantillons ont été rincés 5 minutes dans SSC 2X et 5 minutes dans STE, chacun à température de la pièce. Les lames ont ensuite été lavées dans SSC 2X+50% formamide, puis dans SSC 1X, 10 minutes à 42°C chacun. Ensuite deux autres lavages ont été faits, soit un lavage dans SSC 0.1X 10 minutes, puis un lavage dans PBS 0.7X 5 minutes, à température de la pièce. Les échantillons ont ensuite été rincés dans le tampon 1, 2 minutes à température pièce. Après le rinçage, on bloque avec le tampon 1 auquel on a ajouté 10% de sérum de mouton, une heure à température pièce. On dilue ensuite l'anticorps anti-DIG couplé à l'alkaline-phosphatase

(Roche Diagnostics, Laval, Qc) 1 :500 dans tampon 1+10% sérum et on l'ajoute aux échantillons. Les lames ont ensuite été incubées toute la nuit à 4°C, dans une chambre humide. Au début du dernier jour, Les lames ont été rincées dans le tampon 1 puis dans le tampon 3, pendant 5 minutes chacun à température pièce. Ensuite le substrat pour la réaction colorimétrique a été ajouté (NBT-BCIP Roche) et la réaction a été arrêté après 15 minutes en trempant les lames dans le tampon 4 pendant 5 minutes, puis dans l'eau-DEPC. Finalement, les lames ont été montées avec un milieu de montage aqueux (Aquatex, EMD chemicals, Gibbstown, NJ)

4.2.4 Blessure de la peau chez l'axolotl

Pour induire une blessure de la peau, un poinçon cutané de 1.5 mm de diamètre a été utilisé. Suite à l'anesthésie de l'animal, le poinçon était tourné délicatement sur la peau d'un côté de la queue de l'animal, de manière à délimiter un cercle de 1.5 mm de diamètre. Ensuite, la portion de peau délimitée par la lame du poinçon était finement découpée à l'aide d'un ciseau chirurgical puis enlevée à l'aide d'une pince de dissection. Cette technique permet de reproduire une blessure équivalente sur chacun des animaux tout en préservant l'intégrité des tissus sous la peau blessée (*i.e.* le muscle).

4.2.5 Coloration au Trichrome de Masson

La coloration histologique du trichrome de Masson a été utilisée pour colorer les sections de tissus pour l'étude du processus de guérison des plaies chez l'axolotl. Cette technique a été mentionnée au chapitre 2 mais les détails sont présentés ici. Avant la coloration, les échantillons ont été prélevés puis fixés dans une solution de paraformaldéhyde 4%, PBS 0.7X, toute la nuit à 4°C. Les échantillons ont été enrobés de paraffine puis coupés à l'aide d'un microtome à une épaisseur de 10 µm. Pour la coloration, les échantillons sont déparaffinés dans 3 bains consécutifs de toluène, pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite réhydratés dans une série de bains d'éthanol 100%, 90%, 70% et 50% pendant 5 minutes chacun. Après on rince les échantillons à l'eau distillée 5 minutes. Après ce rinçage, les échantillons sont fixés pendant 1h15 à 56°C dans une solution de Bouin. Les échantillons sont rincés 10 minutes à l'eau courante puis 5 minutes à l'eau distillée. Ensuite on colore avec l'hématoxyline de Weigert pendant 10 minutes (mélanger des parties égales de la solution A et B). On jette l'hématoxyline. Les échantillons sont rincés 10 minutes à l'eau courante puis 5 minutes à l'eau distillée. On colore ensuite avec le *Biebrich scarlet-acid fuschin* 2 minutes (on conserve cette solution). On rince les échantillons 5 minutes à l'eau distillée. On colore les échantillons avec le *Aniline blue* pendant 5 minutes puis on les rince à l'eau distillée 5 minutes. Les échantillons sont ensuite trempés dans une solution d'acide acétique 1% pendant 1 minute et 30 secondes (on jette cette solution). On déshydrate ensuite les échantillons dans une série de

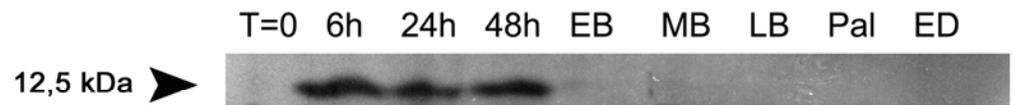
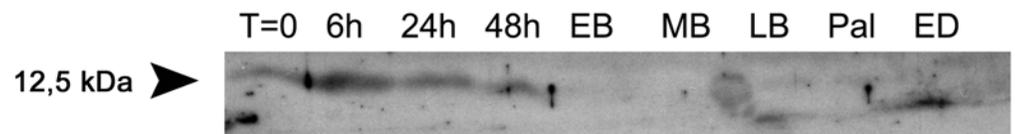
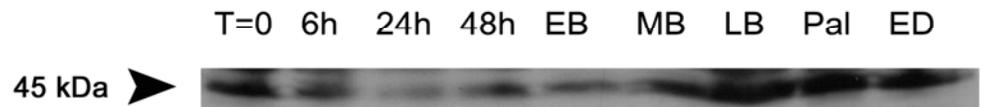
bains consécutifs d'éthanol 95%, d'éthanol 100% et de xylène 100% pour 2 x 2 minutes chacun. On monte ensuite les lames avec une lamelle en utilisant un médium de montage organique (*e.g.* Permount®).

4.3 Résultats

4.3.1 Expression des protéines de la famille des TGF- β lors de la régénération du membre chez l'axolotl

Afin de compléter les études d'expression de *Tgf- β 1*, présentées au chapitre 2, des expériences d'immuno-buvardage ont été effectuées pour déterminer la production des protéines de certains membres de la famille des TGF- β au cours de la régénération. La figure 24 (Fig. 24, p. 183) présente l'expression des protéines TGF- β 1 et SMAD 3 au cours de la régénération. En A, on peut observer l'expression de la protéine TGF- β 1 lors de la régénération du membre chez l'axolotl. Dans cette expérience, un anticorps reconnaissant les trois isoformes des TGF- β a été utilisé (anticorps-PAN). La bande détectée dans cette expérience a un poids moléculaire de 12,5 kilodaltons (kDa) ce qui concorde avec le poids moléculaire d'un monomère de TGF- β actif (que ce soit TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) [214]. On peut noter une forte expression de la protéine à 6h, 24h et 48h après l'amputation. Pour confirmer ces données, un immuno-buvardage a été effectué en utilisant l'anticorps sc-146 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz CA.) qui reconnaît seulement l'isoforme TGF- β 1 (Fig. 24 B). L'anticorps sc-146 permet d'observer un patron d'expression qui correspond à celui obtenu avec l'anticorps-PAN (Fig. 24 A). Par contre, une faible bande est détectée dans le tissu mature (T=0) avec ce dernier. Il

Figure 24 – Détection des protéines TGF- β 1 et SMAD3 aux différents stades de régénération du membre chez l'axolotl par immuno-buvardage Western. A) Détection de TGF- β 1 dans le membre en régénération de l'axolotl à 6h, 24h et 48h post-amputation. Un anticorps pouvant reconnaître les trois isoformes humaines de TGF- β (1, 2 et 3) a été utilisé (anticorps PAN anti-TGF- β). L'expérience a été effectuée en conditions dénaturantes et on remarque que la bande correspondant à TGF- β 1 a un poids moléculaire de 12,5 kDa, ce qui correspond au poids de TGF- β 1 sous forme de monomère. B) Détection de TGF- β 1 dans le membre en régénération de l'axolotl à 6h, 24h et 48h post-amputation. On détecte aussi une faible bande à T=0h. Un anticorps spécifique à TGF- β 1 a été utilisé lors de cette expérience (anticorps sc-146 anti-TGF- β 1). C) Détection de SMAD3 dans le membre en régénération de l'axolotl. On peut voir que SMAD3 est présent en grande quantité à T=0, que son expression diminue à 6h, 24h 48h et EB puis qu'elle revient à un niveau normal aux stades MB, LB, PAL et ED. Le poids moléculaire détecté (45 kDa) correspond au poids moléculaire de SMAD3 non-phosphorylé. D) Coloration de la membrane au bleu de Coomassie montrant une quantité égale de protéines dans chaque puits.

A Anti-TGF- β Pan**B** Anti-TGF- β 1 SC-146**C** Anti-SMAD 3**D**

est possible que, comme chez plusieurs autres espèces, une certaine quantité de TGF- β soit gardée de manière latente dans plusieurs tissus matures [214]. Les deux anticorps utilisés en A et B permettent toutefois de montrer que la protéine TGF- β 1 est produite durant la phase de préparation de la régénération, tout comme l'ARN messager de ce gène (voir chapitre 2). L'expression de la protéine d'un des médiateurs cellulaire des TGF- β , SMAD 3, a aussi été déterminée lors de la régénération (Fig. 24 D). On peut noter que le tissu mature renferme une certaine quantité de SMAD 3, mais que suite à l'amputation, l'expression de la protéine diminue rapidement. En fait, l'expression de la protéine diminue dès 6h après l'amputation et demeure faible jusqu'au stade EB. Par la suite, à partir du stade MB, l'expression revient à un niveau normal. On remarque que l'expression de SMAD 3 est très faible lors de la phase de préparation puis revient à un niveau plus fort lors de la phase de redéveloppement.

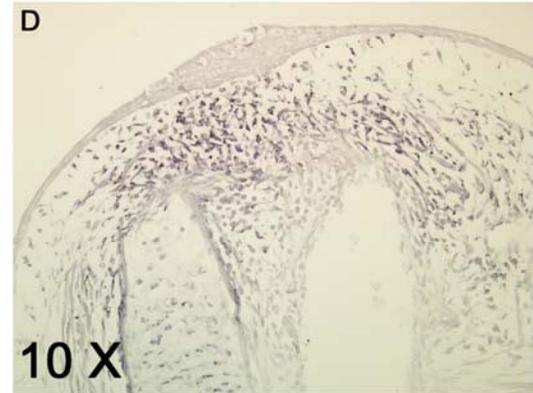
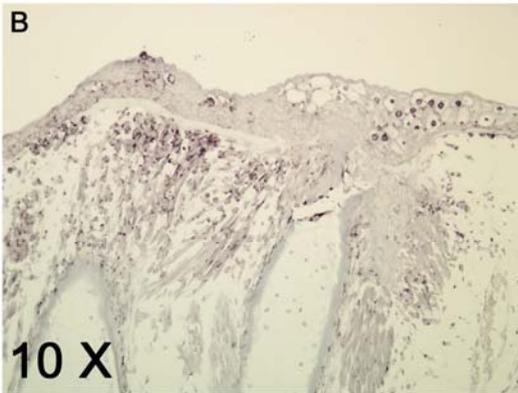
4.3.2 Expression de l'ARNm de *Tgf- β 1* dans le membre en régénération

Afin de confirmer les résultats obtenus au chapitre 2 par hybridation *in situ whole-mount*, nous avons effectué l'hybridation *in situ* sur coupes pour *Tgf- β 1*. L'expérience a été effectuée sur des coupes de pattes fixées 48h après l'amputation et au stade EB. On peut observer que, 48h après l'amputation, l'expression de *Tgf- β 1* est localisée sous l'épiderme de guérison (Fig. 25 A et B, p. 186). Au stade EB, on peut observer que la majorité des cellules du blastème sont positives pour *Tgf- β 1* (Fig. 25 C et D). Ces résultats

Figure 25 – Détection de TGF- β 1 par hybridation *in situ* dans le membre en régénération chez l'axolotl. A) Présence de l'ARN messenger codant pour TGF- β 1 48h post-amputation. L'expression de l'ARNm est marquée par un précipité violet. On peut voir que plusieurs cellules expriment TGF- β 1 au bout de la patte, sous l'épithélium de guérison. Quelques cellules expriment aussi TGF- β 1 dans la peau et les muscles. B) Agrandissement du bout de la patte en A. C) Présence de l'ARN messenger codant pour TGF- β 1 au stade EB. L'expression de l'ARNm est très forte dans le blastème au bout de la patte. D) Agrandissement du bout de la patte en C. On ne détecte aucune expression dans la peau à ce stade.

48h

EB

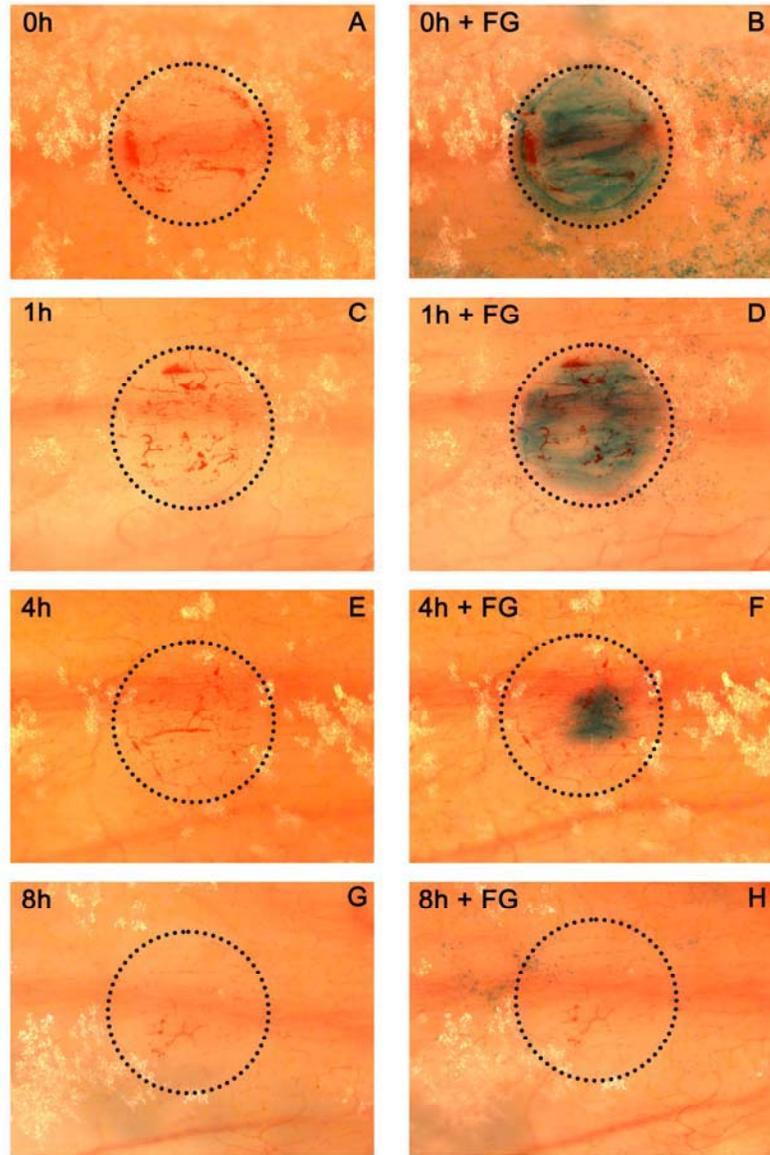


confirment ceux du chapitre 2 et montrent que *Tgf- β 1* est exprimé spécifiquement dans la zone de dédifférenciation cellulaire à 48h et dans le blastème de régénération au stade EB.

4.3.3 Étude du processus de guérison de l'épiderme chez l'axolotl

Dans un autre ordre d'idées, nous avons voulu caractériser le processus de guérison des plaies chez l'axolotl. Pour ce faire, une blessure par excision dans l'épiderme a été effectuée sur un côté de la queue de plusieurs axolotls. Afin de déterminer à quelle vitesse l'axolotl peut refermer une plaie, une goutte de colorant vert, le *fast green*, a été déposée sur la blessure. Le *fast green* est reconnu pour être absorbé par les cellules mortes, ou endommagées, et est excrété par les cellules viables [401,402]. Le principe est donc de voir combien de temps après une blessure la couleur verte n'est plus détectée dans la peau de l'axolotl. À la figure 26 (Fig. 26, p. 189), il est possible d'observer le processus de guérison de l'épiderme au cours des 8 premières heures suivant la blessure. Cette figure présente une photographie de la blessure avant (Fig. 26 A, C, E et G) et après ajout du *fast green* (Fig. 26 B, D, F et H) sur la plaie. On peut constater que la surface de la plaie est totalement teintée par le vert immédiatement après l'induction de la blessure (0h, Fig. 26 B). Une heure après la blessure, il y a encore beaucoup de cellules qui sont marquées par le *fast green* sur toute la surface où la peau a été enlevée (Fig. 26 D). Par contre, on peut remarquer que la démarcation entre la blessure et la peau mature est moins nette à ce moment. Ceci pourrait suggérer que les kératinocytes en périphérie de

Figure 26 – Guérison d'une blessure de la peau en moins de huit heures chez l'axolotl. Dans cette figure, on peut suivre la guérison d'une blessure cutanée, chez l'axolotl, suite à l'extirpation d'un morceau de peau circulaire d'un diamètre correspondant à 1.5 mm. Dans chaque panneau, le cercle pointillé délimite la blessure. Les panneaux A), C), E) et G) sont des photos prises juste après avoir effectué la blessure A), et 1h C), 4h E) et 8h G) après. Les panneaux B), D), F) et H) sont des photos des blessures aux mêmes temps qu'en A), C) E) et G) colorées avec le *fast green*. Ce colorant identifie les cellules endommagées. B) On peut voir que la surface de la blessure est totalement colorée au moment de l'induction. D) Une heure après avoir été effectuée, on remarque que le *fast green* colore presque toute la surface de la blessure, mais de manière plus diffuse, en périphérie. F) Quatre heures après avoir été effectuée, on peut voir que le colorant n'affecte qu'une partie centrale de la blessure correspondant environ au quart de la surface blessée. H) Huit heures après avoir fait la blessure, aucune cellule n'est colorée par le *fast green*, ce qui montre que la blessure est complètement fermée.



la plaie ont déjà commencé leur migration sur le substrat. Quatre heures après la blessure, on peut voir qu'il reste approximativement un quart de la surface blessée qui est toujours colorée par le *fast green* (Fig. 26 F). Huit heures après induction de la blessure, le colorant n'atteint plus aucune cellule de la région blessée, ce qui veut dire que la plaie est complètement fermée (Fig. 26 H).

