

Université de Montréal

**Analyse fonctionnelle du gène *BMP-2* lors de la
régénération du membre chez l'axolotl**

par

Jean-Charles Guimond

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

Avril 2010

© Jean-Charles Guimond, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Analyse fonctionnelle du gène *BMP-2* lors de la régénération du membre chez l'axolotl

présentée par :

Jean-Charles Guimond

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Guy Boileau Ph.D., président-rapporteur

Stéphane Roy Ph.D., directeur de recherche

Alain Moreau Ph.D., membre du jury

Marie-Andrée Akimenko Ph.D., examinatrice externe

Jean-Claude Labbé Ph.D., représentant du doyen de la FES

Résumé

Les amphibiens urodèles (*e.g.* les axolotls) possèdent la remarquable capacité de régénérer plusieurs parties de leur corps. Ils peuvent, entre autres, régénérer parfaitement un membre amputé par épimorphose, un processus biphasique comprenant une phase de préparation, spécifique à la régénération, et une phase de redéveloppement, commune à l'épimorphose et au développement embryonnaire. Durant la phase de préparation, les cellules du moignon se dédifférencient en cellules pseudo-embryonnaires, prolifèrent et migrent distalement au plan d'amputation pour former un blastème de régénération. Parmi les vertébrés, la dédifférenciation est unique aux urodèles. Afin de mieux comprendre le contrôle moléculaire de la régénération chez les urodèles, nous avons choisi d'étudier *BMP-2*, un facteur de croissance, en raison de son implication dans la régénération des phalanges distales chez les mammifères. Le facteur de transcription *MSX-1* a également été sélectionné en raison de sa capacité à induire la dédifférenciation cellulaire *in vitro* et de son interaction potentielle avec la signalisation des BMPs. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que *BMP-2* et *MSX-1* sont exprimés lors des phases de préparation et de redéveloppement de l'épimorphose, et que leur profil d'expression spatio-temporel est très semblable, ce qui suggère une interaction de leurs signaux. En outre, chez les tétrapodes amniotes, l'expression de *Shh* est restreinte au mésenchyme postérieur des membres en développement et chevauche l'expression de *BMP-2*. Toutefois, l'expression de *BMP-2* n'est pas restreinte à la région postérieure mais forme un gradient postéro-antérieur. *Shh* est le principal régulateur de la formation du patron de développement antéro-postérieur du

membre. Étant donné les domaines d'expression chevauchants de *BMP-2* et *Shh* et la restriction postérieure d'expression de *Shh*, on croit que Shh régule la formation du patron de développement de postérieur à antérieur par l'activation de l'expression de *BMP-2*. Fait intéressant, l'axolotl exprime également *Shh* dans la région postérieure, mais le développement des pattes se fait de la région antérieure à la région postérieure au lieu de postérieur à antérieur comme chez les autres tétrapodes, et ceci durant le développement et la régénération. Nous avons utilisé cette caractéristique de l'axolotl pour démontrer que la signalisation Shh ne structure pas l'autopode via *BMP-2*. En effet, l'expression de *BMP-2* n'est pas régulée par l'inhibition de la signalisation Shh, et son expression est du côté opposé à celle de *Shh* durant le développement et la régénération des pattes de l'axolotl. Il a été observé durant le développement du membre chez la souris que *MSX-1* est régulé par la signalisation Shh. Nos résultats ont démontrés que chez l'axolotl, *MSX-1* ne semble pas régulé par l'inhibition de la signalisation Shh au cours de la régénération du membre. De plus, nous avons démontré que contrairement à l'expression de *Shh*, l'expression de *BMP-2* est corrélée avec l'ordre de formation des phalanges, est impliquée dans la condensation cellulaire et dans l'apoptose précédant la chondrogenèse. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de *BMP-2* dans l'initiation de l'ossification endochondrale. Enfin, nous avons démontré que la signalisation BMP est indispensable pour l'épimorphose du membre durant la phase de redéveloppement.

Mots-clés : Urodèle, axolotl, régénération du membre, dédifférenciation, formation de patron, condensation, apoptose, *BMP-2*, *MSX-1*, *Shh*.

Abstract

Urodele amphibians (*e.g.* the axolotls) have a remarkable ability to regenerate parts of their body. They will, among other things, fully regenerate an amputated limb by epimorphosis, a biphasic process comprising a preparation phase, specific to the regeneration, and a redevelopment phase, common to epimorphosis and embryonic development. During the preparation phase, the cells of the stump dedifferentiate into embryonic-like cells, proliferate and migrate distally from the level of amputation to form a regeneration blastema. Among vertebrates, the process of dedifferentiation is unique to urodeles. To better understand the molecular control of regeneration in urodeles, we chose to study BMP-2, a growth factor, because of its involvement in mammalian digit tip regeneration. The transcription factor MSX-1 has also been selected because of its ability to induce cellular dedifferentiation *in vitro* and its potential interaction with BMPs signaling. The results presented in this thesis show that *BMP-2* and *MSX-1* are expressed during phases of preparation and redevelopment of epimorphosis, and their spatio-temporal expression profiles are very similar at each stage of epimorphosis, suggesting an interaction of their signals during regeneration. In addition, in tetrapod amniotes, the expression of *Shh* is restricted to the posterior mesenchyme of developing limbs and overlaps with the expression of *BMP-2*. However, the expression of *BMP-2* is not restricted to the posterior region but forms a posterior-anterior gradient. *Shh* is the main regulator of the anterior-posterior pattern formation of developing limbs. Given the overlapping expression domains of *Shh* and *BMP-2*, and the expression restriction of *Shh* in posterior, *Shh* is believed to

regulate the pattern formation of developing limbs by the activation of *BMP-2* expression. Interestingly, the axolotl also expresses *Shh* in the posterior region, but the limb develops from anterior to posterior rather than posterior to anterior as in other tetrapods, and this, during development and epimorphosis. We used this feature of the axolotl to demonstrate that Shh signaling does not regulate pattern formation through *BMP-2*. Indeed, the expression of *BMP-2* is not regulated by the inhibition of hh signaling, and its expression is opposite to that of *Shh* during development and regeneration of the axolotl limb. It was observed, during limb development in mice that *MSX-1* is regulated by Shh signaling. Our results suggest that in the axolotl, *MSX-1* is not regulated by the inhibition of Shh signaling during limb regeneration. Furthermore, we demonstrated that unlike the expression of *Shh*, the expression of *BMP-2* is correlated with the order of formation of the phalanges, is involved in cell condensation and apoptosis preceding chondrogenesis. Taken together, these results suggest a role for BMP-2 in the initiation of endochondral ossification. Finally, we demonstrated that BMP signaling is essential for the redevelopment phase of limb epimorphosis.

Keywords: Urodele, axolotl, limb regeneration, dedifferentiation, pattern formation, condensation, apoptosis, BMP-2, MSX-1, Shh.

Table des matières

Introduction	1
1.0 Une brève histoire de la régénération	2
1.1 La médecine régénérative	3
1.1.1 Les transplantations de cellules souches	4
1.1.2 Créer nos propres cellules souches à partir de nos cellules adultes	6
1.1.3 Livrer les cellules souches ou leur contenu curatif	8
1.2 Le choix d'un modèle de recherche en biologie de la régénération	10
1.3 La régénération chez les modèles invertébrés	12
1.4 La régénération chez les modèles vertébrés	14
1.4.1 La régénération physiologique de maintien	15
1.4.2 L'hypertrophie et l'hyperplasie compensatrice	16
1.4.2.1 L'hypertrophie	16
1.4.2.2 L'hyperplasie compensatrice	16
1.4.3 La régénération de réparation	17
1.5 L'axolotl, un modèle de recherche pour l'étude de la régénération chez les vertébrés	18
1.6 L'épimorphose de la patte d'urodèle	20
1.6.1 La phase de préparation	25
1.6.1.1 La formation d'un épithélium de guérison et sa transformation en coiffe apicale épidermique	25

1.6.1.2 La réaction immunitaire au site d'amputation	30
1.6.1.3 La dédifférenciation cellulaire et la formation du blastème de régénération	31
1.6.1.4 La formation du patron de développement du blastème	34
1.6.1.4.1 L'axe proximodistal (de l'épaule vers les doigts)	34
1.6.1.4.2 L'axe antéropostérieur (de l'index vers l'auriculaire)	36
1.6.1.4.3 L'axe dorsoventral (du revers de la main vers la paume)	37
1.6.1.5 Le modèle de coordonnées polaires	39
1.6.1.6 La dépendance aux nerfs	44
1.6.2 La phase de redéveloppement	45
1.7 La peau, importante source de cellules pour la formation du blastème de régénération	50
1.8 Les gènes d'intérêts	53
1.8.1 Muscle Segment Homeobox Gene 1 (<i>MSX-1</i>)	57
1.8.2 Bone morphogenetic protein-2 (<i>BMP-2</i>)	63
1.8.2.1 La biosynthèse des BMPs	64
1.8.2.2 Activation des récepteurs des BMPs et transduction de la signalisation intracellulaire	68
1.8.2.3 Quelques modes de régulation de la signalisation BMP	69
1.8.2.4 Rôles physiologiques de BMP-2	73
1.9 Les perspectives de la médecine régénérative	77
1.10 Hypothèses et objectifs	79
Chapitre 1 – Article 1	81
2.0 Mise en contexte	83

2.1 Contribution des auteurs	85
2.2 Autorisation de l'éditeur et des auteurs pour incorporer l'article dans la thèse en vue de son indexation et de sa diffusion	86
2.3 Page couverture de l'article – BMP-2 functions independently of Shh signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs	87
2.4 Abstract	88
2.4.1 Background	88
2.4.2 Results	88
2.4.3 Conclusion	89
2.5 Background	90
2.6 Results	95
2.6.1 Cloning and analysis of <i>BMP-2</i>	95
2.6.2 <i>BMP-2</i> and <i>SOX-9</i> expression during limb development	96
2.6.3 Effects of blocking Shh signaling in developing digits	100
2.6.3.1 14 days	101
2.6.3.2 21 days	102
2.6.4 <i>BMP-2</i> and <i>SOX-9</i> expression during limb regeneration	105
2.6.5 Effects of blocking Shh signaling on regenerating digits	109
2.6.6 Overexpression of <i>BMP-2</i> and <i>Noggin</i> in regenerating limbs	113
2.7 Discussion	125
2.8 Conclusion	127

2.9 Methods	128
2.9.1 Animal maintenance and surgery	128
2.9.2 Cloning of axolotl <i>BMP-2</i> full length cDNA	129
2.9.3 Whole-mount <i>in situ</i> hybridization	129
2.9.4 Whole mount skeletal staining of limbs	131
2.9.5 Histology	131
2.9.6 Cyclopamine treatments	131
2.9.7 Luciferase assays	133
2.9.8 Injections and electroporation of constructs	134
2.9.9 BrdU incorporation assay	134
2.9.10 TUNEL assay	136
2.9.11 Image treatments	136
2.10 Author's contributions	137
2.11 Acknowledgements	137
2.12 Additional files	139
Chapitre 2 – Article 2	149
3.0 Mise en contexte	151
3.1 Contribution des auteurs	155
3.2 Autorisation des auteurs pour incorporer l'article dans la thèse, en vue de son indexation et de sa diffusion	156

3.3 Page couverture de l'article – Expression pattern of <i>MSX-1</i> during limb regeneration in axolotl	157
3.4 Abstract	158
3.5 Results and discussion	160
3.5.1 <i>MSX-1</i> expression pattern during epimorphosis of the limb	161
3.5.2 Effects of blocking Hh signalling on the expression of <i>MSX-1</i>	166
3.6 Conclusion	169
3.7 Experimental procedures	169
3.7.1 Animal maintenance and surgery	169
3.7.2 Whole-mount <i>in situ</i> hybridization	170
3.7.3 Cyclopamine treatments	171
3.7.4 Image treatments	172
3.8 Acknowledgements	172
<i>Chapitre 3 – Discussion</i>	173
4.0 Analyse des résultats	174
4.1 Perspectives de recherche dans notre laboratoire	179
4.2 Perspectives de recherche en biologie de la régénération	180
<i>Bibliographie</i>	192
<i>Appendice 1 - Article publié en co-auteur</i>	226

Appendice 2 – Résultats supplémentaires _____ 267

**Annexe 1 – Similarités entre les protéines BMP-2 et BMP-4 et expériences effectuées afin d'isoler
la séquence codante pour le gène BMP-4 chez l'axolotl _____ 278**

Liste des figures

<i>Figure 1.1: Les stades de référence de l'épimorphose de la patte chez l'axolotl</i>	23
<i>Figure 1.2 : Formation de l'épithélium de guérison et de la CAE suite à l'amputation de la patte supérieure chez l'axolotl mature</i>	28
<i>Figure 1.3: Formation et croissance du blastème de régénération durant l'épimorphose de la patte supérieure chez l'axolotl mature</i>	32
<i>Figure 1.4: Le modèle de coordonnées polaires</i>	42
<i>Figure 1.5: Phase de redéveloppement de la patte supérieure chez l'axolotl mature</i>	48
<i>Figure 1.6: Expérience de régénération d'une patte irradiée aux rayon-X restaurée par une greffe de peau non-irradiée</i>	51
<i>Figure 1.7: Schématisation de la synthèse des BMPs</i>	66
<i>Figure 1.8: Voies de signalisation ostéogénique activées par les BMPs</i>	71
<i>Figure 2.1: Expression patterns (whole mount in situ hybridisation) for BMP-2, SOX-9 and Shh in developing limbs and cartilage staining (Victoria blue; V.b.)</i>	98
<i>Figure 2.2: Expression of BMP-2 and SOX-9 detected by whole mount in situ hybridisation, and cartilage staining in developing limbs treated with cyclopamine</i>	103
<i>Figure 2.3: Expression pattern, by whole mount in situ hybridisation, for BMP-2, SOX-9 and Shh transcript, and cartilage staining of skeletal elements at different stages of limb regeneration</i>	107

Figure 2.4: Expression pattern, by whole mount in situ hybridisation, for BMP-2 and SOX-9 in regenerating limbs treated with cyclopamine	111
Figure 2.5: Activation of BMP responsive promoter construct by ectopic expression of axolotl BMP-2	115
Figure 2.6: Ectopic expression of axolotl BMP-2 and <i>Xenopus laevis</i> Noggin by electroporating the expression plasmids directly into regenerating limbs	119
Figure 2.7: Histological analysis, cellular proliferation and apoptosis of regenerating limbs transfected with axolotl BMP-2, <i>Xenopus laevis</i> Noggin and mRFP	123
Figure S1: Sequence analysis of axolotl BMP-2	139
Figure S2: Expression of BMP-2 and SOX-9 at stage 45 of limb development	141
Figure S3: Expression of BMP-2 and SOX-9 at MB with cyclopamine	143
Figure S4: Primers	145
Figure S5: In vivo electroporation	147
Figure 3.1: Expression pattern by whole mount in situ hybridization for MSX-1 during different stages of limb regeneration	164
Figure 3.2: Expression pattern by whole mount in situ hybridization for MSX-1 at the MB stage in regenerating limb treated with cyclopamine from the time of amputation	167

Liste des sigles et abréviations

AEC: apical ectodermal cap, signifie « CAE; coiffe apicale ectodermique »

AER: apical ectodermal ridge, signifie « crête apicale ectodermique »

ARNm: acide ribonucléique messenger

CAE: coiffe apicale ectodermique

cca: circa, signifie « environ »

cm: centimètre

©: Copyright

EB: early bud, signifie « bourgeon primaire »

ED: early differentiation, signifie « bourgeon au stade différenciation primaire »

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

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

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

LB: late bud, signifie « bourgeon tardif »

LPM : lateral plate mesoderm, signifie « lame latérale du mésoderme »

MB: medium bud, signifie « bourgeon moyen »

mm: millimètre

mm³: millimètre cube

ms: milliseconde

Pal: palette, signifie « bourgeon au stade palette »

PCM: polar coordinate model, signifie « modèle de coordonnées polaires »

PCR: polymerase chain reaction

PZ: progress zone, signifie « zone de progression »

®: Registered trade-mark, signifie « MD; Marque de commerce déposée au sens de la loi »

s:seconde

sp.: espèce

TM: Trade Mark, signifie « MC ; Marque de Commerce non déposée au sens de la loi »

ZPA: zone of polarizing activity, signifie « zone d'activité polarisante »

*À tous les patients amputés de l'Institut
de Réadaptation de Montréal que j'ai
rencontrés à maintes reprises; l'espoir
qui jaillit de votre regard sur les
chercheurs m'a toujours stimulé à faire
mon travail du mieux que je le pouvais.*

Remerciements

Bon ça y est, la dernière section à écrire de la thèse. Pas besoin de «End Note » pour celle là. Je ne pourrai pas remercier personnellement tout le monde qui a contribué de près ou de loin à cette thèse, alors je m'en tiendrai à ceux qui ont contribué de près.

Qui pourrait être plus près de ma thèse que mon directeur de recherche; Stéphane Roy. Dire qu'avant d'intégrer son labo, je buvais du décaféiné! Heureusement, il m'a ouvert les yeux et enseigné par l'exemple les bienfaits de la caféine sur le cerveau. Stéphane, je te remercie de m'avoir permis d'étudier dans un domaine qui me fascine considérablement. Tu es une véritable encyclopédie ambulante et tes connaissances font de toi un chercheur compétent. En conséquence, tu as toujours su répondre à mes questions et ton assistance constante a été très appréciée. Il y a cependant une seule question à laquelle tu ne m'as pas encore répondu: Dans combien d'année(s) la médecine régénérative sera t'elle en mesure de régénérer un membre?! Pour toutes nos conversations philosophiques, politiques et scientifiques, pour ton soutien et pour ton aide constante au cours des dernières années, merci.

Un gros merci aux membres de ma famille, Antonio, Paulette et Johanne, pour m'avoir encouragé et supporté chacun à votre manière durant ce long retour aux études. Je savais que ça ne serait pas de tout repos pour ma petite tête d'ouvrier, mais votre confiance en moi m'a beaucoup aidée à atteindre mes objectifs. Imaginez, un électricien qui voulait faire

un doctorat. Vous étiez bien les seuls qui croyaient vraiment que je me rendrai à la défense de ma thèse. Pour votre support et vos encouragements constants, je vous remercie énormément.

Un merci particulier à Clarice Nishio, ma petite « Brazilian, Carioca, Paulista, Japanese CANADIAN girl », l'une des bonnes choses que m'a apportées ce doctorat. Merci pour ton support et ta compréhension ma chérie, spécialement au cours des dernières semaines!

Je veux également remercier ceux qui ont partagé la majorité de mon temps durant ces années au doctorat; mes chers collègues. Premièrement, ceux qui étaient là avant moi, les pionniers du laboratoire, soit Mireille Pilote, Éric Villiard et Mathieu Lévesque. Mireille et moi on ne s'est pas côtoyé longtemps puisqu'elle terminait sa maîtrise alors que je commençais mon doctorat, mais c'est tout de même elle qui m'a montré à faire un PCR. Eh oui, quand j'ai commencé mon doctorat, mes connaissances de la biologie moléculaire étaient très restreintes, pour ne pas dire inexistantes. Éric, un gars très intelligent, fiable et honnête qui gagne à être connu. S'il a une tâche à accomplir, il la fera toujours consciencieusement et honnêtement. Il pratique le vélo extrême, l'escalade extrême et le kayak extrême, mais bonne chance si vous voulez le faire parler au téléphone cellulaire ou lui faire boire une bière, car il vous dira que c'est dangereux pour la santé! Éric, on garde contact pour le kayak, je vais finir par avoir du temps pour les loisirs bientôt j'espère. Mathieu, l'homme aux milles surnoms! Quant je pense à Mathieu, la première image qui

me vient en tête, c'est de le voir entrer au laboratoire à 11h26 de l'avant midi en disant: « Bon matin tout le monde! ». Il nous a toujours fait mourir de rire Sophie et moi avec cette phrase classique. Il aime bien se donner un air sérieux mais en fait, c'est un pince sans rire. Mathieu est maintenant post doctorant au Royaume Uni et je suis bien content pour lui, car je sais que c'est ce qu'il désirait vraiment. De toute évidence, il va suivre la voix de la recherche académique et je suis certain qu'il fera un excellent chercheur universitaire. Donc à vous trois, je dis merci pour l'aide que vous m'avez apporté chacun à votre manière, pour les nombreux bons moments passés au labo, et pour Éric et Mathieu, également à l'extérieur du labo. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous et bien que les années passées à faire un doctorat ne sont pas une partie de plaisir à chaque jour, vous avez contribué à le rendre agréable. Mathieu, spécialement pour toi: « Cheerio! »

Je veux également remercier ceux qui sont arrivés après moi dans le laboratoire, soit Sophie Desmeules, Cara Hutchison, Samuel Gatien et Étienne Vincent. Sophie, ma chère « trottinette », un gros merci pour tout les lentivirus que tu as synthétisés pour nous tous pendant près de deux ans. Malheureusement, le sort à voulu qu'ils ne fonctionnent pas chez l'axolotl, mais c'est ça un axolotl, ça fait toujours différent des autres modèles. Heureusement, sinon il ne régénérerait pas parfaitement! Ta compagnie fut toujours agréable quand nous prenions quotidiennement notre bon « caf » du matin sur la table abritant des « p'tits oiseaux » dans le café de chimie pendant que mes gels courraient, que tes virus centrifugeaient et que tu me racontais tes joies et tes peines. Ces moments font

partie des bons souvenirs que je garderai de mes années passées au « Labo Roy ». Bon, c'est le tour du « gros », c'est-à-dire Samuel «PCR» Gatien, le gars qui commande plus d'amorces de PCR à lui seule en une semaine que le département de biochimie au complet en un an. J'ai sincèrement eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi Sam et je dois l'avouer, tu étais celui que j'adorais le plus embêter. Mais c'est normal, c'est toujours ceux qui on le dos large qui écopent le plus! Tu étudies des gènes plus qu'intéressants pour la régénération et maintenant que tu as cloné les smads 1, 5, 8 & 2, 3, 9 & 4 & 6, 7 et peut-être des nouveaux (on ne sait jamais avec toi!), j'ai bien hâte de voir les résultats que tu vas nous sortir dans ta première publication. Ici je dois ajouter Sacha Blain au groupe de ceux qui sont arrivés après moi. En fait, Sacha faisait partie du « package deal » qui venait avec Sam. Elle n'est pas officiellement de notre labo, quoi que... Provenant d'un laboratoire satellite, Sacha était à toutes nos rencontres de laboratoire (fête, diner, 5@7 ...). D'ailleurs, je crois qu'elle devrait aussi assister au «lab meeting» du lundi matin! Sacha, ta présence aux alentours du laboratoire a toujours été agréable et en plus, quand tu étais là, je n'avais pas de besoin de tenir Sam par la main, donc ça me donnait une pause! Ici, je dois mentionner que l'une des choses les plus drôle que j'ai vue dans ce laboratoire, c'est ton visage changer après que tu aies fait une petite blague à Mathieu qui n'était pas dans sa meilleur forme ce jour là. Comme on dit, c'était «priceless». Cara maintenant. Cara est passé très rapidement dans le laboratoire pour y empocher une maîtrise et quand je pense à Cara, je l'imagine venir me voir en disant: mais qu'est-ce que tu « faisez »? En provenance directement de Winnipeg, elle avait des petits problèmes (vraiment petits) avec la langue

française, mais c'est ce qui lui donnait son charme. J'ai pris un vilain plaisir à lui balancer des phrases en français qui ne faisaient absolument aucun sens dans le seul but de la confondre un peu. Avec le temps, elle a compris mon jeu et quand je lui parlais, si elle ne comprenait pas ce que je lui disais dès le début, elle considérait que je ne disais rien d'intelligible et m'ignorait tout simplement. Aujourd'hui, c'est moi qui suis dans un milieu de langue étrangère et c'est à mon tour de me faire taquiner. Je sais maintenant par quoi elle a dû passer durant sa maîtrise et je lui lève mon chapeau. Cara, « je remercie toi pour toutes les bonnes moments que j'avons eu dans la laboratoire ». Enfin, le petit dernier: Étienne. Je n'ai pas travaillé longtemps avec lui, mais de ce que j'ai vu, ça s'annonçait bien ses affaires. C'est lui qui continue mon projet avec le gène *MSX-1* et j'ai vraiment hâte de voir ce qui va sortir de ces résultats. J'ai plein d'hypothèses en tête en ce qui concerne le rôle de *MSX-1* dans la régénération. Étienne j'ai hâte de voir si tu vas valider au moins une de mes hypothèses. Donc à vous quatre (cinq), je dis la même chose qu'aux trois pionniers: Merci pour l'aide que vous m'avez apporté chacun à votre manière, et pour les nombreux bons moments passés au labo et à l'extérieur du labo.

Quand je pense à chacun d'entre vous sept (huit), les pionniers et les suivants, j'ai sincèrement que de bons souvenirs qui me viennent à l'esprit.

Je veux aussi remercier tous les stagiaires qui ont passé au laboratoire. Ici je vais me contenter de les nommer car il y aurait beaucoup trop d'anecdotes à raconter. 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 et Hien Nguyen. Merci de votre aide. Un merci plus particulier à Pierre-Luc et Jérémie qui ont passé plus d'un été au labo et qui m'ont beaucoup aidé durant leur passage.

Je veux aussi remercier les membres de trois laboratoires que j'ai toujours considérés comme des laboratoires cousins car je m'y suis toujours senti un peu comme chez-nous et je crois que la réciproque est la même pour ces membres: Le professeur Jean Barbeau et son équipe : Annie Leduc, Élisabeth Fafard, Jacinthe Séguin, Daniel Chartrand, Cristina Irimes, Zohra Bendouah, Jean-François Ross, et Sabrina Gravel. Le professeur Antonio Nanci et son équipe : Charles E. Smith, Rima Wazen, Clarice Nishio, Micheline Fortin, Sylvia Francis Zalzal, Karine Sellin, Cynthia Török et Pierre Moffatt. Le professeur Anie Philip et son équipe: Kenneth Finsson, Albane Bizet et Joshua Vorstenbosch.

Merci également à Louise Beaudriault, technicienne en coordination de travail de bureau à la faculté de médecine dentaire. Merci Louise pour tout le travail administratif que tu as accompli pour moi et également pour la quantité phénoménale de barres de protéine énergétiques de marque Atkins que tu m'as donnée. Il faut croire que je devais parfois avoir l'air malade! Merci aussi pour toutes ces conversations et ces faux rires que tu nous as procuré dans le laboratoire.

Je veux également remercier Sylvie Beauchemin, notre technicienne en gestion des dossiers étudiants au département de biochimie. Je n'ose même pas imaginer ce qu'aurait l'air le département sans Sylvie. Véritable pierre angulaire du département, Sylvie fait partie de ces gens extrêmement compétents qui accomplissent leur travail avec une efficacité exceptionnelle et ce, toujours avec le sourire. Posez une question à n'importe qui au département à propos de cours au baccalauréat, à la maîtrise ou au doctorat, de règles départementales, du comité de thèse, de l'examen pré-doctoral ... La réponse ne se fera pas attendre longtemps et elle sera souvent: je ne suis pas certain, mais si tu va voir Sylvie Beauchemin, elle pourra répondre à ta question et régler ton problème. Sylvie, un sincère GROS merci.

Enfin, je veux également remercier les membres de mon comité de thèse. Merci au professeur Marko Horb, un monsieur qui en plus de siéger sur mon comité, nous a généreusement donné plusieurs constructions plasmidiques toutes prêtes à utiliser pour l'expression de différents gènes. Merci également aux professeurs Muriel Aubry et Mark Featherstone pour avoir apporté une analyse externe objective à mon projet et pour leurs conseils et encouragements.

Finalement, merci à tous les étudiants, techniciens, secrétaires et professeurs que j'ai côtoyé durant mes années au doctorat, ce serait à peu près impossible de tous les nommer ...

“The ultimate in regeneration is to grow an entire organism from a single cell. When the ovum does it, the distinction between reproduction and regeneration disappears.”

- Richard J. Goss

Introduction

1.0 Une brève histoire de la régénération

Depuis des millénaires, la régénération est un sujet d'intérêt pour l'homme et on peut en retracer des descriptions à différentes époques. Dans la mythologie grecque (810-790 av. J-C), on relate que Prométhée, ayant volé le feu de Zeus pour le remettre aux mortels, fût puni pour son crime. En guise de punition, Zeus enchaîna Prométhée à un rocher. Chaque jour, un aigle venait dévorer son foie, mais chaque soir, son foie était régénéré (Tsonis, 1996). Heureusement pour Prométhée, il fût libéré par Hercules qui brisa ses chaînes et tua l'aigle (Stocum, 2006), mettant fin à un cycle autrement éternel d'hépatectomie et de régénération hépatique. La légende de Prométhée suggère que les anciens Grecs étaient conscients du phénomène de la régénération hépatique. Le mot « foie » correspond au mot grec « hepar » qui provient du verbe « hepaomai » qui signifie réparer. On retrouve également des descriptions de cas de régénération dans les notes du célèbre philosophe Aristote (384-322 av. J-C). En effet, dans ses traités de biologie, Aristote décrit la repousse de la queue amputée chez le lézard et le serpent (Dinsmore, 1996).

La première véritable observation scientifique de la régénération a été rapportée en 1712 par René Antoine Ferchault de Réaumur qui fournit une description détaillée de la régénération de la patte chez l'écrevisse (Reaumur, 1712). Au cours de ce siècle, un certain nombre d'études sur la régénération furent réalisées chez différents organismes: en 1740, Abraham Trembley publia ses travaux sur la régénération de l'hydre (Lenhoff and Lenhoff,

1991); en 1745, Charles Bonnet ses travaux sur les annélides (Carlson, 2007a); en 1768 Lazzaro Spallanzani ses travaux sur les amphibiens (Dinsmore, 1991) et en 1774, Peter Simon Pallas ses travaux sur le ver planaire (Pallas, 1774). Mais jusqu'à l'élaboration des techniques histologiques et de la théorie de la cellule par Matthias Schleiden et Théodore Schwann en 1838, l'étude de la régénération se limitait à des descriptions macroscopiques (Carlson, 2007a). Au début du 20^{ième} siècle il y eut des descriptions histologiques détaillées du processus de la régénération chez différentes espèces. Par contre, après quelques temps, l'étude de la régénération mamifère perdit de l'intérêt étant donnée l'absence apparent de potentiel de régénération des tissus humains (Carlson, 2007a). La deuxième guerre mondiale amena une recrudescence de l'intérêt pour la régénération du membre, entre autres chez le *Xenopus*. Bien que plusieurs ouvrages furent publiés à cette époque, l'étude de la régénération perdit à nouveau de l'intérêt (Carlson, 2007a). Ce n'est que vers la fin du 20^{ième} siècle avec de nouvelles connaissances sur la morphogenèse que l'intérêt pour la régénération reprit (Carlson, 2007a). Aujourd'hui, notre compréhension de la régénération est encore très sommaire. Toutefois, la quête du secret de ce phénomène remarquable a clairement ré-émergée et les attentes sont élevées.

1.1 La médecine régénérative

Lorsqu'un individu subit une amputation ou de graves brûlures, différentes solutions prothétiques ou chirurgicales s'offrent à lui pour faciliter sa réadaptation. Bien que certaines de ces solutions offrent des résultats impressionnants, la fonction, et l'esthétique

de la structure amputée ou brûlée ne sont à peu près jamais complètement rétablies (O'Toole et al., 2008, Thombs et al., 2008, Franke, 2009). Par exemple, la meilleure main myoélectrique existant sur le marché est certainement très utile pour un amputé, mais elle est encore très loin d'offrir toutes les caractéristiques que peut offrir une main humaine: puissance combinée à la motricité fine; somesthésie; proprioception et le réseau neural complexe associé à toutes ces fonctions. C'est pourquoi la médecine régénérative tente de régénérer des structures plutôt que de fabriquer de toutes pièces ce que l'évolution a mis des millions d'années à perfectionner (Bell et al., 1991). La médecine régénérative est une nouvelle branche de la médecine combinant principalement la médecine à la biologie de la régénération, aux nanotechnologies et à la bio-ingénierie tissulaire. L'approche principale utilisée en médecine régénérative est la transplantation de tissus (autogéniques, allogéniques ou xénogéniques) ou de cellules souches. Les cellules souches peuvent être transplantées directement ou via leur intégration préalable dans un tissu bioartificiel (Wu et al., 1996, Brundin et al., 2000, Carpenter et al., 2003, Carpenter et al., 2004, Chen et al., 2007). Dans ce dernier cas on isole des cellules souches et on les manipule dans le but de diriger leur différenciation (Bianco and Robey, 2001). Toutefois, les manipulations nécessaires au contrôle de la différenciation cellulaire sont encore loin d'être au point.