Les blessures ont aussi été analysées de manière histologique. Les figures 27 et 28 (Fig. 27 et 28, p. 192 et 194) présentent des coupes histologiques effectuées sur des échantillons de blessure fixés à différents temps et colorées au trichrome de Masson. Immédiatement après avoir exécuté la blessure (T=0h), on peut identifier la région où l'épiderme a été enlevé et voir que la blessure ne touche pas au muscle sous-jacent (Fig. 27 A). Une heure après la blessure, il est difficile de dire si les cellules de la peau ont débuté leur migration sur la surface blessée (Fig. 27 C et D). Quatre heures après l'induction de la blessure, on peut voir que la surface de la blessure qui est toujours ouverte correspond environ au tiers du diamètre original (*i.e.* largeur de la surface ouverte $\approx 450 \mu\text{m}$ et diamètre original = $1500 \mu\text{m}$) (Fig. 27 E et F). Ceci signifie que les kératinocytes ont migré pour couvrir environ les deux tiers du diamètre original de la plaie. On peut aussi voir, 4 heures après la blessure, que les kératinocytes qui migrent sur la surface de la plaie ne sont pas solidement attachés au mésenchyme sous-jacent (Fig. 27 F). Huit heures après avoir fait la blessure, on peut voir que les kératinocytes ont complètement fermé l'ouverture de la plaie (Fig. 28 A). Ces données histologiques corréleront parfaitement avec l'absence de

Figure 27 – Analyse histologique du processus de guérison des blessures chez l'axolotl, 1h et 4h après avoir fait la blessure. La coloration au trichrome de Masson a été utilisée pour colorer en rouge le cytoplasme des cellules, en bleu le collagène et en noir les noyaux. A) Photographie prise juste après avoir effectué la blessure. On peut voir que la peau est enlevée sur une zone d'environ 1.5 mm de longueur. B) Agrandissement de la région encadrée en A). On peut observer l'endroit où la peau saine rencontre la région blessée. C) Photographie prise une heure après avoir fait la blessure. D) Agrandissement de la région encadrée en C). On peut observer que quelques cellules de l'épiderme saine semblent commencer leur migration sur la surface blessée (flèche blanche). E) Photographie prise quatre heures après avoir fait la blessure. On remarque que la surface de la blessure qui est « ouverte » est grandement réduite. F) Agrandissement de la région encadrée en E). On remarque que l'épiderme nouvellement formé n'est pas collé au mésenchyme sous-jacent (flèches blanches).

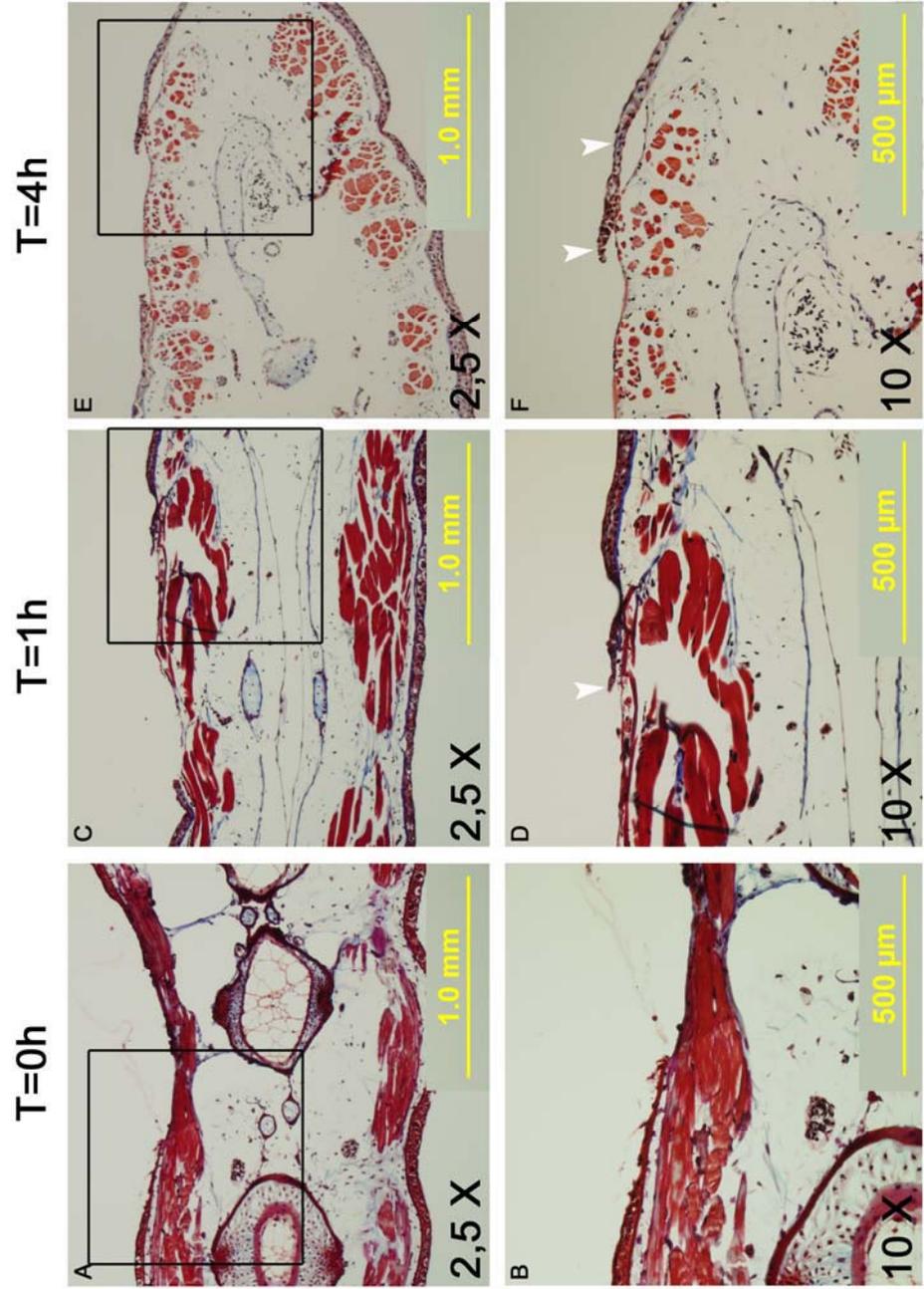
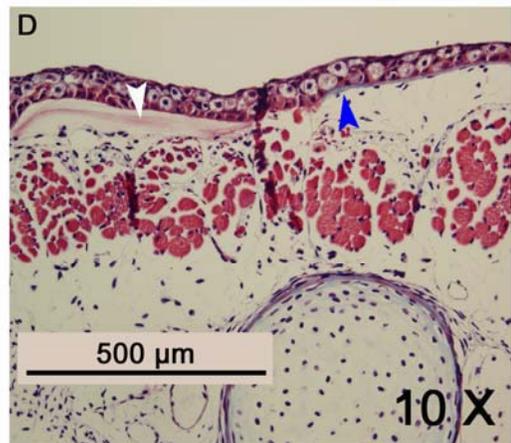
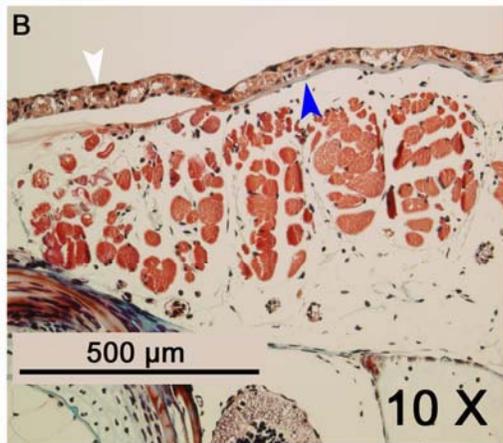
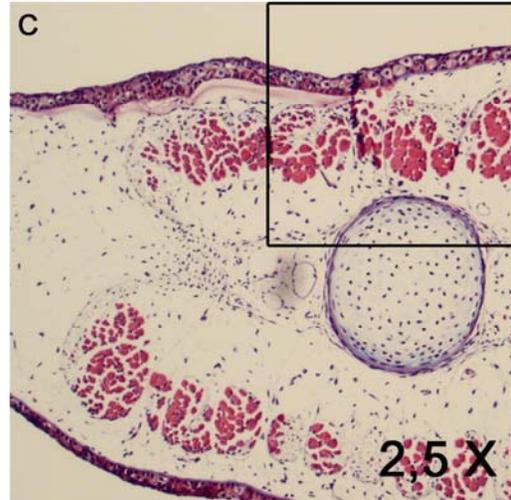
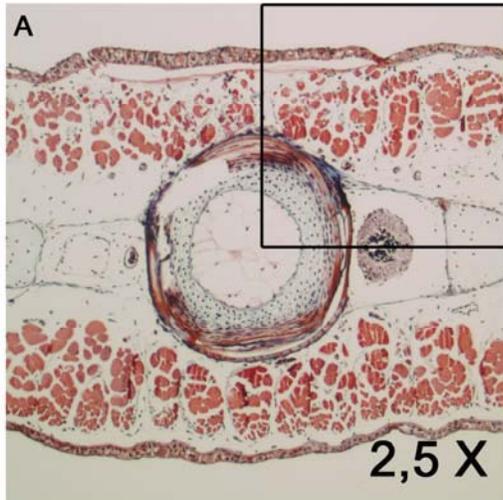


Figure 28 - Analyse histologique du processus de guérison des blessures chez l'axolotl, 8h et 24h après avoir fait la blessure. La coloration au trichrome de Masson a été utilisée pour colorer en rouge le cytoplasme des cellules, en bleu le collagène et en noir les noyaux. A) Photographie prise huit heures après avoir fait la blessure. On remarque qu'un épithélium de guérison nouvellement formé couvre maintenant toute la surface de la blessure. Cet épithélium n'est pas attaché au mésenchyme sous-jacent. B) Agrandissement de la région encadrée en A). On peut voir que l'épithélium nouvellement formé n'est pas attaché au muscle qu'il recouvre (flèche blanche). On peut voir que la lame basale de l'épiderme, composée de collagène (flèche bleue), n'est pas encore régénérée. C) Photographie prise vingt-quatre heures après avoir fait la blessure. D) Agrandissement de la région encadrée en C). L'épithélium nouvellement formé sur la blessure n'est pas encore bien attaché au muscle sous-jacent, à ce moment. On note par contre la formation d'une matrice, entre l'épiderme et le muscle (flèche blanche). Il est possible que cette matrice se condense, plus tard, pour reformer une lame basale (flèche bleue), qui permettrait à l'épiderme de bien s'attacher au muscle.

T=8h

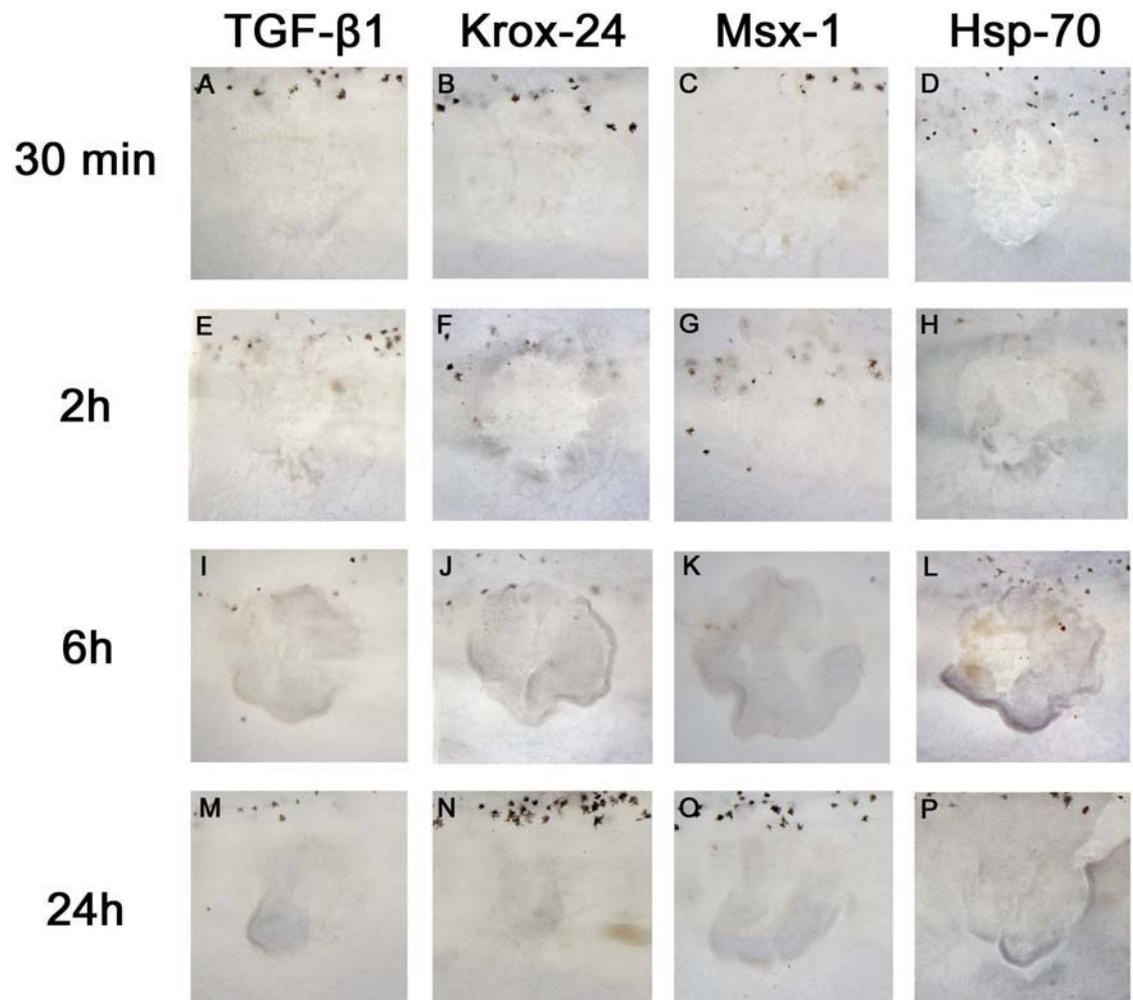
T=24h



coloration de la plaie au *fast green* à 8 heures (Fig. 26 H). À plus fort grossissement, on peut observer que les cellules de l'épiderme qui ont fermé la plaie ne sont toujours pas attachées au substrat (Fig. 28 B). Vingt-quatre heures après la blessure, les cellules de l'épiderme qui couvrent la plaie ne sont toujours pas complètement attachées au mésenchyme (Fig 28 C). On peut tout de même observer qu'il y a condensation de la matrice extra-cellulaire, entre les kératinocytes de la peau et le muscle, au site de la blessure (Fig. 28 C et D). Il suffirait d'aller voir à des temps plus éloignés, après la blessure, pour compléter l'analyse histologique et vérifier si le processus de guérison d'une plaie est parfait chez l'axolotl.

Afin de vérifier comment le processus de guérison des plaies est régulé chez l'axolotl, l'expression de certains gènes connus pour avoir un rôle dans la guérison/régénération a été déterminée par hybridation *in situ whole-mount*. Nous avons analysé l'expression de *Tgf-β1*, *Krox-24*, *Msx-1* et *Hsp-70* 30 minutes, deux heures, six heures et 24 heures après la blessure (Fig. 29, p. 197). 30 minutes après la blessure, il semble qu'aucun des gènes choisis ne soit exprimé dans la plaie ou dans la région avoisinante à la blessure (Fig. 29 A, B, C et D). Le gène *Krox-24* semble être celui qui est exprimé le plus rapidement parmi les quatre gènes choisis. On peut détecter son expression dans l'épiderme bordant la plaie à partir de deux heures après avoir effectué la blessure (Fig. 29 F). L'expression des gènes *Tgf-β1*, *Msx-1* et *Hsp-70* n'est pas détectée à cet instant. Toutefois, il est possible d'observer du signal correspondant à

Figure 29 – Expression des gènes *Tgf-β1*, *Krox-24*, *Msx-1* et *Hsp-70* durant le processus de guérison des plaies chez l'axolotl. Pour chaque gène, l'expression a été détectée par hybridation *in situ whole-mount* à trente minutes (A, B, C et D), deux heures (E, F, G et H), six heures (I, J, K et L) et vingt-quatre heures (M, N, O et P) après la blessure. L'expression de *Tgf-β1* a été détectée pour la première fois six heures après la blessure, dans l'épiderme de guérison formé sur la plaie (I). Cette expression diminue, mais est encore présente vingt-quatre heures après la blessure (M). L'expression de *Krox-24* apparaît, quant à elle, deux heures après avoir fait la blessure, en bordure de celle-ci (F). On peut toujours détecter l'expression de *Krox-24* six heures après la blessure (J) dans l'épiderme qui couvre celle-ci. Vingt-quatre heures après la blessure, l'expression de *Krox-24* est très faible (N). Pour chacun des gènes *Msx-1* et *Hsp-70*, on détecte l'expression dans l'épiderme couvrant la plaie, six heures après avoir fait la blessure (K et L). Leur expression devient plus faible vingt-quatre heures après la blessure (O et P). L'expression des gènes est montrée par les flèches noires.



l'expression des quatre gènes choisis six heures après l'induction de la blessure (Fig. 29 I, J, K et L). Pour chacun de ces gènes, l'expression est détectée dans la nouvelle couche d'épiderme formée sur la plaie. Vingt-quatre heures après avoir effectué la blessure, l'épiderme a maintenant complété la fermeture de la plaie, comme l'ont montré les données histologiques (Fig. 28 C et D). À ce moment, l'expression des quatre gènes étudiés est toujours présente bien que plus faible qu'à six heures après la blessure.

4.4 Recettes des solutions

4.4.1 Hybridation *in situ* sur coupes

Solution d'hybridation

50% formamide

2X SSC

1X Denhardt's

0.25M Tris-HCl pH 7.5

10% Dextran sulfate

0.5% Sodium pyrophosphate

0.5% SDS

25µg/mL ADN de sperme de saumon dénaturé

250µg/mL ARNt de levure

STE

500mM NaCl

1mM EDTA

20mM Tris-HCl pH 7.5

Tampon 1

100mM maleic anhydride

100mM NaCl

0.3% Triton X-100

Ajuster le pH à 7.5

Tampon 3

100mM Tris-HCl pH 9.5

100mM NaCl

50 mM MgCl₂

Tampon 4

10mM Tris-HCl pH 8.0

1mM EDTA

4.4.2 Trichrome de MassonBouin's

acide picrique saturé 128mL

formaldéhyde 37% 40 mL

acide acétique glacial 8 mL

total 168 mL

Weigert's iron hematoxylin

Solution A

Hématoxyline	1 g
Éthanol 95%	100 mL

Solution B

Solution aqueuse de chlorure de fer 10%	11,6 mL
Eau distillée	87,4 mL
Acide chlorhydrique concentré	1 mL

5. Discussion

5.1 Analyse et mise en contexte des résultats

De manière générale, l'étude de la régénération tissulaire vise à comprendre comment est régulé le processus de régénération au niveau cellulaire et moléculaire. Cette étude est grandement facilitée par l'utilisation d'animaux ayant une capacité naturelle à régénérer leurs organes et membres amputés comme l'axolotl. Plus la quantité de connaissances sur la régénération s'accroît, plus la conversion de ces connaissances en thérapies visant ultimement à permettre la régénération tissulaire parfaite chez l'humain devient envisageable.

Les résultats présentés dans cette thèse apportent un regard nouveau sur l'étude de la régénération tissulaire chez les urodèles. Pour une première fois, les gènes *Hsp-70* et *Tgf- β 1* sont étudiés chez un modèle vertébré qui peut régénérer plusieurs de ses organes et membres. Comme mentionné dans la discussion des articles, au chapitre 1 et 2, l'amputation d'un membre provoque l'activation de plusieurs réponses cellulaires et moléculaires spécifiques à la guérison/régénération (*e.g.* formation d'un caillot de sang, inflammation, activation des fibroblastes, dédifférenciation cellulaire, remodelage de la matrice extra-cellulaire, production de cytokines, etc). Chez les vertébrés supérieurs, *Tgf- β 1* est un des principaux régulateurs des différents mécanismes à la base de la guérison incluant la migration des kératinocytes, l'activation et la migration des fibroblastes, l'inflammation ainsi que la production de matrice extracellulaire [192,237-241,247].

Quelques études ont aussi montré l'expression de *Hsp-70* au site d'une blessure [309,310]. Il faut réaliser que l'environnement cellulaire d'une plaie présente plusieurs éléments qui peuvent être dommageable pour les cellules intactes (*e.g.* un pH bas, présence de radicaux libres, présence de pathogènes, etc) [195-197,286,287]. Il est donc raisonnable de croire que *Hsp-70*, un facteur de réponse au stress, et *Tgf- β 1*, un régulateur important de la guérison des plaies, ont un rôle à jouer lors du processus de régénération chez l'axolotl.

Les données présentées au chapitre 2 montrent pour la première fois qu'un gène de réponse au stress, dans ce cas-ci *Hsp-70*, est exprimé lors du processus de régénération chez une salamandre. Cette étude est aussi la première à décrire l'expression d'une protéine de réponse au choc thermique (*Heat shock protein*) dans le membre en développement. Bien que notre étude n'apporte pas d'analyse fonctionnelle du rôle de *Hsp-70* lors du développement du membre ou de la régénération, il est possible d'établir plusieurs corrélations intéressantes avec d'autres études. Nos résultats démontrent une expression prononcée de *Hsp-70* dans le membre en développement et lors du processus de régénération chez l'axolotl. Dans les deux cas, l'expression couvre la totalité de la région du membre qui se développe ou régénère. Cette expression similaire de *Hsp-70*, lors des deux processus, supporte la réactivation des mécanismes propres au développement embryonnaire lors de la phase de redéveloppement de la régénération [130]. Quant à eux, Vlaskalin *et al.* ont démontré qu'il n'y avait que quelques cellules apoptotiques dans le membre en développement chez le triton, *Notophtalmus viridescens* [332]. Ils ont aussi

montré que plusieurs cellules apoptotiques sont présentes dans le membre en régénération, lors des trois premiers jours suivant l'amputation. Par contre, très peu de ces cellules sont encore présentes sept jours après l'amputation [332], ce qui correspond au stade EB chez l'axolotl. L'expression de *Hsp-70* détectée lors du développement du membre et de la régénération chez l'axolotl corrèle avec une absence d'apoptose durant ces deux processus. Il est tentant de suggérer que l'axolotl pourrait avoir une adaptation qui lui permet d'exprimer *Hsp-70* de manière préventive, lors du développement et de la régénération de ses membres, pour se protéger d'un éventuel stress. Comme souligné dans l'introduction, un choc thermique qui induit l'expression des protéines de la famille des HSP est bénéfique pour la guérison de plaies ou de blessures, s'il est effectué préalablement au traumatisme [312-314]. Aussi, une opération effectuée à l'aide d'un laser à dissection, qui induit un choc thermique, favorise une guérison améliorée et une cicatrisation diminuée [315]. Ceci reste à déterminer de manière fonctionnelle, mais il est raisonnable de croire, en regardant ces études, que *Hsp-70* pourrait avoir un rôle clé à jouer lors dans la réponse régénératrice chez l'axolotl. En concordance avec nos résultats, quelques temps après la sortie de notre article sur *Hsp-70*, est parue une étude démontrant que *Hsp-60* est essentiel à la régénération chez le poisson-zèbre [403]. Dans cet article, Makino *et al.* ont déterminé que le mutant *nbl* ne forme pas de blastème suite à une amputation de la nageoire ou de l'apex du coeur et que ce phénotype est causé par une mutation dans le gène *Hsp-60* [403]. De plus, les auteurs ont observé une expression de la caspase-3 dans les cellules de la queue amputée chez le mutant *nbl*, indiquant la présence d'apoptose [403]. Ces données corrélerent avec nos

résultats et démontrent que les HSP pourraient permettre la régénération chez le poisson-zèbre et la salamandre en empêchant la mort des cellules du blastème par apoptose. Récemment, une équipe a démontré une association entre *Hsp-70* et la régénération du foie après hépatectomie partielle chez la souris KO pour le gène de la *nitric oxide synthase 2* (*Nos2*) [404]. Dans cet article, les auteurs démontrent que la souris KO pour *Nos2* présente une régénération hépatique retardée causée par une faible prolifération cellulaire et une augmentation du nombre de cellules apoptotiques au niveau du foie [404]. À l'aide d'analyse de micro-puces d'ADN et de PCR quantitatif, ils démontrent que l'expression de *Hsp-70* est fortement diminuée chez les souris KO pour *Nos2* après une hépatectomie partielle [404]. Les auteurs concluent que l'oxyde nitrique, qui est habituellement bénéfique pour la régénération hépatique, agirait en amont de *Hsp-70* et de plusieurs gènes de réponse au stress et favoriserait la survie des hépatocytes suite à une blessure au foie [404]. *Hsp-70* a aussi récemment été associé à la survie de myoblastes injectés chez une souris immuno-déficiente dans le but de développer un traitement pour certaines myopathies [405]. Un choc thermique induisant l'expression de *Hsp-70* a grandement amélioré la survie des cellules injectées dans ce modèle [405]. Somme toute, les études mentionnées ci-haut arrivent aux mêmes conclusions : *Hsp-70* joue un rôle important pour la survie des cellules dans plusieurs contextes différents. N'étant pas une famille de gènes associée au développement ou à la guérison des plaies, la famille des HSP pouvait, à prime abord, sembler un groupe peu intéressant pour l'étude de la régénération. Nos résultats d'expériences sur l'axolotl ainsi que le mutant *nbl* du poisson-zèbre montrent bien que les

HSP sont directement impliquées dans le contrôle de la régénération. L'étude des chaperonnes moléculaires de la famille des HSP apporte un nouveau regard sur la régénération tissulaire en impliquant des facteurs de réponse au stress, comme *Hsp-70*, dans la régulation de ce processus complexe.

Tout comme ce qui concerne *Hsp-70*, cette thèse est la première à jeter un regard sur le rôle des *Tgf- β* , et plus particulièrement de *Tgf- β 1*, dans un contexte de régénération tissulaire. C'est en considérant les deux phases du processus de régénération du membre chez l'axolotl, la phase de préparation et la phase de redéveloppement, qu'on comprend pourquoi l'étude de gènes jouant un rôle clé lors de la guérison devient importante. Il est maintenant accepté que la phase de redéveloppement, qui est la deuxième phase du processus de régénération, n'est qu'une répétition des différentes étapes qui se déroulent lors du développement embryonnaire [1,127,130,406]. On peut donc croire que l'étape clé de la régénération doit se situer à l'intérieur de la phase de préparation. Cette phase de préparation renferme des étapes essentielles au bon déroulement de la régénération comme la guérison de la plaie, la formation d'une coiffe apicale ectodermique et la formation d'un blastème de régénération [1,3]. En choisissant *Tgf- β 1* comme gène d'intérêt, notre laboratoire a été le premier à étudier ce gène, important pour la guérison des plaies chez les amniotes, durant la régénération chez l'axolotl.

Puisque le séquençage du génome de l'axolotl n'est pas encore complété, nous avons d'abord dû isoler la séquence correspondant à l'ADN complémentaire de *Tgf-β1*. Ensuite, nous avons démontré que *Tgf-β1* est exprimé dès six heures après l'amputation et que son expression est très intense pendant toute la phase de préparation. Son domaine d'expression couvre la région où se déroule la dédifférenciation cellulaire (premiers 48h) et couvre aussi le blastème de régénération (stades EB et MB, chapitres 2 et 3). Pour plusieurs raisons, nous croyons que *Tgf-β1* pourrait être impliqué dans le contrôle direct de la participation des fibroblastes du derme à la formation du blastème chez l'axolotl. La protéine TGF-β1 est reconnue pour être un puissant stimulateur de la migration et de la prolifération des fibroblastes chez les mammifères [238,239,407,408]. Chez les vertébrés supérieurs adultes, suite à une blessure, les fibroblastes se transforment en myofibroblastes et sécrètent une quantité abondante de collagène de type I qui s'accumule pour former une cicatrice [408,409]. Ces myofibroblastes sont aussi caractérisés par la présence de filaments d'actine de muscle lisse alpha (*α-smooth muscle actin*, *α-SMA*) avec lesquels ils peuvent contracter la plaie [192,408,409]. Chez l'axolotl, une blessure ou une amputation d'un membre ne mène jamais à la formation d'une cicatrice. TGF-β1 ne serait donc produit et sécrété dans le membre en régénération que pour stimuler la prolifération et la migration des fibroblastes vers le blastème. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le blocage de la voie de signalisation des TGF-β par l'inhibiteur SB-431542 empêche la formation du blastème et bloque la prolifération cellulaire dans le membre en régénération (chapitre 2). Ce blocage retarde mais n'empêche tout de même pas la fermeture de la plaie au site de

l'amputation, ce qui veut dire que l'effet est spécifique au mésenchyme et n'affecte pas ou que très peu l'épiderme. L'interprétation de TGF- β 1 faite par les fibroblastes de l'axolotl pourrait donc être différente de celle faite par les fibroblastes des vertébrés supérieurs adultes (*i.e.* mammifères, oiseaux, poissons, reptiles). Le contexte cellulaire et l'environnement pourrait influencer cette interprétation. De manière intéressante, Rolfe *et al.* ont démontré que TGF- β 1 a un effet bien différent chez les fibroblastes de mammifères provenant d'embryons ou d'animaux adultes [276,277]. Dans leur premier article, les auteurs montrent que TGF- β 1 induit la transformation des fibroblastes embryonnaires et adultes en myofibroblastes, mais que cette transformation est temporaire et de courte durée chez les fibroblastes embryonnaires [277]. Ceci pourrait s'expliquer par l'activation très brève et temporaire de Smad 2 et 3 dans les cellules embryonnaires [277]. Dans leur second article, les auteurs démontrent que l'activation de gènes pro-fibrose par TGF- β 1 est très faible dans les fibroblastes embryonnaires mais considérable dans les fibroblastes adultes [276]. Par exemple, TGF- β 1 stimule la production de collagène de type I, de PAI-1 et de CTGF (pro-fibrose) dans les cellules adultes mais de collagène de type III et de TGF- β 3 (pro-régénération) dans les cellules embryonnaires [276]. Ceci montre qu'un même type cellulaire peut répondre de manière différente, et même opposée, à un signal extracellulaire, dans ce cas-ci TGF- β 1, selon le contexte. Rolfe *et al.* soulignent aussi que c'est souvent la combinaison de l'effet de plusieurs acteurs qui peut mener à une réponse menant vers la fibrose ou la régénération (par exemple TGF- β 1, PAI-1 et CTGF qui, tous ensemble, mènent vers l'apparition de fibrose) [276,277]. TGF- β 1 n'est pas le seul régulateur de la

régénération chez l'axolotl, mais nos résultats appuient le fait que TGF- β 1 dirige les fibroblastes vers une réponse régénératrice, en favorisant la formation du blastème. Les fibroblastes peuvent contribuer jusqu'à 78% de la composition du membre régénéré chez les salamandres [151,406]. Il n'est donc pas surprenant qu'en bloquant la voie de signalisation des TGF- β , on affecte grandement la régénération du membre, ce qui résulte ici en une inhibition du processus.

D'autre part, il est aussi important de souligner que la quantité de SMAD 3 produite lors de la phase de préparation de la régénération est très faible (chapitre 3). Cette protéine effectrice de la voie des TGF- β semble être un des acteurs principaux lors de l'apparition de fibrose chez les amniotes [410]. En se liant à un élément de réponse aux SMAD (*SMAD binding element* (SBE), séquence CAGA), SMAD 3 peut activer plusieurs gènes impliqués dans la formation de cicatrices dont certains types de collagènes et des gènes exprimés lors du réarrangement de la matrice extra-cellulaire comme *Pai-1*, *Timp-1* et plusieurs *Mmp* [411]. La souris KO pour *Smad 3* présente un phénotype intéressant lorsqu'on considère la quantité de SMAD 3 présente dans le membre en régénération de l'axolotl. Cette souris démontre une ré-épithélialisation plus rapide de ses plaies cutanées, comparativement à la souris normale [269,270]. De plus, cette guérison accélérée est associée avec une diminution de l'inflammation, de l'infiltration de la plaie par les macrophages et de la production de matrice extra-cellulaire au site de la blessure [269]. Comme mentionné plus haut, le nombre de cellules immunitaires en circulation est très faible lors de la phase de

préparation dans le membre en régénération chez les urodèles [175]. De plus, l'amputation d'un membre ne mène jamais à la formation de cicatrice ou à l'apparition de fibrose chez l'axolotl. La faible quantité de SMAD 3 détectée lors de la phase de préparation concorde donc avec le phénotype de la souris *Smad 3* KO. Similairement, il a été montré que TGF- β 1 inhibe la production de SMAD 3, sans affecter SMAD 2, dans les cellules épithéliales pulmonaires [412]. Ceci est intéressant, car le poumon est un des organes chez lequel il a été récemment possible d'induire la régénération [413,414]. Ces données corrélerent avec les nôtres et avec celles générées chez la souris *Smad 3* KO : une présence de TGF- β 1 et une absence de SMAD 3 peut mener à un contexte favorisant la régénération. On peut suggérer, avec ces données, que TGF- β 1 pourrait réguler le processus de régénération via un autre médiateur que SMAD 3 lors de la phase de préparation. Il se pourrait que la réponse à TGF- β 1 soit effectuée par SMAD 2, lors de la régénération. Il a été montré que les rôles de SMAD 2 et 3 sont bien distincts chez des fibroblastes en culture ou chez l'embryon en développement, en prenant pour exemple la souris *Smad 2* KO qui n'est pas viable [415-417]. Aussi, la souris hétérozygote pour *Smad 2* ne présente pas une meilleure guérison suite à une blessure, ce qui voudrait dire que SMAD 2 n'est pas impliqué lors de la cicatrisation ou de l'apparition de fibrose [269]. Il est très probable que *Smad 2* joue un rôle important dans la régénération du membre, puisqu'une équipe de recherche a démontré son implication dans la régénération de la queue chez le têtard de *Xenopus* [418]. Il reste maintenant à vérifier si SMAD 2 est produit et régulé lors du processus de régénération chez l'axolotl.

En plus de passer par les SMAD, TGF- β 1 pourrait aussi activer d'autres voies cellulaires lors de la régénération. Il est maintenant bien connu que TGF- β 1 peut activer des voies non-canoniques comme celle des MAPK ou des Wnt/ β -catenin [278]. Il a été montré récemment que TGF- β 1 pouvait bloquer la voie des Wnt/ β -catenin de manière indépendante à SMAD 4 dans une lignée de cellules cancéreuses [419]. Une autre équipe a démontré que TGF- β 1 promeut la survie des ostéoclastes en activant la voie des MAPK (TAK1/MEK/AKT/NF κ B) [420]. Une bonne manière de vérifier si ces voies sont impliquées dans le contrôle de la régénération serait de traiter des animaux avec différents inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à chacune de ces voies, suite à l'amputation d'un membre. On sait déjà que les Wnt sont impliqués dans le contrôle de la régénération du membre [421-423]. Il serait possible de vérifier l'implication des MAPK en traitant des animaux avec le SB-203580 (un inhibiteur de la MAPK p38) [424] ou 5Z-7-Oxozeaenol (un inhibiteur de TAK1 (TGF- β activated kinase 1)) [425].

Nos expériences portant sur la guérison de la peau montrent que l'axolotl est aussi un modèle de choix pour l'étude de la guérison des plaies. Contrairement aux mammifères, l'axolotl ne présente aucune apparition de fibrose une fois la fermeture de la plaie terminée. Ceci permet donc d'établir une comparaison avec d'autres modèles vertébrés (*e.g.* souris, lapin et rat), qui eux forment des cicatrices. Nos données montrent que la plaie est recouverte en moins de 8 heures suite à une blessure par excision de la peau chez l'axolotl (chapitre 3). Cette observation est corroborée par une récente étude de l'influence des nerfs

sur le processus de dédifférenciation chez l'axolotl, où les auteurs ont induit une blessure similaire à la nôtre et ont aussi observé un temps de guérison de huit heures [426]. Ceci est très rapide lorsqu'on compare avec le temps requis pour fermer une plaie chez les mammifères, qui varie entre 2 et 10 jours [427]. Chez ces animaux, suite à la phase où se déroule l'inflammation (0-48h), suit une période pendant laquelle de nouveaux tissus, incluant l'épiderme et les vaisseaux sanguins, sont formés. De plus chez l'axolotl, il ne semble pas y avoir de formation d'une galle composée de fibrine et de plaquettes sanguines sur la plaie. Il existe peu d'études qui ont examiné le processus de guérison des plaies chez les salamandres, mais nos données concordent avec ces dernières. Par exemple, Ziegels a observé qu'une blessure de 5 mm de côté était complètement ré-épithélialisée 48h après avoir effectué la lésion [134]. Par contre, étant donné qu'une journée complète se trouvait entre ce moment de collecte de données et le précédent, il est possible que la fermeture de la plaie ait été un peu plus rapide. Il faut tout de même souligner qu'une blessure carrée de 5 mm de côté couvre une surface beaucoup plus grande que celle que nous avons effectuée (un cercle de 1,5 mm de diamètre, chapitre 3). Dans une expérience de laboratoire suggérée pour étudier la guérison des plaies et la migration des cellules pigmentées de la peau chez le triton, Robert Zaccaria affirme qu'il est possible d'observer la fermeture d'une plaie rectangulaire de 1 mm par 2 mm en moins de 24h [428]. De plus, suite à l'amputation d'un membre chez l'axolotl, l'épithélium de guérison couvre la plaie en moins de deux heures (chapitre 2 et [136]). Toutes ces données rassemblées montrent que l'axolotl ne semble pas

former d'escarre (galle), contrairement aux mammifères, suite à une blessure et démontrent que le mécanisme de fermeture de la plaie est très rapide chez les salamandres [427].