1.1.1 Les transplantations de cellules souches

Beaucoup d'énergie a été déployée pour le développement de thérapies régénératrices utilisant des cellules souches embryonnaires (ESC). Leur pluripotence leur confère la

possibilité de se transformer en cellules de presque tous les tissus du corps humain (Carpenter et al., 2003), mais plusieurs difficultés rendent les ESC difficiles d'utilisation. Puisque les ESC proviennent généralement de fœtus issus d'interruptions volontaires de grossesses, d'embryons surnuméraires issus de fécondations *in vitro* ou de sang de cordon ombilical, leur quantité est généralement insuffisante pour qu'elles puissent être utilisées directement et elles doivent donc au préalable être amplifiées *in vitro* (Deierborg et al., 2008). Le fort potentiel des ESC à former des tératomes (Dressel et al., 2008), le contrôle complexe de leur différenciation (Bianco and Robey, 2001, Carpenter et al., 2003) et leur assujettissement à l'immuno-rejet allogénique (Carpenter et al., 2004, Trigona et al., 2007), sont des obstacles importants à leur utilisation en médecine régénérative. D'autres difficultés spécifiques à leurs différentes applications peuvent s'ajouter à leur utilisation. Pour ne citer qu'un seul exemple, dans le traitement de la maladie de Parkinson, on cherche à régénérer des neurones dopaminergiques dans le cerveau. On injecte des ESC dans le cerveau, mais un maximum de 20% des cellules survivent (Brundin et al., 2000), et de cette proportion, 3 à 20% deviendront des neurones dopaminergiques (Deierborg et al., 2008). Ce qui veut dire que dans le meilleur des cas, seulement 4% des cellules injectées accompliront la tâche visée. En général, l'efficacité de la transplantation des ESC est encore loin d'être optimale et le problème d'éthique relié à la destruction d'embryons humains pour obtenir les cellules souches demeure.

Les cellules souches adultes (ASC) offrent certains avantages sur les ESC. Une autogreffe d'ASC ne requiert pas de destruction d'embryon et ne subit pas d'immuno-rejet. Bien que les ASC ne possèdent pas une aussi grande capacité de différenciation que les ESC, elles offrent quand même un bon nombre de possibilités et certains avantages intéressants. Par exemple, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) de la moelle osseuse sont facilement amplifiables *in vitro* et peuvent se différencier en chondrocytes, en ostéocytes ou en adipocytes (Deans and Moseley, 2000). On peut également extraire des ASC du tissu adipeux par simple liposuction et les réinjecter pour une correction mammaire mineure (Moseley et al., 2006). Par contre, la plupart des ASC présentent aussi des difficultés d'utilisation. Elles sont aussi sujettes à l'immuno-rejet allogénique dans le cas des allogreffes et leur potentiel de différenciation, bien qu'elles soient multipotentes, diminue avec l'âge (D'Ippolito et al., 1999, Huibregtse et al., 2000).

1.1.2 Créer nos propres cellules souches à partir de nos cellules adultes

Étant donné les difficultés d'utilisation des ESC ou des ASC, les chercheurs tentent de produire *in vitro* des cellules pluripotentes par dédifférenciation cellulaire. La dédifférenciation cellulaire est le processus par lequel une cellule adulte retrouve des capacités pseudo-embryonnaire (Odelberg, 2005) (le processus de dédifférenciation cellulaire sera discuté en détail à la section 1.7.1.3). En 2006, un groupe de recherche a réussi à induire la dédifférenciation cellulaire de fibroblastes adultes par régulation épigénétique chez la souris (Takahashi and Yamanaka, 2006), et en 2007, un autre groupe a

obtenu les mêmes résultats chez l'humain (Yu et al., 2007). Dans les deux cas, l'introduction de quatre gènes, à l'aide de vecteurs viraux, a été suffisante pour induire la dédifférenciation cellulaire et obtenir des cellules pluripotentes. Les cellules obtenues, nommées « induced pluripotent stem cells » (iPSC) ont démontrées des caractéristiques équivalentes aux ESC. Les iPSC ont un potentiel de différenciation supérieur aux ASC et comme ce sont des cellules autologues, elles ne subiront pas d'auto-rejet allogénique comme les ESC provenant d'embryons. Toutefois, la transfection virale aléatoire des quatre gènes dans le génome des cellules hôtes a soulevé des inquiétudes pour l'utilisation thérapeutique des iPSC en raison des dangers d'induction de tumeurs qu'elles représentent. En mars 2009, des chercheurs canadiens de l'hôpital Mount Sinai à Toronto ont contourné le problème d'intégration virale aléatoire et ont réussi à produire des iPSC à l'aide d'un système nommé PiggyBac transposon/transposase ne nécessitant pas l'intégration des transgènes dans le génome de l'hôte (Woltjen et al., 2009). Enfin, encore plus récemment (mai 2009), un autre groupe de recherche est parvenu à induire des iPSC sans introduire de matériel génétique dans les cellules hôtes. Dans ce dernier cas, les cellules ont été induites par l'introduction directe de quatre protéines (Oct4, SOX2, Klf4 et c-Myc) en les fusionnant avec un peptide de pénétration permettant de traverser la membrane cytoplasmique des cellules hôtes (Kim et al., 2009). Cette percée importante pourrait permettre de contourner l'utilisation des ESC et des ASC en médecine régénérative, éliminant ainsi plusieurs problèmes. Par contre, le contrôle de la différenciation des iPSC demeure un défi.

1.1.3 Livrer les cellules souches ou leur contenu curatif

Comme il a été mentionné précédemment, les cellules souches peuvent être transplantées directement ou via leur intégration préalable dans un tissu bioartificiel (Wu et al., 1996, Brundin et al., 2000, Piskin, 2002, Carpenter et al., 2003, Carpenter et al., 2004, Chen et al., 2007). Ces tissus bioartificiels sont constitués de cellules souches incorporées dans une matrice contenant du collagène et des polymères (Piskin, 2002, Sato et al., 2009). Pour les autogreffes, des polymères naturels ou synthétiques biodégradables sont utilisés afin de favoriser l'incorporation des cellules afin qu'elles participent directement à la régénération (Piskin, 2002). Pour les allogreffes et les xélogreffes, des capsules fermées de polymères non biodégradables sont utilisées (Piskin, 2002). Dans ce cas, on ne tente pas d'incorporer ces cellules dans le tissu à restaurer, mais on compte sur les molécules libérées par les cellules pour favoriser la régénération. Elles peuvent alors favoriser l'angiogénèse locale, supporter la protection contre le stress oxydatif ou supporter la prolifération et la survie des cellules hôtes (Madhavan et al., 2005, Chen et al., 2008, Katchman et al., 2008, Madhavan et al., 2008, Sato et al., 2009). Déjà, on utilise couramment des extraits de matrice extracellulaire xénogénique en chirurgie de reconstruction afin de favoriser la régénération de tissus ou d'organes reconstruits (Badylak and Gilbert, 2008). L'isolement de molécules pro régénératives est d'ailleurs une partie importante des recherches effectuées en médecine régénérative et en biologie de la régénération (Markintantova Iu, 2006, Lin et al.).

Les applications des tissus bioartificiels sont multiples. La peau synthétique, contenant les éléments principaux de la peau naturelle, est utilisée en clinique pour couvrir des plaies de larges excisions chirurgicales de peau brûlée (Waymack et al., 2000) ou des plaies d'ulcères diabétiques (Veves et al., 2001) durant leur guérison. Les tissus bioartificiels sont également utilisés pour tenter de régénérer des organes, comme les tubules rénaux (MacKay et al., 1998) ; les os (Yang et al., 2004); les muscles (Powell et al., 2002); la vessie (Gabouev et al., 2003), les voies respiratoires (Sato et al., 2009), etc. Bien que les cellules souches améliorent la fonction et la régénération du tissu receveur, elles peuvent parfois induire la formation de tératomes (Carpenter et al., 2003, Nishio et al., 2006, Cai et al., 2007) et leur utilisation doit donc être prudente.

Qu'elles soient utilisées directement ou via l'intermédiaire de tissus bioartificiels, l'efficacité des cellules souches (et éventuellement des iPSC) nécessitera un meilleur contrôle de leur différenciation et ce sera probablement le prochain défi à relever avant de pouvoir les utiliser systématiquement dans des applications médicales. La salamandre, le modèle de recherche qui a été utilisé pour obtenir les résultats présentés dans cette thèse, peut produire naturellement des cellules dédifférenciées suite à un traumatisme et elle maîtrise parfaitement les étapes subséquentes de différenciation de ces cellules afin de régénérer une patte amputée sans laisser de cicatrice. L'étude de ces étapes chez la salamandre apportera possiblement des connaissances clés pour obtenir des cellules pseudo

embryonnaire par dédifférenciation cellulaire et le contrôle de leur différenciation subséquente pour les incorporer dans un tissu à régénérer.

1.2 Le choix d'un modèle de recherche en biologie de la régénération

Le choix d'un modèle de recherche est régulièrement un sujet de questionnement pour les chercheurs. Il n'existe pas de modèles parfaits répondant à toutes les exigences mais chaque modèle peut apporter un élément de compréhension particulier.

Les cultures cellulaires sont efficaces pour identifier et caractériser des voies de signalisation spécifiques ou des interactions moléculaires pratiquement impossibles à étudier *in vivo*. Par exemple, la levure s'est avérée un outil particulièrement puissant pour détecter des interactions protéine-protéine grâce au système de double hybride (Young, 1998). Toutefois, les cultures cellulaires, bien qu'extrêmement utiles, ne pourraient permettre d'étudier des phénomènes physiologiques complexes impliquant l'interaction de plusieurs types cellulaires tels que ceux impliqués dans la régénération d'une patte. À l'opposé, l'utilisation d'un seul modèle animal pourrait s'avérer restrictif. Il est donc utile de combiner les modèles cellulaires et les modèles animaux pour étudier la régénération dans son ensemble.

Par exemple, le poisson zèbre (*Danio rerio*) peut régénérer une partie de ses nageoires par épimorphose. La partie pouvant régénérer contient différents types cellulaires, comme par exemple du tissu osseux et de l'épiderme, et opère des interactions épithélio-mésenchymateuses, un phénomène important en régénération (Akimenko et al., 2003). Le séquençage du génome du poisson zèbre est presque complété et les croisements génétiques chez cet animal sont très rapides (Ny et al., 2006). Il est également possible de créer des poissons mutants thermosensibles qui permettent à l'animal de se développer normalement (Johnson and Weston, 1995) et d'activer des mutations uniquement durant l'épimorphose de la nageoire. Les animaux incapables de régénérer leur nageoire à cause de la mutation sont alors facilement repérés par un simple dépistage visuel. Ainsi, bien que les nageoires du poisson zèbre ne possèdent pas la complexité de la structure d'une patte, elles constituent un excellent modèle d'étude en régénération, particulièrement pour la régénération de l'os.

Les urodèles amphibiens, particulièrement les salamandres et les tritons des familles *Ambystomatidae* et *Salamandridae*, possèdent une capacité inégalée parmi les vertébrés à régénérer parfaitement des structures complexes par épimorphose (Wallace, 1981). Toutefois, utiliser les salamandres pour étudier la génétique de l'épimorphose serait extrêmement difficile pour au moins deux raisons. Premièrement, le génome des salamandres n'est pas séquencé et conséquemment les puces à ADN sont incomplètes. Pour l'axolotl, il existe actuellement une seule puce à ADN contenant seulement 4402

« expressed sequence tag » uniques à l'axolotl (Monaghan et al., 2007, Page et al., 2007). Deuxièmement, la génération de salamandres mutantes par croisement génétique serait extrêmement longue puisque ces animaux mettent beaucoup de temps pour atteindre la maturité sexuelle. Pour l'axolotl, la maturité sexuelle est atteinte seulement à l'âge d'un an (Armstrong and Malacinski, 1989).

Plusieurs autres modèles animaux, vertébrés et invertébrés, comportent différents avantages pour l'étude de la régénération et il semble logique que l'étude de la régénération profitera des avantages de chaque modèle.

1.3 La régénération chez les modèles invertébrés

La régénération est un phénomène relativement commun chez les invertébrés et différents aspects y ont été étudiés depuis plus de 200 ans (Sanchez Alvarado and Tsonis, 2006). Par exemple, on a étudié l'épimorphose dans les pattes de cricket (Mito et al., 2002), de sauterelle (Ludke and Lakes-Harlan, 2008) et de coquerelle (French, 1976, French et al., 1976). On a également étudié la dédifférenciation cellulaire et la formation du patron de développement des disques imaginaux chez la drosophile (French et al., 1976, Brawley and Matunis, 2004). On retrouve des capacités de régénération chez plusieurs autres espèces comme par exemple dans les bras de l'étoile de mer (Thorndyke et al., 2001) et dans les viscères du concombre de mer (Garcia-Arraras et al., 1999).

Deux modèles d'invertébrés ont particulièrement retenu l'attention pour l'étude de la régénération, soit le ver planaire (Sanchez Alvarado, 2006) et l'hydre (Sanchez Alvarado and Tsonis, 2006). Ces deux modèles de recherche opèrent deux types de régénération différents: l'épimorphose et la morphallaxie, qui sont en fait les deux grandes divisions classiques de la régénération (Agata et al., 2007, Takeo et al., 2008). Déjà en 1901, Thomas Morgan avait établi la distinction entre ces deux modes de régénération et c'est d'ailleurs Morgan qui inventa le terme morphallaxie (Morgan, 1901). Il qualifia d'épimorphose la régénération par prolifération cellulaire et de morphallaxie la régénération par réorganisation tissulaire sans prolifération cellulaire (Morgan, 1901). Aujourd'hui, la définition d'épimorphose a évolué et elle est caractérisée par la présence d'un blastème de régénération et la prolifération de ses cellules (Agata et al., 2007).

Si l'on tranche un ver planaire en deux parties pour obtenir un segment avec la tête et un segment avec la queue, deux vers planaires plus petits germeront des deux segments par épimorphose. Des blastèmes de régénération se formeront sur la partie rostrale de la queue et sur la partie caudale de la tête. La régénération s'opérera à partir de ces blastèmes (Agata et al., 2007).

Si l'on tranche une hydre en deux parties, pour obtenir un segment avec la tête et un segment avec la queue, deux hydres plus petites se formeront également des deux segments

mais cette fois-ci, ce sera par morphallaxie. Ici, il n'y aura pas de formation de blastème, mais il y aura une réorganisation des cellules pour reformer les parties manquantes.

1.4 La régénération chez les modèles vertébrés

En général, les vertébrés, incluant l'humain, peuvent régénérer des lésions de la peau (Michalik et al., 2005); des lésions des nerfs périphériques (Landegren et al., 2007); des blessures aux muscles squelettiques (Gates et al., 2008); la dernière phalange d'un doigt (Illingworth, 1974); leurs cheveux (Porter, 2003) et peuvent même récupérer d'une hépatectomie partielle (Fausto et al., 2006).

Dans plusieurs de ces cas, la régénération se limite à la période périnatale/jeune enfant. Par exemple, le *Xénope* peut régénérer parfaitement une patte complète au stade têtard, mais perd cette capacité au stade adulte (Pearl et al., 2008). C'est le même principe pour la souris et l'humain qui peuvent régénérer le bout de leur doigts en bas âge mais qui perdent cette capacité en tant qu'adulte (Douglas, 1972, Illingworth, 1974, Vidal and Dickson, 1993, Reginelli et al., 1995, Han et al., 2003, Allan et al., 2006). D'autres animaux préservent la capacité de régénération lorsque devenus adultes, mais la régénération n'est pas parfaite. Suite à une autotomie, le lézard adulte parvient à régénérer sa queue (Bellairs et al., 1985). La fonction de la queue est restaurée, mais l'os est remplacé par du cartilage (Clause and Capaldi, 2006). Finalement, un très petit nombre d'espèces régénèrent parfaitement des

structures complexes à l'âge adulte. Parmi celles-ci, la salamandre adulte régénère fonctionnellement et structurellement la queue ou une patte amputée, et elles sont alors indiscernables de celles qui n'ont pas été amputées (Dinsmore, 1996, Carlson et al., 2001, Echeverri and Tanaka, 2002, Schnapp et al., 2005).

Parmi tous ces exemples de régénération chez les vertébrés, on distingue principalement trois types de régénération: 1) la régénération physiologique de maintien, 2) la régénération par hyperplasie ou par hypertrophie et 3) la régénération de réparation.

1.4.1 La régénération physiologique de maintien

La régénération physiologique de maintien comprend des processus cycliques comme la repousse des cheveux, le remplacement de l'épiderme, la repousse des ongles et la régénération des bois chez le cerf (Goss, 1984, Porter, 2003, Lord et al., 2007, Amoh et al., 2008, Yu et al., 2008). Bien que ce type de régénération ne concerne pas vraiment la régénération d'une structure blessée, sa compréhension est utile pour l'avancement de la recherche en biologie de la régénération. Par exemple, le follicule pileux, un organe miniature possédant des cellules souches, se régénère plus de 10 fois dans la vie d'un humain. La compréhension de ce phénomène pourrait permettre d'élaborer des avenues de recherche portant sur la maîtrise des mécanismes de la différenciation des cellules souches et sur le contrôle de leur cycle cellulaire (Yu et al., 2008).

1.4.2 L'hypertrophie et l'hyperplasie compensatrice

Plusieurs organes internes ont la capacité d'augmenter leur masse en réaction à une perte partielle de leur masse ou de leur fonction. La masse est augmentée afin de maintenir le rendement de la fonction de l'organe. Pour y parvenir, les organes peuvent opérer deux stratégies principales: l'hypertrophie ou l'hyperplasie compensatrice (Goss, 1966).

1.4.2.1 L'hypertrophie

L'hypertrophie consiste à combler le volume et le rendement de la partie manquante d'un organe en augmentant le nombre d'organites (hyperplasie d'organites) à l'intérieur des cellules. Dans ce cas, le nombre de cellules et d'unités fonctionnelles reste le même et seul le nombre d'organites est augmenté. C'est ce qui se produit lorsque le rein d'un individu cesse de fonctionner. Le rein controlatéral engendre une hypertrophie pouvant atteindre 66% du volume des deux reins combinés afin de maintenir l'équilibre métabolique du système (Hayslett et al., 1968). Chaque glomérule augmente sa masse et son rendement métabolique en augmentant le nombre d'organites dans les cellules, mais le nombre de cellules et de glomérule reste inchangé.

1.4.2.2 L'hyperplasie compensatrice

L'hyperplasie compensatrice se produit par prolifération cellulaire. C'est largement la stratégie employée lors de l'hyperplasie compensatrice du foie suite à une hépatectomie partielle (Fausto et al., 2006). Si on enlève deux lobes du foie, ils ne seront pas régénérés

comme les lobes originaux, mais leur masse sera compensée par la prolifération des cellules du lobe restant (Higgins and Anderson, 1931).

1.4.3 La régénération de réparation

La régénération de réparation est un terme utilisé dans les cas de régénération post-traumatique. Ce phénomène s'étend de la régénération d'un tissu relativement simple à la reconstruction parfaite d'une patte amputée.

On qualifie la réparation d'un tissu simple de régénération tissulaire (Carlson, 2007b). Cette régénération s'opère principalement par la prolifération et la différenciation de cellules souches adultes déjà présentes sur le site de lésion. Par exemple, les mammifères possèdent la capacité de régénérer des blessures musculaires en utilisant des cellules souches locales (Irintchev and Wernig, 1987, Peng and Huard, 2004, Gates et al., 2008).

Dans le cas d'une réparation d'une structure très abimée ou complètement amputée, on parle alors d'épimorphose. Cette régénération s'opère alors par l'entremise de la formation d'un blastème de régénération. La section 1.7 présente une description détaillée de l'épimorphose de la patte chez l'axolotl, mais il est intéressant de mentionner ici que l'humain possède la capacité, très limitée, de régénérer par épimorphose. En effet, en période périnatale et chez les jeunes enfants, la dernière phalange des doigts a la capacité de

régénérer par épimorphose si elle est amputée (Douglas, 1972, Illingworth, 1974, Allan et al., 2006).

1.5 L'axolotl, un modèle de recherche pour l'étude de la régénération chez les vertébrés

L'axolotl (*Ambystoma mexicanum*), un amphibien urodèle, est le modèle de recherche qui a été utilisé pour obtenir les résultats présentés dans cette thèse. On retrouve cette salamandre originaire du Mexique dans les lacs à proximité de Mexico. Elle atteint la maturité sexuelle en conservant des caractéristiques larvaires (caractéristique connue sous le nom de néoténie) (Gilbert, 2003) car elle n'opère pas de métamorphose. En conséquence, elle conserve des branchies et garde un mode de vie aquatique toute sa vie (Voss and Shaffer, 2000, Gilbert, 2003), ce qui la rend particulièrement intéressante comme modèle de recherche. L'entretien de son habitat est beaucoup plus simple que celui d'une salamandre terrestre, et la possibilité d'administrer différentes drogues expérimentales directement dans la solution où elle vit est un avantage important. De plus, l'axolotl est l'une des salamandres se reproduisant le mieux en captivité.

Les salamandres ont une capacité exceptionnelle de régénération par dédifférenciation cellulaire (Hay, 1959, Laufer, 1959, Hay and Fischman, 1961, Maden, 1977, Roy and Levesque, 2006, Straube and Tanaka, 2006). Par ce processus, les salamandres peuvent

régénérer, parfaitement et sans cicatrice, plusieurs parties de leur corps telles que la peau, la queue, la mâchoire, les yeux, le cerveau, la moelle épinière, l'apex du cœur et les pattes; (Goss, 1969, Ziegels, 1971, Iten and Bryant, 1973, Vargas-Gonzalez et al., 2005, Straube and Tanaka, 2006). Puisque la dédifférenciation cellulaire pourrait être ce qui distingue les salamandres des mammifères dans leur capacité de régénération, la compréhension des mécanismes soutenant la dédifférenciation cellulaire est centrale. En étudiant la régénération chez l'axolotl, on cherche à comprendre: quels sont les mécanismes cellulaires permettant d'obtenir des cellules pseudo-embryonnaires par dédifférenciation cellulaire; quels sont les gènes responsables de leur dédifférenciation; et comment est ensuite contrôlée la re-différenciation de ces cellules pseudo-embryonnaires.

Parmi toutes les études de régénération de membres ou d'organes chez les urodèles, la régénération par épimorphose de la patte amputée a été la plus largement documentée puisqu'elle comporte plusieurs avantages comme modèle d'étude (Wallace, 1981, Hutchison et al., 2006). Contrairement à une structure symétrique comme la queue, la patte possède trois axes asymétriques bien définis (proximodistal, dorsoventral et antéropostérieur) et contrairement à un organe interne, elle est facilement accessible et se manipule aisément. De plus, comme les pattes sont normalement en paires, la patte controlatérale de l'animal peut souvent servir de contrôle interne pour les traitements locaux. Ceci assure que la patte traitée soit dans les mêmes conditions expérimentales que

la patte contrôle et élimine les possibilités de différences génétiques possibles si la patte d'un autre animal est utilisée comme contrôle.

La formation du patron de développement de l'autopode des urodèles amphibiens (*e.g.* les axolotls) est unique. Durant le développement larvaire de l'autopode, les phalanges se forment séquentiellement en commençant avec les phalanges antérieures. Chez l'axolotl, la régénération de l'autopode suite à une amputation procède en suivant le même patron antéropostérieur. Inversement, les amniotes développent leurs phalanges presque simultanément avec les phalanges postérieures se formant légèrement en avance. En raison de cette différence, une dissimilitude importante de l'expression d'un gène durant le développement du membre chez l'axolotl pourrait permettre de corréler rapidement l'expression du gène à une fonction dans la formation du patron de développement. Cette caractéristique de développement/régénération du membre de l'axolotl a d'ailleurs été mise à profit dans cette thèse tel qu'il sera exposé dans la mise en contexte du chapitre un.

1.6 L'épimorphose de la patte d'urodèle

L'épimorphose de la patte est un phénomène biphasique comprenant une phase de préparation unique à la régénération et une phase de redéveloppement commune à l'épimorphose et au développement embryonnaire de la patte. La phase de préparation de l'épimorphose chez les urodèles présente plusieurs similarités avec la guérison de la plaie chez les mammifères (Roy and Levesque, 2006). Pourtant, chez ces derniers, il y a guérison

par fibrose et formation d'une cicatrice (Harty et al., 2003). Comme l'épimorphose mène à la régénération parfaite d'une patte amputée, la compréhension des mécanismes impliqués dans la phase de préparation de l'épimorphose chez les urodèles pourrait aider à mettre au point des thérapies permettant d'obtenir des guérisons de plaies sans cicatrices chez les mammifères.

Durant les deux phases de l'épimorphose, la patte en régénération passera par différents stades de références (fig.1.1) (Tank et al., 1976). Dans l'espace de quelques heures, la surface amputée est couverte par un épithélium de guérison de type squameux et cuboïde. Cet épithélium est très mince et pratiquement transparent (fig.1.1A). Il s'épaissit ensuite alors que la dédifférenciation commence et qu'une coiffe apicale épidermique se forme (fig. 1.1B). La dédifférenciation des cellules du moignon et la formation de la coiffe apicale épidermique seront vu en détail dans les prochaines sections (1.6.1.1 et 1.6.1.3). Après quelques jours, le blastème de régénération commence sa formation et se nomme « bourgeon primaire » (fig. 1.1C). Il a alors la forme d'un petit cône et est complètement blanc, avasculaire et non pigmenté. Il croît ensuite, surtout en longueur, pour atteindre le stade « bourgeon moyen » (fig.1.1D). Quelques cellules pigmentées apparaissent sur la surface dorsale du blastème et la vascularisation commence mais reste très éparse. À la fin de ce stade, la phase de préparation est généralement considérée terminée. Le cône continue sa croissance et atteint le stade « bourgeon tardif » (fig. 1.1E) où il s'aplatie et retrousse son apex pour donner une polarité dorsoventrale au blastème. La pointe du cône s'élargit au

stade « palette » (fig. 1.1F) et la forme des deux premiers doigts commence à apparaître du côté antérieur du blastème. Pendant que ces deux doigts deviennent plus proéminents, les deux doigts postérieurs commencent à apparaître au stade « différenciation primaire » (fig. 1.1G). Enfin, le patron de formation du membre est complété quelques semaines plus tard (fig. 1.1F)

Figure 1.1: Les stades de référence de l'épimorphose de la patte chez l'axolotl

Phase de préparation: A, formation de l'épithélium de guérison (Wound Epithelium; WE); B, début de la dédifférenciation cellulaire (Dedifferentiation); C, bourgeon primaire (Early Bud; EB); D, bourgeon moyen (Medium Bud; MB).

Phase de redéveloppement: E, bourgeon tardif (Late Bud; LB); F, palette (Palette; Pal); G, différenciation primaire (Early Differentiation; ED); H, patron complété (Pattern Completed).

Figure adaptée de Tank, 1976

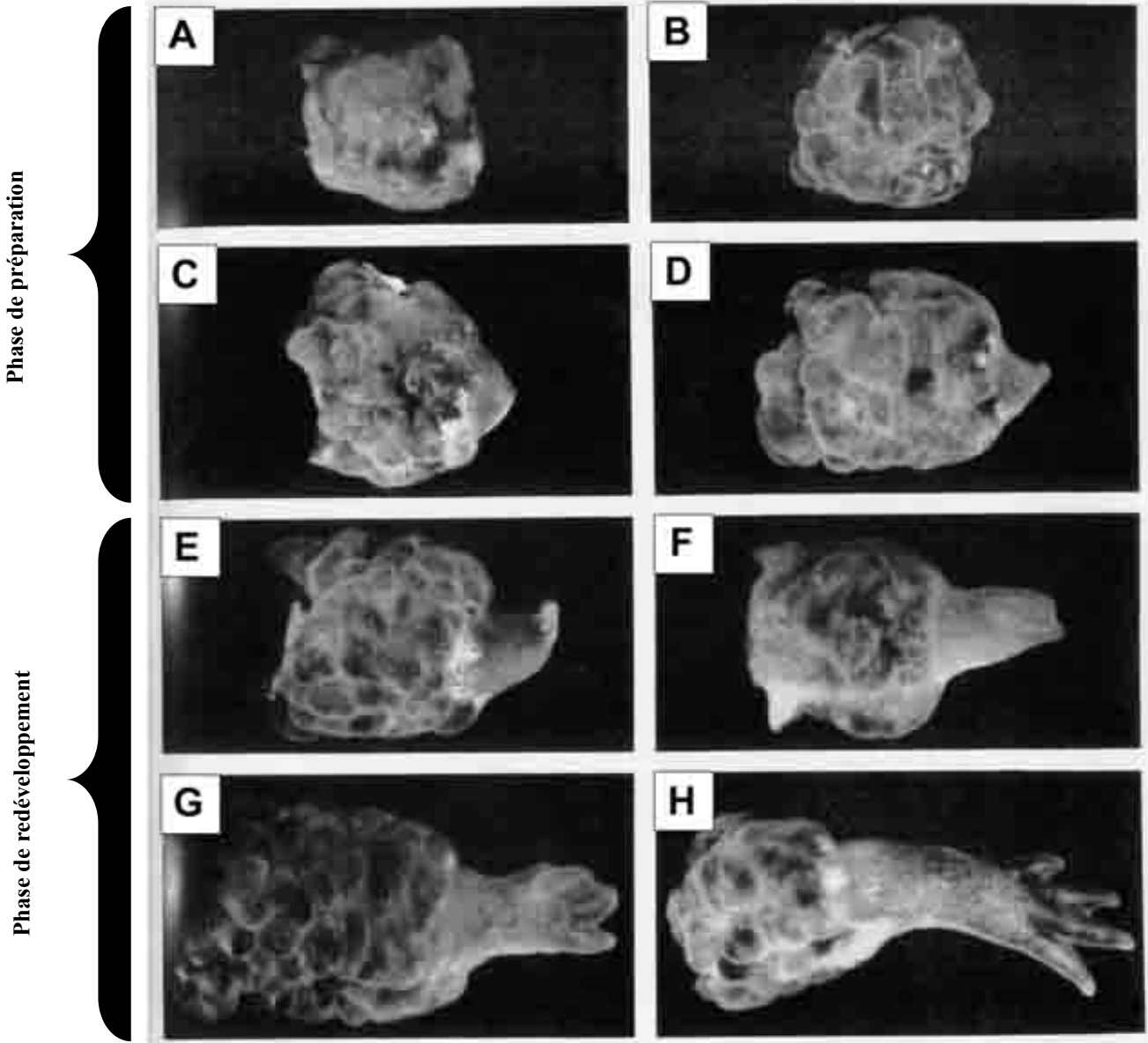


Figure 1.1

1.6.1 La phase de préparation

1.6.1.1 La formation d'un épithélium de guérison et sa transformation en coiffe apicale épidermique

Immédiatement après une amputation, les tissus mous de la patte se rétractent proximale au plan d'amputation en raison de la contractilité des muscles de la patte. Quelques secondes plus tard, l'hémorragie provoquée par l'amputation s'arrête par la contraction des parois vasculaires des vaisseaux sanguins sectionnés (Carlson, 2007b). Dans l'heure suivant l'amputation, les cellules épithéliales basales changent de morphologie, perdent leur hémidesmosomes et se détachent de la lame basale (Norman and Schmidt, 1967, Repesh and Oberpriller, 1980, Mescher, 1996). Elles migrent ensuite, sans prolifération, en une seule couche, de la périphérie vers le centre de la surface amputée, qui est recouverte de plasma et de liquide extracellulaire, pour former l'épithélium de guérison (fig. 1.2A) (Repesh and Oberpriller, 1980, Carlson et al., 1998). Le contact des cellules provenant des côtés opposés du moignon déclenchent le processus d'épimorphose (Satoh et al., 2008). Une greffe de peau mature sur le moignon avant la fermeture de l'épithélium de guérison inhibe la régénération (Mescher, 1976, Brockes and Kumar, 2008) et retirer l'épithélium de guérison après sa fermeture inhibe également la régénération (Thornton, 1957). La migration des cellules qui formeront l'épithélium de guérison est donc essentielle à la régénération (Brockes and Kumar, 2002). La protéine TGF- β 1 est impliquée dans presque tous les processus qui viennent d'être mentionnés et elle est présente sous forme latente dans la matrice extracellulaire et dans les plaquettes sanguines (Assoian et al., 1983,

Kehrl et al., 1986, Sato and Rifkin, 1989, Pietenpol et al., 1990, Grainger et al., 1995, O'Kane and Ferguson, 1997, Massague, 1998, Khalil, 1999, Blobe et al., 2000, Yu and Stamenkovic, 2000, Annes et al., 2003, Werner and Grose, 2003, Leask and Abraham, 2004, Schmierer and Hill, 2007, Willis and Borok, 2007, Gos et al., 2009). Elle pourrait donc être impliquée dans plusieurs étapes de la phase de préparation. Il a d'ailleurs été démontré chez l'axolotl que son expression est régulée à la hausse seulement six heures post amputation et y est maintenue élevée durant toute la phase de préparation (Levesque et al., 2007).