Les données d'expression de gènes récoltées amènent aussi quelques informations en ce qui concerne le contrôle du processus de guérison parfaite chez l'axolotl. Au chapitre 3, on peut voir que *Tgf-β1* n'est pas exprimé dans la région avoisinant la blessure avant 6 heures après le traumatisme. Son domaine d'expression couvre l'épithélium nouvellement formé à 6h et est similaire, mais à un niveau plus faible, à 24h. Cette expression est très rapide et momentanée et ressemble à ce qui a été observé chez l'embryon de souris. Chez l'embryon de souris au stade E11,5, *Tgf-β1* est rapidement exprimé, dès 3-6h post-blessure, mais son expression revient à un niveau basal moins de 24h après la blessure [274]. Cette expression temporaire de *Tgf-β1* a été observée au niveau de l'ARN et de la protéine chez l'embryon E11,5 [274]. Chez l'adulte, le niveau d'expression de *Tgf-β1* est souvent encore élevé 5 jours après la blessure [246]. On peut croire que, chez l'embryon de souris et chez l'axolotl, *Tgf-β1* est exprimé rapidement et de manière transitoire, ce qui a un effet positif sur la guérison de la plaie. En n'étant pas exprimé de manière prolongée, *Tgf-β1* ne pourrait pas contribuer à l'apparition de fibrose; il pourrait toutefois stimuler la migration des cellules épidermiques sur la plaie ouverte et le recrutement des fibroblastes [238,239,247,274]. Il est possible que l'environnement de la plaie, chez l'embryon de souris et chez l'axolotl, contienne plusieurs régulateurs de l'activité de TGF-β1 (*e.g.* protéases, inhibiteur de protéases, protéines se liant à TGF-β1) qui limitent l'action de cette

protéine [274]. Il est connu que le processus de fermeture de la plaie chez l'axolotl, suite à une amputation ou une blessure, est exécuté par les kératinocytes qui migrent sur la plaie (chapitres 2 et 3 et [1,135]). Il est aussi intéressant de constater que la ré-épithélialisation accélérée chez la souris β_3 -intégrine KO est associée avec une amplification de la signalisation par TGF- β 1 [429].

Quant à elle, l'expression de *Krox-24* apparaît dès 2h après la blessure, ce qui est plus tôt que pour *Tgf- β 1* (Chapitre 3). L'expression de ce facteur de transcription est semblable à celle de *Tgf- β 1* à 6h et est presque totalement absente à 24h. Chez la souris, *Krox-24* (aussi appelé *Egr-1*) est exprimé très rapidement en bordure de la blessure chez l'embryon et l'adulte [430]. Son expression atteint rapidement un plateau (30 minutes chez l'embryon et l'adulte) puis disparaît tout aussi vite de la région blessée (revient au niveau basal après 90 minutes chez l'embryon et 24h chez l'adulte), ce qui semble indiquer un rôle direct dans l'activation de plusieurs mécanismes reliés à la guérison [430,431]. Le patron d'expression de *Krox-24*, comme celui de *Tgf- β 1*, ressemble beaucoup à ce qui est observé chez l'embryon de souris qui ne forme pas de cicatrice.

L'expression de *Msx-1* a aussi été analysée lors de la guérison d'une blessure. Comme mentionné dans l'introduction, *Msx-1* est probablement le gène le plus étudié pour son rôle lors de la régénération chez la salamandre. Nos résultats démontrent une expression de *Msx-1* à 6h et 24h après la blessure, dans l'épiderme de guérison qui recouvre

la plaie. Il n'existe aucune étude qui ait regardé le rôle des gènes *homeobox Msx* lors de la guérison des plaies. La seule étude qui pourrait donner un indice sur le rôle de *Msx-1* dans la peau montre que, chez l'humain, *Msx 1* et *2* sont exprimés dans le derme et l'épiderme chez l'embryon mais restreint à l'épiderme chez l'adulte [432]. Les auteurs suggèrent que cette différence d'expression pourrait être associée à la guérison avec ou sans cicatrice chez l'adulte et l'embryon [432]. Chez l'axolotl, Carlson *et al.* ont démontré que le gène *Msx-2* est exprimé dès 1h après l'amputation du membre et qu'il est aussi exprimé lors de la guérison d'une blessure cutanée [136]. Ceci semble indiquer que *Msx-2* régule certains mécanismes communs aux processus de guérison et de régénération chez l'axolotl [136]. Un de ces mécanismes pourrait être lié à la transformation de l'épiderme de l'axolotl en épithélium de guérison permettant la régénération [136].

En dernier lieu, l'expression de la chaperonne *Hsp-70* a été vérifiée lors de la guérison. L'expression observée pour *Hsp-70* est identique à celle de *Msx-1* et couvre l'épiderme de guérison à 6h puis diminue en intensité à 24h (Chapitre 3). Tout comme lors de la régénération du membre (Chapitre 1), l'expression de *Hsp-70* dans la peau de l'axolotl pourrait faciliter la régénération en empêchant l'apoptose. Plusieurs études mentionnées précédemment associent la présence de *Hsp-70* avec une guérison améliorée, et ce dans plusieurs contextes différents [309,314,315].

5.2 Perspectives

Afin de continuer l'étude du rôle des TGF- β lors de la régénération chez l'axolotl, plusieurs expériences potentielles pourraient être réalisées. Il serait d'abord important de déterminer le rôle exact que joue TGF- β 1 lors du processus. Pour ce faire, deux approches sont possibles, l'inhibition ou la surexpression du gène. Tout d'abord, il faudrait générer un animal transgénique qui exprime un ARN interférant (RNAi) contre *Tgf- β 1*. La technique de génération d'axolotl transgénique à l'aide de la méganucléase *ISce1* est maintenant reconnue idéale pour obtenir un bon taux d'animaux transgéniques à la F0 (environ 16-20% [433] et Villiard E. et Roy S., données non-publiées). Pour permettre l'induction du RNAi au moment voulu, il serait possible d'utiliser le promoteur du gène *Hsp-70*, qui permet la transcription du transgène suite à un choc thermique. Ce promoteur a déjà été utilisé plusieurs fois avec succès lors d'études du processus de régénération chez la grenouille *Xenopus* [434-436]. Il a été démontré que le choc thermique n'affecte pas le processus de régénération (Lévesque M. et Roy S. données non-publiées et [434-436]) et ce système permettrait d'induire l'expression du RNAi dans une seule patte d'un animal en soumettant seulement cette patte au choc thermique. Une autre approche possible serait d'utiliser un promoteur inductible par la tetracycline pour activer le RNAi en ajoutant l'antibiotique à l'eau de l'axolotl qu'on voudrait traiter [437]. On peut croire qu'une inhibition de l'expression de *Tgf- β 1* empêchera le bon déroulement de la régénération du membre chez l'axolotl. Il est possible que le phénotype d'une inhibition spécifique de *Tgf- β 1* par RNAi

donne un résultat similaire à celui obtenu avec le SB-431542 (chapitre 2). Cette approche pourrait aussi être utilisée pour vérifier l'effet d'une inhibition du gène *Hsp-70* pendant le processus de régénération. Il serait intéressant de mesurer le niveau d'apoptose, à l'aide de la technique du TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), ou le niveau de prolifération cellulaire, à l'aide du marquage au BrdU, suite à l'inhibition de *Hsp-70*. Une telle inhibition nous permettrait aussi de constater si l'expression de *Hsp-70* est essentielle au processus de régénération. Les deux approches mentionnées ci-haut pourraient aussi être utilisées pour surexprimer *Tgf-β1* ou *Smad 3* lors de la régénération du membre. Notre hypothèse est qu'il y aura une apparition marquée de fibrose au site d'amputation, suite à la surexpression de ces deux gènes. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'une stimulation des fibroblastes d'axolotl en culture (lignée AL-1) avec la protéine TGF-β1 humaine recombinante provoque l'activation des gènes pro-fibrose comme *Pai-1* et la fibronectin (chapitre 2). Il existe, par contre, peu d'études ayant regardé le rôle de *Tgf-β1* dans le membre, sur lesquelles nous pouvons appuyer notre hypothèse. Joyce *et al.* ont montré qu'une injection de TGF-β1 dans la région du péri-os du fémur chez le rat cause la formation d'os ectopique [438]. D'autre part, à l'aide de billes renfermant du TGF-β1, Hayamizu *et al.* ont démontré que TGF-β1 pouvait causer des déformations squelettiques lorsque la bille était implantée à différents niveaux de l'avant-bras chez le poulet [439]. L'expérience de Hayamizu a été reprise par Ferguson *et al.* qui ont montré que la présence d'une bille de TGF-β1 n'affecte pas l'expression des gènes importants pour la formation du cartilage comme *Sox-9* ou *Col-2* [440]. Par contre, TGF-β1 bloque la

prolifération des chondrocytes et l'expression des gènes *Ihh* et *Bmp-6*, essentiels pour la maturation de ces cellules, ce qui cause un raccourcissement des éléments du squelette [440]. Quant à eux, Kawakami *et al.* ont démontré qu'une bille de TGF- β 1 peut induire l'expression de *Sox-9* dans l'espace interdigital chez le poulet et mener à la formation de doigts surnuméraires [441]. Il se pourrait alors qu'une surexpression de *Tgf- β 1* durant la phase de redéveloppement, lorsque le cartilage se forme dans le membre en régénération, cause une malformation du squelette.

Ensuite, il serait intéressant d'utiliser la même stratégie afin de déterminer les rôles exacts que jouent SMAD 3 et SMAD 2 lors de la régénération chez l'axolotl. De plus, au cours des dernières années, plusieurs tentatives ont été effectuées afin d'isoler la séquence de l'ADN complémentaire de *Tgf- β 3* chez l'axolotl (voir annexe 1). Malheureusement, toutes les expériences tentées se sont avérées infructueuses dans l'identification d'une séquence correspondant à *Tgf- β 3* chez cette espèce. Il aurait été très intéressant de pouvoir comparer le patron d'expression ainsi que le rôle de *Tgf- β 3* avec celui de *Tgf- β 1* lors de la régénération chez l'axolotl. TGF- β 3 est reconnu pour avoir un rôle favorisant une diminution de la cicatrisation, à l'inverse de TGF- β 1, chez les mammifères [14,260,442]. Toutefois, un gène codant pour *Tgf- β 3* n'a jamais été identifié chez la grenouille *Xenopus laevis* et cette espèce possède seulement deux isoformes des *Tgf- β* (*Tgf- β 5*, orthologue de *Tgf- β 1* [355] et *Tgf- β 2* (NCBI GenBank)). Un résultat négatif ne constitue jamais une preuve scientifique, mais suite aux expériences effectuées, il semble que l'axolotl, comme les

amphibiens *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*, ne possède pas de séquence codant pour le gène *Tgf-β3*.

Quelques expériences déterminantes seraient aussi à réaliser pour compléter l'étude du processus de guérison chez l'axolotl. Tout d'abord, la détermination du patron d'expression du gène *Msx-2* pourrait compléter les données d'expression et nous permettre de comparer la présente avec une des seules études s'étant attardée à la guérison de blessures chez l'axolotl [136]. Une autre expérience à effectuer est la détermination de la présence de α -SMA dans le tissu blessé. Cette protéine est exprimée par les myofibroblastes chez les mammifères et leur permet d'exercer une force contractile afin de fermer la plaie [250,251,254,409]. Les myofibroblastes sont souvent associés à l'apparition de cicatrices, chez les mammifères [250,251,254,409]. L'absence de α -SMA lors de la guérison chez l'axolotl est attendue puisque ce dernier ne forme pas de cicatrice. De plus, nos données histologiques, qui montrent qu'il n'y a pas de formation de tissu granuleux dans une blessure chez l'axolotl, pourraient être complétées avec l'utilisation de colorations spécifiques aux cellules immunitaires. Différents anticorps, colorants ou substances chimiques peuvent être utilisés pour identifier certaines cellules immunes; par exemple un anticorps contre la protéine L-plastine (spécifique aux macrophages), un essai à base de naphthol chloroacetate (spécifique aux neutrophiles) ou la coloration au bleu de toluidine (spécifique aux mastocytes). Ces expériences complèteraient bien notre étude, s'il était

possible de démontrer qu'il y a peu d'inflammation lors du processus de guérison chez l'axolotl [175].

5.3 Applications chez l'humain

La recherche ayant pour but d'élucider les différents mécanismes qui régulent la régénération chez l'axolotl en est encore à un niveau fondamental. Plusieurs étapes restent à franchir avant d'en arriver au développement de traitements cliniques favorisant la régénération tissulaire chez l'humain. Ces étapes incluent une meilleure caractérisation des processus de formation de l'épithélium de guérison et de dédifférenciation cellulaire effectué par les fibroblastes et les cellules musculaires des salamandres. Une meilleure compréhension de ces processus passe par l'analyse de l'expression et des fonctions de plusieurs gènes au cours de ces différents processus. Seulement une fois ces processus maîtrisés sera-t-il possible de tenter d'induire la régénération tissulaire chez un autre modèle de recherche comme la grenouille ou la souris.

Par contre, il est possible d'extrapoler les résultats présentés dans cette thèse et de suggérer des applications potentielles découlant d'une telle étude ou de faire un parallèle avec quelques applications cliniques déjà existantes. Il est raisonnable de penser que les

résultats de recherche dans le domaine de la régénération tissulaire mèneront d'abord à des traitements visant l'amélioration des capacités de guérison chez l'humain. Par exemple, les résultats du chapitre 2 montrent que *Hsp-70* est exprimé lors de la régénération du membre chez l'axolotl. Advenant qu'il soit essentiel à la régénération du membre chez l'axolotl (ce qui est toujours à vérifier), il pourrait devenir intéressant d'induire ce gène chez l'humain lors d'opérations chirurgicales afin de favoriser une meilleure guérison et de promouvoir la régénération. D'ailleurs, comme mentionné précédemment, des coupures de la peau à l'aide d'un laser, qui provoque un choc thermique et une induction de *Hsp-70*, mène à une guérison améliorée [315]. Une première mesure à prendre pour favoriser une guérison qui présente moins de fibrose pourrait être de toujours utiliser un laser pour couper la peau ou d'autres tissus lors d'opérations chirurgicales chez l'humain, lorsque c'est réalisable. Si on en venait à comprendre le rôle exact de *Hsp-70* lors de la régénération chez l'axolotl, peut-être serait-il possible de moduler son expression chez l'humain, afin de mener vers une réponse régénératrice.

Les résultats du chapitre 3 montrent que la voie de signalisation des TGF- β qui passe par le récepteur ALK-5 est essentielle au processus de régénération chez l'axolotl. Par contre chez l'humain, tout indique que cette voie est au centre de la régulation des processus de guérison menant à la formation de cicatrices. Une plus grande compréhension du rôle de la voie des TGF- β lors de la régénération chez l'axolotl est nécessaire avant de

pouvoir transposer les connaissances acquises chez l'axolotl à l'humain. Il sera important de vérifier les rôles des différents ligands (TGF- β 1 et, TGF- β 2 et TGF- β 3 s'il est possible d'isoler leur séquence nucléotidique) dont le signal passe par cette voie lors de la régénération. Il sera aussi essentiel de continuer la caractérisation des différents récepteurs (ALK-5, TGF- β RII, betaglycan, endogline) qui se acceptent ces ligands pour vérifier s'il existe des différences entre ceux-ci et leurs homologues humains. De plus, il faudrait vérifier de quelle manière les TGF- β influencent le cycle cellulaire chez les urodèles. Comme on sait que le contexte cellulaire est important dans la réponse aux différents TGF- β , sans doute sera-t-il possible d'identifier de nouveaux éléments expliquant pourquoi cette voie est essentielle au processus de régénération chez les urodèles [276,277].

Chez l'humain, des applications cliniques basées sur la modulation des TGF- β , ou de gènes régulés par les TGF- β sont déjà en développement [443]. Quelques-unes de ces applications incluent l'ajout de facteurs de croissances directement au site de la plaie, le traitement de la plaie avec un inhibiteur pharmacologique ou l'ajout d'un oligonucléotide antisens spécifique à un gène [443]. Il est clair qu'une thérapie locale est beaucoup plus sûre, particulièrement si on veut moduler les TGF- β , car ces facteurs ont un effet sur la majorité des cellules humaines [208]. En agissant localement, on évite l'apparition d'un effet non désiré dans une autre partie du corps.

De manière plus générale, une meilleure compréhension des mécanismes menant à la régénération, comme la dédifférenciation cellulaire, pourrait mener au développement de nouvelles thérapies pour certaines maladies ou problèmes de santé. Les patients atteints de diabète constituent un bon exemple de personnes qui bénéficieraient grandement de traitement pro-régénération. L'hyperglycémie récurrente retrouvée chez ces patients mène, dans la majorité des cas, à l'apparition de fibrose dans la paroi des vaisseaux sanguins [444]. Le blocage des capillaires fait en sorte qu'une plaie dans une région mal irriguée a tendance à guérir très lentement et à réapparaître de manière chronique chez les diabétiques [445]. Un état avancé de la maladie mène souvent à l'amputation d'orteils ou du pied chez les patients atteints. Un traitement favorisant la régénération des vaisseaux sanguins bloqués, ou des régions ulcérées, aiderait grandement les diabétiques. Il est aussi intéressant de constater qu'on retrouve très peu de TGF- β 1 sécrété dans un ulcère chez un patient atteint de diabète, comparativement à la quantité retrouvée dans une plaie, chez une personne normale [445]. Jude *et al.* croient que c'est exactement pourquoi ce type de plaie ne guérirait pas [445]. Cette absence de production de TGF- β 1 a aussi été observée dans des plaies chroniques chez des personnes âgées [257]. Chez des souris diabétiques, une surexpression systémique de *Tgf- β 1*, effectuée en injectant un adéno-virus codant pour la protéine TGF- β 1 humaine, mène à une inhibition de l'attaque auto-immune des lymphocytes sur le pancréas et à une régénération des cellules β productrice d'insuline [446]. La régénération du pancréas peut être très longue, car les cellules β ont une longue période réfractaire entre 2 divisions [21]. Une meilleure compréhension du rôle de TGF- β 1

lors de la régénération chez l'axolotl pourrait peut-être mener à une nouvelle approche en médecine régénératrice dans le traitement du diabète.