Pour des animaux de 3-5 cm, le recouvrement de la plaie d'amputation par l'épithélium de guérison est complet en environ deux à trois heures (Reפש and Oberpriller, 1978). Une langue épidermique marque la limite entre l'épiderme de guérison et l'épiderme original (fig. 1.2A). L'épiderme de guérison est dépourvu de lame basale (Carlson et al., 1998) ce qui permettra des interactions épithélio-mésenchymateuses essentielles à la régénération (Gardiner et al., 2002). La formation d'une nouvelle lame basale surviendra beaucoup plus tard dans le processus de régénération (Singer, 1949, Wallace, 1981, Carlson et al., 1998). L'épithélium de guérison s'épaissit ensuite pour former la coiffe apicale épidermique (CAE) au dessus du caillot de fibrine qui s'est accumulé suite à l'amputation (fig. 1.2B)(Gardiner et al., 2002, Han et al., 2005). L'épaississement est causé par la migration d'autres cellules épidermiques, par l'accumulation de débris cellulaires due à l'activité des phagocytes et en réaction à l'activité des cellules inflammatoires (Carlson et

al., 1998). Durant cette période, il y a littéralement une démolition des tissus du moignon pour préparer la reconstruction (régénération) (Singer, 1949, Wallace, 1981). La CAE acquiert des propriétés biochimiques à peu près identiques à la crête apicale ectodermique (AER), un épithélium spécialisé et un centre de régulation pendant le développement embryonnaire du membre chez les autres vertébrés (Yonei-Tamura et al., 1999, Christensen and Tassava, 2000, Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001, Han et al., 2005). Suite à la formation de la CAE, la dédifférenciation (sera définie à la section 1.7.1.3) des cellules proximales au plan d'amputation débute.

Figure 1.2 : Formation de l'épithélium de guérison et de la CAE suite à l'amputation de la patte supérieur chez l'axolotl mature

A) Formation de l'épithélium de guérison. Une seule couche de cellules épithéliales basales migre sans prolifération de la périphérie vers le centre de la surface amputée.

B) Suite à la fermeture de l'épithélium de guérison, c'est l'étape dite de démolition. Ensuite, l'épithélium de guérison s'épaissît pour former la CAE et la dédifférenciation des cellules proximales au plan d'amputation débute.

Figure adaptée de Carlson (2007).

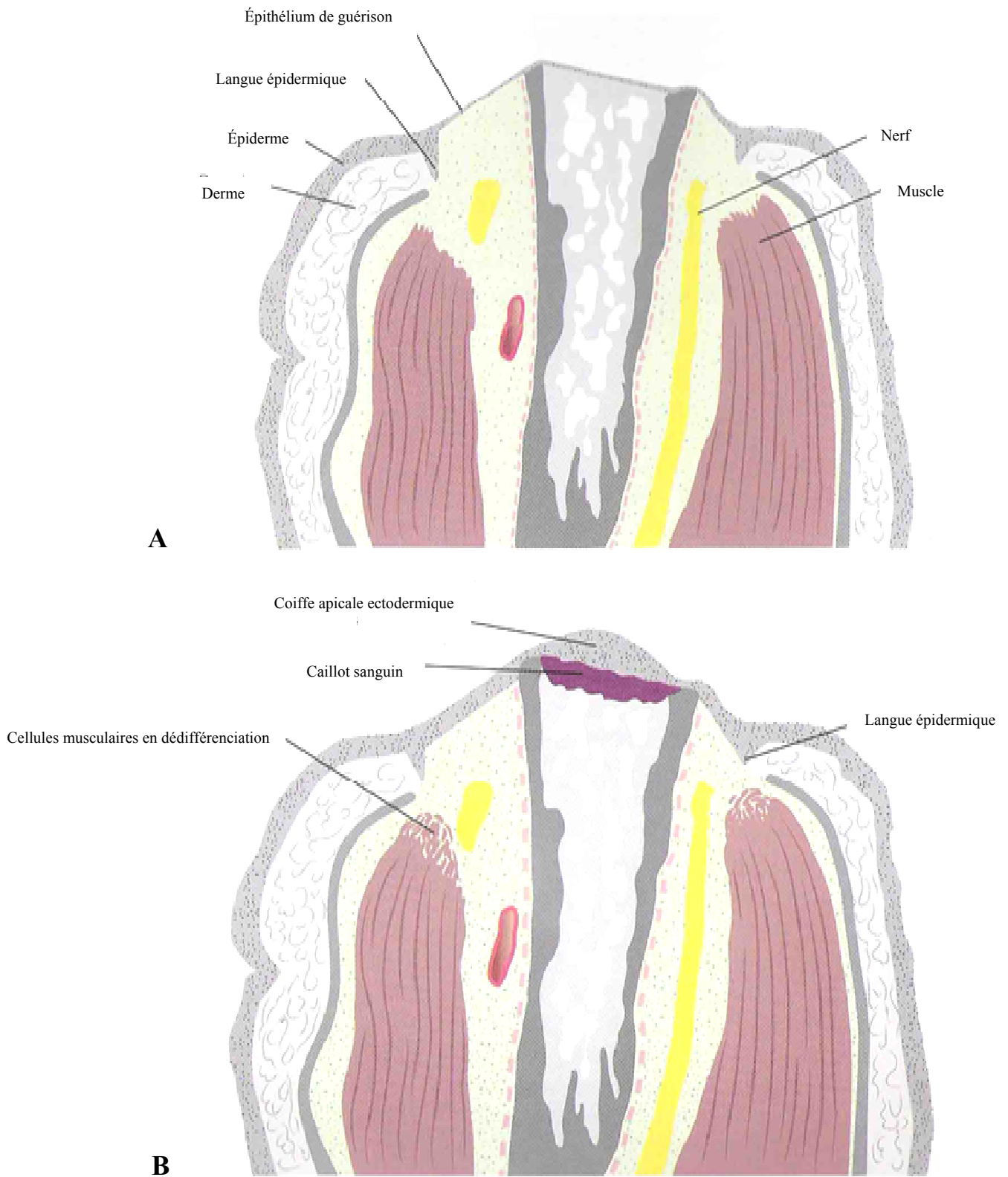


Figure 1.2

1.6.1.2 La réaction immunitaire au site d'amputation

Durant la régénération, les tissus mous sous la CAE sont légèrement infiltrés par les cellules de l'inflammation, mais beaucoup moins que dans une blessure similaire chez les mammifères. Bien que les macrophages et les neutrophiles soient employés à nettoyer les débris des cellules mortes et des bactéries, leur rôle dans la régénération demeure encore largement inconnu (Mescher and Neff, 2006). En fait, le rôle du système immunitaire en général durant la régénération chez les urodèles est encore très obscur mais il semble qu'une régulation à la baisse du système immunitaire simultanément à l'amputation soit favorable à la régénération. Par exemple, suite à une amputation chez le triton adulte, le nombre de lymphocytes et monocytes circulant diminue de plus de 50% et se rétablit seulement lorsque la régénération est presque complétée (Mescher and Neff, 2006). Également, l'administration de cyclophosphamide, un immunosuppresseur, au moment de l'amputation accélère la régénération (Michael et al., 1993).

Il est intéressant de souligner une particularité chez des souris mutantes nulles pour le gène PU1. Le système immunitaire de ces souris est privé de macrophages et de neutrophiles et par conséquent, ne fournit pratiquement pas de réponse immunitaire. Ces souris guérissent leurs blessures de la peau non par fibrose, comme leurs frères et sœurs sauvages, mais par ce qui semble être de la régénération tissulaire sans cicatrice (Martin et al., 2003, Redd et al., 2004). L'ensemble des résultats mentionnés ci-dessus suggère qu'une partie du secret

de la régénération des urodèles réside peut-être dans leur capacité de réguler leur système immunitaire.

1.6.1.3 La dédifférenciation cellulaire et la formation du blastème de régénération

La dédifférenciation cellulaire peut être définie comme la régression d'une cellule adulte vers un état pseudo-embryonnaire ou progéniteur (Han et al., 2005, Odelberg, 2005). Les signaux moléculaires déclenchant la dédifférenciation sont encore peu compris (Odelberg, 2005) mais on suspecte fortement que la CAE est la source de ce déclenchement (Han et al., 2005). Suite à la formation de la CAE, les cellules du moignon, principalement des fibroblastes dermiques et non dermiques et des cellules musculaires, sont libérées, se dédifférencient, prolifèrent et migrent sous la CAE pour former une masse de cellules nommée blastème de régénération (fig. 1.3A). Le blastème de régénération est donc une masse de cellules dédifférenciées (Tassava and Mescher, 1975, Gardiner et al., 1986, Muneoka et al., 1986, Mescher et al., 2000, McGann et al., 2001, Han et al., 2005, Odelberg, 2005). Les cellules de la CAE ne participent pas directement à la formation du blastème (Brockes and Kumar, 2002) mais elles sont essentielles à sa formation et à sa croissance (Gardiner et al., 2002). En effet, la CAE, est indispensable à la dédifférenciation, la prolifération et la migration des cellules qui formeront le blastème (Han et al., 2005).

Figure 1.3: Formation et croissance du blastème de régénération durant l'épimorphose de la patte supérieure chez l'axolotl mature

Suite à la formation de la CAE, les cellules sous jacentes sont libérées de la matrice extracellulaire, se dédifférencient, prolifèrent et migrent sous la CAE pour former le blastème de régénération. Le blastème passera par les stades EB(A), MB et LB (B). C'est approximativement durant la transition de MB à LB que la dédifférenciation se termine et que la phase de redéveloppement de l'épimorphose commence.

Figure adaptée de Carlson (2007)

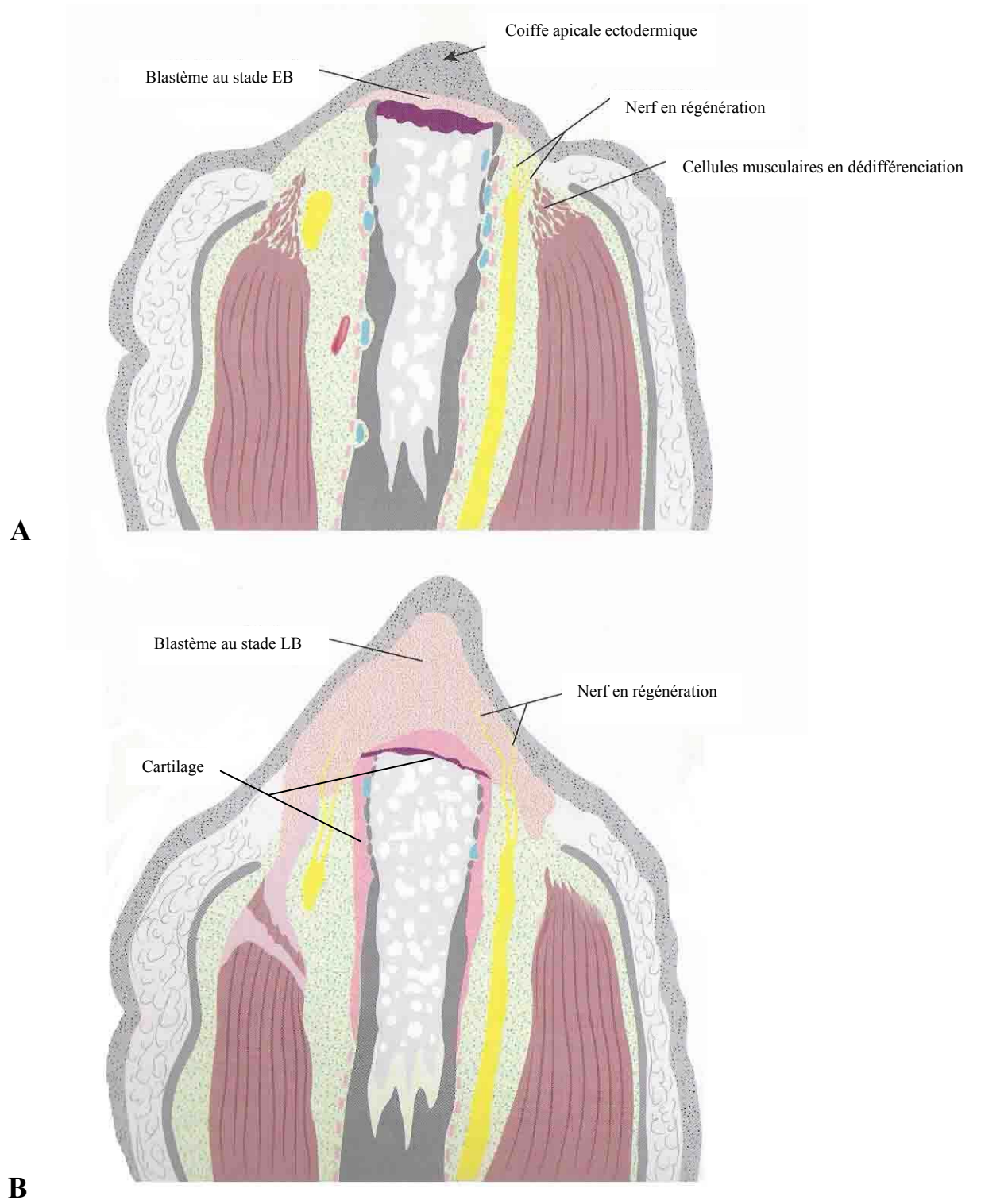


Figure 1.3

1.6.1.4 La formation du patron de développement du blastème

Durant sa croissance, le blastème de régénération passera par les stades de référence EB (fig. 1.3A), MB et LB (fig. 1.3B; voir aussi la figure 1.1 pour une vue d'ensemble des stades de régénération du blastème). Lorsque le blastème atteint le stade LB, son patron de développement est établi pour les trois axes et c'est approximativement à ce stade que la phase de redéveloppement débute (Iten and Bryant, 1973, Roy and Levesque, 2006).

1.6.1.4.1 L'axe proximodistal (de l'épaule vers les doigts)

Tel que déjà mentionné, la CAE de la patte d'axolotl en régénération est fonctionnellement très semblable à l'AER du bourgeon en développement chez les autres vertébrés (Christensen and Tassava, 2000). Anatomiquement, la CAE est uniformément lisse et couvre l'entièreté de l'extrémité du bourgeon de régénération, alors que l'AER forme une crête couvrant uniquement la frontière dorsoventrale du bourgeon en développement. Toutefois, malgré leurs différences anatomiques, ces deux structures ont des propriétés pratiquement identiques (Christensen and Tassava, 2000). Durant le développement embryonnaire, l'AER interagit avec le mésenchyme sous-jacent du bourgeon nommé zone de progression (PZ) qui contient des cellules mésenchymateuses en état de haute prolifération (Xu et al., 1998, Yonei-Tamura et al., 1999). De la même manière, durant la régénération de la patte chez l'axolotl, la CAE est en interaction constante avec les cellules du blastème de régénération (Giampaoli et al., 2003). En maintenant cette interaction, la CAE contrôle la prolifération cellulaire et la formation du patron de développement

proximodistal des cellules du blastème (Han et al., 2005). Les cellules du blastème donneront naissance uniquement aux structures distales au plan d'amputation; ce phénomène est appelé «transformation distale », ou parfois «distalisation» (Stocum, 1983). Les cellules du blastème qui engendrent les structures distales sont spécifiées en premier et les cellules qui formeront les structures proximales sont spécifiées plus tard; ce processus est qualifié de «régénération par intercalation » (Iten and Bryant, 1975). Une étude a démontré que les cellules du blastème sont spécifiées seulement quatre jours après amputation (environ au stade EB). Suivant une amputation à la moitié du stylopede (bras ou cuisse), les cellules du blastème formées à quatre jours après amputation ont été marquées à différents niveaux proximodistal à l'aide d'un traceur fluorescent (Echeverri and Tanaka, 2005). Lorsque la patte était entièrement régénérée, les cellules marquées dans le blastème distal se retrouvaient uniquement dans l'autopode (main ou pied), les cellules médianes dans le zeugopode (avant bras ou jambe) et les cellules proximales dans le stylopede.

L'expression des gènes *Hox-A9* et *Hox-A13* chez l'axolotl est un exemple intéressant appuyant le modèle de régénération par intercalation. Ces gènes sont importants pour la formation du patron de développement de la patte (Gardiner et al., 1995, Zakany and Duboule, 2007). Pendant le développement embryonnaire de la patte chez l'axolotl, l'expression de *Hox-A9* comble la totalité du bourgeon et celle de *Hox-A13* dont l'expression est associée aux structures distales, vient s'ajouter tardivement mais seulement

sur la partie distale du bourgeon (Gardiner et al., 1995). Durant la régénération de la patte, l'expression des deux gènes est différente. Durant la phase de préparation, l'expression des deux gènes est simultanée suggérant que les éléments distaux sont spécifiés en premier, supportant ainsi le modèle de régénération par intercalation. Durant la phase de redéveloppement, l'expression des deux gènes redevient comparable à celle du développement embryonnaire. *Hox-A9* couvre la totalité du bourgeon et *Hox-A13* est confiné distalement, ce qui supporte également la théorie selon laquelle la phase de redéveloppement de la patte est une récapitulation de son développement embryonnaire (Gardiner et al., 1995).

1.6.1.4.2 L'axe antéropostérieur (de l'index vers l'auriculaire)

La PZ postérieure du membre en développement chez les amniotes est nommée zone d'activité polarisante (ZPA). La ZPA contrôle la formation du patron de développement antéropostérieur du membre principalement sous l'action du gène Sonic Hedgehog (*Shh*) dont l'expression spatiale est strictement limitée à la ZPA (Saunders and Gasseling, 1968, Riddle et al., 1993, Lopez-Martinez et al., 1995, McGlenn and Tabin, 2006). Durant le développement du membre chez le poulet, si des cellules de la ZPA sont greffées dans le bourgeon antérieur, ou si *Shh* y est surexprimé, il y a induction de polydactylie (Tickle et al., 1975, Honig and Summerbell, 1985). Inversement, les souris mutantes nulles pour *Shh* (-/-) ont une déficience majeure de leur patron de développement antéropostérieur de leur

autopode menant au développement d'une patte hypomorphique à un seul doigt (Litingtung et al., 2002).

Chez les urodèles, la partie postérieure du bourgeon en développement ou du blastème en régénération, exprime également *Shh* et opère apparemment les mêmes fonctions que la ZPA (Imokawa and Yoshizato, 1997, Imokawa and Yoshizato, 1998, Torok et al., 1999, Roy et al., 2000, Roy and Gardiner, 2002, Stopper and Wagner, 2007). Une rotation de 180° du blastème, ou une surexpression de *Shh* dans le blastème antérieur, induit la polydactylie comme durant le développement embryonnaire du membre chez le poulet (Imokawa and Yoshizato, 1998, Roy et al., 2000). L'inhibition de la voie de signalisation de *Shh* durant le développement ou la régénération produit une patte hypomorphique à peu près identique à celle observée chez les souris mutantes pour *Shh* (-/-) (Roy and Gardiner, 2002, Stopper and Wagner, 2007). Il semble donc que la formation du patron de développement antéropostérieur de la patte d'urodèle en régénération ou en développement est très similaire à celle des amniotes.

1.6.1.4.3 L'axe dorsoventral (du revers de la main vers la paume)

L'ectoderme dorsal du bourgeon de la patte en développement chez les vertébrés est très probablement le centre de signalisation contrôlant la formation du patron de développement dorsoventral. Le gène *Wnt-7a* est exprimé dans l'ectoderme dorsal et induit le gène *Lmx-1* dans le mésoderme dorsal sous-jacent. Le mésoderme dorsal est ventralisé par la perte de

fonction de *Wnt-7a* ou *Lmx-1* (Parr and McMahon, 1995, Cygan et al., 1997, Rodriguez-Esteban et al., 1998). *En-1* est exprimé dans l'ectoderme ventral. L'absence de sa fonction permet l'expression de *Wnt-7a* dans l'ectoderme ventral et l'apparition d'un phénotype double dorsal (Cygan et al., 1997) (Loomis et al., 1998). L'ensemble de ces résultats suggère que *En-1* réprime normalement l'expression de *Wnt-7a* de l'ectoderme ventral et que l'expression antagoniste de ces deux gènes est probablement la base de la polarité dorsoventrale de la patte en développement. Les souris expriment les gènes *BMP-2*, *BMP-4* et *BMP-7* dans l'AER et l'absence de signalisation de ces trois gènes spécifiquement dans cette région provoque un phénotype double dorsal de la patte (Robert, 2007). De plus, chez ces souris, l'expression de *En-1* est absente de l'ectoderme ventrale durant le développement de la patte et l'expression de *Wnt-7a* s'étend alors dans l'ectoderme ventral. Ces résultats suggèrent que l'expression de *BMP-2*, *BMP-4* et *BMP-7* dans l'AER contrôle le patron de formation dorsoventral de la patte en développement.

Aucun de ces gènes n'a encore été étudié durant la régénération chez les urodèles mais une étude a démontré que durant la régénération de la patte chez le *Xénope*, *Lmx-1* est exprimé dans le mésenchyme dorsal du blastème de régénération (Matsuda et al., 2001). Dans la même étude, il a été démontré qu'un signal inconnu de l'épiderme de guérison régule l'expression de *Lmx-1* et la formation du patron de développement dorsoventral de la régénération de la patte. Puisque l'expression de *Lmx-1* en régénération est identique à son

expression durant le développement, il est probable que le signal provenant de l'épiderme de guérison soit Wnt-7a comme c'est le cas durant le développement embryonnaire.

1.6.1.5 Le modèle de coordonnées polaires

Les cellules du derme sont reconnues depuis longtemps pour leur importance dans la formation du patron de développement de la patte en régénération (Carlson, 1974, Brockes and Kumar, 2008). Le patron de développement du blastème est coordonné par des interactions locales avec la peau du moignon d'amputation (Mescher, 1996). Pour tenter d'expliquer comment ces interactions coordonnent la formation du patron de développement du blastème par un modèle unifié, des expériences de greffes de blastèmes ont été effectuées. Les expériences ont permis de proposer un modèle de coordonnées polaires (PCM) en deux dimensions où chaque cellule a une coordonnée polaire et reconnaît sa position dans la patte par son interaction avec les cellules avoisinantes. Le champ épimorphique est perçu comme une série de cercles concentriques de différents rayons. Chaque cellule a une position déterminée sur l'un des cercles par un angle et un rayon (coordonnée polaire). Le PCM comporte deux règles: 1) la plus courte intercalation et 2) le cercle complet pour la transformation distale (French et al., 1976).

La règle de la plus courte intercalation implique que lorsque deux coordonnées normalement éloignées l'une de l'autre viennent en confrontation suite à une amputation,

les tissus qui étaient entre ces deux coordonnées sont reconstitués en empruntant le chemin le plus court.

La règle du cercle complet pour la transformation distale implique qu'au moins un cercle complet doit être présent pour que la régénération puisse s'opérer, s'il n'est pas possible de former un cercle complet, la régénération n'aura pas lieu.

Il est aisé d'imaginer plusieurs expériences de greffes ou d'amputations pour vérifier l'exactitude du PCM. Toutefois, un seul exemple de greffe de blastème tiré de Wallace (1979) (Wallace and Watson, 1979) sera présenté ici. Une salamandre est amputée aux deux pattes. Quelques jours plus tard, un blastème s'est formé sur la patte gauche (fig. 4A) et sur la patte droite (fig. 1.4B). Si le blastème de la patte gauche est transféré (sans rotation du blastème) sur le moignon de la patte droite, il y aura des confrontations antéropostérieures (sans confrontation dorsoventrale) entre le moignon et le blastème transféré (fig. 4C). Aucune intercalation n'est nécessaire sur la face ventrale et la face dorsale car il n'y a pas de confrontation et pas de tissus manquant à remplacer (le blastème ventral est en contact avec le moignon ventral et le blastème dorsal est en contact avec le moignon dorsal). Toutefois, les coordonnées de cercles complets sont présentes de chaque côté du plan dorsoventral et deux nouveaux blastèmes peuvent donc se former de chaque côté en respectant la règle de plus courte intercalation (fig. 1.4D). Le résultat de cette greffe mènera donc à la régénération de trois pattes (fig. 1.4E). Soit celle qui était déjà en

régénération dans le blastème greffé et deux autres provenant des blastèmes néoformés par intercalation de cellules de chaque côté du blastème greffé.

Figure 1.4: Le modèle de coordonnées polaires

Des blastèmes sont présents sur la patte gauche (A) et sur la patte droite (B) d'une salamandre. Si le blastème de la patte gauche est transféré (sans rotation du blastème) sur le moignon de la patte droite, il y aura une confrontation antéropostérieure, sans confrontation dorsoventrale, entre le moignon et le blastème transféré (C). Deux nouveaux blastèmes se formeront de chaque côté du blastème greffé (D). Le résultat de cette greffe mènera à la régénération de trois pattes (E). Les figures A-C montrent une vue dorsale de la patte et la figure D montre une coupe transverse de la patte en régénération. A, antérieur; P, postérieur, D, dorsal; V, ventral.

Figure adaptée de Wallace (1979)

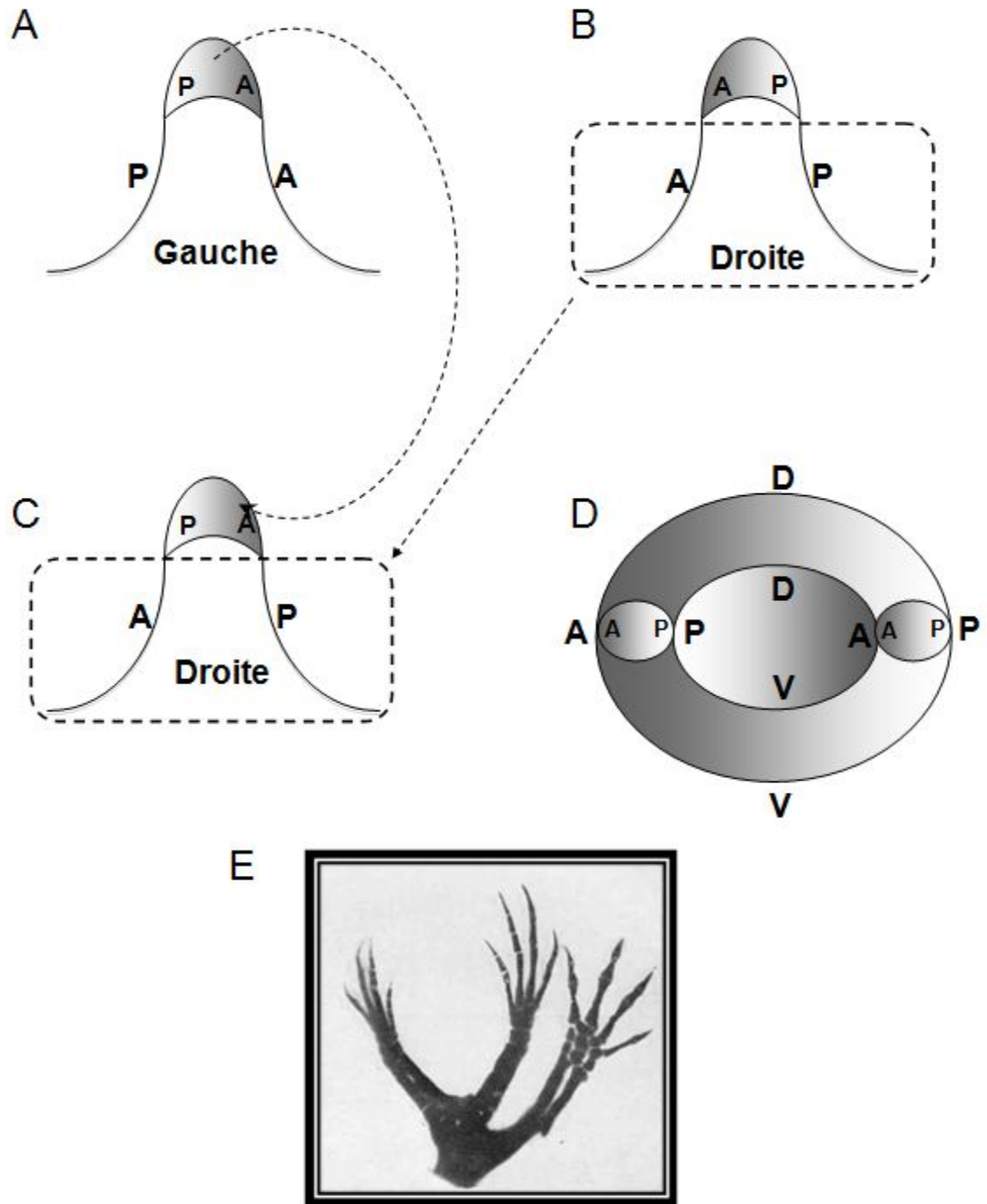


Figure 1.4

1.6.1.6 La dépendance aux nerfs

Durant la phase de préparation de l'épimorphose, la présence des nerfs dans la patte n'est pas requise pour la formation de l'épithélium de guérison, mais la dénervation de la patte amputée inhibera la migration des cellules dédifférenciées, qui surviendrait normalement dans une patte innervée, et empêchera la prolifération des cellules pour donner naissance au blastème. Il y aura alors de la fibrose au bout du moignon, et la régénération sera complètement stoppée (Bryant et al., 2002). À partir du stade LB (i.e. au début de la phase de redéveloppement), la présence des nerfs dans la patte n'est plus requise et l'épimorphose se poursuit même en absence de nerfs.

Une étude a démontré que le facteur de croissance nAG est exprimé dans l'épithélium de guérison et que son expression est régulée par les nerfs (Kumar et al., 2007). nAG est une protéine sécrétée et interagissant avec Prod-1, une protéine de surface impliquée dans l'identité des cellules du blastème (da Silva et al., 2002). Suite à une amputation, la protéine nAG est exprimée d'abord dans les cellules de Schwann des nerfs du moignon et ensuite dans l'épithélium de guérison. La dénervation de la patte supprime l'expression dans les deux régions (Kumar et al., 2007). L'électroporation de nAG sous l'épithélium de guérison, 5 jours après l'amputation d'une patte dénervée, induit son expression dans l'épithélium de guérison et restaure la régénération. Ces résultats suggèrent que l'expression de nAG dans les cellules de Schwann du nerf est responsable d'induire sa propre expression dans l'épithélium de guérison durant la régénération normale (Brookes

and Kumar, 2008). nAG n'est pas exprimée directement par les axones des nerfs, mais est sous le contrôle d'un facteur libéré par les axones.