Il est évident que, dans le futur, plusieurs patients pourraient bénéficier de traitements en médecine régénératrice. Ceux-ci incluent les personnes souffrant de maladies dégénératrices (Alzheimer, Parkinson), auto-immunes (Diabète de type 1, maladie de Crohn) ou autres comme l'emphysème ou la cirrhose du foie. Les personnes ayant subi une ou plusieurs amputations de membres verraient aussi leur vie s'améliorer grandement suite à de tels traitements.

6. Conclusion

Cette thèse apporte un regard nouveau sur la régénération tissulaire en étudiant pour la première fois l'expression et la fonction des gènes *Hsp-70* et *Tgf- β 1* dans le membre en régénération de l'axolotl. Il est surprenant que ces gènes n'aient pas été étudiés dans un contexte de régénération avant notre étude qui débuta en 2002. L'amputation d'un membre est un traumatisme important qui déclenche plusieurs cascades moléculaires et cellulaires reliées à la réponse au stress et à la guérison des plaies. Étant directement impliqués dans ces deux processus chez les mammifères, *Hsp-70* et *Tgf- β 1* sont maintenant connus pour jouer un rôle important dans le processus de régénération tissulaire chez les salamandres. Les résultats obtenus chez l'axolotl nous poussent à revoir les rôles déjà connus de ces protéines et complètent les études qui ont majoritairement été réalisées chez des mammifères aux capacités de régénération limitées. Même si les gènes sont conservés à travers les espèces, de la mouche à fruits jusqu'à l'humain, il est important de considérer le contexte d'expression d'un gène, chez un animal donné. Par exemple, *Tgf- β 1* est clairement impliqué dans le contrôle des mécanismes menant à la cicatrisation chez les mammifères, mais nos résultats démontrent que la voie des *Tgf- β* est essentielle au bon déroulement de la régénération du membre chez l'axolotl. Ces deux fonctions semblent opposées mais dépendent peut-être seulement de l'expression simultanée d'un activateur ou d'un répresseur d'une fonction spécifique des *Tgf- β* dans un des deux contextes. Finalement, la recherche portant sur les gènes *Hsp-70* et *Tgf- β 1* mérite d'être poursuivie afin de mieux comprendre leur implication durant le processus de régénération chez les urodèles

amphibiens. Ces recherches permettront peut-être un jour de moduler leurs actions chez l'humain afin d'empêcher la formation de cicatrice et de promouvoir la régénération des tissus et des organes blessés ou amputés.

7. Bibliographie

1. Wallace H (1981) Vertebrate limb regeneration. Chichester Eng. ; New York: Wiley. xii, 276 p.
2. Dinsmore CE (1998) Conceptual foundations of metamorphosis and regeneration: from historical links to common mechanisms. *Wound Repair Regen* 6: 291-301.
3. Tsonis PA (1996) Limb regeneration. Cambridge [England] ; New York, NY, USA: Cambridge University Press. xii, 241 p. p.
4. Stocum DL (2006) Regenerative biology and medicine. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. x, 448 p. p.
5. Ingber DE, Levin M (2007) What lies at the interface of regenerative medicine and developmental biology? *Development* 134: 2541-2547.
6. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH (2001) Renal homotransplantation in identical twins. 1955. *J Am Soc Nephrol* 12: 201-204.
7. Dubernard JM, Lengele B, Morelon E, Testelin S, Badet L, et al. (2007) Outcomes 18 months after the first human partial face transplantation. *N Engl J Med* 357: 2451-2460.
8. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C (2007) The operation of the century: total hip replacement. *Lancet* 370: 1508-1519.
9. Blom AS, Acker MA (2007) The surgical treatment of end-stage heart failure. *Curr Probl Cardiol* 32: 553-599.
10. MacNeil S (2007) Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 445: 874-880.
11. Bianco P, Robey PG (2001) Stem cells in tissue engineering. *Nature* 414: 118-121.
12. Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, Barrandon Y, De Bari C (2007) Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res* 313: 3377-3385.
13. Harty M, Neff AW, King MW, Mescher AL (2003) Regeneration or scarring: an immunologic perspective. *Dev Dyn* 226: 268-279.

14. Martin P (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276: 75-81.
15. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ (2006) Liver regeneration. *Hepatology* 43: S45-53.
16. Sanchez Alvarado A, Tsonis PA (2006) Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet* 7: 873-884.
17. Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* 276: 60-66.
18. Fausto N, Campbell JS (2003) The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 120: 117-130.
19. Fausto N (2000) Liver regeneration. *J Hepatol* 32: 19-31.
20. Dhawan S, Georgia S, Bhushan A (2007) Formation and regeneration of the endocrine pancreas. *Curr Opin Cell Biol* 19: 634-645.
21. Teta M, Rankin MM, Long SY, Stein GM, Kushner JA (2007) Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Dev Cell* 12: 817-826.
22. Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46.
23. Charge SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 209-238.
24. Carlson BM (2003) Muscle regeneration in amphibians and mammals: passing the torch. *Dev Dyn* 226: 167-181.
25. Tidball JG (2005) Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R345-353.
26. Snow MH (1977) Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec* 188: 201-217.
27. Zammit PS, Heslop L, Hudon V, Rosenblatt JD, Tajbakhsh S, et al. (2002) Kinetics of myoblast proliferation show that resident satellite cells are competent to fully regenerate skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 281: 39-49.
28. Whalen RG, Harris JB, Butler-Browne GS, Sesodia S (1990) Expression of myosin isoforms during notexin-induced regeneration of rat soleus muscles. *Dev Biol* 141: 24-40.

29. Conboy IM, Rando TA (2005) Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. *Cell Cycle* 4: 407-410.
30. Carlson BM, Gutmann E (1972) Development of contractile properties of minced muscle regenerates in the rat. *Exp Neurol* 36: 239-249.
31. Grefte S, Kuijpers-Jagtman AM, Torensma R, Von den Hoff JW (2007) Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev* 16: 857-868.
32. Navarro X, Vivo M, Valero-Cabre A (2007) Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Prog Neurobiol* 82: 163-201.
33. Reyes O, Sosa I, Kuffler DP (2005) Promoting neurological recovery following a traumatic peripheral nerve injury. *P R Health Sci J* 24: 215-223.
34. Salonen V, Aho H, Roytta M, Peltonen J (1988) Quantitation of Schwann cells and endoneurial fibroblast-like cells after experimental nerve trauma. *Acta Neuropathol* 75: 331-336.
35. Brushart TM (1993) Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci* 13: 2730-2738.
36. Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG, Royall RM (1998) Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *J Neurosci* 18: 8674-8681.
37. Fields RD, Ellisman MH (1986) Axons regenerated through silicone tube splices. II. Functional morphology. *Exp Neurol* 92: 61-74.
38. Fields RD, Ellisman MH (1986) Axons regenerated through silicone tube splices. I. Conduction properties. *Exp Neurol* 92: 48-60.
39. Borgens RB (1982) Mice regrow the tips of their foretoes. *Science* 217: 747-750.
40. Douglas BS (1972) Conservative management of guillotine amputation of the finger in children. *Aust Paediatr J* 8: 86-89.
41. Han M, Yang X, Farrington JE, Muneoka K (2003) Digit regeneration is regulated by *Msx1* and *BMP4* in fetal mice. *Development* 130: 5123-5132.
42. Illingworth CM (1974) Trapped fingers and amputated finger tips in children. *J Pediatr Surg* 9: 853-858.

43. Reginelli AD, Wang YQ, Sassoon D, Muneoka K (1995) Digit tip regeneration correlates with regions of Msx1 (Hox 7) expression in fetal and newborn mice. *Development* 121: 1065-1076.
44. Rosenthal LJ, Reiner MA, Bleicher MA (1979) Nonoperative management of distal fingertip amputations in children. *Pediatrics* 64: 1-3.
45. Singer M, Weckesser EC, Geraudie J, Maier CE, Singer J (1987) Open finger tip healing and replacement after distal amputation in rhesus monkey with comparison to limb regeneration in lower vertebrates. *Anat Embryol (Berl)* 177: 29-36.
46. Mohammad KS, Day FA, Neufeld DA (1999) Bone growth is induced by nail transplantation in amputated proximal phalanges. *Calcif Tissue Int* 65: 408-410.
47. Han M, Yang X, Lee J, Allan CH, Muneoka K (2008) Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Dev Biol* 315: 125-135.
48. Allan CH, Fleckman P, Fernandes RJ, Hager B, James J, et al. (2006) Tissue response and Msx1 expression after human fetal digit tip amputation in vitro. *Wound Repair Regen* 14: 398-404.
49. Lee LP, Lau PY, Chan CW (1995) A simple and efficient treatment for fingertip injuries. *J Hand Surg [Br]* 20: 63-71.
50. Réaumur R-Ad (1712) Sur les diverses reproductions qui se font dans les scrivisses, les omars, les crabes, etc. et entre autres sur celles de leurs jambes et de leurs ecailles . *Mém de l'Acad Roy des Sci*: 226-245.
51. Trembley A (1744) Mémoires, pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, à bras en forme de cornes. Leiden, Verbeek.
52. Spallanzani L (1768) *Prodromo sa un Opera da Imprimersi sopra le Riproduzioni animali*. Modena 7.
53. Morgan TH (1906) The Physiology of Regeneration. *J Exp Zool* 3: 457-500.
54. Morgan TH (1901) Regeneration and Liability to Injury. *Science* 14: 235-248.
55. Morgan TH (1898) Experimental Studies of the Regeneration of *Planaria maculata*. *Dev Genes Evol*: 364-397.
56. Morgan TH (1901) *Regeneration*. New York, London,: The Macmillan Company; Macmillan & Co. ltd. xii , 1 l., 316 p.

57. Sanchez Alvarado A (2000) Regeneration in the metazoans: why does it happen? *Bioessays* 22: 578-590.
58. Brockes JP, Kumar A, Velloso CP (2001) Regeneration as an evolutionary variable. *J Anat* 199: 3-11.
59. Bosch TC (2007) Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Dev Biol* 303: 421-433.
60. Technau U, Cramer von Laue C, Rentzsch F, Luft S, Hobmayer B, et al. (2000) Parameters of self-organization in Hydra aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12127-12131.
61. Holstein TW, Hobmayer E, David CN (1991) Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Dev Biol* 148: 602-611.
62. Martinez DE (1998) Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Exp Gerontol* 33: 217-225.
63. Forman BJ, Javois LC (1999) Interactions between the foot and the head patterning systems in Hydra vulgaris. *Dev Biol* 210: 351-366.
64. Cummings SG, Bode, H.R. (1984) Head regeneration and polarity reversal in Hydra attenuata can occur in the absence of DNA synthesis. *Roux's Arch Dev Biol* 194: 79-86.
65. Wittlieb J, Khalturin K, Lohmann JU, Anton-Erxleben F, Bosch TC (2006) Transgenic Hydra allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6208-6211.
66. Miljkovic M, Mazet F, Galliot B (2002) Cnidarian and bilaterian promoters can direct GFP expression in transfected hydra. *Dev Biol* 246: 377-390.
67. Lohmann JU, Endl I, Bosch TC (1999) Silencing of developmental genes in Hydra. *Dev Biol* 214: 211-214.
68. Galliot B, Miljkovic-Licina M, Ghila L, Chera S (2007) RNAi gene silencing affects cell and developmental plasticity in hydra. *C R Biol* 330: 491-497.
69. Salo E (2006) The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *Bioessays* 28: 546-559.

70. Newmark PA, Sanchez Alvarado A (2000) Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol* 220: 142-153.
71. Reddien PW, Sanchez Alvarado A (2004) Fundamentals of planarian regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 725-757.
72. Sanchez Alvarado A (2006) Planarian regeneration: its end is its beginning. *Cell* 124: 241-245.
73. Chandebois R (1980) The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration. II—Distalization. *Dev Growth Differ* 22: 693-704.
74. Sanchez Alvarado A, Newmark PA (1998) The use of planarians to dissect the molecular basis of metazoan regeneration. *Wound Repair Regen* 6: 413-420.
75. Reddien PW, Bermange AL, Murfitt KJ, Jennings JR, Sanchez Alvarado A (2005) Identification of genes needed for regeneration, stem cell function, and tissue homeostasis by systematic gene perturbation in planaria. *Dev Cell* 8: 635-649.
76. Sanchez Alvarado A, Newmark PA (1999) Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5049-5054.
77. Sanchez Alvarado A, Newmark PA, Robb SM, Juste R (2002) The Schmidtea mediterranea database as a molecular resource for studying platyhelminthes, stem cells and regeneration. *Development* 129: 5659-5665.
78. Bannister R, McGonnell IM, Graham A, Thorndyke MC, Beesley PW (2008) Coelomic expression of a novel bone morphogenetic protein in regenerating arms of the brittle star *Amphiura filiformis*. *Dev Genes Evol* 218: 33-38.
79. Thorndyke MC, Chen WC, Beesley PW, Patruno M (2001) Molecular approach to echinoderm regeneration. *Microsc Res Tech* 55: 474-485.
80. Garcia-Ararras JE, Greenberg MJ (2001) Visceral regeneration in holothurians. *Microsc Res Tech* 55: 438-451.
81. Dupont S, Thorndyke MC (2006) Growth or differentiation? Adaptive regeneration in the brittlestar *Amphiura filiformis*. *J Exp Biol* 209: 3873-3881.

82. French V (1976) Leg regeneration in the cockroach, *Blattella germanica*. II. Regeneration from a non-congruent tibial graft/host junction. *J Embryol Exp Morphol* 35: 267-301.
83. Uetz GW, McClintock, W.J., Miller, D., Smith, E.I., Cook, K.K. (1996) Limb regeneration and subsequent asymmetry in a male secondary sexual character influences sexual selection in wolf spiders. *Behav Ecol Sociobiol* 38: 253-257.
84. Paulus T, Muller MC (2006) Cell proliferation dynamics and morphological differentiation during regeneration in *Dorvillea bermudensis* (Polychaeta, Dorvilleidae). *J Morphol* 267: 393-403.
85. Myohara M, Yoshida-Noro C, Kobari F, Tochinal S (1999) Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: a new material for regeneration study. *Dev Growth Differ* 41: 549-555.
86. Bely AE, Wray GA (2001) Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed- and orthodenticle-class gene expression. *Development* 128: 2781-2791.
87. Nakamura T, Mito T, Bando T, Ohuchi H, Noji S (2008) Molecular and Cellular Basis of Regeneration and Tissue Repair : Dissecting insect leg regeneration through RNA interference. *Cell Mol Life Sci* 65: 64-72.
88. Nakamura T, Mito T, Tanaka Y, Bando T, Ohuchi H, et al. (2007) Involvement of canonical Wnt/Wingless signaling in the determination of the positional values within the leg segment of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Growth Differ* 49: 79-88.
89. Kille FR (1933) Regeneration in *Thyone briareus* following induced evisceration. *Anat Rec* 57: 66.
90. Menton DN, Eisen AZ (1973) Cutaneous wound healing in the sea cucumber, *Thyone briareus*. *J Morphol* 141: 185-203.
91. Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A (2003) Tales of regeneration in zebrafish. *Dev Dyn* 226: 202-210.

92. Becker T, Wullimann MF, Becker CG, Bernhardt RR, Schachner M (1997) Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 377: 577-595.
93. Akimenko MA, Johnson SL, Westerfield M, Ekker M (1995) Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development* 121: 347-357.
94. Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, Holdway JE, Roberts RW, et al. (2006) A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 127: 607-619.
95. Poss KD, Wilson LG, Keating MT (2002) Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298: 2188-2190.
96. Akimenko MA, Mari-Beffa M, Becerra J, Geraudie J (2003) Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev Dyn* 226: 190-201.
97. Johnson SL, Weston JA (1995) Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in Zebrafish fin regeneration. *Genetics* 141: 1583-1595.
98. Poss KD (2007) Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 18: 36-45.
99. Callery EM (2006) There's more than one frog in the pond: a survey of the Amphibia and their contributions to developmental biology. *Semin Cell Dev Biol* 17: 80-92.
100. Dent JN (1962) Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J Morphol* 110: 61-77.
101. Forsyth JW (1946) The histology of anuran limb regeneration. *J Morphol* 79: 287-321.
102. Michael MI, el-Malkh NM (1969) Hind limb histogenesis and regeneration in larvae and metamorphic stages of the Egyptian toad, *Bufo regularis* Reuss. I. Transection at the thigh level. *Arch Biol (Liege)* 80: 299-326.
103. Slack JM, Beck CW, Gargioli C, Christen B (2004) Cellular and molecular mechanisms of regeneration in *Xenopus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 745-751.

104. Filoni S, Bernardini S, Cannata SM, D'Alessio A (1997) Lens regeneration in larval *Xenopus laevis*: experimental analysis of the decline in the regenerative capacity during development. *Dev Biol* 187: 13-24.
105. Michael MI, Niazi IA (1972) Hind limb regeneration in tadpoles of *Bufo viridis viridis* Laurenti, and cartilage formation from cells of non-chondrogenic origin in the thigh. *Acta Embryol Exp (Palermo)* 3: 349-363.
106. Gallien L, Beetschen JC (1951) [Extent and limits of the regenerative power of the extremities in *Xenopus laevis* Daudin after metamorphosis.]. *C R Seances Soc Biol Fil* 145: 874-876.
107. Goode RP (1962) Regeneration of limbs in adult *Hymenochirus boettgeri*. *Nature* 193: 1098.
108. Suzuki M, Yakushiji N, Nakada Y, Satoh A, Ide H, et al. (2006) Limb regeneration in *Xenopus laevis* froglet. *ScientificWorldJournal* 6 Suppl 1: 26-37.
109. Endo T, Tamura K, Ide H (2000) Analysis of gene expressions during *Xenopus* forelimb regeneration. *Dev Biol* 220: 296-306.
110. Goss RJ, Holt R (1992) Epimorphic vs. tissue regeneration in *Xenopus* forelimbs. *J Exp Zool* 261: 451-457.
111. Gargioli C, Slack JM (2004) Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Development* 131: 2669-2679.
112. Brockes JP (1997) Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* 276: 81-87.
113. Char ZY, Tsilfidis C (2006) Newt opportunities for understanding the dedifferentiation process. *ScientificWorldJournal* 6: 55-64.
114. Odelberg SJ, Kollhoff A, Keating MT (2000) Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell* 103: 1099-1109.
115. Suzuki M, Satoh A, Ide H, Tamura K (2005) Nerve-dependent and -independent events in blastema formation during *Xenopus* froglet limb regeneration. *Dev Biol* 286: 361-375.
116. Beetschen JC (1996) How did urodele embryos come into prominence as a model system? *Int J Dev Biol* 40: 629-636.