Le facteur de transcription à homéodomaine Dlx-3 est exprimé dans la CAE durant la phase de préparation de l'épimorphose. La dénervation de la patte durant cette phase nerveuse dépendante régule à la baisse l'expression de Dlx-3 (Mullen et al., 1996). Toutefois, durant la phase de redéveloppement nerveuse indépendante, la dénervation n'a plus d'effet sur son expression (Singer, 1974, Mullen et al., 1996). L'implantation de billes de la protéine FGF-2 dans la CAE d'une patte dénervée restaure l'expression de Dlx-3 et permet à la régénération de se poursuivre (Mullen et al., 1996). Durant la régénération, FGF-2 est exprimée dans la CAE et dans les nerfs, mais le type cellulaire exprimant FGF-2 n'a pas été déterminé. Une dénervation de la patte durant l'épimorphose régule à la baisse l'expression de FGF-2 dans la CAE et dans les nerfs. FGF-2 pourrait donc être l'une des molécules essentielles libérées par les axones du nerf, ou à tout le moins, sous le contrôle de cette molécule.

1.6.2 La phase de redéveloppement

Au début de la phase de redéveloppement, le blastème de régénération est au stade LB (fig.1.3B; voir aussi la figure 1.1 pour une vue d'ensemble des stades de régénération du blastème). À ce stade, le blastème ressemble en quelque sorte au bourgeon d'une patte

embryonnaire en développement et comme pour ce bourgeon en développement, la formation du patron de développement du blastème est maintenant établie (Roy and Levesque, 2006). Également, à partir de la phase de redéveloppement, l'expression de plusieurs gènes est virtuellement identique à celle du développement embryonnaire (Muneoka and Bryant, 1982, Gardiner et al., 1993, Gardiner et al., 1995, Torok et al., 1999). De plus, dans les deux cas (développement et redéveloppement) la présence des nerfs n'est pas requise pour la croissance, le développement et la différenciation des cellules du bourgeon (Tassava et al., 1974, Tassava and Mescher, 1975, Tassava et al., 1987, Tomlinson and Tassava, 1987, Mullen et al., 1996). Pour toutes ces raisons il est maintenant généralement reconnu que la phase de redéveloppement de l'épimorphose de la patte est en fait une répétition de son développement embryonnaire (Wallace, 1981, Gardiner, 2005). Par exemple, durant le développement embryonnaire, suite à l'induction de l'AER, des cellules quittant proximale la PZ commencent déjà à se condenser pour entreprendre la chondrogénèse. Le cartilage des structures proximales de la patte commence alors sa formation (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001). De la même façon, chez l'axolotl, le blastème proximal déclenche sa chondrogenèse au début de la phase de redéveloppement au stade LB (fig. 1.4B) (Fitch et al., 1989, Bell et al., 1997, Hutchison et al., 2006). Au stade Pal, la formation du cartilage progresse proximale et simultanément, des cellules se condensent et se différencient aux endroits où se formera le squelette des doigts dans le blastème distal (fig. 1.5A) (Hutchison et al., 2006, Carlson, 2007b). Parallèlement, les cellules musculaires se redifférencient et les muscles se forment

le long du blastème de manière virtuellement identique à ce qui se produit au cours du développement embryonnaire de la patte (Grim and Carlson, 1974) (fig. 1.5A). Le squelette de la patte est ensuite complété en cartilage et ce dernier enclot le périoste de l'os résiduel du moignon (fig.1.5B). Plus tard, lorsque le membre aura récupéré sa taille originale, le cartilage sera transformé en os par ossification endochondrale.

Figure 1.5: Phase de redéveloppement de la patte supérieure chez l'axolotl mature

Au début de la phase de redéveloppement, le blastème est au stade LB et déclenche sa chondrogenèse (fig. 4). Au stade suivant, le stade Pal, le cartilage est formé dans le blastème proximal, et simultanément, des cellules se condensent et se différencient aux endroits où se formera le squelette des doigts dans le blastème distal (A). Parallèlement, les cellules musculaires se redifférencient et les muscles se forment le long du blastème de manière virtuellement identique au développement embryonnaire de la patte (A). Ensuite, lorsque la patte atteint le stade « patron complété » le squelette de la patte est entièrement formé en cartilage et enclot le périoste de l'os du moignon (B).

Figure adaptée de Carlson (2007)

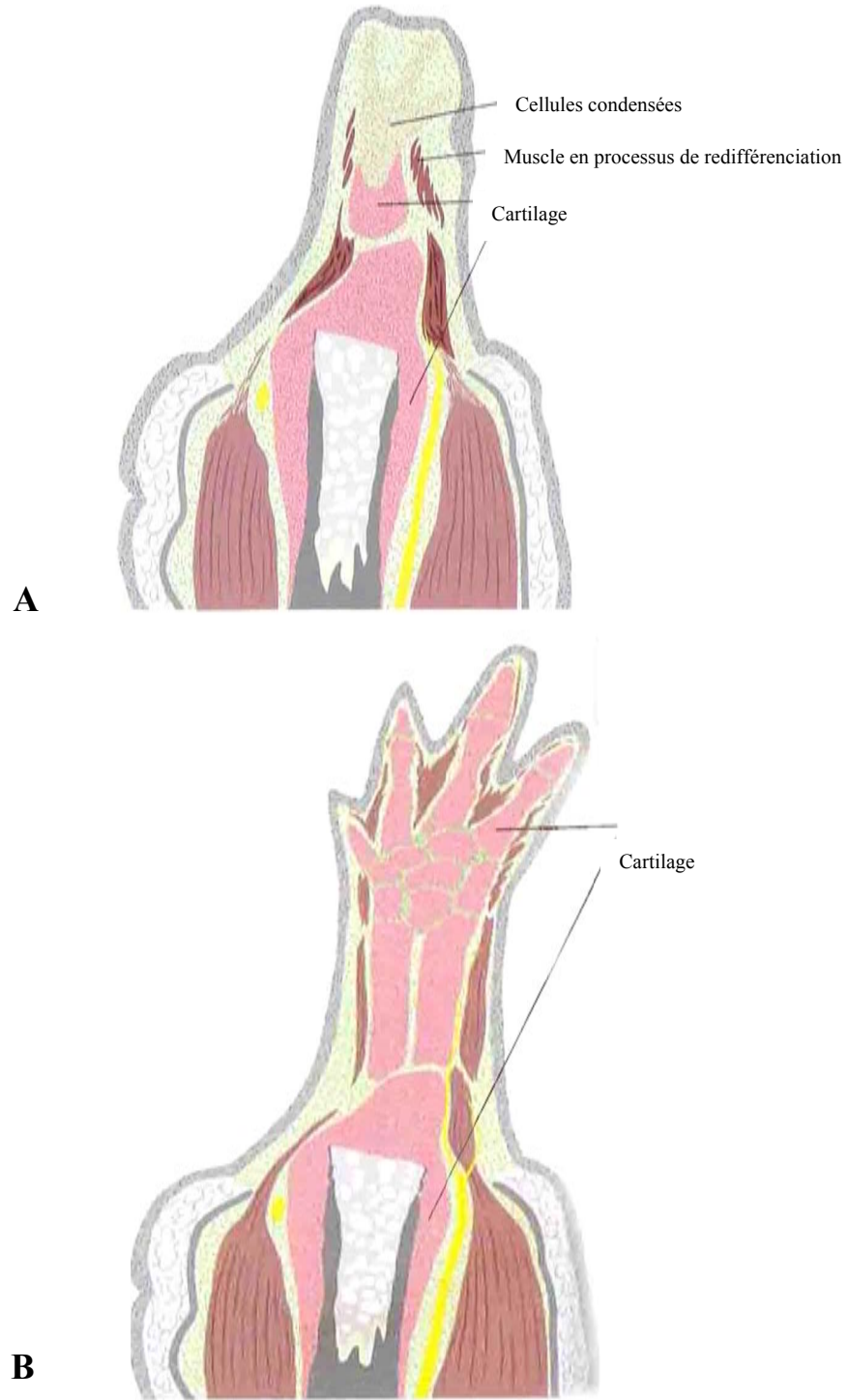


Figure 1.5

1.7 La peau, importante source de cellules pour la formation du blastème de régénération

Des expériences de greffes de peau ont démontré que la peau peut fournir à elle seule presque tous les types cellulaires pour reconstruire une patte. Une démonstration directe de l'importance de la peau provient d'expériences de régénération de pattes irradiées aux rayons-X. Les pattes irradiées sont incapables de régénération, mais cette dernière peut être restaurée par une greffe de peau non-irradiée (Holder, 1989). Pour faire l'expérience, un lambeau circulaire de peau, un « skin cuff », contenant le derme et l'épiderme a été retiré au centre d'une patte (fig. 1.6 A-B). La patte était ensuite irradiée au complet (fig. 1.6C) et le lambeau circulaire de peau non irradiée regreffé à son emplacement d'origine (fig. 1.6D). Une semaine plus tard, la patte était amputée dans la partie distale de la greffe (fig. 1.6 E-F) et une patte entière était régénérée de cette amputation (fig. 1.6G). Cette patte était formée à partir des cellules de la greffe (car les autres cellules irradiées de la patte n'avaient plus la capacité de proliférer). La formation du patron du squelette en redéveloppement, des vaisseaux sanguins, des nerfs et des tissus conjonctifs étaient normaux. Le seul tissu manquant était le muscle mais ses tendons étaient présents (Holder, 1989). Cette expérience démontre bien que la peau peut, à elle seule, établir la formation du patron de développement de la patte et qu'elle peut donner naissance à tous les tissus à l'exception du muscle.

Figure 1.6: Expérience de régénération d'une patte irradiée aux rayon-X restaurée par une greffe de peau non-irradiée

Un lambeau circulaire de peau («skin cuff»), contenant le derme et l'épiderme est retiré de la patte (A, B). La patte est ensuite irradiée au complet (C). Le lambeau circulaire de peau (non irradiée) est remis en place (D). Une semaine plus tard, la patte est amputée dans la partie distale du lambeau circulaire greffé (E). La peau greffée est alors la seule source de cellules non irradiée (F). Une patte complète est régénérée à partir des cellules de la greffe (G). La formation du patron de redéveloppement du squelette, des vaisseaux sanguins, des nerfs et des tissus conjonctifs est normale et le seul tissu manquant est le muscle mais ses tendons sont présents.

Figure adaptée de Holder (1989)

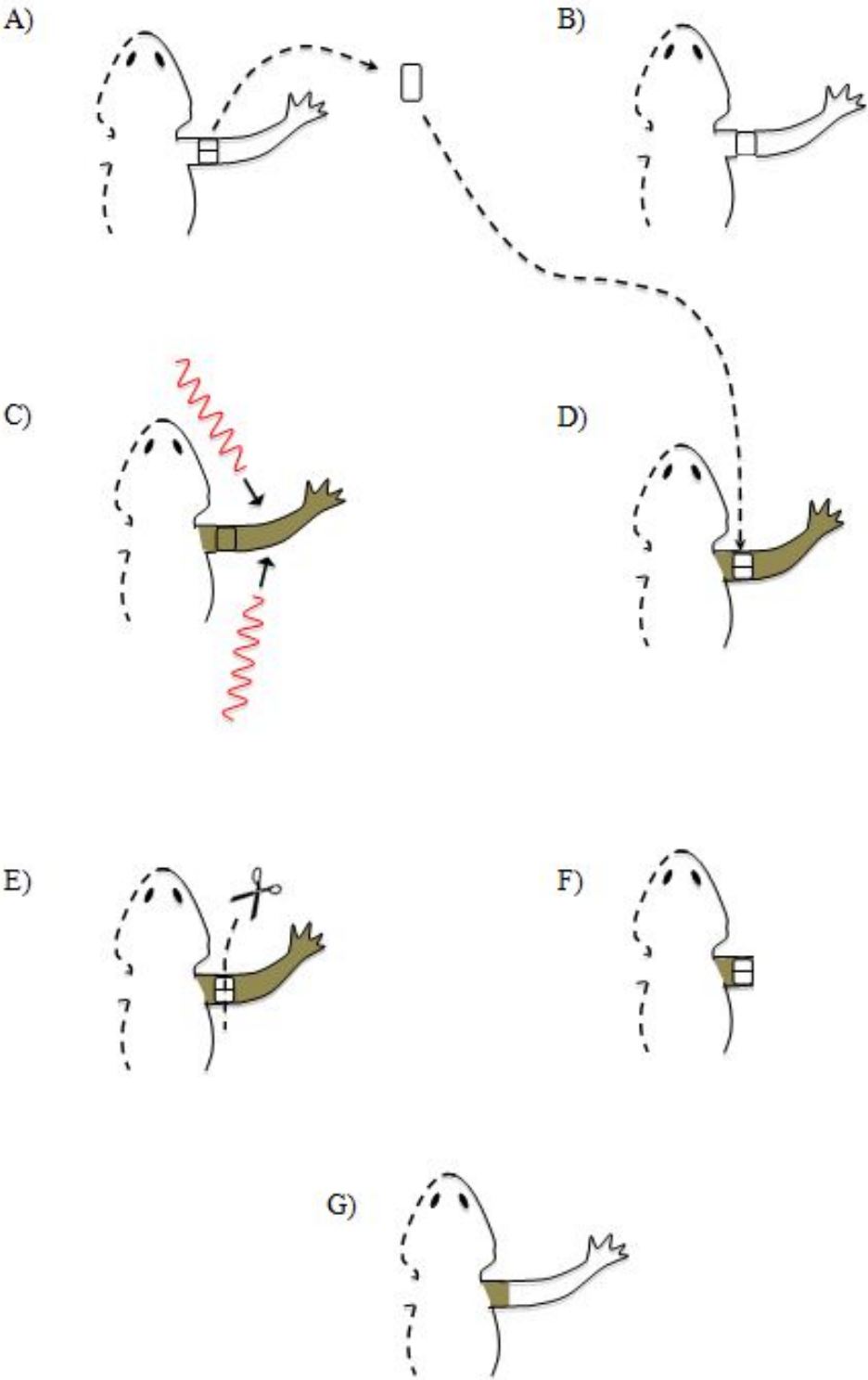


Figure 1.6

1.8 Les gènes d'intérêts

Les mammifères néonataux, incluant l'homme, peuvent régénérer d'une amputation de la partie distale de la dernière phalange de leurs doigts mais uniquement dans la région d'expression des gènes *MSX-1* et *MSX-2* (Reginelli et al., 1995, Han et al., 2003, Allan et al., 2006). Suite à une amputation dans cette région, une souris mutante pour *MSX-1* (-/-) ne parviendra pas à régénérer alors qu'une souris mutante pour *MSX-2* (-/-) y parviendra (Han et al., 2003). Il semble donc y avoir une corrélation spécifique entre le succès de la régénération et l'expression de *MSX-1*. Toutefois, il a été démontré que les protéines BMPs sont impliquées dans le succès de cette régénération:

Chez une souris sauvage [*MSX-1*(+/+) & *MSX-2* (+/+)], la régénération procède sans problème, et les transcrits pour les gènes *MSX-1*, *MSX-2* et *BMP-4* sont tous exprimés dans le blastème de régénération (ligne 1 du tableau 1)(Han et al., 2003).

Chez une souris mutante pour *MSX-1* [*MSX-1*(-/-) & *MSX-2* (+/+)], la régénération est inhibée, et les transcrits pour *MSX-1*, *MSX-2* et *BMP-4* sont également inhibés dans le blastème de régénération (ligne 2 du tableau 1)(Han et al., 2003). À première vue, il semble que *MSX-1* soit le gène maître de la régénération et son absence bloquerait l'expression de ses gènes cibles qui bloqueraient à leur tour la régénération. Le gène d'importance serait *BMP-4* puisque les souris mutantes pour *MSX-1* (-/-) sont incapables de régénération et qu'elles possèdent les deux copies du gène *MSX-2*.

Chez une souris mutante pour *MSX-1* [*MSX-1*(-/-) & *MSX-2* (+/+)], à laquelle on applique directement la protéine BMP-4 au site d'amputation, la régénération est restaurée et l'expression des gènes *MSX-2* et *BMP-4* est réactivée dans le blastème (ligne 3 du tableau 1)(Han et al., 2003). Il semble donc que l'un des rôles de *MSX-1* (chez les souris sauvages) soit d'activer la protéine BMP-4 et que cette dernière ait une capacité de réactiver sa propre expression et l'expression de *MSX-2*. On peut donc se demander ici si la régénération est restaurée par la réexpression de *BMP-4* ou par son effet sur la réexpression de *MSX-2*. Il est tentant de conclure encore une fois que le gène d'importance serait *BMP-4* puisque les souris mutantes pour *MSX-1* (-/-) sont incapables de régénérer même si elles possèdent les deux copies du gène *MSX-2*. Toutefois, puisque les souris mutantes pour *MSX-1* (-/-) perdent l'expression de *BMP-4* et *MSX-2* et que l'application directe de la protéine BMP-4 réactive l'expression de *BMP-4* et *MSX-2*, il n'est pas impossible que l'incapacité de régénération observée dans les souris mutantes pour *MSX-1* (-/-) mais possédant les deux copies fonctionnelles de *MSX-2* soit simplement due au fait que l'expression de *MSX-2* soit inhibée par l'absence de *MSX-1*. En absence de *MSX-1*, si l'activation de l'expression de *MSX-2* est induite par un autre moyen que par *MSX-1*, la protéine *MSX-2* pourrait peut-être maintenir la régénération.

Une autre expérience de la même étude vient quelque peu apporter des éléments qui favorisent la protéine BMP-4 comme la protéine effectrice de la régénération (ligne 4 du tableau 1). En effet, chez une souris sauvage [*MSX-1*(+/+) & *MSX-2* (+/+)] à laquelle on

applique directement la protéine Noggin (antagoniste général de tous les BMPs), la régénération est inhibée, mais les transcrits de *MSX1*, *MSX-2* et *BMP-4* sont tous présents (Han et al., 2003). Ceci démontre que la protéine effectrice dans ce réseau complexe n'est sûrement pas *MSX-1* ou *MSX-2* puisqu'elles sont exprimées dans ces conditions (ligne 4 du tableau 1) (Han et al., 2003). *BMP-4* serait donc la protéine la plus en aval de la cascade qui donnerait la capacité de régénération. Toutefois, comme Noggin est un antagoniste général des BMPs, il n'est pas possible de conclure ici que la régénération chez les souris mutantes pour *MSX-1* (-/-) est restaurée uniquement par *BMP-4*. En effet, les BMPs comptant à ce jour plus de 20 membres chez les vertébrés (Attisano and Wrana, 2002, Massague et al., 2005, Robert, 2007, Schmierer and Hill, 2007, Alaoui-Ismaili and Falb, 2009), il pourrait y en avoir plusieurs capables de restaurer la régénération chez les souris mutantes. D'ailleurs, une amputation proximale à la région d'expression de *MSX-1* (région normalement incapable de régénération endogène) peut être restaurée par épimorphose grâce à l'application des protéines *BMP-2* ou *BMP-7* sur le moignon d'amputation (Yu et al., 2010). Curieusement, la protéine *BMP-4* qui pouvait restaurer la régénération de la partie la plus distale chez les souris *MSX-1* (-/-), n'arrive pas à restaurer la régénération proximale.

Type de souris	Traitement sur l'animal	Succès de la Régénération	Expression de <i>MSX-1</i> dans le blastème	Expression de <i>MSX-2</i> dans le blastème	Expression de <i>BMP-4</i> dans le blastème
<i>MSX-1</i> (+/+) <i>MSX-2</i> (+/+)	Amputation	+	+	+	+
<i>MSX-1</i> (-/-) <i>MSX-2</i> (+/+)	Amputation	-	-	-	-
<i>MSX-1</i> (-/-) <i>MSX-2</i> (+/+)	Amputation + <i>BMP-4</i>	+	-	+	+
<i>MSX-1</i> (+/+) <i>MSX-2</i> (+/+)	Amputation + Noggin	-	+	+	+

Les résultats de ce tableau sont une compilation des expériences de (Han et al., 2003)

À la vue de tous ces résultats, il devient évident qu'une meilleure compréhension des rôles des protéines MSXs et BMPs, et leurs interactions complexes, permettra une meilleure compréhension de l'épimorphose. Entre autres il sera intéressant d'étudier quels sont les mécanismes de contrôle en amont de l'expression des protéines MSXs et BMPs afin de remonter jusqu'au signal original de la cascade d'événements pouvant mener à la régénération parfaite d'une patte par épimorphose. Bien sur, il n'existe pas de preuve que ce signal existe vraiment ou qu'il soit unique, plusieurs signaux simultanés sont potentiellement nécessaires, mais seule la recherche dans cette direction saura nous apporter des éléments de réponse. Dans l'éventualité où un interrupteur maître pour le déclenchement de l'épimorphose existe réellement, on pourrait alors espérer qu'en activant cet interrupteur maître, le corps humain pourrait lui-même compléter le reste du processus menant à la régénération parfaite.

Ainsi, nous avons choisi d'étudier l'expression et les rôles des gènes *MSX-1* et *BMP-2* durant l'épimorphose en raison des interactions BMPs/MSXs décrites plus haut. Le gène *MSX-1* a été choisi puisqu'il possède plusieurs caractéristiques très intéressantes en régénération, qui seront décrites dans la prochaine section, et également parce que son expression est intimement corrélée au succès de l'épimorphose chez plusieurs animaux possédant cette capacité: les doigts de l'homme (Douglas, 1972, Illingworth, 1974, Allan et al., 2006), les doigts de la souris (Reginelli et al., 1995, Han et al., 2003), la patte d'urodèle (Crews et al., 1995, Simon et al., 1995, Koshiba et al., 1998), la patte arrière du

Xénope (Beck et al., 2006) et la nageoire du poisson zèbre (Akimenko et al., 1995, Poss et al., 2000). Nous avons également choisi d'étudier le gène de *BMP-2* pour son potentiel régénératif et pour ses interactions avec la protéine *MSX-1* durant le développement et la régénération chez les vertébrés (Barlow and Francis-West, 1997, Wang et al., 1999, Bei et al., 2000, Rachmiel et al., 2004, Murashima-Suginami et al., 2008, Chen et al., 2009). De plus, *BMP-2* est structurellement et fonctionnellement très semblable à la protéine *BMP-4* (annexe 2), qui, comme il vient d'être décrit, possède aussi des capacités régénératives très intéressantes. Cette section présente donc un tour d'horizon des différents rôles des gènes *MSX-1* et *BMP-2* durant le développement et la régénération chez différents modèles animaux.

1.8.1 Muscle Segment Homeobox Gene 1 (*MSX-1*)

Les gènes à homéoboîte sont une large famille de gènes impliqués dans la régulation du développement. Chez les vertébrés supérieurs, le groupe des gènes à homéoboîte *MSX* comporte trois membres: *MSX-1* (*Hox-7*), *MSX-2* (*Hox-8*) et *MSX-3*. *MSX-1* et *MSX-2* sont exprimés dans plusieurs organes et divers tissus durant le développement embryonnaire (Carlson et al., 1998, Koshiba et al., 1998, Alappat et al., 2003) alors que *MSX-3* est exprimé uniquement dans le tube neural dorsal (Alappat et al., 2003, Liu et al., 2004).

MSX-1 et *MSX-2* codent pour des homéoprotéines contenant un homéodomaine de 60 acides aminés (DeWees and Geiger, , Hovde et al., 2001). Ces homéoprotéines sont des

facteurs de transcription fonctionnant principalement comme des répresseurs de la transcription (Catron et al., 1995, Lee et al., 1998, Hu et al., 2001). L'expression de ces deux facteurs de transcription est souvent associée aux cellules progénitrices multipotentes, donc peu différenciées (Hill et al., 1989, Robert et al., 1989, Song et al., 1992, Reginelli et al., 1995, 675, Hu et al., 2001). Par exemple, durant le développement de la patte, *MSX-1* est exprimé dans les cellules progénitrices de la PZ mais est absent dans les parties proximales de la patte où les cellules ont commencé leur différenciation (Bendall and Abate-Shen, 2000, Hu et al., 2001). Ces observations ont mené à l'hypothèse que *MSX-1* et *MSX-2* corrélerent avec l'absence de différenciation cellulaire (Song et al., 1992, Catron et al., 1996, Mina et al., 1996, Takahashi et al., 1996, Carlson et al., 1998, Bendall et al., 1999, Dodig et al., 1999)

L'expression du gène *MRF-4* (un marqueur de cellules musculaires différenciées) durant l'épimorphose de la patte chez la salamandre supporte le rôle inhibiteur de *MSX-1* sur la différenciation cellulaire. Chez cet animal, *MSX-1* est exprimé dans les pattes durant le développement, et plus tard, l'expression s'arrête dans une patte mature (Simon et al., 1995, Koshiba et al., 1998). Si la patte est amputée, *MSX-1* est ré-exprimé durant la régénération à partir du stade EB (Crews et al., 1995, Simon et al., 1995, Koshiba et al., 1998). Parallèlement, le gène myogénique *MRF-4* montre un profil d'expression inverse à celui de *MSX-1* (Simon et al., 1995). *MRF-4* est exprimé dans les muscles adultes, rapidement

régulé à la baisse à un niveau indétectable dans le blastème de régénération au stade EB et seulement ré-exprimé à l'achèvement de l'épimorphose (Simon et al., 1995).

Plus récemment, une autre étude supporte l'hypothèse que *MSX-1* et *MSX-2* sont des inhibiteurs de la différenciation cellulaire (Hu et al., 2001). En effet, il a été démontré que *MSX-1* peut inhiber la différenciation cellulaire dans différentes lignées mésenchymateuses (myocytes, adipocytes, chondrocytes et ostéoblastes). L'expression de *MSX-1* pendant leur différenciation respective inhiberait la transformation morphologique des cellules propre à chacun des types. De plus, il a été démontré dans la lignée des myocytes que l'inhibition de la différenciation s'effectue par la régulation du cycle cellulaire via une régulation à la hausse de l'expression de la cycline D1 et l'activité de sa kinase cycline dépendante CDK-4. La cycline D1 et la CDK-4 sont responsables d'empêcher les cellules de sortir du cycle cellulaire et de rentrer en quiescence (transition G1-G0). L'expression de *MSX-1* induirait la formation d'un complex cycline D1/CDK-4, et les cellules seraient alors incapables de sortir du cycle cellulaire et de se différencier. Dans cette même étude, il a également été démontré que *MSX-1* n'avait pas d'effet sur la prolifération cellulaire. Les mêmes résultats ont été obtenus avec le gène *MSX-2*(Hu et al., 2001).

Une autre étude menée en culture cellulaire a démontré que *MSX-1* inhibe la différenciation des cellules musculaires murines par une interaction physique entre les protéines *MSX-1* et l'histone 1b (H1b) (Lee et al., 2004a). H1b est une « linker histone » se

liant à l'ADN à l'entrée et à la sortie des enroulements autour des nucléosomes pour les relier afin de former la chromatine (Cirillo and Zaret, 2004). Lorsque MSX-1 est présent, il y a formation d'un complexe MSX-1/H1b qui se fixe à un activateur de MyoD et inhibe sa transcription. Comme MyoD est un régulateur central de la différenciation musculaire, la répression de sa transcription a pour effet de réprimer la myogénèse. La nécessité de l'interaction entre MSX-1 et H1b pour inhiber la différenciation a également été démontrée (Lee et al., 2004a). Un ARN interférant (ARNi) contre H1b était co-transfecté avec *MSX-1* dans les cellules musculaires (Lee et al., 2004a). La présence de l'ARNi avait pour effet de favoriser la différenciation musculaire et l'expression d'un autre marqueur de la différenciation musculaire, la protéine « myosine heavy chain » (MHC). Ces résultats démontrent que si la transcription de *H1b* est inhibée par l'ARNi, les cellules se différencient même en présence de MSX-1. La coopération entre MSX-1 et H1b semble donc essentielle à l'inhibition de la différenciation cellulaire. L'ensemble des résultats présentés jusqu'à maintenant suggère fortement que l'un des rôles des protéines MSX-1 et MSX-2 est d'inhiber la différenciation cellulaire.

MSX-1 et MSX-2 semblent être des acteurs importants dans le domaine de la régénération. En effet, comme il a déjà été mentionné, les mammifères embryonnaires peuvent régénérer la partie distale de la dernière phalange de leurs doigts (Douglas, 1972, Illingworth, 1974, Reginelli et al., 1995, Han et al., 2003, Allan et al., 2006), mais seulement dans la région d'expression de *MSX-1* et *MSX-2* (Reginelli et al., 1995, Han et al., 2003, Allan et al.,

2006). Toutefois, il a été démontré chez des souris mutantes pour *MSX-1* (-/-) ou pour *MSX-2* (-/-) que seul *MSX-1* est essentiel à la régénération (Han et al., 2003).

Une caractéristique pouvant donner cette aptitude pro-régénération à *MSX-1* pourrait provenir de son habileté à induire la dédifférenciation cellulaire (Odelberg et al., 2000, Odelberg, 2005) et à maintenir les cellules dans un état non différencié durant la régénération (Hu et al., 2001). Il a été démontré que la surexpression de *MSX-1* dans des myotubes en culture réduisait l'expression des marqueurs musculaires MyoD, Myogenin, MRF-4 et p-21 à un niveau indétectable et induisait la cellularisation des myotubes multinucléés (Odelberg et al., 2000). Les cellules mononucléées résultantes se dédiffénciaient et entraient en intense prolifération. Ces cellules pouvaient ensuite exprimer des facteurs chondrogéniques, adipogéniques, myogéniques ou ostéogéniques si elles étaient induites avec un facteur de différenciation correspondant. Ces résultats suggèrent premièrement que *MSX-1* possède la capacité d'induire la dédifférenciation cellulaire et deuxièmement que les cellules mammifères possèdent le potentiel de se dédifférencier.

Le rôle potentiel de *MSX-1* dans la dédifférenciation est également supporté par des expériences menées sur des cultures de fibres musculaires de salamandre (Kumar et al., 2004). Ces expériences en culture cellulaires ont démontré que la dissociation de fibres musculaires multinucléées, reproduisant un traumatisme du muscle, activait leur

cellularisation. L'inhibition de la transcription de *MSX-1* à l'aide de morpholinos contre l'ARNm de *MSX-1* inhibait la traduction de la protéine MSX-1 et induisait une inhibition marquée de la cellularisation. Ces résultats démontrent que les myofibres de salamandre répondent aux traumatismes par l'activation d'un programme endogène de cellularisation impliquant la traduction de *MSX-1* (Kumar et al., 2004).

Un autre rôle possible de MSX-1 durant la régénération pourrait avoir un lien avec la fonction pro-apoptotique de la protéine p53. Une étude a démontré que l'inhibition de la voie de signalisation de p53 (Komarov et al., 1999, Gudkov and Komarova, 2005) inhibait significativement l'épimorphose de la patte chez l'axolotl (Villiard et al., 2007). Toutefois, on ne comprend pas encore comment l'absence de signalisation de p53 inhibe la régénération. p53 peut empêcher la transformation tumorale en prévenant la prolifération des cellules contenant des anomalies génomiques par la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Vogelstein et al., 2000, Vousden and Lu, 2002). Dans ses fonctions apoptotiques, la stabilité de p53 est critique et il a été démontré que MSX-1 favorise l'apoptose des cellules tumorales en stabilisant p53 par une interaction protéine-protéine (Park et al., 2005). Son expression dans le blastème de régénération, pendant une période d'intense prolifération cellulaire, pourrait servir à stabiliser p53 durant cette période afin d'assurer l'apoptose pendant une période où les possibilités d'anomalies génomiques sont élevées.