117. Capanna E (1999) Lazzaro Spallanzani: At the roots of modern biology. *J Exp Zool* 285: 178-196.
118. Armstrong JB, Malacinski GM (1989) *Developmental biology of the axolotl*. New York: Oxford University Press. xi, 320 p.
119. Gresens J (2004) An introduction to the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Lab Anim (NY)* 33: 41-47.
120. Ducibella T (1974) The occurrence of biochemical metamorphic events without anatomical metamorphosis in the axolotl. *Dev Biol* 38: 175-186.
121. Habermann B, Bebin AG, Herklotz S, Volkmer M, Eckelt K, et al. (2004) An *Ambystoma mexicanum* EST sequencing project: analysis of 17,352 expressed sequence tags from embryonic and regenerating blastema cDNA libraries. *Genome Biol* 5: R67.
122. Putta S, Smith JJ, Walker JA, Rondet M, Weisrock DW, et al. (2004) From biomedicine to natural history research: EST resources for ambystomatid salamanders. *BMC Genomics* 5: 54.
123. Smith JJ, Putta S, Walker JA, Kump DK, Samuels AK, et al. (2005) Sal-Site: integrating new and existing ambystomatid salamander research and informational resources. *BMC Genomics* 6: 181.
124. Monaghan JR, Walker JA, Page RB, Putta S, Beachy CK, et al. (2007) Early gene expression during natural spinal cord regeneration in the salamander *Ambystoma mexicanum*. *J Neurochem* 101: 27-40.
125. Page RB, Monaghan JR, Samuels AK, Smith JJ, Beachy CK, et al. (2007) Microarray analysis identifies keratin loci as sensitive biomarkers for thyroid hormone disruption in the salamander *Ambystoma mexicanum*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145: 15-27.
126. Page RB, Voss SR, Samuels AK, Smith JJ, Putta S, et al. (2008) Effect of thyroid hormone concentration on the transcriptional response underlying induced metamorphosis in the Mexican axolotl (*Ambystoma*). *BMC Genomics* 9: 78.
127. Roy S, Levesque M (2006) Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? *ScientificWorldJournal* 6: 12-25.

128. Tank PW, Carlson BM, Connelly TG (1976) A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J Morphol* 150: 117-128.
129. Iten LE, Bryant SV (1973) Forelimb regeneration from different levels of amputation in the Newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, Rate, and Stages. *Wilhelm Roux' Archiv* 173: 263-282.
130. Gardiner DM, Carlson MR, Roy S (1999) Towards a functional analysis of limb regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 10: 385-393.
131. Goss RJ (1969) Principles of regeneration. New York,: Academic Press. ix, 287 p. p.
132. Thornton CS (1957) The effect of apical cap removal on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *J Exp Zool* 134: 357-381.
133. Hay ED, Fischman DA (1961) Origin of the blastema in regenerating limbs of the newt *Triturus viridescens*. An autoradiographic study using tritiated thymidine to follow cell proliferation and migration. *Dev Biol* 3: 26-59.
134. Ziegels J (1971) [The melanocytes of the Axolotl. Their modifications during skin regeneration]. *Arch Biol (Liege)* 82: 407-428.
135. Repesh LA, Oberpriller JC (1978) Scanning electron microscopy of epidermal cell migration in wound healing during limb regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Am J Anat* 151: 539-555.
136. Carlson MR, Bryant SV, Gardiner DM (1998) Expression of *Msx-2* during development, regeneration, and wound healing in axolotl limbs. *J Exp Zool* 282: 715-723.
137. Christensen RN, Tassava RA (2000) Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Dev Dyn* 217: 216-224.
138. Thornton CS, Thornton MT (1965) The regeneration of accessory limb parts following epidermal cap transplantation in urodeles. *Experientia* 21: 146-148.
139. Garat C, Kheradmand F, Albertine KH, Folkesson HG, Matthay MA (1996) Soluble and insoluble fibronectin increases alveolar epithelial wound healing in vitro. *Am J Physiol* 271: L844-853.

140. Williams CM, Engler AJ, Slone RD, Galante LL, Schwarzbauer JE (2008) Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Res* 68: 3185-3192.
141. Yang EV, Gardiner DM, Carlson MR, Nugas CA, Bryant SV (1999) Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Dev Dyn* 216: 2-9.
142. Kato T, Miyazaki K, Shimizu-Nishikawa K, Koshiha K, Obara M, et al. (2003) Unique expression patterns of matrix metalloproteinases in regenerating newt limbs. *Dev Dyn* 226: 366-376.
143. Miyazaki K, Uchiyama K, Imokawa Y, Yoshizato K (1996) Cloning and characterization of cDNAs for matrix metalloproteinases of regenerating newt limbs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6819-6824.
144. Yang EV, Bryant SV (1994) Developmental regulation of a matrix metalloproteinase during regeneration of axolotl appendages. *Dev Biol* 166: 696-703.
145. Vinarsky V, Atkinson DL, Stevenson TJ, Keating MT, Odelberg SJ (2005) Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. *Dev Biol* 279: 86-98.
146. Chalkley DT (1954) A quantitative histological analysis of forelimb regeneration in *Triturus viridescens*. *J Morphol* 94: 21-70.
147. Wolff E, Wey-Schue M (1952) [Experimental demonstration of the migration of regeneration cells in regeneration of limbs in *Triton cristatus*]. *C R Seances Soc Biol Fil* 146: 113-117.
148. Namenwirth M (1974) The inheritance of cell differentiation during limb regeneration in the axolotl. *Dev Biol* 41: 42-56.
149. Dunis DA, Namenwirth M (1977) The role of grafted skin in the regeneration of x-irradiated axolotl limbs. *Dev Biol* 56: 97-109.
150. Holder N (1989) Organization of connective tissue patterns by dermal fibroblasts in the regenerating axolotl limb. *Development* 105: 585-593.
151. Muneoka K, Fox WF, Bryant SV (1986) Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. *Dev Biol* 116: 256-260.

152. Lo DC, Allen F, Brockes JP (1993) Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7230-7234.
153. Echeverri K, Clarke JD, Tanaka EM (2001) In vivo imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema. *Dev Biol* 236: 151-164.
154. Tanaka EM, Gann AA, Gates PB, Brockes JP (1997) Newt myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 136: 155-165.
155. Imokawa Y, Brockes JP (2003) Selective activation of thrombin is a critical determinant for vertebrate lens regeneration. *Curr Biol* 13: 877-881.
156. Tanaka EM, Drechsel DN, Brockes JP (1999) Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes. *Curr Biol* 9: 792-799.
157. McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT (2001) Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13699-13704.
158. Koshiha K, Kuroiwa A, Yamamoto H, Tamura K, Ide H (1998) Expression of *Msx* genes in regenerating and developing limbs of axolotl. *J Exp Zool* 282: 703-714.
159. Kumar A, Velloso CP, Imokawa Y, Brockes JP (2004) The regenerative plasticity of isolated urodele myofibers and its dependence on *MSX1*. *PLoS Biol* 2: E218.
160. Morrison JI, Loof S, He P, Simon A (2006) Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *J Cell Biol* 172: 433-440.
161. Del Rio-Tsonis K, Tsonis PA (2003) Eye regeneration at the molecular age. *Dev Dyn* 226: 211-224.
162. Taylor RR, Forge A (2005) Hair cell regeneration in sensory epithelia from the inner ear of a urodele amphibian. *J Comp Neurol* 484: 105-120.
163. Tsonis PA (2006) How to build and rebuild a lens. *J Anat* 209: 433-437.
164. Tsonis PA (2007) Regeneration via transdifferentiation: the lens and hair cells. *Hear Res* 227: 28-31.
165. Echeverri K, Tanaka EM (2002) Ectoderm to mesoderm lineage switching during axolotl tail regeneration. *Science* 298: 1993-1996.

166. Gardiner DM, Endo T, Bryant SV (2002) The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new. *Semin Cell Dev Biol* 13: 345-352.
167. Mullen LM, Bryant SV, Torok MA, Blumberg B, Gardiner DM (1996) Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development* 122: 3487-3497.
168. Imokawa Y, Yoshizato K (1997) Expression of Sonic hedgehog gene in regenerating newt limb blastemas recapitulates that in developing limb buds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9159-9164.
169. Torok MA, Gardiner DM, Izpisua-Belmonte JC, Bryant SV (1999) Sonic hedgehog (shh) expression in developing and regenerating axolotl limbs. *J Exp Zool* 284: 197-206.
170. Capdevila J, Izpisua Belmonte JC (2001) Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 87-132.
171. Gardiner DM, Blumberg B, Komine Y, Bryant SV (1995) Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development* 121: 1731-1741.
172. Haack H, Gruss P (1993) The establishment of murine Hox-1 expression domains during patterning of the limb. *Dev Biol* 157: 410-422.
173. Yokouchi Y, Sasaki H, Kuroiwa A (1991) Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. *Nature* 353: 443-445.
174. Mescher AL, Neff AW (2006) Limb regeneration in amphibians: immunological considerations. *ScientificWorldJournal* 6: 1-11.
175. Sicard RE (1983) Blood cells and their role in regeneration. I. Changes in circulating blood cell counts during forelimb regeneration. *Exp Cell Biol* 51: 51-59.
176. Gawronska-Kozak B, Bogacki M, Rim JS, Monroe WT, Manuel JA (2006) Scarless skin repair in immunodeficient mice. *Wound Repair Regen* 14: 265-276.
177. Martin P, D'Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, et al. (2003) Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* 13: 1122-1128.

178. Ferguson MW, O'Kane S (2004) Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 839-850.
179. Ruben LN, Selker EU (1975) Polyfunctional antigen-binding specificity in hapten-carrier responses of the newt, *Triturus viridescens*. *Adv Exp Med Biol* 64: 387-395.
180. Schaerlinger B, Fripiat JP (2008) IgX antibodies in the urodele amphibian *Ambystoma mexicanum*. *Dev Comp Immunol* 32: 908-915.
181. Andre S, Kerfourn F, Affaticati P, Guerci A, Ravassard P, et al. (2007) Highly restricted diversity of TCR delta chains of the amphibian Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*) in peripheral tissues. *Eur J Immunol* 37: 1621-1633.
182. Kaufman J, Volk H, Wallny HJ (1995) A "minimal essential Mhc" and an "unrecognized Mhc": two extremes in selection for polymorphism. *Immunol Rev* 143: 63-88.
183. Tournefier A, Laurens V, Chapusot C, Ducoroy P, Padros MR, et al. (1998) Structure of MHC class I and class II cDNAs and possible immunodeficiency linked to class II expression in the Mexican axolotl. *Immunol Rev* 166: 259-277.
184. Houdayer M, Fougereau M (1972) [Phylogeny of immunoglobulins: immune reaction of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Kinetics of the immune response and characterization of antibodies]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 123: 3-28.
185. Cohen N (1969) Chronic skin graft rejection in the Urodela. II. A comparative study of xenograft rejection. *Transplantation* 7: 332-346.
186. Cohen N, Baldwin WM, 3rd, Manickavel V (1975) Phylogeny of functional humoral transplantation immunity: comparative studies in amphibians and rodents. *Adv Exp Med Biol* 64: 411-420.
187. Iten LE, Bryant SV (1975) The interaction between the blastema and stump in the establishment of the anterior--posterior and proximal--distal organization of the limb regenerate. *Dev Biol* 44: 119-147.
188. Maden M (1979) The role of irradiated tissue during pattern formation in the regenerating limb. *J Embryol Exp Morphol* 50: 235-242.
189. Schotté OE, Butler, E.G., Hood, R.T. (1941) Effects of transplanted blastemas on amputated nerveless limbs of urodele larvae. *Proc Soc exp Biol Med* 48: 500-503.

190. Stocum DL (1968) The urodele limb regeneration blastema: a self-organizing system. I. Morphogenesis and differentiation of autografted whole and fractional blastemas. *Dev Biol* 18: 457-480.
191. Galis F, Wagner GP, Jockusch EL (2003) Why is limb regeneration possible in amphibians but not in reptiles, birds, and mammals? *Evol Dev* 5: 208-220.
192. Leask A, Abraham DJ (2004) TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J* 18: 816-827.
193. Letterio JJ, Roberts AB (1998) Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16: 137-161.
194. Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835-870.
195. Morimoto RI (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259: 1409-1410.
196. Parsell DA, Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437-496.
197. Thomson S, Hollis A, Hazzalin CA, Mahadevan LC (2004) Distinct stimulus-specific histone modifications at hsp70 chromatin targeted by the transcription factor heat shock factor-1. *Mol Cell* 15: 585-594.
198. de Larco JE, Todaro GJ (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 4001-4005.
199. Roberts AB, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, et al. (1980) Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 3494-3498.
200. Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Todaro GJ (1984) Rat transforming growth factor type 1: structure and relation to epidermal growth factor. *Science* 223: 1079-1082.
201. Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JE, et al. (1983) Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts

- and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4684-4688.
202. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Frolik CA, et al. (1982) Isolation from murine sarcoma cells of novel transforming growth factors potentiated by EGF. *Nature* 295: 417-419.
 203. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB (1981) New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78: 5339-5343.
 204. Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, et al. (1985) Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 316: 701-705.
 205. Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791.
 206. Schmierer B, Hill CS (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 970-982.
 207. Attisano L, Wrana JL (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296: 1646-1647.
 208. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342: 1350-1358.
 209. Massague J, Blain SW, Lo RS (2000) TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103: 295-309.
 210. Miyazono K, Kusanagi K, Inoue H (2001) Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *Journal of Cellular Physiology* 187: 265-276.
 211. O'Kane S, Ferguson MW (1997) Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 63-78.
 212. Siegel PM, Massague J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 807-821.
 213. Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F, et al. (2001) Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* 158: 305-316.

214. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB (2003) Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116: 217-224.
215. Khalil N (1999) TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* 1: 1255-1263.
216. Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem* 258: 7155-7160.
217. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, et al. (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328.
218. Murphy-Ullrich JE, Poczatek M (2000) Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 59-69.
219. Sato Y, Rifkin DB (1989) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* 109: 309-315.
220. Yu Q, Stamenkovic I (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14: 163-176.
221. Lopez-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, et al. (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF-beta receptor system. *Cell* 67: 785-795.
222. Feng XH, Derynck R (2005) Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-693.
223. Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, Shi G, Lam S, et al. (2004) Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 15: 813-823.
224. Massague J (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-178.
225. Hannon GJ, Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371: 257-261.

226. Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9: 1831-1845.
227. Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massague J (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* 110: 19-32.
228. Liu P, Zhang C, Feng JB, Zhao YX, Wang XP, et al. (2008) Cross talk among Smad, MAPK, and integrin signaling pathways enhances adventitial fibroblast functions activated by transforming growth factor-beta1 and inhibited by Gax. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 725-731.
229. Willis BC, Borok Z (2007) TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L525-534.
230. Pietenpol JA, Holt JT, Stein RW, Moses HL (1990) Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 3758-3762.
231. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, et al. (1986) Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163: 1037-1050.
232. Mishra L, Derynck R, Mishra B (2005) Transforming growth factor-beta signaling in stem cells and cancer. *Science* 310: 68-71.
233. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, et al. (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353.
234. Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, et al. (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13: 189-195.
235. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, et al. (1994) Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8: 345-351.

236. Assoian RK, Sporn MB (1986) Type beta transforming growth factor in human platelets: release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol* 102: 1217-1223.
237. Border WA, Noble NA (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286-1292.
238. Pierce GF, Mustoe TA, Deuel TF (1988) Transforming growth factor beta induces increased directed cellular migration and tissue repair in rats. *Prog Clin Biol Res* 266: 93-102.
239. Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH (1987) Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 165: 251-256.
240. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, et al. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 4167-4171.
241. Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, et al. (1987) Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5788-5792.
242. Assoian RK, Fleurdelys BE, Stevenson HC, Miller PJ, Madtes DK, et al. (1987) Expression and secretion of type beta transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6020-6024.
243. Bascom CC, Wolfshohl JR, Coffey RJ, Jr., Madisen L, Webb NR, et al. (1989) Complex regulation of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Mol Cell Biol* 9: 5508-5515.
244. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, et al. (1990) Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 10: 1492-1497.

245. Zhang M, Fraser D, Phillips A (2006) ERK, p38, and Smad signaling pathways differentially regulate transforming growth factor-beta1 autoinduction in proximal tubular epithelial cells. *Am J Pathol* 169: 1282-1293.
246. Frank S, Madlener M, Werner S (1996) Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 271: 10188-10193.
247. Gailit J, Welch MP, Clark RA (1994) TGF-beta 1 stimulates expression of keratinocyte integrins during re-epithelialization of cutaneous wounds. *J Invest Dermatol* 103: 221-227.
248. Hebda PA (1988) Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explant cultures. *J Invest Dermatol* 91: 440-445.
249. Tredget EB, Demare J, Chandran G, Tredget EE, Yang L, et al. (2005) Transforming growth factor-beta and its effect on reepithelialization of partial-thickness ear wounds in transgenic mice. *Wound Repair Regen* 13: 61-67.
250. Gabbiani G (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200: 500-503.
251. Hinz B (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127: 526-537.
252. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122: 103-111.
253. Bayat A, McGrouther DA, Ferguson MW (2003) Skin scarring. *Bmj* 326: 88-92.
254. Grinnell F (1994) Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 124: 401-404.
255. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146: 56-66.

256. Levine JH, Moses HL, Gold LI, Nanney LB (1993) Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 during excisional wound repair. *Am J Pathol* 143: 368-380.
257. Schmid P, Cox D, Bilbe G, McMaster G, Morrison C, et al. (1993) TGF-beta s and TGF-beta type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. *J Pathol* 171: 191-197.
258. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW (1992) Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor beta. *Lancet* 339: 213-214.
259. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW (1994) Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci* 107: 1137-1157.
260. Shah M, Foreman DM, Ferguson MW (1995) Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 108: 985-1002.
261. Huang JS, Wang YH, Ling TY, Chuang SS, Johnson FE, et al. (2002) Synthetic TGF-beta antagonist accelerates wound healing and reduces scarring. *Faseb J* 16: 1269-1270.
262. Allanore Y, Wipff J, Kahan A, Boileau C (2007) Genetic basis for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine* 74: 577-583.
263. Trojanowska M, Varga J (2007) Molecular pathways as novel therapeutic targets in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 19: 568-573.
264. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, et al. (1993) Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 770-774.
265. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, et al. (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-699.
266. Prud'homme GJ, Piccirillo CA (2000) The inhibitory effects of transforming growth factor-beta-1 (TGF-beta1) in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 14: 23-42.