Cette hypothèse est supportée par une étude récente chez la souris où il a été démontré que l'un des rôles de *MSX-1* durant le développement de la patte est de contrôler l'apoptose des cellules mésenchymateuses et probablement patron de développement (Lallemand et al., 2009). Comme il a été mentionné précédemment, les souris mutantes pour *Shh* (-/-) présentent un phénotype hypomorphique de la patte (Litingtung et al., 2002). Chez ces souris, l'expression de *MSX-1* est régulée à la hausse et l'apoptose est augmentée (Lallemand et al., 2009). Chez les souris doubles mutantes *Shh* et *MSX-1* [*Shh* (-/-) & *MSX-1* (-/-)], l'apoptose et le patron de développement de la patte étaient partiellement restaurés. Ces résultats suggèrent que *MSX-1* pourrait avoir un rôle dans l'apoptose mais aussi dans la formation du patron de développement.

1.8.2 Bone morphogenetic protein-2 (*BMP-2*)

La protéine *BMP-2* fait partie de la famille des protéines morphogénétiques de l'os (BMPs); des molécules de signalisation sécrétées appartenant à la très grande superfamille des facteurs de croissances transformant beta (TGF- β s). Les BMPs ont été nommés sur la base de leur habileté à induire la formation d'os ectopique lorsqu'implantés dans des tissus mous *in vivo* (Urist, 1965, Reddi and Huggins, 1972, Wozney et al., 1988). La famille des BMPs compte à ce jour plus de 20 membres chez les vertébrés (Attisano and Wrana, 2002, Massague et al., 2005, Robert, 2007, Schmierer and Hill, 2007, Alaoui-Ismaili and Falb, 2009). Bien que leur appellation d'origine laisse croire qu'ils sont uniquement impliqués dans la formation de l'os, leur rôle est beaucoup plus large que leur nom laisse supposer.

Les BMPs sont impliqués dans une multitude de processus lors du développement embryonnaire: lors de l'induction neurale; durant l'angiogénèse; durant la formation du patron de développement de la patte; durant l'induction du cartilage et de l'os; et aussi durant bien d'autres processus (Klingensmith et al., Francis et al., 1994, Kawakami et al., 1996, Monsoro-Burq et al., 1996, Suzuki et al., 1997, Pizette et al., 2001, Munoz-Sanjuan and Brivanlou, 2002, Chen et al., 2004, Wan and Cao, 2005, Hong and Yu, 2009, Ripamonti and Petit, 2009, Ye et al., 2009).

1.8.2.1 La biosynthèse des BMPs

La plupart des BMPs sont synthétisés sous forme d'un pré-pro-peptide comprenant une séquence signal, une pro-région et un domaine actif possédant sept cystéines (fig. 1.7A). Par exemple, chez l'humain, le pré-pro-peptide de BMP-2 comprend une séquence signal de 19 acides aminés, une pro-région de 263 acides aminés et un segment actif de 114 acides aminés. La séquence signal dirige la synthèse vers la voie de sécrétion alors que la pro-région assure un repliement adéquat de la protéine avant la sécrétion. Durant la transcription, l'ARNm du pré-pro-peptide est dirigé par la séquence signal vers le réticulum endoplasmique rugueux, où, suite à sa traduction, la séquence peptidique de la séquence signal est clivée (Felin et al., Wan and Cao, 2005, Xiao et al., 2007). Le tandem pro-région/domaine actif libéré se dimérise avec un autre tandem pro-région/domaine actif par un seul pont disulfure (cystine) entre les deux tandems monomériques. Les six autres cystéines de chaque domaine actif forment des ponts disulfures intra-chaîne (fig. 1.7

B)(Wan and Cao, 2005). Les deux domaines actifs sont ensuite libérés de leur pro-région par une pro-protéine convertase et le dimère mature (fig. 1.7C) est alors sécrété à l'extérieur de la cellule (Felin et al.). Les dimères sécrétés peuvent être des homodimères ou des hétérodimères, par exemple, BMP-2/BMP-2 ou BMP-2/BMP-7 ou BMP-4/BMP-7, etc. (Xiao et al., 2007). Bien que la formation d'hétérodimères a été démontrée *in vitro* et qu'ils ont possiblement un effet plus puissant que les homodimères, leurs fonctions *in vivo* est encore mal comprise (Xiao et al., 2007).

Figure 1.7: Schématisation de la synthèse des BMPs

Deux pré-pro-peptides sont traduits séparément dans la cellule avec chacun une séquence signal (N-terminal), un pro-peptide et une séquence active (C-terminal) contenant sept cystéines (A). Les pré-pro-peptides sont ensuite libérés de leur séquence signal et les monomères résultants se lient ensemble par un seul pont disulfure (S-S) pour former un homodimère (B). Les six autres cystéines de chaque domaine actif forment des ponts disulfures intra-chaîne (B). Finalement, une pro-protéine convertase libère les séquences actives et le dimère final (C) est sécrété hors de la cellule. Les ions sulfures des cystines intra-chaîne ne sont pas dessinés pour plus de clarté du schéma.

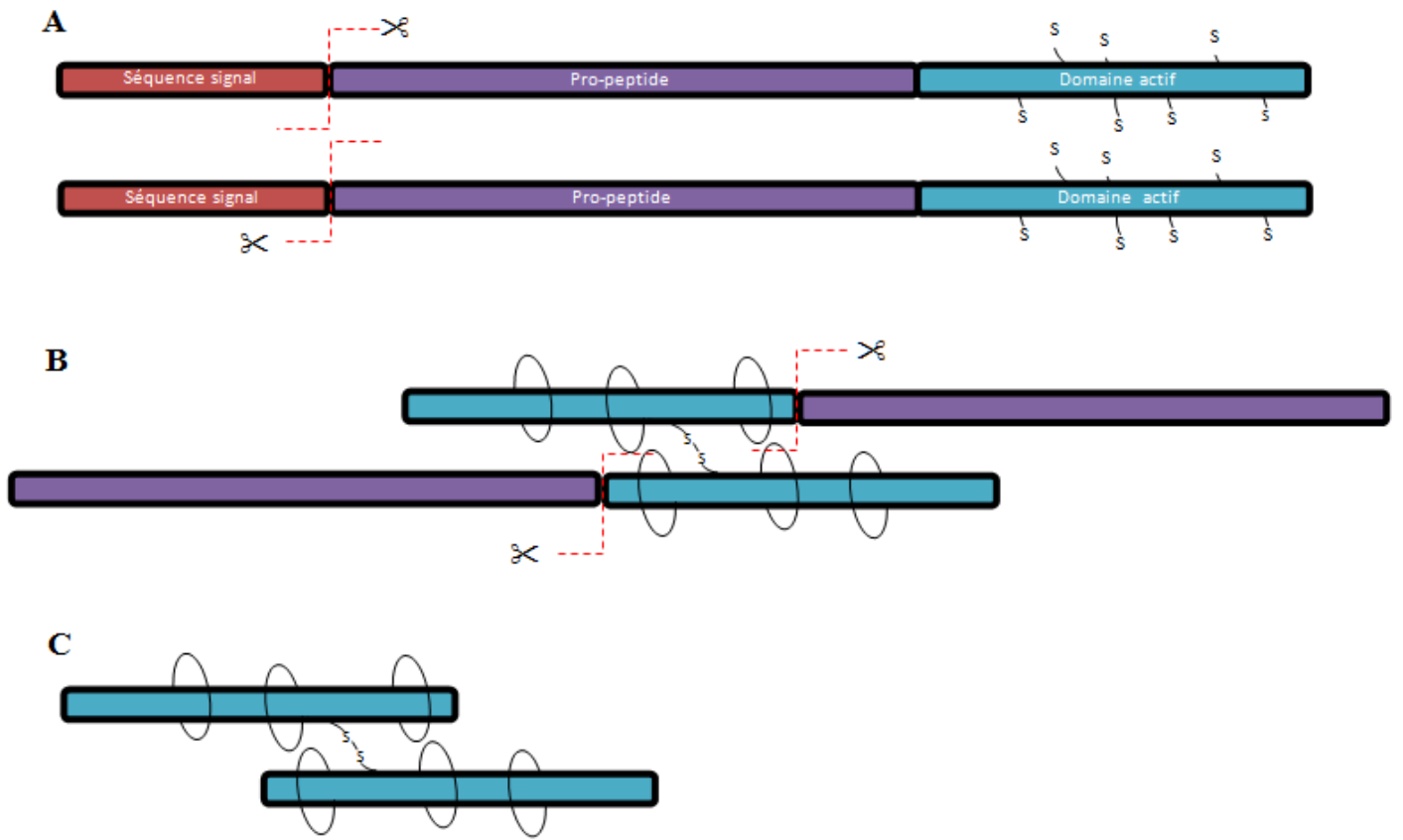


Figure 1.7

1.8.2.2 Activation des récepteurs des BMPs et transduction de la signalisation intracellulaire

Il existe au moins six types de récepteurs pour les BMPs qui peuvent être divisés en deux classes fonctionnelles: les types I et les types II (Schmierer and Hill, 2007). Il a été démontré que trois formes de récepteurs de type I peuvent lier les BMPs, soit ActR-IA, BMPR-1A et BMPR-1B. Ces deux derniers lient exclusivement les BMPs alors que ActR-IA peut également lier les activines (Wan and Cao, 2005). Trois récepteurs de type II ont également été identifiés pour lier un ligand BMP. Il s'agit de BMPR-II, ActR-II et ActR-IIB. BMPR-II lie exclusivement les BMPs alors que ActR-II et ActR-IIB peuvent lier d'autres membres de la superfamille de TGF- β s (Schmierer and Hill, 2007).

Lorsqu'un dimère de BMPs se lie à ses récepteurs, les récepteurs forment un complexe hétérotétramérique activé (deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II; fig.1.8). Les récepteurs de type I lient ensuite une protéine Smad. Dans le cas des TGF- β s de la famille des BMPs, les smads seront Smad-1, Smad-5 ou Smad-8 (pour les TGF- β s de la famille des TGF- β s, ce sera Smad-2 et Smad-3). Le récepteur de type II (récepteur sérine/thréonine kinase) phosphoryle les résidus Sérine et Thréonine du domaine intracellulaire du récepteur de type I. Le récepteur kinase de type I phosphoryle à son tour le Smad qui lui est associé (Smads 1, 5 ou 8), et ce Smad phosphorylé est libéré du récepteur de type I. Deux de ces Smads libres et phosphorylés se lieront ensuite à Smad-4, également nommé co-smad (Smad-4 peut se lier à Smad 1,2,3,5 et 8). Le trimère de Smads

est alors transporté au noyau cellulaire (fig. 1.8) ou il participera à l'activation de la transcription de gènes cibles avec l'aide de facteur de transcriptions (Schmierer and Hill, 2007).

1.8.2.3 Quelques modes de régulation de la signalisation BMP

Noggin

Noggin (fig. 1.8, numéro 1) est une protéine sécrétée pouvant se lier à BMP-2, BMP-4 et BMP-7. La co-crystallisation de Noggin et BMP-7 a démontré que Noggin peut inhiber la signalisation BMP en bloquant l'interface moléculaire du domaine des BMPs se liant au récepteurs de type I et II (Groppe et al., 2002). La structure cristalline en trois dimensions de Noggin a clairement démontré que Noggin peut au moins bloquer la signalisation de BMP-2, 4 et 7.

Smad-6

Smad-6 (fig. 1.8, numéro 2) est un autre membre de la famille des Smads et joue un rôle de régulation négative de la signalisation BMP en bloquant l'accès des Smads 1, 5 et 8 aux récepteurs de type I (Imamura et al., 1997). La surexpression de Smad-6 dans des chondrocytes provoque un délai de la différenciation des chondrocytes et de leur maturation (Horiki et al., 2004). Chez la souris, le promoteur de Smad-6 possède des sites de liaison pour Smad-1 et Smad-5 (Ishida et al., 2000), ce qui suggère une boucle de régulation négative de la signalisation BMP.

Tob

Tob (Figure 1.8, numéro 3) est une protéine antiproliférative et inhibe la transcription Smad dépendante induite par les BMPs dans les ostéoblastes par son association avec Smad-1 ou Smad-5 (Yoshida et al., 2000). Chez les souris mutantes pour *Tob* (-/-), la signalisation BMP-2 est augmentée et l'effet de BMP-2 sur la prolifération et la différenciation des ostéoblastes est augmentée parallèlement. L'ostéoinduction locale via BMP-2 est également augmentée chez les souris *Tob* (-/-) (Usui et al., 2002).

Smurf-1

Smurf1 (Smad ubiquitin regulatory factor-1) est une ubiquitine ligase (fig. 1.8, numéro 4, 5 et 6). Elle interagit avec Smad-1 et Smad-5 pour induire leur protéolyse. La dégradation de Smad-1 et Smad-5 (sous formes phosphorylé ou non phosphorylé et ceci dans le cytoplasme comme dans le noyau cellulaire) par Smurf-1 se produit indépendamment de l'activation des récepteurs des BMPs et semble responsable de maintenir un niveau d'équilibre de ces deux Smads (Chen et al., 2004).

Figure 1.8: Voies de signalisation ostéogénique activées par les BMPs

Un ligand BMP (homodimère) se lie à son récepteur (hétérotétramère de récepteurs de type I et II). Les deux récepteurs de type I se lient à Smad-1. Les deux récepteurs de type II phosphorylent les résidus Sérine et Thréonine du domaine intracellulaire des récepteurs de type I. Les récepteur de type I phosphorylent à leur tour Smad-1 qui est alors libéré des récepteurs de type I. Deux protéines Smad-1 libres et phosphorylés se lieront ensuite à Smad-4. Le trimère de Smads est alors transporté au noyau cellulaire où il se liera avec le facteur de transcription RUNX-2 à l'élément ostéogénique OSE2 (osteoblast-specific cis-acting element two) (Schmierer and Hill, 2007). ① En extracellulaire, Noggin peut antagoniser la signalisation BMP en bloquant l'interface moléculaire du domaine des BMPs se liant au récepteurs de type I et II. ② Dans le cytoplasme, Smad-6 joue un rôle de régulation négative de la signalisation BMP en bloquant l'accès de Smad-1 aux récepteurs de type I. ③Également dans le cytoplasme, Tob peut inhiber la transcription Smad dépendante induite par les BMPs. ④⑤⑥ Dans le cytoplasme et dans le noyau cellulaire, Smurf1 interagit avec Smad-1 et Smad-5 pour induire leur protéolyse. La dégradation de Smad-1 et Smad-5 (sous formes phosphorylé ou non phosphorylé) par Smurf-1 se produit indépendamment de l'activation des récepteurs des BMPs et semble responsable de maintenir un niveau d'équilibre de ces deux Smads. Figure adaptée de Chen *et al.* (2004).

1.8.2.4 Rôles physiologiques de BMP-2

Chez les amniotes en général, BMP-2 a reçu beaucoup d'intérêt dû à son expression dans la ZPA de la patte en développement (Geetha-Loganathan et al., 2006). La ZPA est la région responsable de la formation du patron de développement antéropostérieur de la patte et *Shh*, un morphogène exprimé exclusivement dans la ZPA, en est le principal médiateur (Riddle et al., 1993, Lopez-Martinez et al., 1995, McGlenn and Tabin, 2006). À cause de cette expression restreinte à la ZPA, on comprend mal comment ce gène peut contrôler la formation du patron de développement de toute la largeur de la patte et on pense qu'il pourrait peut-être le faire via un signal secondaire. C'est pour cette raison que BMP-2 a soulevé beaucoup d'intérêts (Hogan, 1996). Chez les tétrapodes amniotes, l'expression de *Shh* est restreinte à la ZPA de la patte en développement et chevauche l'expression de *BMP-2*. Toutefois, l'expression de *BMP-2* n'est pas restreinte à la région postérieure mais forme un gradient postéro-antérieur. Des expériences ont aussi démontré que *BMP-2* peut être induit par *Shh* dans le bourgeon d'un membre de poulet en développement (Laufer et al., 1994, Yang et al., 1997). Cependant, différentes études ont démontré que la surexpression de *BMP-2* ne peut pas reproduire les effets phénotypiques de *Shh*, que l'expression de *BMP-2* est maintenue chez les souris mutantes nulles pour *Shh*, et que *BMP-2* n'est pas essentiel pour relayer la signalisation de *Shh* lors de la formation du patron de développement de la patte (Duprez et al., 1996b, Drossopoulou et al., 2000, Litingtung et al., 2002, Bandyopadhyay et al., 2006). Il semble donc que si l'expression de

BMP-2 durant le développement de la patte est associée à la formation du patron de développement, elle n'est pas activée par Shh.

Des expériences avec des antagonistes de la signalisation BMP dans les espaces interdigitales du membre en développement ont suggérées que l'expression des *BMPs* (surtout *BMP-2*, *BMP-4* et *BMP-7*) est importante pour diriger la formation du patron de développement des doigts (Dahn and Fallon, 2000). Toutefois, une étude plus récente avec des souris mutantes pour *BMP-2* (-/-), *BMP-4* (-/-) ou *BMP-7* (-/-) a démontré qu'aucun de ces trois BMPs est essentiel pour spécifier l'identité des phalanges mais qu'ils peuvent induire collectivement l'apoptose interdigitale (Bandyopadhyay et al., 2006). Chez le poulet, la surexpression de récepteurs dominants négatifs de types I-A ou I-B (*dnBMPR-IA* or *dnBMPR-IB*) dans la patte en développement réduit l'apoptose interdigitale; résultant en des pattes palmé ressemblant à celles du canard (Yokouchi et al., 1996, Zou and Niswander, 1996). Au contraire, l'application de *BMP-2* ou *BMP-7* dans l'espace interdigitale accélère et intensifie l'apoptose interdigitale (Macias et al., 1997). Chez le canard (Laufer et al., 1997) et la chauve-souris (Weatherbee et al., 2006), les *BMPs* sont aussi exprimé dans l'espace interdigitale. Cependant, dans les deux cas il n'y a pas d'apoptose interdigitale. Ceci peut s'expliquer chez le canard par le fait que Gremlin (antagoniste des BMPs) est également exprimé dans l'espace interdigitale (Laufer et al., 1997) mais cela n'a pas été démontré chez la chauve souris. Néanmoins, ces résultats

suggèrent qu'en plus d'induire de l'apoptose, l'expression des BMPs dans les espaces interdigitales a d'autres rôles dans le développement de la patte.

Le développement squelettique de la patte est un aspect clairement affecté par l'expression de *BMP-2* (Duprez et al., 1996a, Duprez et al., 1996b, Healy et al., 1999, Drossopoulou et al., 2000, Pizette and Niswander, 2001, Quint et al., 2002). D'ailleurs, les BMPs, ont été découverts par la formation ectopique de cartilage et d'os suite à l'implantation de matrice osseuse déminéralisée dans les tissus mous d'un animal (Urist, 1965, Wozney, 2002). Il a été démontré, chez le poulet, que les BMPs participent à la détermination et/ou la condensation des cellules chondroprogénitrices et leur différenciation subséquente en chondrocytes (Pizette and Niswander, 2000). Chez les souris dont l'expression de *BMP-2* et *BMP-4* est absente uniquement dans les pattes, la différenciation des préchondrocytes en chondrocytes est retardée, indiquant qu'un seuil de BMPs est requis pour déclencher la chondrogenèse (Bandyopadhyay et al., 2006). Chez ces souris mutantes, les deux doigts postérieures ne parviennent pas à se former conséquemment à l'absence d'expression du gène *SOX-9*; le facteur de transcription représentant le marqueur le plus précoce connu de la chondrogenèse (Weston et al., 2003) et un régulateur du collagène de type II (un constituant majeur du cartilage hyalin (Bell et al., 1997, Healy et al., 1999)). *SOX-9* est une cible de *BMP-2* (Zehentner et al., 1999) et la surexpression de *BMP-2* dans un membre de poulet en développement induit l'expression de *SOX-9* qui stimule ensuite la formation de cartilage (Healy et al., 1999).

L'expression de *BMP-2* et *Shh* a également été démontrée durant le développement des nageoires chez le poisson zèbre (Martinez-Barbera et al., 1997, Laforest et al., 1998, Quint et al., 2002, Crotwell et al., 2004, Smith et al., 2006, Hadzhiev et al., 2007). L'exosquelette des nageoires est formé de rayons osseux et deux copies de *BMP-2* (*BMP-2a* et *BMP-2b*) y sont exprimées durant le développement des nageoires (Martinez-Barbera et al., 1997, Quint et al., 2002, Crotwell et al., 2004). Une amputation au niveau de l'exosquelette de la nageoire caudale (la queue du poisson) stimule sa régénération par épimorphose qui est complétée en environ 3 semaines (Smith et al., 2006). Durant la régénération, il a été démontré que *BMP-2b* et *Shh* sont exprimés dans les rayons de la nageoire (Quint et al., 2002). La même étude a démontré que la surexpression de *BMP-2b* ou *Shh* entre deux rayons voisins induisait de l'os en excès entre les rayons et altérait la formation du patron de développement de la nageoire. Toutefois, la surexpression de *Shh* induisait l'expression de *Ptc1* (le récepteur membranaire de *Shh*) entre les rayons alors que la surexpression de *BMP-2b* n'avait pas d'effet sur l'expression de *Ptc1*.

Ainsi, l'augmentation de *Ptc1* entre les rayons après surexpression de *Shh* durant la régénération de la nageoire chez le poisson zèbre, suggère que l'os en excès induit par *Shh* entre les rayons est un effet sur la formation du patron de développement de la nageoire et que l'os formé est possiblement le résultat de cellules artificiellement spécifiées par la surexpression de *Shh*. Leur nouvelle spécification ferait qu'elles répondraient aux BMPs. D'ailleurs, dans la même étude, la co-expression de *Chordin* (antagoniste de la signalisation

de tous les BMPs et non de *Shh*) pendant la surexpression de *Shh* annulait la formation osseuse ectopique induite par la surexpression de *Shh*, ce qui démontre que les effets de la surexpression de *Shh* impliquent des BMPs. Parallèlement, l'absence d'activation de *Ptc1* suite à la surexpression de *BMP-2b* suggère que l'altération du patron de développement provoquée par la surexpression est reliée directement à la formation d'os ectopique plutôt qu'à un effet sur le patron de développement. L'ensemble des résultats de cette étude supporte donc que, même si l'expression de *BMP-2* et *Shh* est chevauchante, leurs rôles est différents et que *BMP-2* est associé directement à la régénération osseuse. Ceci est d'ailleurs appuyé par les expériences précédemment mentionnées chez la souris où les protéines *BMP-2*, *BMP-4* et *BMP-7* sont toutes capables d'induire la régénération phalangienne impliquant de la régénération osseuse (Han et al., 2003, Yu et al., 2010).

1.9 Les perspectives de la médecine régénérative

La combinaison de la bio ingénierie et des nanotechnologies permet déjà le développement d'applications de plus en plus sophistiquées en médecine régénérative. Ces applications prennent naissance dans la recherche fondamentale et sont possibles entre autres grâce aux découvertes en biologie de la régénération. C'est dans cette optique que l'étude de l'expression et des fonctions des gènes *MSX-1* et *BMP-2* lors de l'épimorphose chez l'axolotl ont été menées. La compréhension des rôles de ces gènes chez l'axolotl pourrait

mener à la capacité d'induction de l'épimorphose chez l'humain et lui donner ainsi la capacité d'utiliser ses propres cellules afin de se régénérer lui-même.

1.10 Hypothèses et objectifs

À la vue des résultats discutés dans l'introduction, les hypothèses suivantes ont été testées dans cette thèse:

Les hypothèses testées au chapitre un sont:

- 1- L'expression de *BMP-2* est indépendante de la signalisation Shh

- 2- L'expression de *BMP-2* est corrélée à l'initiation de la chondrogenèse et à l'ordre de développement des phalanges durant l'épimorphose de la patte chez l'axolotl.
 - L'objectif à atteindre pour tester l'hypothèse un était d'analyser l'effet de la cyclopamine (antagoniste de la signalisation hedgehog) sur l'expression de *BMP-2* et *SOX-9* dans la patte d'axolotl en développement et en régénération.

 - L'objectif à atteindre pour tester l'hypothèse deux était d'analyser l'effet d'une surexpression de *BMP-2* ou de *Noggin* (un antagoniste de la signalisation BMP) dans la région postérieure du bourgeon de la patte en régénération pendant que les phalanges postérieures sont en redéveloppement.

Les hypothèses testées au chapitre deux sont:

- 1- Durant l'épimorphose de la patte, l'expression de *MSX-1* chez l'axolotl commence avant la formation du blastème et est corrélée à la dédifférenciation cellulaire durant l'épimorphose.
 - 2- Durant l'épimorphose de la patte, *MSX-1* contrôle le patron de développement et l'apoptose via la signalisation Shh.
- L'objectif à atteindre pour tester l'hypothèse un du chapitre deux était d'analyser et de comparer l'expression déjà publiée de *MSX-1* chez l'axolotl par un autre groupe. L'expression déjà publiée démontrait que l'expression de *MSX-1* commençait seulement au stade Pal, soit bien après le début de la dédifférenciation cellulaire.
 - L'objectif à atteindre pour tester l'hypothèse deux du chapitre deux était d'analyser l'effet de la cyclopamine sur l'expression de *MSX-1*.

Chapitre 1 – Article 1

Titre: BMP-2 functions independently of SHH signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs

Auteurs: Jean-Charles Guimond, Mathieu Lévesque, Pierre-Luc Michaud, Jérémie Berdugo, Kenneth Finnson, Anie Philip et Stéphane Roy

Journal : BMC Developmental Biology Vol. 10 (15), pages 1-16, 2010.

PMID: 20152028

2.0 Mise en contexte

Parmi les tétrapodes vertébrés, la formation du patron de développement de l'autopode des urodèles amphibiens (*e.g.* les axolotls) est unique. Durant le développement ou la régénération de l'autopode, les phalanges se forment séquentiellement en commençant avec les phalanges antérieures. Inversement, les amniotes développent leurs phalanges presque simultanément mais les phalanges postérieures se forment légèrement en avance.

L'ordre de développement des phalanges chez les amniotes corrèle avec l'expression des gènes *BMP-2* et *Shh* qui se chevauchent spatiotemporellement dans la partie postérieure du bourgeon de la patte. L'expression de *Shh* est toutefois très restreinte et s'étend beaucoup moins antérieurement que celle de *BMP-2*. *Shh* est le principal médiateur de la formation du patron de développement antéropostérieur des membres. Puisque l'expression de *BMP-2* s'étend plus distalement que celle de *Shh*, *BMP-2* était jusqu'à maintenant considéré médiateur secondaire de *Shh* pour la formation du patron de développement antéropostérieur des membres. Cependant, de plus en plus de données d'évidences chez la souris suggèrent que *BMP-2* n'est pas impliqué dans la formation du patron de développement.

La particularité de l'ordre d'apparition des phalanges chez l'axolotl nous a permis de démontrer que durant le développement et la régénération de la patte, l'expression de *BMP-2* corrèle avec l'ordre d'apparition des phalanges et est opposée à l'expression de *Shh*.

L'ordre de développement unique des phalanges durant la régénération chez l'axolotl a également permis de démontrer que *BMP-2* n'est pas sous le contrôle de *Shh* et que les fonctions de ces deux gènes sont indépendantes. L'expression de *Shh* induit la formation du patron de développement. L'expression de *BMP-2* induit la condensation des cellules qui formeront le squelette des phalanges et non la formation du patron de développement. Finalement, nos résultats ont également démontré que *BMP-2* induit de l'apoptose durant la régénération de la patte tel qu'il a déjà été démontré durant le développement de la patte chez les amniotes.

2.1 Contribution des auteurs

Ces auteurs ont conçu les expériences: Jean-Charles Guimond et Stéphane Roy.

Ces auteurs ont effectué les expériences: Jean-Charles Guimond, Pierre Luc Michaud, Jérémie Berdugo, Mathieu Lévesque, Kenneth Finson.

Ces auteurs ont analysé les données: Jean-Charles Guimond et Stéphane Roy.

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

Ces auteurs ont écrit l'article: Jean-Charles Guimond et Stéphane Roy.

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

2.2 Autorisation de l'éditeur et des auteurs pour incorporer l'article dans la thèse en vue de son indexation et de sa diffusion

BioMed Central Open Access Charter

Every peer-reviewed research article appearing in any journal published by BioMed Central is 'open access', meaning that:

1. The article is universally and freely accessible via the Internet, in an easily readable format and deposited immediately upon publication, without embargo, in an agreed format - current preference is XML with a declared DTD - in at least one widely and internationally recognized open access repository (such as PubMed Central).
2. The author(s) or copyright owner(s) irrevocably grant(s) to any third party, in advance and in perpetuity, the right to use, reproduce or disseminate the research article in its entirety or in part, in any format or medium, provided that no substantive errors are introduced in the process, proper attribution of authorship and correct citation details are given, and that the bibliographic details are not changed. If the article is reproduced or disseminated in part, this must be clearly and unequivocally indicated.

BioMed Central Open Access license agreement

Brief summary of the agreement

Anyone is free:

- to copy, distribute, and display the work;
- to make derivative works;
- to make commercial use of the work;

En vertu de la **chartre du libre accès de « BioMed Central »**, les auteurs suivant ont donné leur permission pour reproduire cet article dès sa publication: Jean-Charles Guimond, Mathieu Lévesque, Pierre-Luc Michaud, Jérémie Berdugo, Kenneth Finsson, Anie Philip et Stéphane Roy.

2.3 Page couverture de l'article – BMP-2 functions independently of Shh signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs

Jean-Charles Guimond², Mathieu Lévesque², Pierre-Luc Michaud¹, Jérémie Berdugo¹,
Kenneth Finnsen³, Anie Philip³ and Stéphane Roy^{1,2*}

1- Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal (QC) Canada.

2- Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal (QC) Canada.

3- Department of Surgery, Faculty of Medicine, McGill University, Montreal (QC) Canada.

Author's e-mails:

confidential
confidential
confidential
confidential
confidential
confidential
confidential

*Corresponding author
Stéphane Roy Ph.D.
Faculty of Dentistry
Université de Montréal
C.P. 6128, succursale Centre-Ville
Montréal, QC, Canada, H3C 3J7
Tel: (514) 343-6111 ext 1780
Fax: (514) 343-2233
e-mail: confidential

2.4 Abstract

2.4.1 Background

Axolotls have the unique ability, among vertebrates, to perfectly regenerate complex body parts, such as limbs, after amputation. In addition, axolotls pattern developing and regenerating autopods from the anterior to posterior axis instead of posterior to anterior like all tetrapods studied to date. Sonic hedgehog is important in establishing this anterior-posterior axis of limbs in all tetrapods including axolotls. Interestingly, its expression is conserved (to the posterior side of limb buds and blastemas) in axolotl limbs as in other tetrapods. It has been suggested that *BMP-2* may be the secondary mediator of sonic hedgehog, although there is mounting evidence to the contrary in mice. Since *BMP-2* expression is on the anterior portion of developing and regenerating limbs prior to digit patterning, opposite to the expression of sonic hedgehog, we examined whether *BMP-2* expression was dependent on sonic hedgehog signaling and whether it affects patterning of the autopod during regeneration.

2.4.2 Results

The expression of *BMP-2* and *SOX-9* in developing and regenerating axolotl limbs corresponded to the first digits forming in the anterior portion of the autopods. The inhibition of sonic hedgehog signaling with cyclopamine caused hypomorphic limbs

(during development and regeneration) but did not affect the expression of *BMP-2* and *SOX-9*. Overexpression of *BMP-2* in regenerating limbs caused a loss of digits. Overexpression of *Noggin* (*BMP* antagonist) in regenerating limbs also resulted in a loss of digits. Histological analysis indicated that the loss due to *BMP-2* overexpression was the result of increased cell condensation and apoptosis while the loss caused by *Noggin* was due to a decrease in cell division.