267. Koch RM, Roche N.S., Parks W.T., Ashcroft G.S., Letterio J.J., Roberts A.B. (2000) Incisional wound healing in transforming growth factor-beta1 null mice. *Wound Rep Reg* 8: 179-191.
268. Crowe MJ, Doetschman T, Greenhalgh DG (2000) Delayed wound healing in immunodeficient TGF-beta 1 knockout mice. *J Invest Dermatol* 115: 3-11.
269. Ashcroft GS, Yang X, Glick AB, Weinstein M, Letterio JL, et al. (1999) Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* 1: 260-266.
270. Falanga V, Schraye D, Cha J, Butmarc J, Carson P, et al. (2004) Full-thickness wounding of the mouse tail as a model for delayed wound healing: accelerated wound closure in Smad3 knock-out mice. *Wound Repair Regen* 12: 320-326.
271. Martin P, Parkhurst SM (2004) Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131: 3021-3034.
272. Wadman M (2005) Scar prevention: the healing touch. *Nature* 436: 1079-1080.
273. Cowin AJ, Holmes TM, Brosnan P, Ferguson MW (2001) Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur J Dermatol* 11: 424-431.
274. Martin P, Dickson MC, Millan FA, Akhurst RJ (1993) Rapid induction and clearance of TGF beta 1 is an early response to wounding in the mouse embryo. *Dev Genet* 14: 225-238.
275. Soo C, Beanes SR, Hu FY, Zhang X, Dang C, et al. (2003) Ontogenetic transition in fetal wound transforming growth factor-beta regulation correlates with collagen organization. *Am J Pathol* 163: 2459-2476.
276. Rolfe KJ, Irvine LM, Grobbelaar AO, Linge C (2007) Differential gene expression in response to transforming growth factor-beta1 by fetal and postnatal dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen* 15: 897-906.
277. Rolfe KJ, Richardson J, Vigor C, Irvine LM, Grobbelaar AO, et al. (2007) A role for TGF-beta1-induced cellular responses during wound healing of the non-scarring early human fetus? *J Invest Dermatol* 127: 2656-2667.

278. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425: 577-584.
279. Letamendia A, Labbe E, Attisano L (2001) Transcriptional regulation by Smads: crosstalk between the TGF-beta and Wnt pathways. *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1: S31-39.
280. Cao Y, Ohwatari N, Matsumoto T, Kosaka M, Ohtsuru A, et al. (1999) TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts. *Pflugers Arch* 438: 239-244.
281. Diez-Fernandez C, Andres D, Cascales M (2002) Attenuating effects of heat shock against TGF-beta1-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med* 33: 835-846.
282. Ellis J (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328: 378-379.
283. Pelham HR (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46: 959-961.
284. Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, et al. (2006) Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol*: 171-198.
285. Ritossa F (1996) Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1: 97-98.
286. Moseley PL (1997) Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Appl Physiol* 83: 1413-1417.
287. Pockley AG, Muthana M, Calderwood SK (2008) The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends Biochem Sci* 33: 71-79.
288. Mosser DD, Morimoto RI (2004) Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 23: 2907-2918.
289. Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858.
290. Zeng XC, Bhasin S, Wu X, Lee JG, Maffi S, et al. (2004) Hsp70 dynamics in vivo: effect of heat shock and protein aggregation. *J Cell Sci* 117: 4991-5000.

291. Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62: 670-684.
292. Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112: 41-50.
293. Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579.
294. Welch WJ, Feramisco JR (1984) Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J Biol Chem* 259: 4501-4513.
295. Fourie AM, Hupp TR, Lane DP, Sang BC, Barbosa MS, et al. (1997) HSP70 binding sites in the tumor suppressor protein p53. *J Biol Chem* 272: 19471-19479.
296. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, et al. (1997) Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272: 18033-18037.
297. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS (2000) Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem* 275: 25665-25671.
298. Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Teshigawara K, Uchida A (1995) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 40: 73-78.
299. Dura JM (1981) Stage dependent synthesis of heat shock induced proteins in early embryos of *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* 184: 381-385.
300. Bienz M (1984) Developmental control of the heat shock response in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3138-3142.
301. Heikkila JJ, Kloc M, Bury J, Schultz GA, Browder LW (1985) Acquisition of the heat-shock response and thermotolerance during early development of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 107: 483-489.
302. Muller WU, Li GC, Goldstein LS (1985) Heat does not induce synthesis of heat shock proteins or thermotolerance in the earliest stage of mouse embryo development. *Int J Hyperthermia* 1: 97-102.

303. Heikkila JJ (1993) Heat shock gene expression and development. I. An overview of fungal, plant, and poikilothermic animal developmental systems. *Dev Genet* 14: 1-5.
304. Prudhomme C, Moreau N, Angelier N (1997) Conditions for a heat shock response during oogenesis and embryogenesis of the amphibian *Pleurodeles waltl*. *Dev Growth Differ* 39: 477-484.
305. Edwards JL, Ealy AD, Hansen PJ (1995) Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology* 44: 329-337.
306. Gabriel JE, da Mota AF, Boleli IC, Macari M, Coutinho LL (2002) Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic hsp70 gene expression. *Growth Dev Aging* 66: 27-33.
307. Loones MT, Morange M (1998) Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo. *Cell Stress Chaperones* 3: 237-244.
308. Krone PH, Evans TG, Blechinger SR (2003) Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 14: 267-274.
309. Oberringer M, Baum HP, Jung V, Welter C, Frank J, et al. (1995) Differential expression of heat shock protein 70 in well healing and chronic human wound tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 1009-1014.
310. Laplante AF, Moulin V, Auger FA, Landry J, Li H, et al. (1998) Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem* 46: 1291-1301.
311. Kwon SB, Young C, Kim DS, Choi HO, Kim KH, et al. (2002) Impaired repair ability of hsp70.1 KO mouse after UVB irradiation. *J Dermatol Sci* 28: 144-151.
312. Healy C, Mulhall KJ, Fitz Patrick D, Kay EW, Bouchier-Hayes D (2007) The effect of thermal preconditioning of the limb on flexor tendon healing. *J Hand Surg Eur Vol* 32: 289-295.
313. Mulhall KJ, McLaughlin R, Kay E, Kiely P, Bouchier-Hayes D, et al. (2002) Thermal preconditioning prevents peritendinous adhesions and inflammation. *Clin Orthop Relat Res*: 258-266.

314. Harder Y, Contaldo C, Klenk J, Banic A, Jakob SM, et al. (2004) Improved skin flap survival after local heat preconditioning in pigs. *J Surg Res* 119: 100-105.
315. Capon A, Mordon S (2003) Can thermal lasers promote skin wound healing? *Am J Clin Dermatol* 4: 1-12.
316. Klosterhalfen B, Klinge U, Tietze L, Henze U, Muys L, et al. (2000) Expression of heat shock protein 70 (HSP70) at the interface of polymer-implants in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 11: 175-181.
317. Kovalchin JT, Wang R, Wagh MS, Azoulay J, Sanders M, et al. (2006) In vivo delivery of heat shock protein 70 accelerates wound healing by up-regulating macrophage-mediated phagocytosis. *Wound Repair Regen* 14: 129-137.
318. Flohe SB, Bangen JM, Flohe S, Agrawal H, Bergmann K, et al. (2007) Origin of immunomodulation after soft tissue trauma: potential involvement of extracellular heat-shock proteins. *Shock* 27: 494-502.
319. Strom TB, Field LJ, Ruediger M (2002) Allogeneic stem cells, clinical transplantation and the origins of regenerative medicine. *Curr Opin Immunol* 14: 601-605.
320. Badylak SF (2007) The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* 28: 3587-3593.
321. Wong T, McGrath JA, Navsaria H (2007) The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *Br J Dermatol* 156: 1149-1155.
322. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
323. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.
324. Simon HG, Tabin CJ (1993) Analysis of Hox-4.5 and Hox-3.6 expression during newt limb regeneration: differential regulation of paralogous Hox genes suggest different roles for members of different Hox clusters. *Development* 117: 1397-1407.
325. Roy S, Gardiner DM, Bryant SV (2000) Vaccinia as a tool for functional analysis in regenerating limbs: ectopic expression of Shh. *Dev Biol* 218: 199-205.

326. Krone PH (2003) Heat shock proteins in development, aging, and evolution. *Semin Cell Dev Biol* 14: 249.
327. Bienz M (1984) *Xenopus* hsp 70 genes are constitutively expressed in injected oocytes. *Embo J* 3: 2477-2483.
328. Patruno M, Thorndyke MC, Candia Carnevali MD, Bonasoro F, Beesley PW (2001) Growth factors, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. *J Exp Biol* 204: 843-848.
329. Nye HL, Cameron JA, Chernoff EA, Stocum DL (2003) Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. *Dev Dyn* 226: 555-560.
330. Beauchemin M, Noiseux N, Tremblay M, Savard P (1994) Expression of Hox A11 in the limb and the regeneration blastema of adult newt. *Int J Dev Biol* 38: 641-649.
331. Heikkila JJ, Ohan N, Tam Y, Ali A (1997) Heat shock protein gene expression during *Xenopus* development. *Cell Mol Life Sci* 53: 114-121.
332. Vlaskalin T, Wong CJ, Tsilfidis C (2004) Growth and apoptosis during larval forelimb development and adult forelimb regeneration in the newt (*Notophthalmus viridescens*). *Dev Genes Evol* 214: 423-431.
333. Uzawa M, Grams J, Madden B, Toft D, Salisbury JL (1995) Identification of a complex between centrin and heat shock proteins in CSF-arrested *Xenopus* oocytes and dissociation of the complex following oocyte activation. *Dev Biol* 171: 51-59.
334. Lee JE, Kim YJ, Kim JY, Lee WT, Yenari MA, et al. (2004) The 70 kDa heat shock protein suppresses matrix metalloproteinases in astrocytes. *Neuroreport* 15: 499-502.
335. Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L (2000) Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif* 33: 341-365.
336. Geraci F, Agueli C, Giudice G, Sconzo G (2003) Localization of HSP70, Cdc2, and cyclin B in sea urchin oocytes in non-stressed conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 748-753.
337. Stone LS (1967) An investigation recording all salamanders which can and cannot regenerate a lens from the dorsal iris. *J Exp Zool* 164: 87-103.

338. O'Connell-Rodwell CE, Shriver D, Simanovskii DM, McClure C, Cao YA, et al. (2004) A genetic reporter of thermal stress defines physiologic zones over a defined temperature range. *Faseb J* 18: 264-271.
339. Kregel KC (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92: 2177-2186.
340. Echeverri K, Tanaka EM (2003) Electroporation as a tool to study in vivo spinal cord regeneration. *Dev Dyn* 226: 418-425.
341. Ueda Y, Kondoh H, Mizuno N (2005) Generation of transgenic newt *Cynops pyrrhogaster* for regeneration study. *Genesis* 41: 87-98.
342. Roy S, Martel J, Ma S, Tenenhouse HS (1994) Increased renal 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase messenger ribonucleic acid and immunoreactive protein in phosphate-deprived Hyp mice: a mechanism for accelerated 1,25-dihydroxyvitamin D3 catabolism in X-linked hypophosphatemic rickets. *Endocrinology* 134: 1761-1767.
343. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
344. Welch WJ, Suhan JP (1986) Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol* 103: 2035-2052.
345. Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, et al. (1992) Inhibition of the activation of heat shock factor in vivo and in vitro by flavonoids. *Mol Cell Biol* 12: 3490-3498.
346. Jakubowicz-Gil J, Rzymowska J, Gawron A (2002) Quercetin, apoptosis, heat shock. *Biochem Pharmacol* 64: 1591-1595.
347. Hosokawa N, Hirayoshi K, Nakai A, Hosokawa Y, Marui N, et al. (1990) Flavonoids inhibit the expression of heat shock proteins. *Cell Struct Funct* 15: 393-401.
348. Goss RJ (1980) Prospects of regeneration in man. *Clin Orthop Relat Res*: 270-282.
349. Han M, Yang X, Taylor G, Burdsal CA, Anderson RA, et al. (2005) Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anat Rec B New Anat* 287: 14-24.

350. Singer M, Salpeter MM (1961) Regeneration in vertebrates: The role of the wound epithelium. In: Zarrow MX, editor. *Growth in Living Systems*. New York: Basic Books. pp. 277-311.
351. Chodorowska G, Rogus-Skorupska D (2004) Cutaneous wound healing. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med]* 59: 403-407.
352. Clark RA (1985) Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol* 13: 701-725.
353. Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* 6: 199-213.
354. Madlener M (1998) Differential expression of matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors in acute murine skin wounds. *Arch Dermatol Res* 290 Suppl: S24-29.
355. Burt DW, Law AS (1994) Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res* 5: 99-118.
356. Huang SS, Huang JS (2005) TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem* 96: 447-462.
357. Kane CJ, Hebda PA, Mansbridge JN, Hanawalt PC (1991) Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 148: 157-173.
358. Endo T, Bryant SV, Gardiner DM (2004) A stepwise model system for limb regeneration. *Dev Biol* 270: 135-145.
359. Cash DE, Gates PB, Imokawa Y, Brockes JP (1998) Identification of newt connective tissue growth factor as a target of retinoid regulation in limb blastemal cells. *Gene* 222: 119-124.
360. Callahan JF, Burgess JL, Fornwald JA, Gaster LM, Harling JD, et al. (2002) Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *J Med Chem* 45: 999-1001.
361. Bayliss PE, Bellavance KL, Whitehead GG, Abrams JM, Aegerter S, et al. (2006) Chemical modulation of receptor signaling inhibits regenerative angiogenesis in adult zebrafish. *Nat Chem Biol* 2: 265-273.

362. Inman GJ, Nicolas FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, et al. (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62: 65-74.
363. Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, et al. (2002) Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542. *Mol Pharmacol* 62: 58-64.
364. Liu XJ, Ruan CM, Gong XF, Li XZ, Wang HL, et al. (2005) Antagonism of transforming growth factor-Beta signaling inhibits fibrosis-related genes. *Biotechnol Lett* 27: 1609-1615.
365. Mori Y, Ishida W, Bhattacharyya S, Li Y, Plataniias LC, et al. (2004) Selective inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling blocks profibrotic transforming growth factor beta responses in skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 50: 4008-4021.
366. Wu S, Peng J, Duncan MR, Kasisomayajula K, Grotendorst G, et al. (2007) ALK-5 mediates endogenous and TGF-beta1-induced expression of connective tissue growth factor in embryonic lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36: 552-561.
367. Letterio JJ, Roberts AB (1996) Transforming growth factor-beta1-deficient mice: identification of isoform-specific activities in vivo. *J Leukoc Biol* 59: 769-774.
368. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W (2005) Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* 26: 743-774.
369. Tam BY, Finnson KW, Philip A (2003) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins regulate transforming growth factor-beta signaling in human keratinocytes. *J Biol Chem* 278: 49610-49617.
370. Piek E, Franzen P, Heldin CH, ten Dijke P (1997) Characterization of a 60-kDa cell surface-associated transforming growth factor-beta binding protein that can interfere with transforming growth factor-beta receptor binding. *J Cell Physiol* 173: 447-459.
371. Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, et al. (1991) Expression cloning and characterization of the TGF-beta type III receptor. *Cell* 67: 797-805.

372. Quan T, He T, Kang S, Voorhees JJ, Fisher GJ (2004) Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-beta type II receptor/Smad signaling. *Am J Pathol* 165: 741-751.
373. Quan T, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ (2001) Ultraviolet irradiation blocks cellular responses to transforming growth factor-beta by down-regulating its type-II receptor and inducing Smad7. *J Biol Chem* 276: 26349-26356.
374. Keski-Oja J, Raghow R, Sawdey M, Loskutoff DJ, Postlethwaite AE, et al. (1988) Regulation of mRNAs for type-1 plasminogen activator inhibitor, fibronectin, and type I procollagen by transforming growth factor-beta. Divergent responses in lung fibroblasts and carcinoma cells. *J Biol Chem* 263: 3111-3115.
375. Quan G, Choi JY, Lee DS, Lee SC (2005) TGF-beta1 up-regulates transglutaminase two and fibronectin in dermal fibroblasts: a possible mechanism for the stabilization of tissue inflammation. *Arch Dermatol Res* 297: 84-90.
376. Finnson KW, Tam BY, Liu K, Marcoux A, Lepage P, et al. (2006) Identification of CD109 as part of the TGF-beta receptor system in human keratinocytes. *Faseb J* 20: 1525-1527.
377. Sun Z, Jin P, Tian T, Gu Y, Chen YG, et al. (2006) Activation and roles of ALK4/ALK7-mediated maternal TGFbeta signals in zebrafish embryo. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 694-703.
378. Ho DM, Chan J, Bayliss P, Whitman M (2006) Inhibitor-resistant type I receptors reveal specific requirements for TGF-beta signaling in vivo. *Dev Biol* 295: 730-742.
379. James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132: 1273-1282.
380. Hutchison C, Pilote M, Roy S (2007) The axolotl limb: a model for bone development, regeneration and fracture healing. *Bone* 40: 45-56.
381. Grose R, Martin P (1999) Parallels between wound repair and morphogenesis in the embryo. *Semin Cell Dev Biol* 10: 395-404.

382. Wang XJ, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG (2006) Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 11: 112-117.
383. Sicard RE (1985) Regulation of vertebrate limb regeneration. New York: Oxford University Press. ix, 185 p. p.
384. Montesano R, Carrozzino F, Soulie P (2007) Low concentrations of transforming growth factor-beta-1 induce tubulogenesis in cultured mammary epithelial cells. *BMC Dev Biol* 7: 7.
385. Ninomiya K, Takahashi A, Fujioka Y, Ishikawa Y, Yokoyama M (2006) Transforming growth factor-beta signaling enhances transdifferentiation of macrophages into smooth muscle-like cells. *Hypertens Res* 29: 269-276.
386. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, et al. (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 755-764.
387. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, et al. (1997) *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765-771.
388. Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, et al. (2000) Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20: 8783-8792.
389. Maeda S, Hayashi M, Komiya S, Imamura T, Miyazono K (2004) Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells. *Embo J* 23: 552-563.
390. Roberts AB (1995) Transforming growth factor-beta: activity and efficacy in animal models of wound healing. *Wound rep reg* 3: 408-418.
391. Chang J, Thunder R, Most D, Longaker MT, Lineaweaver WC (2000) Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF-beta1 increases postoperative range of motion. *Plast Reconstr Surg* 105: 148-155.