2.4.3 Conclusion

The expression of *BMP-2* and its target *SOX-9* was independent of sonic hedgehog signaling in developing and regenerating limbs. Their expression correlated with chondrogenesis and the appearance of skeletal elements as described in other tetrapods. Overexpression of *BMP-2* did not cause the formation of extra digits, which is consistent with the hypothesis that it is not the secondary signal of sonic hedgehog. However, it did cause the formation of hypomorphic limbs as a result of increased cellular condensation and apoptosis. Taken together, these results suggest that *BMP-2* does not have a direct role in patterning regenerating limbs but may be important to trigger condensation prior to ossification and to mediate apoptosis.

2.5 Background

Bone morphogenetic proteins (*BMPs*) are members of the transforming growth factor- β superfamily and were first discovered when ectopic cartilage and bone formation were induced by demineralized bone matrix implanted into soft tissues of animals (Urist, 1965, Wozney, 2002). However, their biological roles go far beyond osteogenesis (Suzuki et al., 1997, Munoz-Sanjuan and Brivanlou, 2002). *BMPs* have been extensively studied during the development of the vertebrate limb, which has long been recognized as an excellent experimental system to study the genes and signaling pathways involved in patterning complex structures.

The first stage in which *BMPs* were assessed in limb development is the establishment of the anterior-posterior limb axis. In amniotes, the posterior region of the forming limb bud is referred to as the zone of polarizing activity (*ZPA*) and is an organizer of the anterior-posterior patterning of developing limbs (Riddle et al., 1993). When cells from the *ZPA* are grafted into the anterior region of a chick limb bud, polydactyly is induced (Tickle et al., 1975, Honig and Summerbell, 1985). Previous studies have shown that sonic hedgehog (*Shh*) is expressed exclusively in the *ZPA* and that implanting *Shh* expressing cells, or beads of *Shh*, in the anterior limb bud is sufficient to reproduce the polydactyly induced with *ZPA* transplants (Riddle et al., 1993, Lopez-Martinez et al., 1995). On the other hand, knockout mice for *Shh* display a major deficiency in the anterior-posterior patterning of

their autopods which resemble a spike like structure (Litingtung et al., 2002). Thus, Shh appears to be a mediator for the patterning of the anterior-posterior axis of the limb (Riddle et al., 1993, Lopez-Martinez et al., 1995, McGlinn and Tabin, 2006). Because of the restricted expression of *Shh* to the posterior margin, it remains unclear, however, whether Shh induces the limb polarity directly or through a secondary signal. *BMP-2* has received much attention as a downstream target of Shh. Indeed, *BMP-2* expression overlaps spatiotemporally with the expression of *Shh* in the early developing limb bud of mammalian and avian embryos (Francis et al., 1994, Laufer et al., 1994, Hogan, 1996, Yang et al., 1997, Geetha-Loganathan et al., 2006) and can be induced in chick anterior wing buds by ectopic *Shh* expression (Laufer et al., 1994, Yang et al., 1997). However, overexpression of *BMP-2* alone does not reproduce the polydactyly obtained with *Shh* overexpression in chick embryos (Duprez et al., 1996b, Drossopoulou et al., 2000). Moreover, *BMP-2* expression is maintained in the limb buds of *Shh* knockout mice (Litingtung et al., 2002). In addition, the polarity and digit identity is normal in mice with *BMP-2* deficient limbs (Bandyopadhyay et al., 2006). Hence, these data show that *BMP-2* is not essential to relay Shh signaling in developing limbs.

In more advanced limb developmental stages, *BMP-2*, *BMP-4* and *BMP-7* are all expressed in the interdigital (ID) tissue (Francis et al., 1994, Laufer et al., 1997, Geetha-Loganathan et al., 2006). Extirpation experiments of ID tissues have shown that anterior-posterior identity is not a fixed property of digital primordia and that the ID tissues are important for digit

patterning (Dahn and Fallon, 2000). Experiments with inhibitors of *BMP* signaling in ID tissue suggested that differential levels of *BMPs* in the ID mesenchyme may be important in directing digit patterning (Dahn and Fallon, 2000). However, a recent study (Bandyopadhyay et al., 2006) with conditional knockout for *BMP-2*, *BMP-4* or *BMP-7* showed that these *BMPs* are not essential as signals from the ID mesenchyme for specifying digit identity but that they mediate ID programmed cell death as previously reported (Ganan et al., 1996, Chen and Zhao, 1998). In the chicken, overexpression of dominant negative type I-A or type I-B *BMP* receptors (*dnBMPR-IA* or *dnBMPR-IB*), in embryonic hind limbs, reduced ID tissue apoptosis and resulted in webbed feet (Yokouchi et al., 1996, Zou and Niswander, 1996). On the contrary, application of *BMP-2* or *BMP-7* in the ID tissues accelerated and intensified apoptosis (Macias et al., 1997). In ducks (Laufer et al., 1997) and bats (Weatherbee et al., 2006), *BMPs* are also expressed in the ID tissues of developing digits. However, these animals have webbed autopods and apoptosis is absent in ID tissues, suggesting expression of *BMPs* could have other roles in digit formation.

One aspect that is clearly affected by the expression of *BMP-2* in developing limbs is skeletal development (Duprez et al., 1996a, Duprez et al., 1996b, Healy et al., 1999, Drossopoulou et al., 2000, Pizette and Niswander, 2001). It was shown, in chicks, that *BMPs* are needed for chondroprogenitor cell determination and/or condensation and subsequent differentiation into chondrocytes (Pizette and Niswander, 2000). In mice with

BMP-2/BMP-4 deficient limbs, differentiation of condensed prechondrocytes into chondrocytes is delayed, indicating that a threshold level of *BMPs* is required to trigger chondrogenesis (Bandyopadhyay et al., 2006). In these mutants, the two posterior digits fail to form as a consequence of the misexpression of the *SOX-9* gene. *SOX-9*, a High Mobility Group (HMG)-domain transcription factor, is the earliest marker of chondrogenesis (Weston et al., 2003), and a regulator of the type II collagen gene, which is a major constituent of cartilage (Bell et al., 1997, Healy et al., 1999). *SOX-9* is a known target of *BMP-2* (Zehentner et al., 1999) and overexpression of *BMP-2* in developing chick limbs induces *SOX-9* expression which then stimulates cartilage formation (Healy et al., 1999).

Among tetrapod vertebrates, urodele amphibians (i.e. axolotls) have a unique developmental pattern of their limbs. Indeed, while amniotes and anurans develop their digits almost simultaneously with a slightly accelerated onset of posterior digit formation (digit 4 being the first digit to condense in mice) (Shubin and Alberch, 1986, Vargas and Fallon, 2005, Zhu et al., 2008), urodeles show a reversed sequence with a more progressive/successive development of anterior digits followed by posterior digits (Shubin and Alberch, 1986, Hinchliffe and Vorobyeva, 1999). Although the order of digit development is different between the aforementioned animals, the end point is the same with similar digit identity in the mature limb (Franssen et al., 2005). Moreover, even though there is no clearly defined *ZPA per se* in axolotl and newt, *Shh* is expressed, as in amniotes, in the posterior mesenchyme of their developing and regenerating limb buds

(Imokawa and Yoshizato, 1997, Imokawa and Yoshizato, 1998, Torok et al., 1999). The inhibition of Shh signaling with cyclopamine leads to an anterior-posterior truncation of autopod elements in the developing and regenerating axolotl limbs (Roy and Gardiner, 2002, Stopper and Wagner, 2007). In addition, overexpression of *Shh* in the anterior mesenchyme of regenerating limbs induces polydactyly (Roy et al., 2000), showing that as in amniotes, Shh has a morphogenetic property in patterning the anterior-posterior axis in developing and regenerating urodele limbs.

The present study addresses the role of *BMP-2* during limb regeneration in axolotl. We report the first cloning of an axolotl full length *BMP* cDNA (*BMP-2*). We use cyclopamine, a pharmacological antagonist of the hedgehog signaling pathway, to show that, as in mouse, *BMP-2* is not likely to be the secondary signal of Shh. *BMP-2* is expressed in the ID tissues of developing digits in virtually all tetrapod species (Francis et al., 1994, Yokouchi et al., 1996, Laufer et al., 1997, Beck et al., 2006, Geetha-Loganathan et al., 2006, Weatherbee et al., 2006, Pajni-Underwood et al., 2007) and the expression of *SOX-9* in these digits is linked to *BMP-2* expression (Healy et al., 1999, Pizette and Niswander, 2000, Akiyama et al., 2002, Akiyama et al., 2007). The fact that the sequential development/regeneration of digits in axolotl limbs is the opposite of that observed in other tetrapods (anterior digits form first in axolotls instead of the posterior digits), even though *Shh* is expressed on the posterior side of axolotl developing/regenerating limbs, allowed us to assess whether the expression of *BMP-2* and *SOX-9* correlated with digits appearance (as they condense) or

whether their expression correlated with Shh signaling in conditions where it was normal or inhibited. The effect of *BMP-2* or *Noggin* (a general *BMP* antagonist) overexpression on regenerating digits was also assessed.

2.6 Results

2.6.1 Cloning and analysis of *BMP-2*

The axolotl full-length cDNA encoding *BMP-2* was cloned, sequenced and compared to the sequence of other vertebrates. Several *BMP-2* clones were isolated from an axolotl cDNA library. The longest clone of 2228 bp [GenBank: EU339232.1] comprising an open reading frame (ORF) of 1188 bp was selected. The analysis of this ORF, using NCBI-BLAST, showed a highly conserved sequence homology of the *BMP-2* ORF with that of other species: 83% identity to human; 83% to mouse; and 67.3 % to *Xenopus laevis*. Moreover, the 3' UTR of the *BMP-2* mRNA was highly conserved with that of other species (data not shown).

The translated ORF of axolotl *BMP-2* has a predicted amino acid sequence of 395 amino acids (Additional File 1: Figure S1) that varies by less than 1% in length when compared to that of human, mouse and *Xenopus laevis*. The amino acid sequence derived from the ORF

also showed a highly conserved protein homology between species: 73% with human, 72% with mouse, and 68% with *Xenopus laevis* and resulted in an expected value (E-value) of less than $1e^{-164}$ when blasted in Gen Bank. Seven highly conserved cysteine residues characteristic to all members of the *TGF- β* super family (Massague, 1990, Gomez-Escobar et al., 1998) are also present (Additional File 1: Figure S1 shaded amino acids).

2.6.2 *BMP-2* and *SOX-9* expression during limb development

Whole-mount *in situ* hybridization was performed on developing forelimbs of axolotl from developmental stages 41 to 53. The nomenclature of Nye *et al.* (Nye et al., 2003) was used to determine the staging and to label the digits of the forelimb. Digit 1 is the anterior most (corresponding to the index side in human) and digit 4 the posterior most.

At stage 47, the expression of *BMP-2* was mainly detected as a narrow band that surrounded the anterior border of the limb bud and extended slightly to the posterior part of the distal end. Prior to stage 47, *BMP-2* was expressed as a band at the edge of the limb covering both the anterior to posterior portions of the limb (data not shown) as described previously for *Xenopus laevis* (Christen and Slack, 1998). *SOX-9* was also expressed in the anterior portion of the limb bud at stage 47 while *Shh* expression is restricted to the posterior (i.e. opposite to that of *BMP-2*; Figure 2.1). At stage 48, the expression of *BMP-2* had become restricted to the interdigital space between the developing digits 1 and 2 and is adjacent to the expression of *SOX-9* in these two digits at stage 49 (Figure 2.1). At this

stage, *SOX-9* expression correlates with the developing cartilage elements of the wrist (carpals) and the first two digits (phalanges) (Figure 2.1; Victoria blue of stage 49). At stage 50, *BMP-2* was mainly expressed between developing digits 2 and 3 and was adjacent to the expression of *SOX-9* in these two digits at stage 51 (Figure 2.1). At this stage, the expression of *SOX-9* at the tip of digit 2 correlated with the formation of skeletal elements in digit 2 (i.e. the phalanges) and the expression in digit 3 primordium was not yet associated with skeletal elements as revealed by Victoria blue staining (Figure 2.1; Victoria blue of stage 51). Finally, at stage 52, *BMP-2* was expressed between developing digits 3 and 4 and was adjacent to the expression of *SOX-9* in these two digits at stage 53 (Figure 2.1). At that stage, the expression of *SOX-9* at the tip of digit 3 correlated with the formation of skeletal elements in digit 3 but the expression in digit 4 primordium was not yet associated with skeletal elements as revealed by Victoria blue staining (Figure 2.1; Victoria blue of stage 53). In addition to its expression between digits 3 and 4 at stage 52, *BMP-2* expression was still detectable at the base of all 4 digits. This expression was not investigated further in the present study but has been associated with the elongation phase of digits in other species (De Luca et al., 2001, Minina et al., 2001, Sears et al., 2006).

Figure 2.1: Expression patterns (whole mount *in situ* hybridisation) for *BMP-2*, *SOX-9* and *Shh* in developing limbs and cartilage staining (Victoria blue; V.b.)

All pictures show a dorsal view of the limb with the posterior side on top. Numbers in the upper left of each panel refers to the developmental stages.

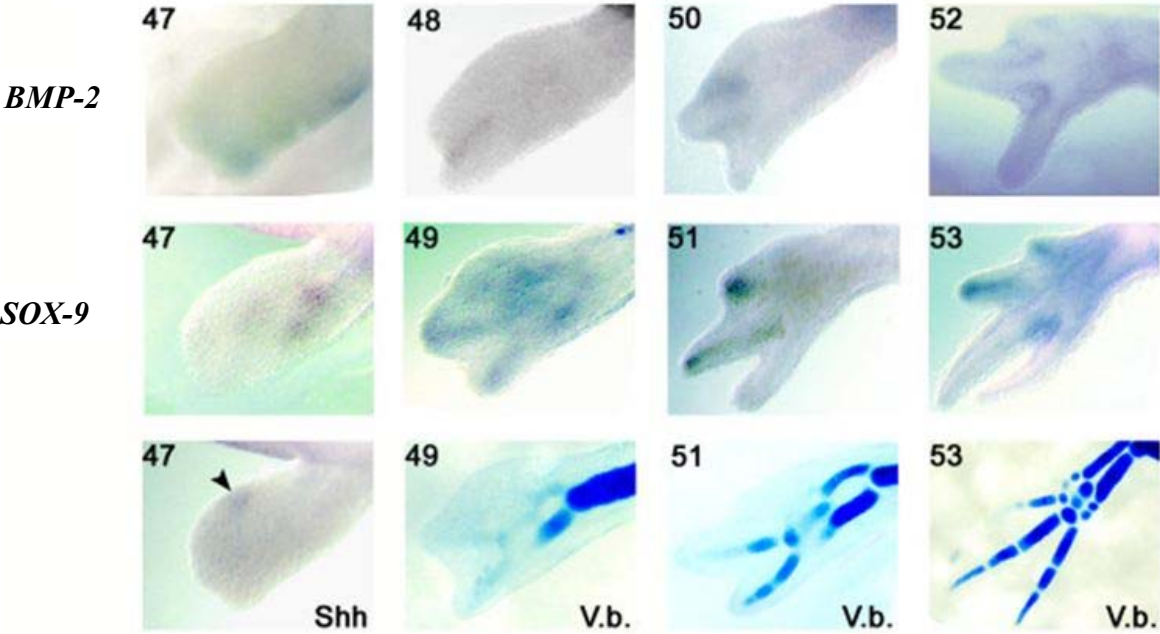


Figure 2.1

2.6.3 Effects of blocking Shh signaling in developing digits

As described above, at stage 47, *BMP-2* and *Shh* expression are on opposite sides of the developing limb bud (Figure 2.1; first column). It has been clearly demonstrated in mouse that *BMP-2* is not essential for digit identity (Bandyopadhyay et al., 2006). It was shown (in knockout mice for *Shh*) that *Shh* is not essential for chondrogenesis and is dispensable for *BMP-2* expression (Litingtung et al., 2002). Based on these observations, we tested, in axolotl, whether *BMP-2* expression is independent of *Shh* signaling. The hedgehog pathway antagonist cyclopamine (Chen et al., 2002) was used to determine whether *BMP-2* expression is independent of *Shh* signaling. The expression of *BMP-2* and *SOX-9* were assessed in limbs of animals treated with 2 different concentrations of cyclopamine that were shown in a previous study to prevent the formation of posterior digits (Stopper and Wagner, 2007). In the aforementioned study, the digits that remained after cyclopamine treatment were identified as follows: when 2 digits remained after treatment, they were found to be digits 1 and 2, and when only 1 digit remained (the result of a higher concentration of cyclopamine), it was identified as digit 1 (Stopper and Wagner, 2007). In the present study, cyclopamine treatment was initiated at developmental stage 41 which corresponds to the onset of *Shh* expression (Imokawa and Yoshizato, 1997, Nye et al., 2003). We confirmed that the expression of *Shh* at various limb development stages (data not shown) was as it had been reported previously by two other groups (Imokawa and Yoshizato, 1997, Torok et al., 1999). The group of Imokawa *et al.* (1997) also reported that

Shh is expressed as late as the 2-3 digit stage which corresponds to stage 51-52 based on Nye *et al.* (2003). The expression of *BMP-2* and *SOX-9* was assessed after 14 (stage 51) and 21 (stage 53) days of treatment to see whether their expression correlated with skeletogenesis even in the absence of *Shh* signaling. *BMP-2* expression was not affected by the presence of cyclopamine prior to stage 51 of limb development (see Additional File 2: Figure S2 for the expression of *BMP-2* at stage 45 in control and cyclopamine treated limbs). The expression of *SOX-9* was not affected either at stage 45 in cyclopamine treated animals (see Additional File 2: Figure S2).

2.6.3.1 14 days

After 14 days of treatment (Figure 2.2A-F), control animals (treated with ethanol, the carrier for cyclopamine) had reached stage 51 with digits 1 and 2 in formation (Figure 2.2 A, D). *BMP-2* was expressed in the interdigital space of digits 1-2 and 2-3 (Figure 2.2 A) and *SOX-9* was expressed at the tips of digits 1 and 2, and fully expressed in the forming digit 3 and in the carpal elements of the wrist (Figure 2.2 D). As expected, *BMP-2* expression was adjacent to *SOX-9* expression in digits 1, 2 and 3. In limbs treated with 1 µg/mL of cyclopamine (Figure 2.2 B, E), digits 1 and 2 were deformed and in animals treated with 2 µg/mL of cyclopamine (Figure 2.2 C, F), only 1 digit was formed. The expression pattern of *BMP-2* was adjacent to the expression of *SOX-9* in the forming digits of cyclopamine treated animals just as it is in control animals.

2.6.3.2 21 days

After 21 days of treatment (Figure 2.2 G-O), control animals had reached stage 53, and at this stage the pattern is complete. Limbs treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cyclopamine developed only digits 1 and 2 and limbs treated with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cyclopamine developed only digit 1. In control animals, the expression of *BMP-2* was observed around the digits, and the expression of *SOX-9* was in digits 3 and 4. This developmental stage corresponds to the elongation phase of digits in other species (De Luca et al., 2001, Minina et al., 2001, Sears et al., 2006) and as previously mentioned, was not investigated further. In the animals treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 2.2 H, K, N) or 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of cyclopamine (Figure 2.2 I, L, O) the expression of *BMP-2* and *SOX-9* in the digits that have formed (digits 1 and 2 for 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treatment and digit 1 for 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ treatment) was adjacent, with the expression of *BMP-2* surrounding the expression of *SOX-9* as in the digits of control animals.

Figure 2.2: Expression of *BMP-2* and *SOX-9* detected by whole mount in situ hybridisation, and cartilage staining in developing limbs treated with cyclopamine

Expression of *BMP-2* (A-C) and *SOX-9* (D-F) detected by whole mount in situ hybridisation in developing limbs treated 14 days with cyclopamine. Expression of *BMP-2* (G-I) and *SOX-9* (J-L) in developing limbs treated 21 days with cyclopamine. Left column (A, D, G, J, M) shows control animals (0.4 μ L EtOH/mL), middle column (B, E, H, K, N) shows the animals treated with 1 μ g/mL of cyclopamine and right column (C, F, I, L, O) shows the animals treated with 2 μ g/mL of cyclopamine. All pictures show a dorsal view of the limbs with posterior side on top. Arrowheads in C, H and K indicate the expression of *BMP-2* on both sides of the developing digits and the expression of *SOX-9* in the middle of the developing digits. The last row (M-O) shows the cartilage staining (Victoria blue) of the skeletal elements at the end of cyclopamine treatments (21 days).

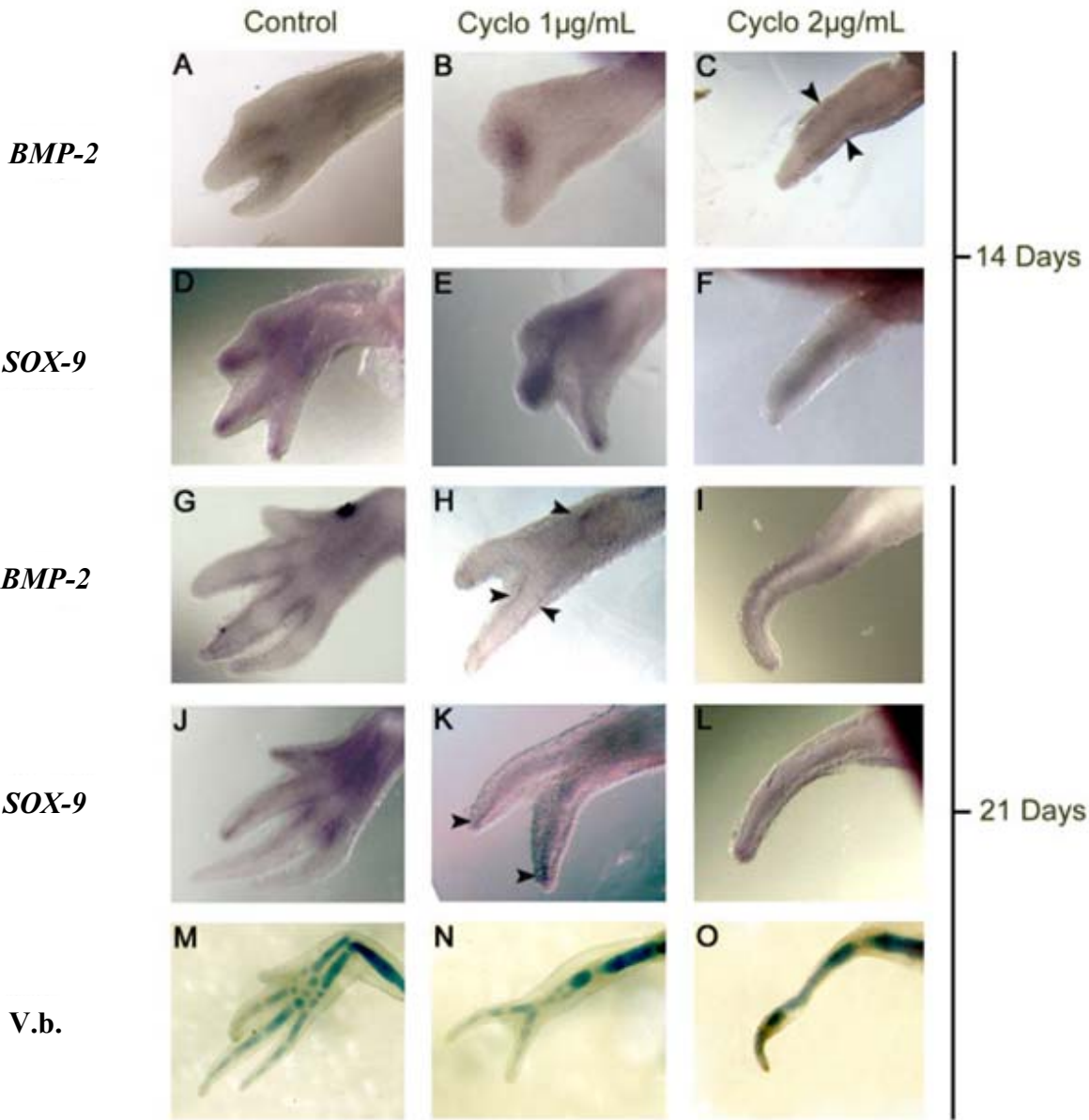


Figure 2.2

2.6.4 *BMP-2* and *SOX-9* expression during limb regeneration

Limb regeneration in salamander can be divided into two main phases. 1) A preparation phase that starts at amputation time and focuses mainly on the formation of the blastema; and 2) a redevelopment phase that starts approximately at the late bud stage and focuses mainly on the differentiation and repatterning of the blastema into a new limb (see reference (Iten and Bryant, 1973) for stages description). To determine when *BMP-2* and *SOX-9* are expressed, whole mount *in situ* hybridisation was performed for both genes throughout limb regeneration. The onset of *BMP-2* expression occurred at the early bud stage (EB; Figure 2.3A) while *SOX-9* was not yet expressed (Figure 2.3D). The expression of *BMP-2* was maintained distally in the blastema of medium bud (MB) and late bud (LB) stages (Figure 2.3 B-C) and was adjacent to the more proximal expression of *SOX-9*; which starts at MB stage (Figure 2.3 E-F). At the Palette (Pal) stage, *BMP-2* (Figure 2.3 G) and *SOX-9* (Figure 2.3 J) expression started to localize in the anterior region where the first two digits eventually form (as revealed by Victoria blue staining; Figure 2.3 N). At this stage, the expression of *BMP-2* (Figure 2.3 G) versus that of *Shh* was on the opposite side of the autopod (Figure 2.3 M). As in development at stage 47 (Figure 2.1), the opposing pattern of expression of *Shh* and *BMP-2* just preceded the onset of digit chondrogenesis. At Pal stage, *BMP-2* (Figure 2.3 G) delineates the first 2 digits, and at early differentiation (ED) stage, *BMP-2* expression also appears between digits 3 and 4 (Figure 2.3H). At these two stages (Pal and ED), the expression of *SOX-9* (Figure 2.3 J-K), was adjacent to *BMP-2* expression

(Figure 2.3 G-H) and corresponded to the exact location of the skeletal elements. In later stages (Figure 2.3 K-L) *SOX-9* expression was tightly correlated to digit chondrogenesis as revealed by Victoria blue staining (Figure 2.3 N-O).

Figure 2.3: Expression pattern, by whole mount in situ hybridisation, for *BMP-2*, *SOX-9* and *Shh* transcript, and cartilage staining of skeletal elements at different stages of limb regeneration

Expression pattern, by whole mount in situ hybridisation, for *BMP-2* (A-C and G-I), *SOX-9* (D-F and J-L), *Shh* (M) and cartilage staining of skeletal elements (Victoria blue; N-O) at different stages of limb regeneration. All pictures show a dorsal view of the regenerating limbs with posterior side on the left. EB, early bud; MB, medium bud; LB, late bud; Pal, palette; ED, early differentiation; LD, late differentiation. The arrowhead in panel M indicates the restricted expression of *Shh* in the posterior portion of the blastema.

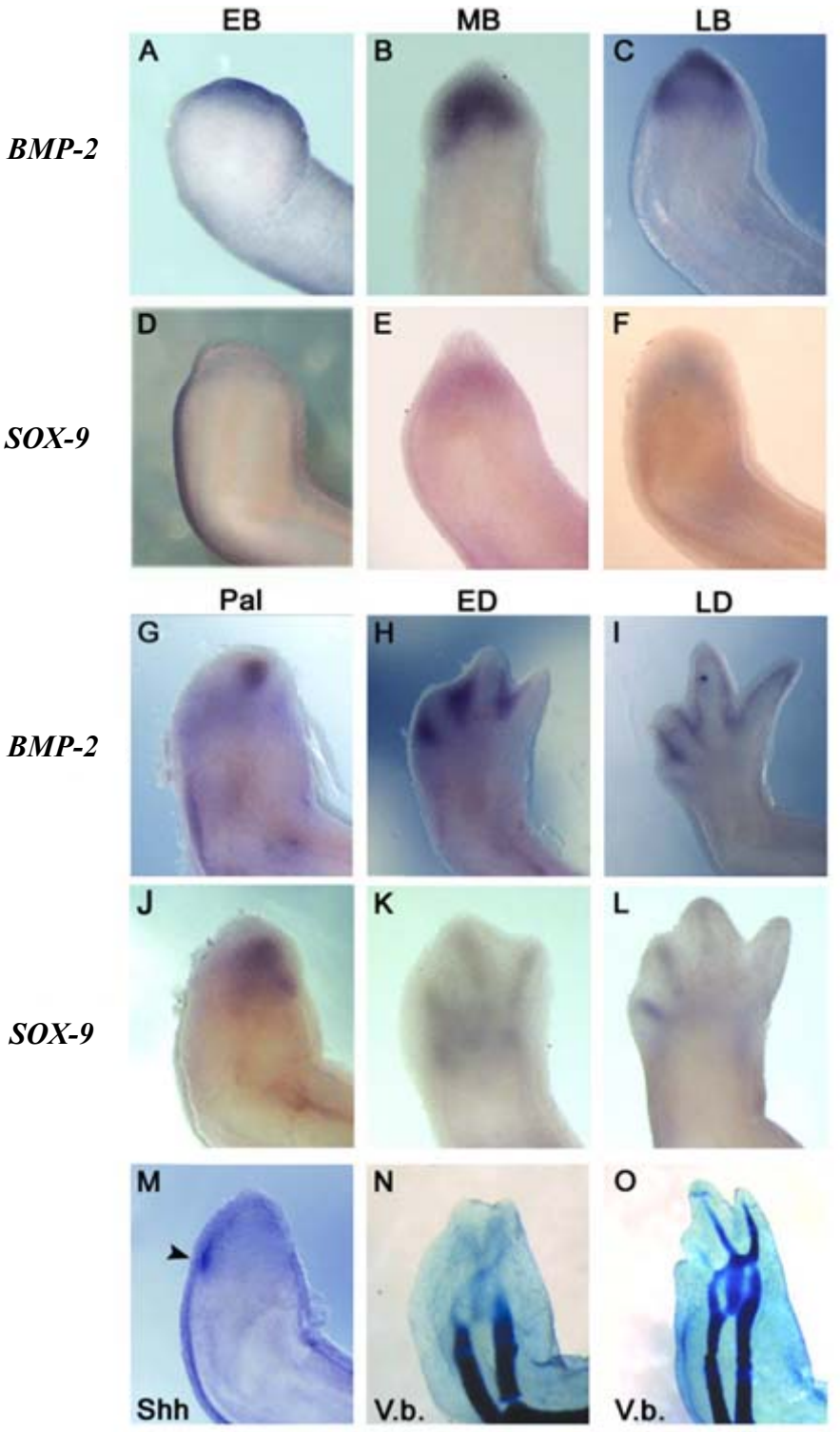


Figure 2.3

2.6.5 Effects of blocking *Shh* signaling on regenerating digits

As described above, at Pal stage, *BMP-2* expression is on the opposite side of the regenerating limb bud compared to that of *Shh* (Figure 2.3 G & M). To determine if *Shh* signaling had an effect on *BMP-2* expression during limb regeneration, as determined for axolotl developing limbs (Figure 2.2), axolotls were treated with cyclopamine. The expression of *BMP-2* and *SOX-9* (determined by RT-PCR at MB stage when *BMP-2*, *SOX-9* and *Shh* are first co-expressed) was not affected after 6 or 24 hours of exposure to 1 or 2 $\mu\text{g/mL}$ of cyclopamine (data not shown). The expression of *BMP-2* at medium bud was not affected in regenerating limbs exposed to cyclopamine from the time of amputation either (see Additional File 3: Figure S3). Therefore, in order to mimic as close as possible the *Shh* knockout phenotype, axolotls were treated from the moment of limb amputation until ED (when patterning is completed). The expression of *BMP-2* and *SOX-9* was assessed at ED stage to determine whether their expression correlated with skeletogenesis during the redevelopment phase of regeneration as shown for development (see Figure 2.2). In animals treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of cyclopamine, *BMP-2* expression (Figure 2.4 B) was adjacent to *SOX-9* expression (Figure 2.4 E). The same observation was made in the 2 $\mu\text{g/mL}$ treated animals (compare Figure 2.4C with 2.4 F). Under these conditions, the expression of *BMP-2* and *SOX-9* relative to each other was the same as observed in corresponding digits of control limbs (Figure 2.4 A & D). As in development, the 1 $\mu\text{g/mL}$ treated animals regenerated limbs with only two digits (Figure 2.4 H) while the 2 $\mu\text{g/mL}$ treated animals

regenerated limbs with only one digit (Figure 2.4 I). Hence, the effect of cyclopamine on patterning regenerated skeletal elements as well as the expression of *BMP-2* and *SOX-9* were virtually identical to that observed in developing limbs treated with cyclopamine

Figure 2.4: Expression pattern, by whole mount in situ hybridisation, for *BMP-2* and *SOX-9* in regenerating limbs treated with cyclopamine

Expression pattern, by whole mount in situ hybridisation, for *BMP-2* (A-C) and *SOX-9* (D-F) at the ED stage in regenerating limb treated with cyclopamine from the time of amputation until fixed at ED. Left column (A, D, G) shows control animals (treated with the carrier 0.4 μ L EtOH/mL), middle column (B, E, H) shows the animals treated with 1 μ g/mL of cyclopamine and right column (C, F, I) shows the animals treated with 2 μ g/mL of cyclopamine. All pictures show a dorsal view of the limbs with the posterior side on the left. The bottom row (G, H, I) show the skeletal staining (Victoria blue) at the end of the treatments when the control animals had completely regenerated.

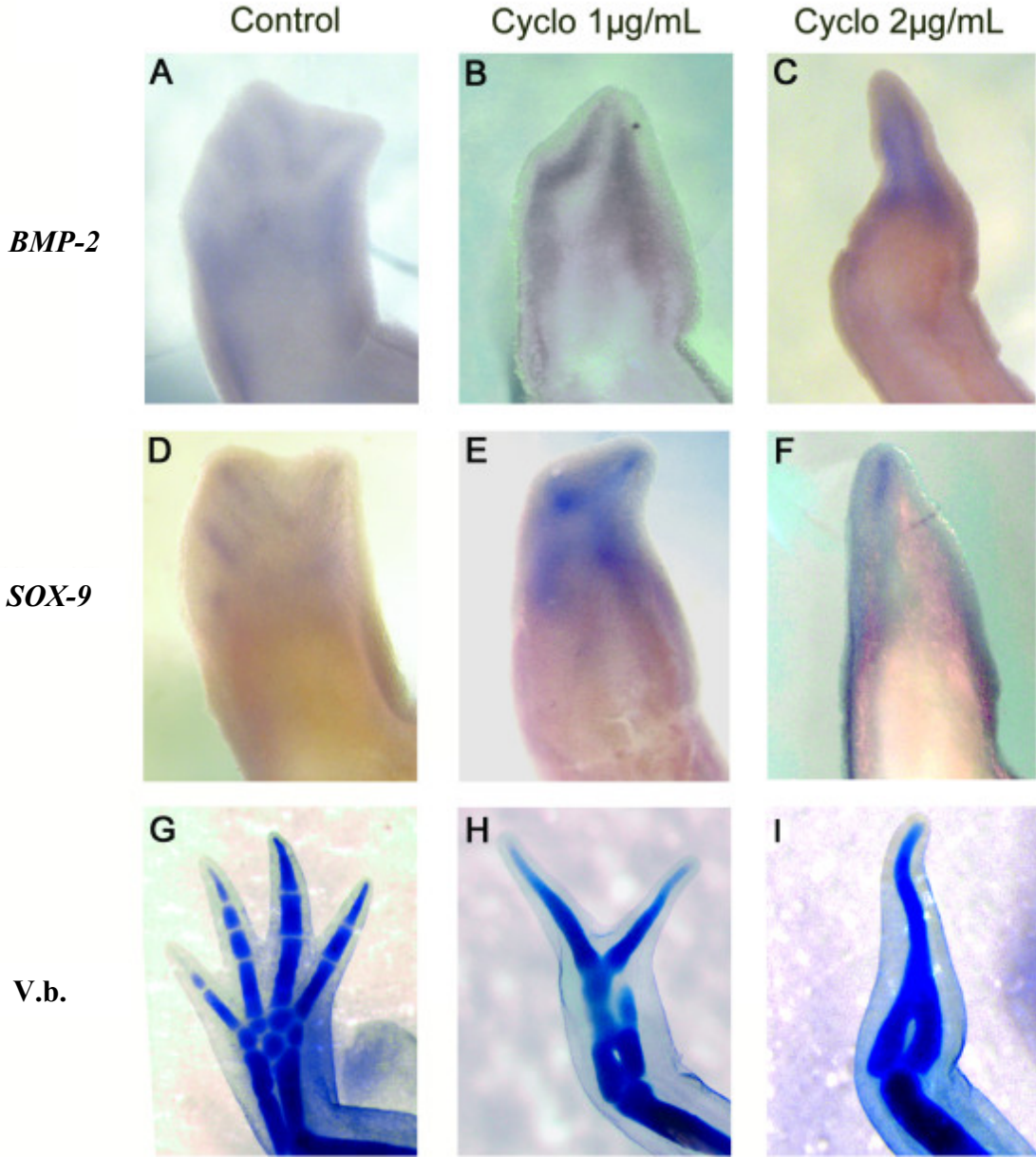


Figure 2.4

2.6.6 Overexpression of *BMP-2* and *Noggin* in regenerating limbs

Prior to investigating the *in vivo* role of *BMP-2* during limb regeneration, constructs expressing the monomeric red fluorescent protein (*mRFP*), *BMP-2* and *Noggin* were tested *in vitro* to verify their efficacy (Figure 2.5). C28/I2 cells were cotransfected with *mRFP*, axolotl *BMP-2* and *Xenopus laevis* *Noggin* along with the *BMP*-responsive BRE2-luciferase reporter construct (Korchynskyi and ten Dijke, 2002) as well as a CMV- β -galactosidase construct as a control. Luciferase and β -galactosidase activities were determined 48 hours later and results (mean \pm sd; n=3/condition) are presented as relative light unit (RLU) normalised with β -galactosidase. The first bar shows a basal activity (*mRFP* alone) of 4.6 ± 0.6 . The second bar shows that axolotl *BMP-2* activity is significantly ($p < 0.05$) higher (27.7 ± 3.4) than the basal activity (an increase of 6.0 fold). In the third bar, the activity of *Xenopus laevis* *Noggin* (general *BMP* antagonist) alone (3.1 ± 0.3) is significantly ($p < 0.05$) lower than *BMP-2* activity and also significantly ($p < 0.05$) lower than basal activity. Finally, the fourth bar shows the activity (13.3 ± 1.9) resulting from *BMP-2* in the presence of *Noggin*. The activity of this combination (*BMP-2* + *Noggin*) is significantly ($p < 0.05$) lower than the *BMP-2* activity alone (a decrease of 2.0 fold). Comparison between each condition (n=3/condition) was tested using Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. Hence, these results show the plasmids expressing axolotl *BMP-2* and *Xenopus laevis* *Noggin* produced functional proteins. As

expected, the *BMP* responsive luciferase reporter construct was activated in the *BMP-2* transfected cells and was antagonized in the *Noggin* transfected cells (Figure 2.5).

Figure 2.5: Activation of BMP responsive promoter construct by ectopic expression of axolotl BMP-2

The graphic summarizes BMP responsive luciferase activity performed in the human chondrocyte cell line, C28/I2, after the transfection of *BMP-2*, *Noggin* or *BMP-2* and *Noggin* expression plasmids combined. For each condition, the BMP responsive reporter construct and the β -galactosidase reporter construct were always co-transfected. The first bar shows the basal luciferase activity (transfected with mRFP without axolotl *BMP-2* or *Xenopus laevis* *Noggin*) of 4.6 ± 0.6 . The second bar shows a significant increase (27.7 ± 3.4) in luciferase activity when the axolotl *BMP-2* expressing plasmid was transfected. The third bar indicates that transfection of the *Xenopus laevis* *Noggin* expressing plasmid decreased luciferase activity (3.1 ± 0.3) compared to basal activity. The fourth bar shows the luciferase activity from the co-transfection of the axolotl *BMP-2* and the *Xenopus laevis* *Noggin* expressing plasmids. This co-expression resulted in a significant decrease in luciferase activity (13.3 ± 1.9) compared to the expression of *BMP-2* alone. All results (mean \pm sd; n = 3/condition) are expressed as relative light unit (RLU) normalised with β -galactosidase activity.

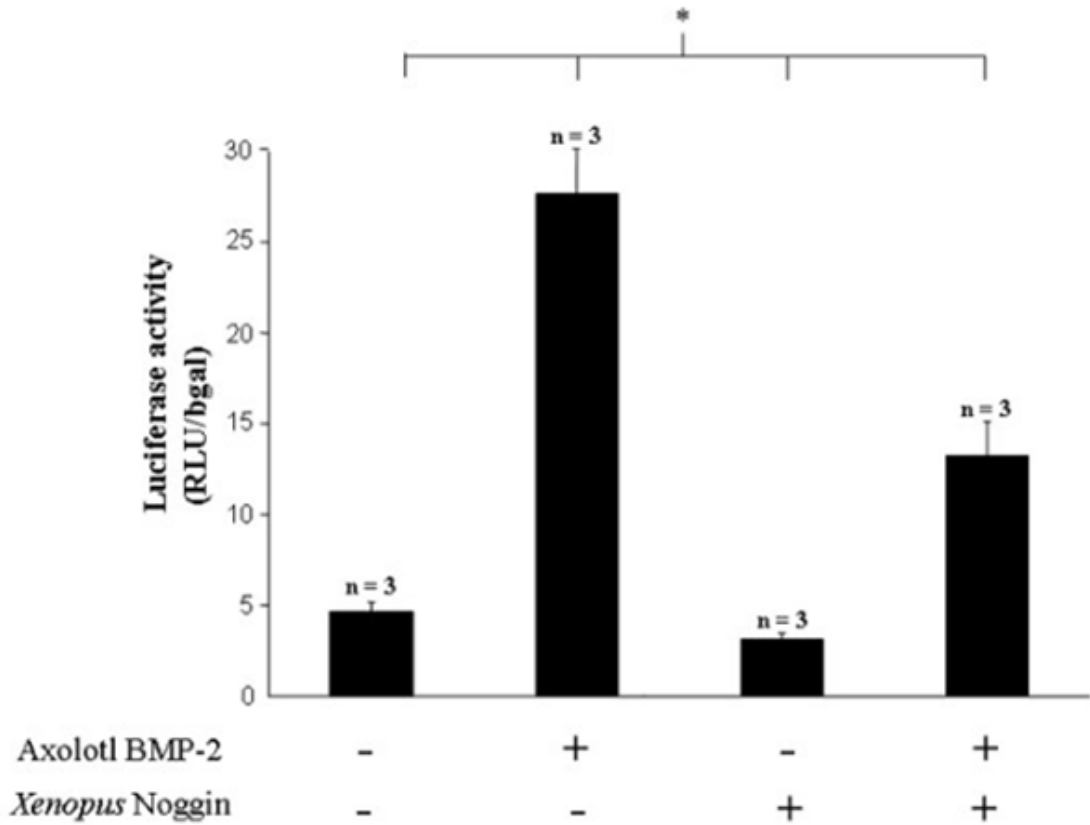


Figure 2.5

In vivo experiments were performed on regenerating limbs and were based on the expression pattern of *BMP-2* and *SOX-9* determined by whole mount *in situ* hybridisation (Figure 2.3 G & J). *BMP-2* and *Noggin* containing plasmids were electroporated in the posterior-half of the blastema at the LB stages in order to obtain maximal expression of the transgene by the time the regenerates reached Pal; the stage when expression of *BMP-2* and *SOX-9* is localized in the anterior portion of the limb (Figure 2.3 G & J). Hence, the electroporation was performed to induce *BMP-2* or *Noggin* at a time and place when no or low endogenous expression of *BMP-2* and *SOX-9* is detected.

The electroporation of *BMP-2* at the LB stage (Figure 2.6 A) resulted in the absence of digit formation (Figure 2.6 B-C) in the region of the electroporation (n=6/7), while controls (electroporation of *mRFP* alone; Figure 2.6 G) were normal (Figure 2.6 H-I) in most cases (n=6/7). In 1 control electroporated limb, 1 digit was missing as it sometimes happens in untreated animals (approximately 1% of the time, unpublished observations). The electroporation of *Xenopus laevis* *Noggin* under the same conditions (Figure 2.6 D) resulted in a similar phenotype (Figure 2.6 E-F; n=4/4) to those obtained with the electroporation of *BMP-2*. When the same quantity of plasmid was injected throughout the blastema to obtain an even distribution of expression across the blastema with *BMP-2* (n=2/2) or *Noggin* (n=3/4), regeneration was inhibited (data not shown). Expression of the *mRFP* construct alone throughout the blastema resulted in normally regenerating limbs (n=4/4) therefore ruling out the electroporation itself as a cause for the inhibition of regeneration (data not

shown). All electroporations performed prior to the LB stages with *BMP-2* in the full blastema had very mild effects (n = 3/10; digits were a little shorter in the electroporated region) and in the majority of cases, had no effect (n = 7/10) (data not shown). The electroporation with *Noggin* prior to the LB stage had no effect in all cases (n = 12/12) (data not shown). In control animals the electroporation of *mRFP* prior to LB gave rise to normal limbs (n = 9/9). With every construct combination used (*BMP-2/mRFP* or *Noggin/mRFP* or *mRFP* alone), the fluorescence detected from the *mRFP* construct lasted a short time (5-7 days) when the electroporation was done prior to LB stage, compared to electroporation at LB stage which lasted longer (up to 15 days).

Figure 2.6: Ectopic expression of axolotl *BMP-2* and *Xenopus laevis* *Noggin* by electroporating the expression plasmids directly into regenerating limbs

Different plasmid combinations were transfected to test the effect of *BMP-2* and *Noggin* on the regeneration process. In order to assess the efficiency of the electroporation in vivo (first column A, D, G), the mRFP expressing plasmid was co-transfected with axolotl *BMP-2* (A), *Xenopus laevis* *Noggin* (D) or mRFP alone (G; control) in the posterior half of regenerating blastema at the LB stage. The second column (B, E, H) show the resulting phenotypes once the controls (mRFP ectopic expression alone) were fully regenerated and the third column (C, F, I) show their skeletal elements using Victoria blue staining.

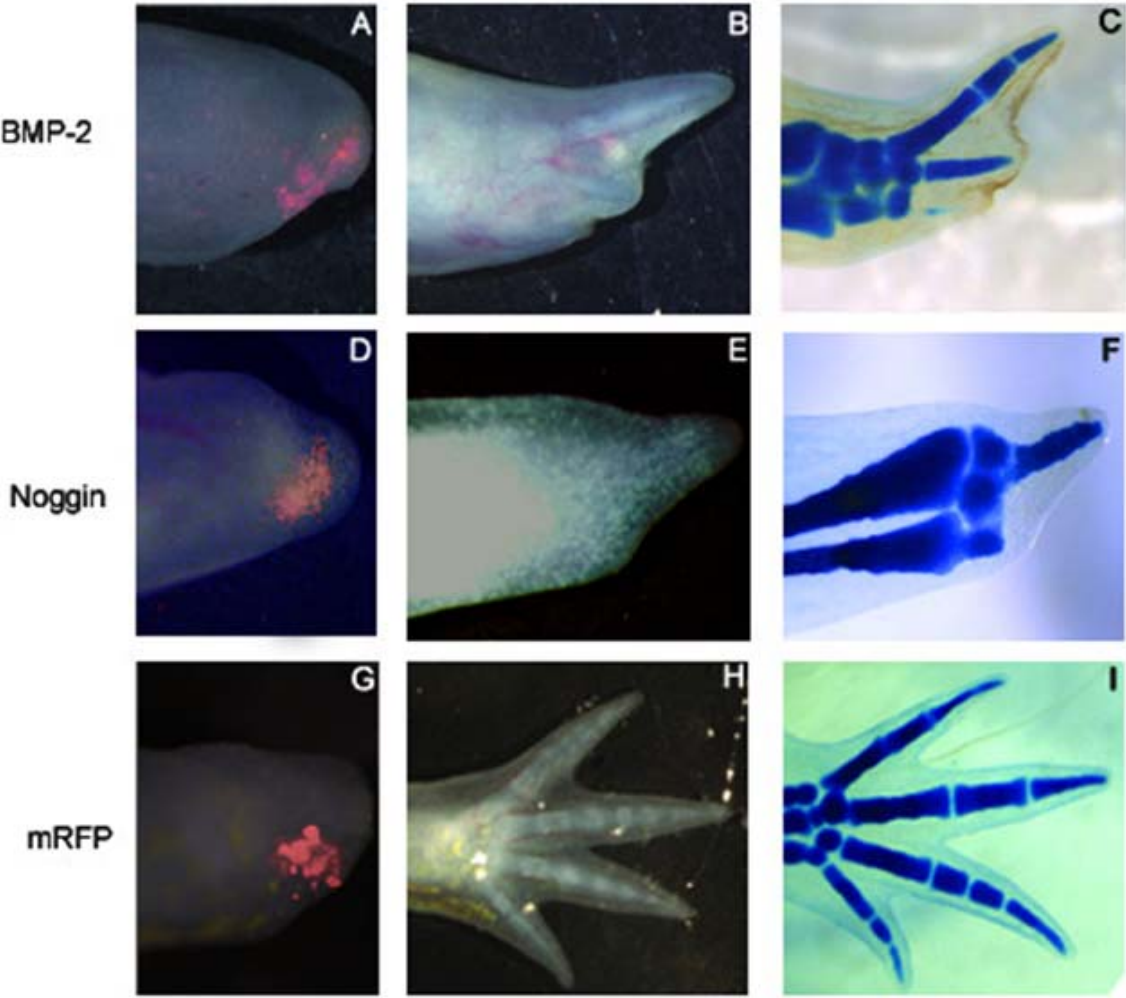


Figure 2.6

To investigate further the effects of *BMP-2* mis-expression, histological analysis was performed using the Masson's trichrome staining on limbs electroporated with *BMP-2* or *Noggin* (Figure 2.7 A, D, G). Although the phenotypes of animals electroporated with *BMP-2* or *Noggin* appeared similar from an exterior perspective (Figure 2.6), the histology results showed significant differences at the tissue level. While limbs electroporated with *BMP-2* showed an increase in cellular density (possibly due to cellular condensation; n=3) in the electroporated region (Figure 2.7 A), limbs electroporated with *Noggin* (n=3) did not show any sign of such increase in cellular density or condensation (Figure 2.7 D). Hence, these results suggest that the similarity between the phenotypes obtained with *BMP-2* and *Noggin* are caused by opposite effects of the ectopically expressed genes; an increase in cellular density or condensation with *BMP-2* and a lack of cellular density or condensation with *Noggin* leading to a loss of digits.

Histological analysis provided some indication as to why *BMP-2* and *Noggin* overexpression caused a loss of digits in regenerating limbs but it did not provide any mechanisms. Therefore, in order to help uncover the mechanism(s) as to how digit loss resulted following *BMP-2* and *Noggin* overexpression, cell division and apoptosis were measured 6 days after electroporation of *mRFP*, *BMP-2* and *Noggin*. Electroporation was performed at LB stage as described above and cell division was determined by 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation (n=3) and apoptosis was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay (n=3). *BMP-2*

overexpression did not seem to cause major changes in cell division (Figure 2.7 B) compared to the controls electroporated with *mRFP* (Figure 2.7 H) which regenerated normally (Figure 2.7 G). Although *BMP-2* overexpression did not cause major changes in cell division, it did cause a marked increase in the number of apoptotic cells (Figure 2.7 C) when compared to control electroporated with *mRFP* (Figure 2.7 I). On the opposite, *Noggin* overexpression resulted in a marked reduction in cell division (Figure 2.7 E) and the near absence of apoptotic cells (Figure 2.7 F) compared to *BMP-2* overexpression and the control electroporated with *mRFP*.

Figure 2.7: Histological analysis, cellular proliferation and apoptosis of regenerating limbs transfected with axolotl *BMP-2*, *Xenopus laevis* *Noggin* and *mRFP*

Ectopic expression of axolotl *BMP-2* (A-C), *Xenopus laevis* *Noggin* (D-F) and *mRFP* (G-I) by electroporating the expression plasmids directly into regenerating limbs were further analysed at the cellular level. Panels A, D and G show the resulting phenotypes at the tissue level on 10 μm sections with the Masson's trichrome staining. Clear differences can be observed between the ectopic expression of axolotl *BMP-2* (A: condensation area pointed out by the black arrow), *Xenopus laevis* *Noggin* (D: no condensation visible) and the mRFP control (G, normal regenerate). Panels B, E and H show the level of BrdU incorporation as a measure of cell division. Overexpression of *BMP-2* 6 days after electroporation (B) did not seem to affect cell division compared to mRFP control (H). However, *Noggin* overexpression significantly reduced the number of BrdU positive cells 6 days after electroporation, especially on the posterior side where it was overexpressed (E). Panels C, F and I show the level of apoptosis as determined by TUNEL assay. *BMP-2* overexpression (C) significantly increased the number of apoptotic cells during regeneration compared to *Noggin* (F), which reduced apoptosis, and mRFP control (I).

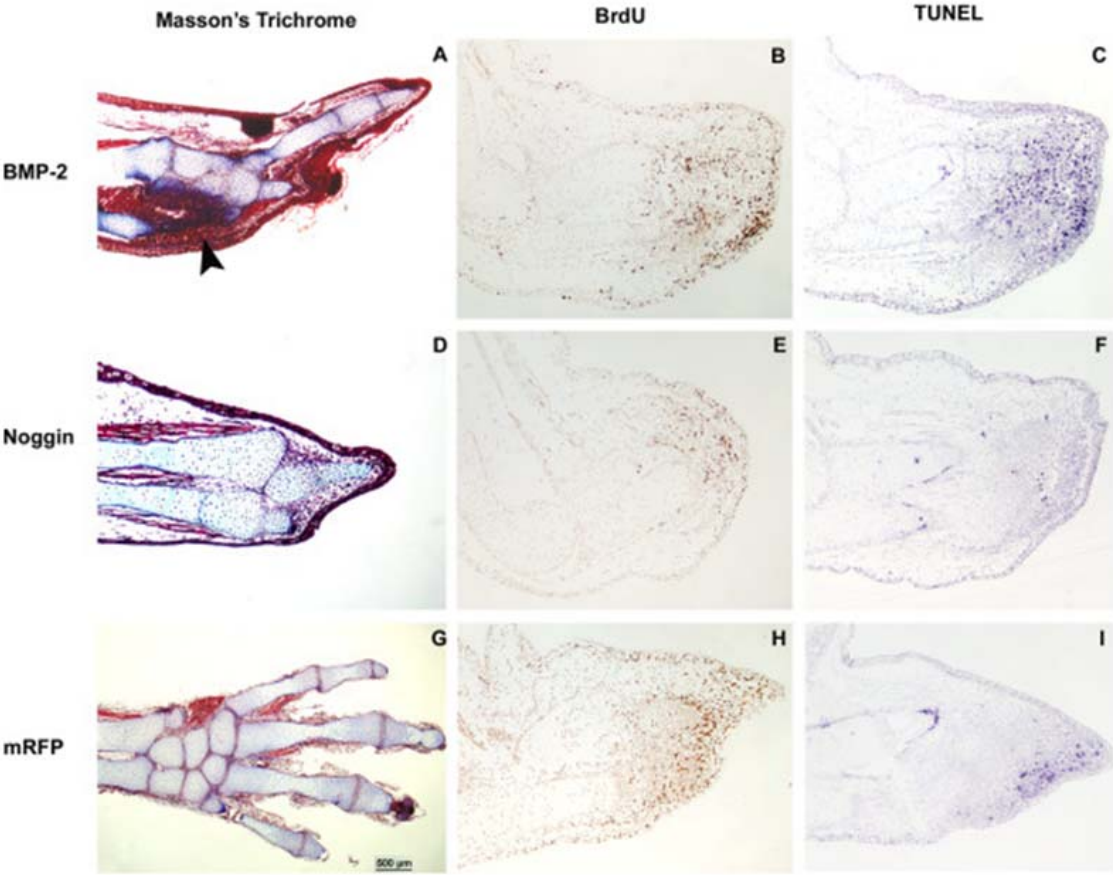


Figure 2.7

2.7 Discussion

Our results show that the expression of *BMP-2* and *SOX-9* in developing axolotl digits is very similar to the expression observed in other non amphibian species (e.g. mouse & chicken) (Roy and Gardiner, 2002, Stopper and Wagner, 2007). The expression pattern of these two genes is also reproduced during digit formation in regenerating axolotl limbs. Since *SOX-9* is the earliest marker of chondrogenesis and a known target of *BMP-2*, these results suggest an activation of *SOX-9* expression (in cells that will form the digit bones) by *BMP-2* expressing cells (in the ID tissue).

As described by previous studies (Litington et al., 2002), the number of digits that form in cyclopamine treated animals (during development and regeneration) is dose-dependent. In the digits that do form in cyclopamine treated animals, the expression of *BMP-2* and *SOX-9* as well as chondrogenesis proceed normally. These results suggest that in axolotl just as it was observed in mice (Niswander and Martin, 1993), *BMP-2* is not likely to be a secondary signal for Shh signaling. This is also supported by the fact that when digits begin to condense in developing and regenerating limbs, *BMP-2* and *Shh* expression are on opposite sides of the limbs (along the anterior-posterior axis) and do not overlap. Hence, these results suggest that, as in mouse, *BMP-2* can trigger cell condensation independently of Shh signaling.

Our results strongly suggest that the inhibition of digit regeneration, in the limbs in which *BMP-2* was overexpressed, is the result of increased cell condensation and apoptosis. This is also supported by a previous study showing an inhibition of chick limb development in the presence of ectopic *BMP-2* (Gardiner et al., 1999, Roy and Levesque, 2006). The *BMP-2* overexpression experiments and the complementarities of expression of *BMP-2* and *SOX-9* (in developing and regenerating limbs), support our hypothesis that *BMP-2* triggers the condensation of adjacent cells destined to become chondrocytes (e.g. in the digits). Taken together, these results suggest that the role of *BMP-2* during limb regeneration is to trigger cell condensation and may be to control, to some extent, apoptosis. The data obtained with *Noggin* overexpression also provides further insight on the potential role of *BMP* signaling in the regeneration process. *Noggin* is an antagonist of *BMPs* and therefore the results obtained could potentially affect *BMPs* other than *BMP-2*. However, these results indicate that *BMP* signaling is essential for cellular division and apoptosis during the regeneration process, since both processes are inhibited when *Noggin* is overexpressed.

The fact that the effects of *BMP-2* and *Noggin* were observed when overexpressed at the LB stage suggest that *BMP-2* regulates cellular activities during the redevelopment phase of regeneration that starts approximately at the LB stage or later (see (Bandyopadhyay et al., 2006) for a more complete description of the different phases of regeneration which are often referred to as: preparation phase which includes the initial stages leading to blastema formation; and redevelopment phase which includes the stages that give rise to the

differentiated tissues and the patterning of the regenerated limb). However given that overexpression of *BMP-2* and *Noggin* were performed using electroporation of plasmids, technical limitations do not allow us to draw any conclusion regarding the role of *BMP-2* during the preparation phase of regeneration. Given the high level of cell proliferation and tissue reorganisation during the stages prior to the LB stage, it is possible that the electroporated plasmids could have been degraded before affecting the regeneration process or that cells compensated somehow to overcome the ectopic *BMP* signaling. This is supported by the rapid rate of fading of red fluorescence resulting from the reporter *mRFP* plasmid, when electroporations were done prior to LB stage. In addition, the fact that *Noggin* did not affect regeneration when overexpressed prior to LB stage is indicative that *BMP* signaling may not be essential for cellular proliferation during EB and MB stages.

2.8 Conclusion

This work represents the first study on the role of *BMPs* during the process of limb regeneration in urodele amphibians. Our data demonstrate that the role of *BMP-2* is conserved in limb regeneration as in limb development and that its function is related to skeletogenesis, cellular proliferation and apoptosis but not pattern formation, as previously demonstrated by the group of Tabin in mice (Gardiner et al., 1995). The ectopic expression of *BMP-2* led to the condensation of cells in regenerating axolotl limbs. The expression of *BMP-2* and *SOX-9* in addition to our functional analysis data from the ectopic expression of

both *BMP-2* and *Noggin* clearly indicate that *BMP* signaling is essential for the process of limb regeneration especially during the redevelopment phase where re-differentiation of all the different cell types and pattern formation occur.

2.9 Methods

2.9.1 Animal maintenance and surgery

Axolotl embryos and larvae (3.0 cm to 8.5 cm from snout to tip of the tail) were purchased from the *Ambystoma* Genetic Stock Center (Lexington, KY, USA). Animals were kept in 20% Holtfreter's solution at a temperature varying from 19-22°C with a photoperiod cycle of 12 hours of light and 12 hours of darkness. Embryos were used for limb development experiments and larvae for limb regeneration experiments. For all manipulations performed, axolotls were anaesthetized in 0.1% MS222 (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma-Aldrich, MO, USA) in Holtfreter's solution at pH 7.0. Axolotls were allowed to recover from anaesthesia in 20% Holtfreter's or were euthanized/fixed for subsequent experiments. All animal care and experiments were done in agreement with the Université de Montréal animal care committee's guidelines.

2.9.2 Cloning of axolotl *BMP-2* full length cDNA

Partial axolotl *BMP-2* cDNA of 239 bases was obtained from axolotl larvae total RNA by RT-PCR. The 239 base cDNA was amplified with primers (see Additional File 4: Figure S4) designed from a partial cDNA sequence of *BMP-2/4* like directly submitted to Genbank by Dalglish, G. *et al.* (Accession number : AY326272). The full length *BMP-2* cDNA was subsequently obtained by screening an axolotl cDNA library (Stratagene, CA, USA), following the manufacturer's instructions and using the 239 bp fragment as a probe radioactively labeled with ³²P-dCTP (Perkin Elmer, MA, USA).

2.9.3 Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed as described in Gardiner *et al.* (Imokawa and Yoshizato, 1997, Imokawa and Yoshizato, 1998, Torok *et al.*, 1999) with a few modifications: The axolotls were anaesthetized and euthanized/fixed in 1X MEMFA (10X MEM salt (1M MOPS pH 7.4, 20mM EGTA, 10mM MgSO₄), 3,7% formaldehyde in DEPC treated H₂O) then transferred to 100% methanol and stored at -20°C until needed. Fragments of 449bp and 381bp (for *BMP-2* probes), 458bp and 455bp (for *SOX-9* probes) and 371bp (for *Shh* probe) were generated by RT-PCR (see Additional File 4: Figure S4 for primers used) and cloned separately into the pCRII-TOPO cloning vector (Invitrogen, CA, USA). These plasmids were then linearized using the appropriate restriction enzymes and

used as template for generating antisense RNA probes. Digoxigenin (DIG) labelled antisense RNA probes were generated using T7 or SP6 RNA polymerase (Invitrogen, CA, USA) and DIG RNA labelling mix (Roche Diagnostics, QC., Canada). Two different probes for *BMP-2* were synthesised. The 3' UTR of the *BMP-2* gene is highly conserved throughout evolution and it was utilized to make a highly specific probe for *BMP-2*. Thus, one probe of 381 bp was designed to overlap part of the 3' UTR and the ORF of *BMP-2*. A second probe of 449 bp was designed in the region overlapping the 5' UTR and the ORF of the gene which confirmed the expression observed with the 381bp probe (data not shown). The expression pattern of *SOX-9* was also determined using two different probes with identical results obtained for both probes (data obtained using the 455 bp probe are not shown). The expression of *Shh* was assessed with only one probe since the results were identical to the results published by two different groups (Bryant and Iten, 1974). For tissue permeabilization of developing embryos, the limbs were incubated with 20µg/mL proteinase K for 15 min on ice and then at 37°C for 5 min. For permeabilization of regenerating tissues, limbs were incubated with 30µg/mL proteinase K for 1 h on ice and then at 37°C for 45 min. Probes were hybridized 24h for embryos and 72h for regenerating animals. Prehybridization and hybridization temperatures were done at: 55°C for the *BMP-2* 449 bp probe and 60°C for all the other probes. Finally, BM purple (Roche Diagnostics, QC., Canada) was used as the alkaline phosphatase substrate for the colorimetric reaction. Each time point presented were performed at least 3 times.