392. Jester JV, Barry-Lane PA, Petroll WM, Olsen DR, Cavanagh HD (1997) Inhibition of corneal fibrosis by topical application of blocking antibodies to TGF beta in the rabbit. *Cornea* 16: 177-187.
393. Lu L, Saulis AS, Liu WR, Roy NK, Chao JD, et al. (2005) The temporal effects of anti-TGF-beta1, 2, and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. *J Am Coll Surg* 201: 391-397.
394. Nath RK, Kwon B, Mackinnon SE, Jensen JN, Reznik S, et al. (1998) Antibody to transforming growth factor beta reduces collagen production in injured peripheral nerve. *Plast Reconstr Surg* 102: 1100-1106; discussion 1107-1108.
395. Schultze-Mosgau S, Wehrhan F, Rodel F, Amann K, Radespiel-Troger M, et al. (2004) Anti-TGFbeta1 antibody for modulation of expression of endogenous transforming growth factor beta 1 to prevent fibrosis after plastic surgery in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 42: 112-119.
396. Jazwinska A, Badakov R, Keating MT (2007) Activin-betaA Signaling Is Required for Zebrafish Fin Regeneration. *Curr Biol* 17: 1390-1395.
397. Levesque M, Guimond JC, Pilote M, Leclerc S, Moldovan F, et al. (2005) Expression of heat-shock protein 70 during limb development and regeneration in the axolotl. *Dev Dyn* 233: 1525-1534.
398. Luna LG, Armed Forces Institute of Pathology (U.S.), Armed Forces Institute of Pathology (U.S.). (1968) Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York,: Blakiston Division. xii, 258 p. p.
399. Finnson KW, Parker WL, ten Dijke P, Thorikay M, Philip A (2008) ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res* 23: 896-906.
400. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, et al. (2003) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* 12: 817-828.
401. Cherner JA, Naik L, Tarnawski A, Brzozowski T, Stachura J, et al. (1989) Ability of prostaglandin to reduce ethanol injury to dispersed chief cells from guinea pig stomach. *Am J Physiol* 256: G704-714.

402. Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL, Macaluso CK (1983) A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res* 43: 749-757.
403. Makino S, Whitehead GG, Lien CL, Kim S, Jhavar P, et al. (2005) Heat-shock protein 60 is required for blastema formation and maintenance during regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14599-14604.
404. Kumamoto T, Togo S, Ishibe A, Morioka D, Watanabe K, et al. (2008) Role of nitric oxide synthesized by nitric oxide synthase 2 in liver regeneration. *Liver Int.*
405. Riederer I, Negroni E, Bigot A, Bencze M, Di Santo J, et al. (2008) Heat shock treatment increases engraftment of transplanted human myoblasts into immunodeficient mice. *Transplant Proc* 40: 624-630.
406. Gardiner DM (2005) Ontogenetic decline of regenerative ability and the stimulation of human regeneration. *Rejuvenation Res* 8: 141-153.
407. Roberts AB (1998) Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 24: 111-119.
408. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214: 199-210.
409. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005) Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 13: 7-12.
410. Flanders KC (2004) Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85: 47-64.
411. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A (2001) Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 276: 17058-17062.
412. Yanagisawa K, Osada H, Masuda A, Kondo M, Saito T, et al. (1998) Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF-beta in human normal lung epithelial cells. *Oncogene* 17: 1743-1747.
413. Maden M, Hind M (2003) Retinoic acid, a regeneration-inducing molecule. *Dev Dyn* 226: 237-244.

414. Stinchcombe SV, Maden M (2008) Retinoic acid induced alveolar regeneration: critical differences in strain sensitivity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 185-191.
415. Heyer J, Escalante-Alcalde D, Lia M, Boettinger E, Edelmann W, et al. (1999) Postgastrulation Smad2-deficient embryos show defects in embryo turning and anterior morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12595-12600.
416. Piek E, Ju WJ, Heyer J, Escalante-Alcalde D, Stewart CL, et al. (2001) Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem* 276: 19945-19953.
417. Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL (2007) A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem* 101: 9-33.
418. Ho DM, Whitman M (2008) TGF-beta signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Dev Biol* 315: 203-216.
419. Wang H, Rajan S, Liu G, Chakrabarty S (2008) Transforming growth factor beta suppresses beta-catenin/Wnt signaling and stimulates an adhesion response in human colon carcinoma cells in a Smad4/DPC4 independent manner. *Cancer Lett* 264: 281-287.
420. Gingery A, Bradley EW, Pederson L, Ruan M, Horwood NJ, et al. (2008) TGF-beta coordinately activates TAK1/MEK/AKT/NFkB and SMAD pathways to promote osteoclast survival. *Exp Cell Res*.
421. Ghosh S, Roy S, Seguin C, Bryant SV, Gardiner DM (2008) Analysis of the expression and function of Wnt-5a and Wnt-5b in developing and regenerating axolotl (*Ambystoma mexicanum*) limbs. *Dev Growth Differ* 50: 289-297.
422. Kawakami Y, Rodriguez Esteban C, Raya M, Kawakami H, Marti M, et al. (2006) Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev* 20: 3232-3237.
423. Yokoyama H, Ogino H, Stoick-Cooper CL, Grainger RM, Moon RT (2007) Wnt/beta-catenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration. *Dev Biol* 306: 170-178.

424. Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger A, Adams JL (1999) p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors--mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther* 82: 389-397.
425. Ninomiya-Tsuji J, Kajino T, Ono K, Ohtomo T, Matsumoto M, et al. (2003) A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* 278: 18485-18490.
426. Satoh A, Graham GM, Bryant SV, Gardiner DM (2008) Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Biol* 319: 321-335.
427. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453: 314-321.
428. Zaccaria RA (1996) A laboratory classroom exercise: cell migration in cutaneous wound healing and pigmentary pattern formation in the red-spotted newt. *Int J Dev Biol* 40: 897-899.
429. Reynolds LE, Conti FJ, Lucas M, Grose R, Robinson S, et al. (2005) Accelerated re-epithelialization in beta3-integrin-deficient mice is associated with enhanced TGF-beta1 signaling. *Nat Med* 11: 167-174.
430. Grose R, Harris BS, Cooper L, Topilko P, Martin P (2002) Immediate early genes *krox-24* and *krox-20* are rapidly up-regulated after wounding in the embryonic and adult mouse. *Dev Dyn* 223: 371-378.
431. Braddock M (2001) The transcription factor *Egr-1*: a potential drug in wound healing and tissue repair. *Ann Med* 33: 313-318.
432. Stelnicki EJ, Komuves LG, Holmes D, Clavin W, Harrison MR, et al. (1997) The human homeobox genes *MSX-1*, *MSX-2*, and *MOX-1* are differentially expressed in the dermis and epidermis in fetal and adult skin. *Differentiation* 62: 33-41.
433. Sobkow L, Epperlein HH, Herklotz S, Straube WL, Tanaka EM (2006) A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Dev Biol* 290: 386-397.

434. Beck CW, Christen B, Barker D, Slack JM (2006) Temporal requirement for bone morphogenetic proteins in regeneration of the tail and limb of *Xenopus* tadpoles. *Mech Dev* 123: 674-688.
435. Beck CW, Christen B, Slack JM (2003) Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Dev Cell* 5: 429-439.
436. Pearl EJ, Barker D, Day RC, Beck CW (2008) Identification of genes associated with regenerative success of *Xenopus laevis* hindlimbs. *BMC Dev Biol* 8: 66.
437. Yamamoto A, Hen R, Dauer WT (2001) The ons and offs of inducible transgenic technology: a review. *Neurobiol Dis* 8: 923-932.
438. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990) Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110: 2195-2207.
439. Hayamizu TF, Sessions SK, Wanek N, Bryant SV (1991) Effects of localized application of transforming growth factor beta 1 on developing chick limbs. *Dev Biol* 145: 164-173.
440. Ferguson CM, Schwarz EM, Puzas JE, Zuscik MJ, Drissi H, et al. (2004) Transforming growth factor-beta1 induced alteration of skeletal morphogenesis in vivo. *J Orthop Res* 22: 687-696.
441. Kawakami Y, Rodriguez-Leon J, Belmonte JC (2006) The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 18: 723-729.
442. Cox DA (1995) Transforming growth factor-beta 3. *Cell Biol Int* 19: 357-371.
443. Occleston NL, O'Kane S, Goldspink N, Ferguson MW (2008) New therapeutics for the prevention and reduction of scarring. *Drug Discov Today* 13: 973-981.
444. Ban CR, Twigg SM (2008) Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers. *Vasc Health Risk Manag* 4: 575-596.
445. Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJ, Ferguson MW (2002) Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med* 19: 440-447.

446. Luo X, Yang H, Kim IS, Saint-Hilaire F, Thomas DA, et al. (2005) Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3⁺ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation* 79: 1091-1096.

Annexe 1

Expériences effectuées afin d'isoler la séquence codante pour *Tgf-β3* chez l'axolotl

Plusieurs expériences ont été tentées dans le but d'isoler la séquence codante (ADNc) pour *Tgf-β3* chez l'axolotl.

1- Tout d'abord, plusieurs rondes de PCR à l'aide d'amorces dégénérées ont été effectuées en prenant de l'ARN de larves d'axolotl comme matériel de départ (Tableau 2, p. III). Ceci permet d'avoir accès à la multitude de gènes exprimés lors du développement embryonnaire. La séquence codante de plusieurs gènes a été isolée avec cette technique au laboratoire (*Tgf-β1*, *Runx-2*, *Sox-9*, *Bmp-2*, *Bmp-5*, *Bmp-7*, *Smad3*, et plusieurs autres). De nombreux produits de PCR ont été soumis au séquençage sans jamais correspondre à *Tgf-β3*.

2- Plusieurs rondes de criblage d'une librairie d'ADNc d'axolotl provenant de la compagnie Stratagene ont aussi été effectuées (Tableau 3, p. IV) (Axolotl cDNA library # cat. 937670, Stratagene, La Jolla, CA).

De plus, sur des échantillons de protéines, des expériences d'immunobuvardage Western ont été réalisées sans donner de résultats reproductibles. Les anticorps suivant ont été testés : l'anticorps polyclonal anti-TGF- β 3 sc-83 de Santa Cruz (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA) et l'anticorps polyclonal anti-TGF- β 3 RB-9262-PO de Neomarkers (Neomarkers, Fremont CA).

Tableau 2 – Amorces utilisées pour tenter d'isoler la séquence de Tgf- β 3 par PCR

<u>Amorce</u>	<u>Type</u>	<u>Séquence</u>
dFTGFB3	dégénérée	catgaagatgyackyrcaaag
dRTGFB3	dégénérée	ctgyttkgcwatrtgytcatc
PDFT3A	dégénérée	garathyayaarttygayatg
PDFT3B	dégénérée	caytgyccntgycayacntt
PDRT3B	dégénérée	cknacrcarcarttytctc
PDRT3A	dégénérée	arrctyngngnacrcarca
CFT3-270	spécifique – poulet	agatggaggaggagaaggag
CRT3-770	spécifique – poulet	ctccaagacctcatgtaagt
hTB3F76	spécifique - humain	acttgaccaccttgactt
hTB3R1076	spécifique - humain	ctgtgggttgctctgact
hTB3F110	spécifique - humain	agaagagggtggaagccatt
hTB3R827	spécifique - humain	gggttggtgatccttctg

Où r = a+g, y = c+t, m = a+c, k = g+t, s = g+c, w = a+t, h = a+t+c, b = g+t+c, d = g+a+t, n = a+c+g+t, v = g+a+c

Tableau 3 - Expériences de criblage de librairie d'ADNc d'axolotl effectuées pour tenter d'isoler la séquence de Tgf- β 3

<u>Criblage</u>	<u>Sonde</u>	<u>Nombre de plages criblées</u>	<u>Nombre d'excisions</u>
1- Primaire	poulet	300000	-
1- Secondaire	poulet	3000	12
2- Primaire	humain	300000	-
2- Secondaire	humain	3000	4
3- Primaire	humain	300000	-
3- Secondaire	humain	3000	1
4- Primaire	humain	150000	-
4- Secondaire	humain	1500	4
5- Primaire	humain	150000	-
5- Secondaire	humain	3000	4
6- Primaire	humain	600000	-
6- Secondaire	humain	3000	4

Annexe 2

Liste des prix et bourses obtenus pendant mes études supérieures

- Prix d'excellence du Réseau de recherche en santé buccodentaire et osseuse du Québec pour une présentation par affiche faite lors de la journée scientifique de la Faculté de médecine dentaire de l'Université de Montréal
125\$ reçus en janvier 2008.
- Bourse d'excellence du FODQ (Fondation de l'ordre des dentistes du Québec) reçue du Réseau de recherche en santé buccodentaire et osseuse du Québec
3 000\$ reçus en mai 2007.
- Bourse de voyage pour étudiant donnée par le comité organisateur du 3rd *European conference on Regeneration: Cellular and molecular basis of regeneration and tissue repair*
500 Euros reçus en septembre 2006
- Bourse de doctorat du Réseau de recherche en santé buccodentaire et osseuse du Québec
17 000\$ par année pour 3 ans reçus en avril 2004
- Bourse d'étude pour le passage direct au doctorat de la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal
7 000\$ par année pour 2 ans, reçus en septembre 2003
- Prix d'excellence pour une présentation par affiche dans la catégorie biologie moléculaire lors du Congrès des stagiaires en recherche de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal
800\$ reçus en janvier 2003

Liste des présentations effectuées au cours de mes études supérieures

- **Lévesque M.**, Roy S., (2008), Présentation orale, Characterization of scarless wound healing in the axolotl, Présentée au British society for developmental biology/British society for cell biology joint meeting, du 31 Mars au 3 Avril 2008, University of Warwick, Angleterre.
- **Lévesque M.**, Gatién S., Finnson K., Desmeules S., Villiard E., Pilote M., Philip A., Roy S., (2008), Présentation par affiche, Transforming growth factor- β signaling is essential for limb regeneration in axolotls, Présentée à la Journée scientifique de la Faculté de médecine dentaire de l'Université de Montréal, le 11 Janvier 2008, Université de Montréal, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Gatién S., Desmeules S., Finnson K., Pilote M., Philip A., Roy S., (2007), Présentation par affiche, Transforming growth factor- β signaling is essential for limb regeneration in axolotls, Présentée à la Journée scientifique du Réseau de recherches en santé buccodentaire et osseuse, le 18 Mai 2007, Auberge Godefroy, Bécancour, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Pilote M., Roy S., (2006), Présentation par affiche, Functional analysis of TGF- β 1 during wound healing and limb regeneration in the axolotl, Présentée au 3rd European conference on Regeneration: Cellular and molecular basis of regeneration and tissue repair, du 10 au 15 Septembre 2006, Ascona, Suisse.
- **Lévesque M.**, Pilote M., Roy S., (2006), Présentation par affiche, Functional analysis of TGF- β 1 during wound healing and limb regeneration in the axolotl, Présentée au 3rd Canadian developmental biology conference/1st Canada regional Society for developmental biology conference, du 6 au 9 Avril 2006, Mont-Tremblant, Québec, Canada.
- Hutchison C., Pilote M., **Lévesque M.**, Roy S., (2006), Présentation par affiche, Cloning and characterization of SOX genes in the axolotl: expression in development and regeneration, Présentée au 3rd Canadian developmental biology conference/1st Canada regional Society for developmental biology conference, du 6 au 9 Avril 2006, Mont-Tremblant, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Pilote M., Roy S., (2005), Présentation par affiche, Characterization of TGF- β 1 expression during wound healing and limb regeneration in the axolotl, Developmental Biology volume 283 supplement, p. 642, Présentée au Society for

developmental biology 64th annual meeting, du 27 Juillet au 1^{er} Août 2005, Hyatt Regency, San Francisco, États-Unis.

- **Lévesque M.**, Guimond J-C., Pilote M., Leclerc S., Moldovan F., Roy S., (2005), Présentation par affiche, Caractérisation des gènes TGF-beta1 et Hsp-70 durant le processus de régénération chez l'axolotl, Présentée à la retraite Louis-Philippe Bouthillier du département de biochimie de l'Université de Montréal, les 10 et 11 Juin 2005, Manoir Saint-Sauveur, Saint-Sauveur, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Pilote M., Guimond J-C., Roy S., (2004), Présentation par affiche, Expression of Hsp-70 during development and limb regeneration in the axolotl, Présentée à la Journée scientifique de la Faculté de médecine dentaire de l'Université de Montréal dans le cadre du centenaire de la Faculté, le 17 Septembre 2004, Hôtel Windsor, Montréal, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Pilote M., Guimond J-C., Roy S., (2004), Présentation par affiche, Expression of Hsp-70 during development and limb regeneration in the axolotl, Developmental Biology volume 271 supplement, p. 627, Présentée au Society for developmental biology 63rd annual meeting, du 24 au 28 Juillet 2004, University of Calgary, Alberta, Canada.
- Pilote M., **Lévesque M.**, Roy S., (2004), Présentation par affiche, The axolotl : a model for bone regeneration, Developmental Biology volume 271 supplement, p. 627, Présentée au Society for developmental biology 63rd annual meeting, du 24 au 28 Juillet 2004, University of Calgary, Alberta, Canada.
- **Lévesque M.**, Villiard E., Roy S., (2004), Présentation par affiche, Étude de l'expression des gènes TGF-β1 et p53 dans le membre en régénération chez l'Axolotl, Présentée au 14^e symposium du département de Biologie de l'Université de Montréal, Janvier 2004, Université de Montréal, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Roy S., (2003), Présentation par affiche, Étude du rôle des gènes de la superfamille des TGF-β dans le membre en régénération chez l'axolotl, Présentée à la rencontre scientifique du Réseau de recherches en santé buccodentaire et osseuse, le 28 Mai 2003, Palais de Congrès de Montréal, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Roy S., (2003), Présentation par affiche, Étude de l'expression du gène BMP-7 dans le membre en régénération chez l'axolotl, Médecine/sciences, vol. 19, supplément 2, p. 38, Présentée au Congrès des stagiaires de recherche e santé de la Faculté de médecine, du CHUM et des centres hospitaliers et instituts de

l'Université de Montréal, le 22 Janvier 2003, Palais des Congrès de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

- Pilote M., **Lévesque M.**, Roy S., (2003), Présentation par affiche, L'axolotl : un modèle pour la régénération osseuse, Médecine/sciences, vol. 19, supplément 2, p. 48, Présentée au Congrès des stagiaires de recherche e santé de la Faculté de médecine, du CHUM et des centres hospitaliers et instituts de l'Université de Montréal, le 22 Janvier 2003, Palais des Congrès de Montréal, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Roy S., Présentation orale, Étude du rôle des gènes de la superfamille des TGF- β dans le membre en régénération chez l'axolotl, Présentée au 13^e symposium du département de Biologie de l'Université de Montréal, Janvier 2003, Université de Montréal, Québec, Canada.
- **Lévesque M.**, Garrel D., (2002), Présentation par affiche, Protocole d'apport en glutamine chez les grands brûlés, Présentée au 13^e symposium du département de Biologie de l'Université de Montréal, Janvier 2002, Université de Montréal, Québec, Canada.

Annexe 3

Articles sous forme publiée