2.9.4 Whole mount skeletal staining of limbs

Cartilage was stained using the Victoria Blue method (Luna, 1968). Limbs were fixed in Bouin's fixative solution for 24 h before being rinsed several times with 70% ethanol. Specimens were then rinsed in 3.5% NH₄OH for 2 days and subsequently treated with Acid alcohol for 2 h. Specimens were stained with 1% Victoria Blue for 2 h and then rinsed with 70% ethanol. Limbs were dehydrated using a gradient ethanol series of 95% and 100%, then cleared and stored in methyl salicylate.

2.9.5 Histology

Electroporated limbs were fixed overnight in Bouin's fixative solution and then rinsed thoroughly with 70% alcohol. Limbs were embedded in paraffin and cut to 10 µm sections. Slides were deparaffinised through 3 baths of toluene for 5 minutes each. Slides were then rehydrated in a graded series of 100%, 90%, 70% and 50% ethanol and then distilled water for 5 minutes each. Masson's trichrome staining method was used to stain cell cytoplasm in red, nuclei in black and collagen in blue (Nye et al., 2003).

2.9.6 Cyclopamine treatments

Cyclopamine powder (Cedarlane, ON., Canada) was dissolved in 100% ethanol at a concentration of 5 mg/mL and stored at -20°C. Cyclopamine was administered by adding it

directly to the Holtfreter's solution to the desired concentrations. For each conditions presented in this study, 10 animals were treated with cyclopamine or ethanol (control). For experiments on developing limbs, treatments began at the developmental stage 41 according to Nye *et al.* (Iten and Bryant, 1973) and animals were fixed after 14 and 21 days of treatment (corresponding approximately to stage 51 and 53 in control animals). For regenerating animals, treatments began at the time of limb amputation and animals were fixed when the controls reached the palette stage (see (Goldring et al., 1994) for stages description) and at completion of regeneration. For limb development as well as limb regenerating experiments, control animals were treated with the same volume of 100% ethanol that was used to dissolve the cyclopamine. Controls were done for both volumes of ethanol (0.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 0.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$) used for the 1 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cyclopamine treatment. There was no difference in limb development between these two control conditions (data not shown) and therefore only those corresponding to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cyclopamine treatment are presented. When the control animals with ethanol were compared with animals bathing in ethanol free solution, there was no difference in limb patterning and gene expression. All solutions were changed daily. Animals were euthanized at the end of the experiment and fixed.

2.9.7 Luciferase assays

The immortalized human chondrocyte cell line, C28/I2, has been described previously (Goldring et al., 1994). It was developed from chondrocytes isolated from juvenile human costal cartilage and immortalized by retroviral infection of the SV40 large T antigen (Korchynskiy and ten Dijke, 2002). C28/I2 cells were cultured in D-MEM/F12 containing 10% FBS with antibiotics (penstrep, fungizone) and 2 mM L-glutamine.

Transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). BRE₂-luc was described previously (Finsson et al., 2008). C28/I2 cells were seeded at a density of 7.5×10^4 cells in a 12-well plate. The next day, cells were transfected with the following constructs and concentrations: axolotl *BMP-2* = 0 or 0.4 μg , *Xenopus laevis* *Noggin* = 0 or 0.4 μg , BRE₂-luc = 0.35 μg and pCMV- β gal = 0.35 μg . The total DNA concentration was brought up to 1.5 μg using pTYFP (expression vector for *mRFP*) as filler DNA. Cell lysates were prepared 48 hours later and analyzed for luciferase and β -galactosidase activity as described previously (Vlaskalin et al., 2004). Data are expressed as a mean \pm standard deviation luciferase activity normalized to β -galactosidase activity. Comparison among each condition (n=3/condition) was tested using Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.

2.9.8 Injections and electroporation of constructs

For injections/electroporation of constructs expressing axolotl *BMP-2* or *Xenopus laevis* *Noggin*, blastemas were injected with 1-1.5 μ L of circular DNA solution through a glass needle with a 0.2-0.4 μ m diameter tip, using a cell microinjector PM-1000 (Micro Data Instrument, Inc., NJ, USA). Immediately following injections, constructs were electroporated in blastemas. Thin gold plated rectangular electrodes (3mm x 5 mm) were placed under (anode) and over (cathode) the blastema. 5 trains (1 train/second) of 20 square wave pulses (200 Hz for 100 ms), at 10 Volts peak to peak, were applied through the electrodes using a S8 stimulator (Grass instruments, MA, USA; Additional File 5: Figure S5). Vectors containing axolotl *BMP-2* (5 μ g/ μ L) or *Xenopus laevis* *Noggin* (5 μ g/ μ L) were always co-injected with a vector containing the *mRFP* (2.8 μ g/ μ L) to monitor the spread of the injection over time and space. Control animals were injected with 7.8 μ g/ μ L of *mRFP* (the vector containing *BMP-2* or *Noggin* was replaced by the same amount of *mRFP*). *BMP-2*, *Noggin* and *mRFP* expressions were all under the control of the constitutive CMV promoter in the pcDNA1/AMP expression vector (Invitrogen, CA).

2.9.9 BrdU incorporation assay

Regenerating axolotls were injected intra-peritoneally, 6 days after electroporation of plasmids (as described above); 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 4x15 minutes 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 were then washed 3x10 minutes 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 (4x15 minutes) 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 4x15 minutes in PBST before being incubated in DAB (Zymed, Invitrogen CA) for signal detection. Slides were counterstained with methyl green for 6 minutes (Dako, Mississauga, ON) before being serially dehydrated 2x2 minutes 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 for each condition tested.

2.9.10 TUNEL assay

TUNEL assay was adapted from Vlaskalin *et al.* (Koshiba *et al.*, 1998) with minor modifications. Tissue sections were deparaffinised and rehydrated as for histology. In a humidified chamber, sections were incubated for 20 minutes in TBS (Tris-buffered saline: 100mM Tris-HCL pH 7.5 + 150 mM NaCl), containing 20 µg/ml proteinase K at RT and rinsed 3x1 minute in TBS. Slides were rinsed in TBS, equilibrated in 1x TdT buffer for 5 minutes and incubated in TdT buffer containing 75 U/ml TdT and 2 µM digoxigenin-dUTP for 1 h at 37°C. End labelling was stopped by transferring the sections into 1× TBS/1 mM EDTA for 10 minutes at RT, followed by 2x2 minutes rinses in TBS. Sections were equilibrated for 5 minutes in TBS and incubated in blocking solution [2% sheep serum in TBS] for 1h at RT. Tissues were incubated overnight at 4°C in blocking solution containing 1:1500 dilution of anti-DIG-AP. The following day, sections were rinsed in PBS and equilibrated 5 minutes in AP buffer. The chromogenic reaction was carried out in AP buffer containing 100 mg/ml NBT and 50 mg/ml BCIP. The reaction was monitored for up to 15 minutes and stopped by several washes in 1x PBS.

2.9.11 Image treatments

Pictures of whole mounts, Victoria blue staining, and mRFP fluorescence were taken by a digital infinity 2 camera (Lumenera corporation, ON., Canada) through a Leica MZ-16F

binocular (Leica Microsystems Ltd., Switzerland). Images of fluorescence in regenerating limbs were merged with white light images using Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Inc., CA, USA).

2.10 Author's contributions

J.-C.G. carried out the majority of manipulations, participated in the design of the study and drafted the manuscript. M. L. performed substantial work in the histology experiments and helped in reviewing the manuscript. P.-L.M. cloned the axolotl *BMP-2* cDNA. J.B. managed the cyclopamine experiments on developing axolotls. K.F. performed the Luciferase assays experiments and helped in reviewing the manuscript. A.P. supervised the Luciferase experiments and helped in reviewing the manuscript. S.R. participated in the design of the present study, supervised all the experimentations and did all the major corrections of the final manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

2.11 Acknowledgements

The authors would like to thank Cara Hutchison and Mireille Pilote for the use of their plasmids containing the fragments for the two *SOX-9* probes used in this paper. We would also like to acknowledge the help of Éric Villiard and Samuel Gatién in preparing the photographs presented in the various figures. The authors would also like to thank Dr.

Antonio Nanci, from the department of Stomatology at the Université de Montréal, for help with the histology and Dr. Marko Horb from the Institut de Recherche Clinique de Montréal, for providing the *Xenopus laevis* *Noggin* plasmid. This work was funded by a grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to S.R. J.-C.G. was supported by a Ph.D. scholarship from NSERC, P.-L.M. and J.B. were supported by an undergraduate studentship from the Network for Oral Research Training and Health of the Canadian Institutes of Health Research and M.L. was supported by a Ph.D. scholarship from the Réseau de Recherche en Santé buccodentaire et osseuse of the Fond de la Recherche en Santé du Québec.

2.12 Additional files

Additional File 1

Figure S1: Sequence analysis of axolotl *BMP-2*

Sequence analysis and alignment of the axolotl *BMP-2* protein. Alignment of the predicted axolotl *BMP-2* protein with human, mouse and *Xenopus*. Seven cysteine residues that are highly conserved and characteristic to all members of the *Tgf- β* superfamily are shaded in red.

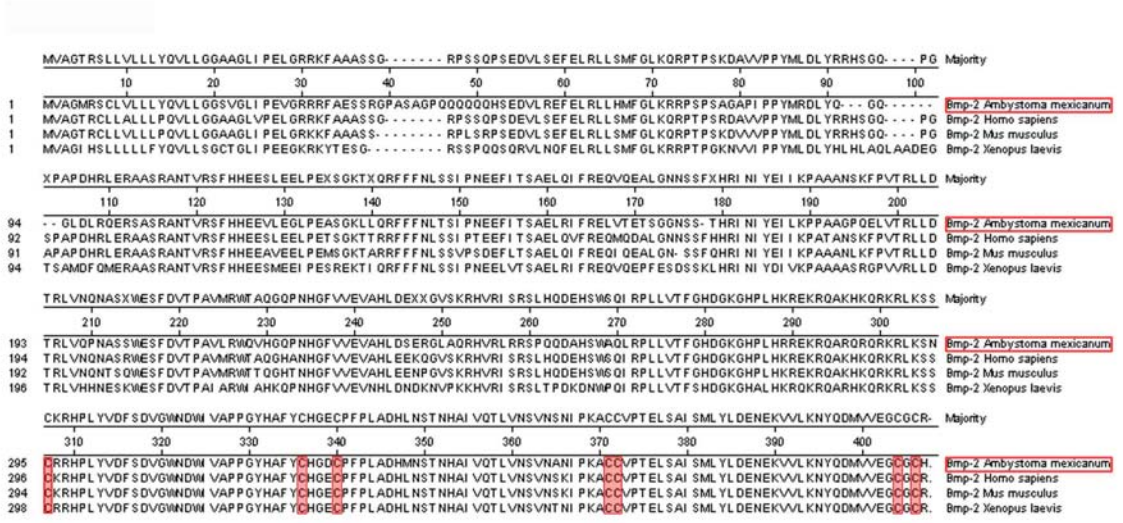


Figure S1

Additional File 2:**Figure S2: Expression of *BMP-2* and *SOX-9* at stage 45 of limb development**

Expression of *BMP-2* and *SOX-9* at stage 45 of limb development in control and cyclopamine treated (2 μ g/mL) axolotls. *Shh* has been shown to be expressed at this stage of axolotl limb development. Our results indicate that the expression of *BMP-2* and *SOX-9* during limb development is not dependent on Shh signaling as they are not affected by cyclopamine treatment. Panels A and B show the expression of *BMP-2* in control (A) and cyclopamine treated (B) animals. Panels C and D show the expression of *SOX-9* in control (C) and cyclopamine treated (D) animals.

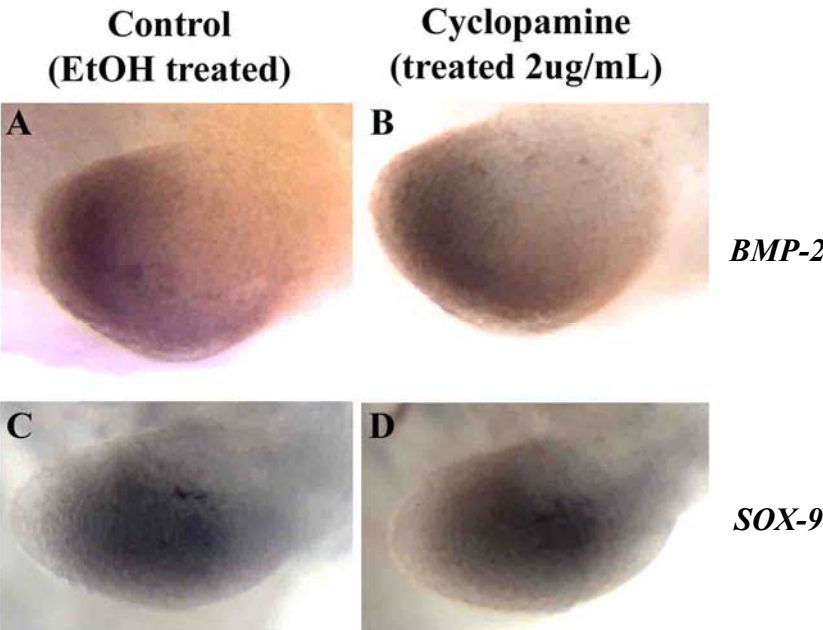


Figure S2

Additional File 3:**Figure S3: Expression of *BMP-2* and *SOX-9* at MB with cyclopamine**

Expression of *BMP-2* and *SOX-9* at MB stage of limb regeneration in control and cyclopamine treated (2 μ g/mL) axolotls. *Shh* has been shown to be expressed at this stage of axolotl limb regeneration. Our results indicate that the expression of *BMP-2* during limb regeneration is not dependent on Shh signaling as it is not affected by cyclopamine treatment. Panels A and B show the expression of *BMP-2* in control (A) and cyclopamine treated (B) animals. Panels C and D show the expression of *SOX-9* in control (C) and cyclopamine treated (D) animals.

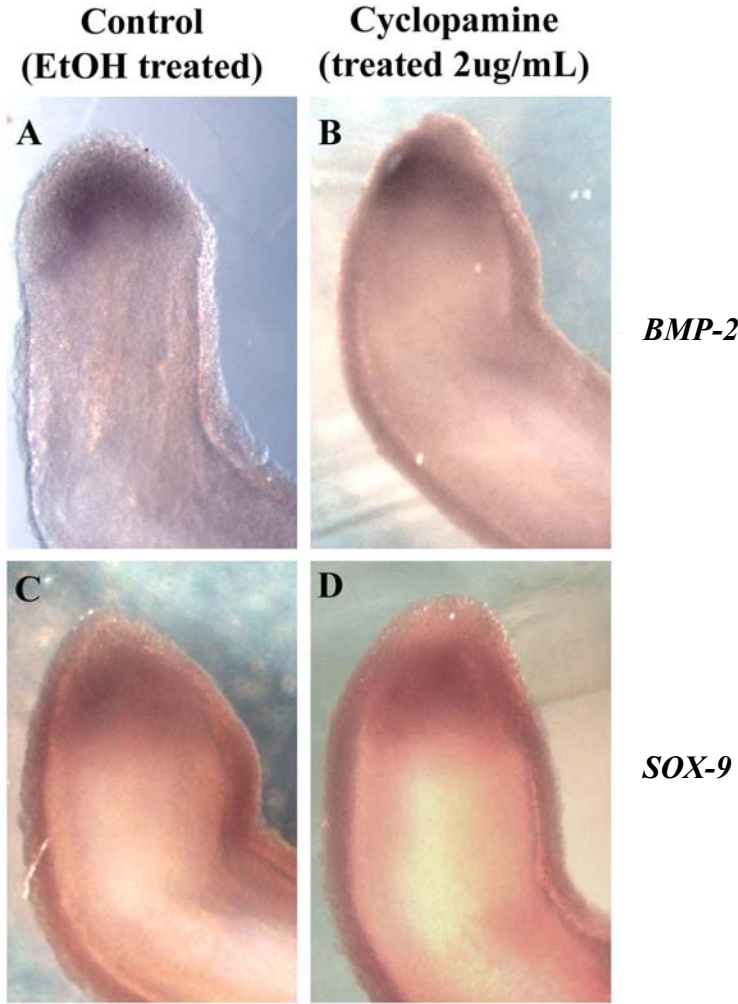


Figure S3

Additional File 4:**Figure S4: Primers**

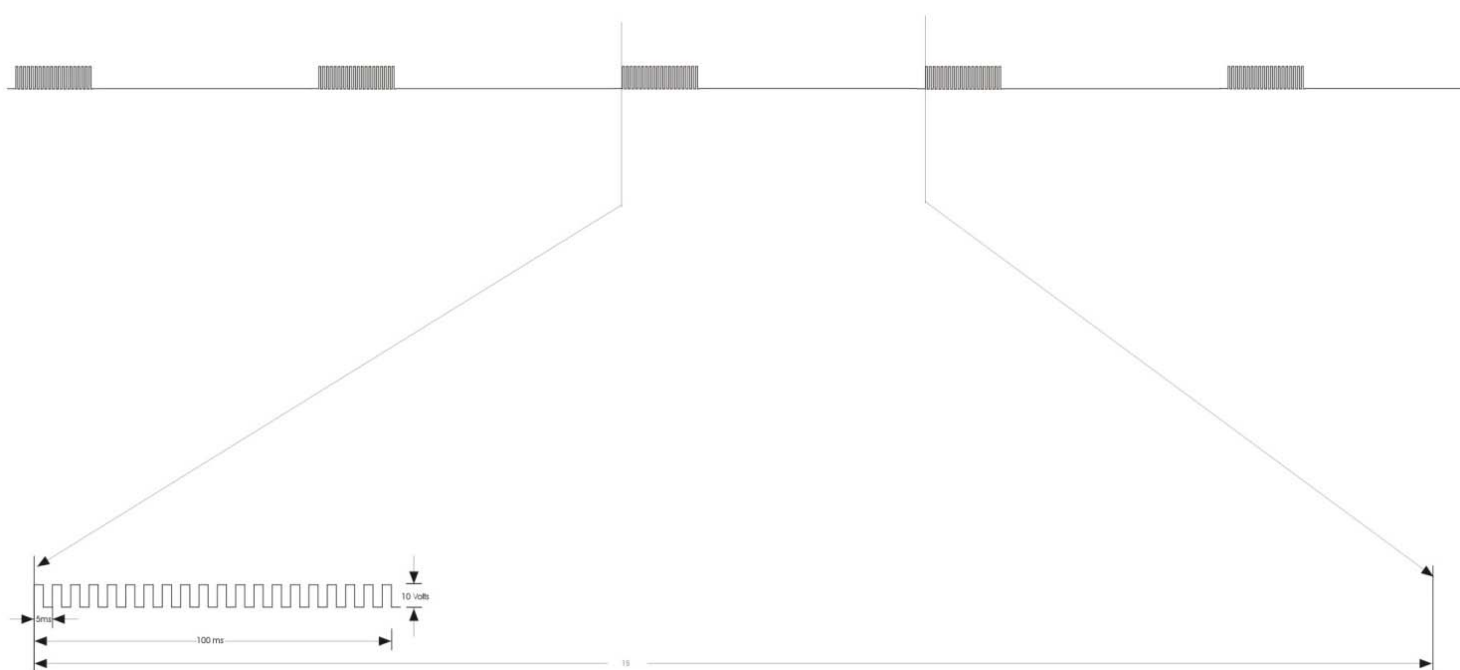
Primers used for PCR amplification of the different probes used for whole mount in situ hybridization and cDNA library screening.

Primers for the 239 bp radioactively labelled probe for Bmp-2 cDNA library screening screening
AFB4-19 = 5'- GTGGG(GAC)TGGAATGACTGGAT-3'
ARB4-258 = 5'- TCCTGGTAATTCTTGAGCAC-3'
Primers for the 381 bp probe for Bmp-2
AB2F-484 = 5'- CGCACCTTTGAAGATTTTCC-3'
AB2R-865 = 5'- AGCAGGCGGAGCTCGAACTC-3'
Primers for the 448 bp probe for Bmp-2
AFB4-97 = 5'- GACCACATGAACTCCACGAA – 3'
ARB4-545 = 5'-ACTTCATGTGCTGGGGGTAA-3'
Primers for the 458 bp probe for Sox-9
DFSOX9: 5'-GA(C/T)CAGTA(C/T)CC(G/C)CA(C/T)CTGCA-3'
DRSOX9: 5'-TGCT(G/C)AG(C/T)TC(A/T/C/G)CC(A/G)ATGTCC-3'
Primers for the 455 bp probe for Sox-9
AETSX9F61: 5'-TACGACTACACCGACCACCA-3'
AETSX9R516: 5'-GCAAAAGGCTTTCCTTTCAG-3'
Primers for the 371 bp probe for Shh
ASHHF41: 5'-CAGGCTAATGACCCAGAGGT-3'
ASHHR412: 5'-CTCAGGTCTTTCACCGGTCT-3'

Figure S4

Additional File 5:**Figure S5: *In vivo* electroporation**

Schematic representation of the electric pulses used for electroporating the plasmids in regenerating tissues. 5 trains of pulses were applied for the *in vivo* electroporation of expression constructs. For each electroporation, a train of 20 square waves (10V peak to peak) in 100ms (200 Hz) is applied every second (1 Hz) over five seconds (5 trains in total).



Schematic of the 5 trains of pulses applied for the electroporation of constructs to over expressed Bmp-2 or Noggin. For each electroporation, a train of 20 square waves ($10V_{\text{peak to peak}}$) in 100ms (200 Hz) is applied every second (1 Hz) over five seconds (5 trains in total).

Figure S5

Chapitre 2 – Article 2

Titre: Expression pattern of *MSX-1* during limb regeneration in axolotl

Auteurs: Jean-Charles Guimond et Stéphane Roy

Journal : Gene Expression Patterns (Manuscrit)

3.0 Mise en contexte

Les mammifères néonataux, incluant l'homme, peuvent régénérer d'une amputation de la partie distale de leur dernière phalange mais uniquement dans la région d'expression du gène *MSX-1*. Une amputation chez une souris mutante pour *MSX-1* (-/-) ne parviendra pas à régénérer. Chez l'axolotl, *MSX-1* n'est pas exprimé dans la patte d'un animal adulte, mais si la patte est amputée à n'importe quel niveau, *MSX-1* sera ré-exprimé et la patte sera parfaitement régénérée. La capacité d'induire l'expression de *MSX-1* à tous les niveaux d'amputation du membre pourrait expliquer pourquoi l'axolotl n'est pas limité, comme les mammifères, à la régénération de la partie distale de sa dernière phalange. Deux caractéristiques qui pourraient donner cette aptitude pro-régénération à la protéine MSX-1 est son habileté à induire la dédifférenciation cellulaire et à maintenir les cellules dans un état non différencié puisque ces processus sont nécessaires à la formation et à la croissance du blastème de régénération. Il a également été démontré durant le développement de la patte chez la souris, que *MSX-1* est une cible de la voie signalisation Shh/Gli3 et qu'il est au moins partiellement responsable du phénotype hypomorphique observé chez les souris mutantes pour *Shh* (-/-). En plus de son habileté à induire la dédifférenciation cellulaire et à maintenir les cellules dans un état non différencié, la protéine MSX-1 peut jouer un rôle dans la formation du patron de développement.

Nous avons déjà démontré au chapitre un que l'inhibition de la voie de signalisation Shh à l'aide de la cyclopamine durant l'épimorphose chez l'axolotl peut moduler la formation du

patron de développement de la patte et reproduire le phénotype de la patte hypomorphique observée chez les souris mutantes pour *Shh* (-/-). Toutefois, le patron d'expression spatiotemporelle du gène *MSX-1* chez l'axolotl a déjà été établi par un autre groupe de recherche (Crews et al., 1995, Simon et al., 1995) et ce patron ne démontrait aucune expression dans le blastème avant le stade Pal de l'épimorphose, stade auquel le patron de développement du blastème est déjà spécifié. À première vue, il serait donc peu probable que la protéine MSX-1 puisse jouer un rôle dans la formation du patron de développement du blastème. Néanmoins, deux autres études indépendantes ont démontré, chez le triton, des résultats d'expression différents de *MSX-1* par buvardage de type Northern et par essai de protection contre la ribonucléase. Dans ces deux études, *MSX-1* était exprimé dans le blastème durant la phase de préparation (Koshiba et al., 1998). Les différences d'expression du gène *MSX-1* entre l'axolotl et le triton sont surprenantes puisque les deux espèces font partie de l'ordre des urodèles qui ont des capacités régénératives pratiquement identiques. Ainsi, afin de valider les résultats d'expression de *MSX-1* chez l'axolotl, le premier objectif de cet article était de caractériser l'expression spatiotemporelle de *MSX-1* par hybridation *in situ* « whole mount » durant les phases de préparation et de redéveloppement à tous les stades de régénération définis dans la littérature (fig. 1 de l'introduction). Le deuxième objectif était d'évaluer si l'expression de *MSX-1* pouvait être modulée par l'inhibition de la voie de signalisation de Shh en tirant profit de la facilité d'utilisation de la cyclopropamine tel qu'il a été démontré au chapitre un.

Nos résultats ont démontré que contrairement au patron d'expression spatiotemporelle du gène *MSX-1* établi chez l'axolotl par un autre groupe de recherche (Crews et al., 1995, Simon et al., 1995), l'expression de *MSX-1* était clairement détectable dans le blastème de régénération durant la phase de préparation et également durant la phase de redéveloppement. Ces résultats, chez l'axolotl, sont en accord avec les résultats chez le triton de Crews et al. (1995) et de Simon *et al.* (1995) mentionnés ci-haut (Douglas, 1972, Illingworth, 1974, Borgens, 1982, Reginelli et al., 1995, Han et al., 2003, Allan et al., 2006). De plus, ce patron spatiotemporel de *MSX-1* était très similaire à celui de *BMP-2* (chapitre un). Les deux gènes initiaient leur expression au stade EB et maintenaient leurs expressions jusqu'à ce que le patron de la patte soit complètement formé. Enfin, les expériences d'inhibition à la cyclopamine ont démontré que contrairement à la patte de souris en développement, le patron d'expression de *MSX-1* semble in affecté par l'inhibition de la signalisation Shh durant la régénération de la patte d'axolotl.

Cet article sera soumis sous peu au journal « Gene Expression Patterns » dont le format exige que les résultats et la discussion soient présentés simultanément dans une même section et que l'introduction soit intégrée à cette section. Puisque les résultats obtenus avec la cyclopamine dans cet article ce sont avérés sans effet sur l'expression de *MSX-1*, l'étude est à caractère descriptif. Le journal « Gene Expression Patterns » a donc été choisi pour son style expéditif et sa spécialisation dans la publication de clonage et d'expression de gènes. Cet article se veut un prélude à des études approfondies du gène *MSX-1* qui se

poursuivront dans le laboratoire à l'aide d'axolotls transgéniques qui n'étaient pas encore au point au moment d'écrire cette thèse, mais qui le seront très bientôt.

3.1 Contribution des auteurs

Ces auteurs ont conçu les expériences: Jean-Charles Guimond et Stéphane Roy.

Cet auteur a effectué les expériences: Jean-Charles Guimond.

Ces auteurs ont analysé les données: Jean-Charles Guimond et Stéphane Roy.

Cet auteur a fourni le matériel et les réactifs: Stéphane Roy.

Ces auteurs ont écrit l'article: Jean-Charles Guimond et Stéphane Roy.

Cet auteur a révisé l'article: Stéphane Roy.

3.2 Autorisation des auteurs pour incorporer l'article dans la thèse, en vue de son indexation et de sa diffusion

Ce manuscrit est reproduit avec la permission écrite de: Jean-Charles Guimond et Stéphane Roy.

3.3 Page couverture de l'article – Expression pattern of *MSX-1* during limb regeneration in axolotl

Jean-Charles Guimond¹, and Stéphane Roy^{1,2*}

1- Department of Biochemistry, Université de Montréal, Québec, Canada.

2- Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Québec, Canada.

*To whom the 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: confidential

KEYWORDS:

Urodele

Axolotl

MSX-1/MSX1

Dedifferentiation

Limb

Regeneration

Patterning

3.4 Abstract

Urodele amphibians (*e.g.*, axolotls) have the unique ability, among vertebrates, to perfectly regenerate an amputated limb by epimorphosis which progresses through the formation of a regenerative blastema that grows by the proliferation of embryonic-like cells obtained by cellular dedifferentiation. *MSX-1* is expressed in the regeneration blastema in urodeles. Since *MSX-1* is capable of triggering cellular dedifferentiation and maintaining cells in an undifferentiated state, its expression in the blastema could be related to these capacities during epimorphosis. It was shown that *MSX-1* is a target gene of the Shh/Gli3 pathway in developing limbs of knockout mice for *Shh*. In these mice, *MSX-1* is up regulated and may at least partially contribute to the hypomorphic limb resulting from the lack of *Shh* expression. Therefore, *MSX-1* may also have a function in patterning the regenerative blastema during epimorphosis. The expression pattern of *MSX-1* previously described in axolotl by another group showed that the expression started when the dedifferentiation and pattern formation processes were almost complete, making it unlikely that *MSX-1* would be involved with pattern formation or dedifferentiation. However, these results showed discrepancies with *MSX-1* expression in the newt where the onset was earlier in the period prior to pattern formation. The difference between the expression of *MSX-1* in axolotl and the expression in newt is surprising since they display almost identical regenerative capacities. In this paper, we reassess the expression pattern of *MSX-1* in axolotl and show that unlike what has been described earlier, the onset of *MSX-1* expression in axolotl was during the dedifferentiation phase when the cells of the blastema are in a highly

proliferative state prior to pattern formation. We also showed that in animals treated with cyclopamine at doses that reproduce the hypomorphic limb phenotype of knockout mice for *Shh*, the *MSX-1* expression was not modulated. Finally, we found that the spatiotemporal expression of *MSX-1* was very similar to that of *BMP-2* that was previously published. Taken together, these results are supportive for a role of *MSX-1* in maintaining the cells of the blastema in an undifferentiated state while also showing that it is unlikely that the *MSX-1* protein is related to the hypomorphic phenotype that results from an inhibition of the *Shh* signalling pathway.

3.5 Results and discussion

Urodele amphibians (*e.g.*, axolotls) have the unique ability, among vertebrates, to perfectly regenerate a limb amputated at any level by epimorphosis which progresses through the formation of a blastema. Young mice and humans can also regenerate but only the last phalanges of their digit tips where *MSX-1* is expressed (Reginelli et al., 1995, Han et al., 2003). Knockout mice for *MSX-1* completely lose their capacity to regenerate (Crews et al., 1995, Simon et al., 1995, Koshiba et al., 1998). Axolotl expresses *MSX-1* during development, including their developing limbs, but this expression stops in the adult axolotl. If an amputation occurs at any level of the limb, *MSX-1* will be re-expressed in the regeneration blastema and a whole limb will be regenerated (Odelberg et al., 2000, Hu et al., 2001). Some roles of *MSX-1* during epimorphosis are possibly related to its ability to induce cellular dedifferentiation and to maintain cells in an undifferentiated state (Lallemand et al., 2009). However, it was shown in developing limbs of knockout mice for *Shh* that *MSX-1* is a target of the *Shh*/*Gli3* pathway (Litingtung et al., 2002, Lallemand et al., 2005, Lallemand et al., 2009). In these mice, *MSX-1* is up regulated and may at least partially contribute to the hypomorphic limb resulting from the lack of *Shh* expression (Chiang et al., 1996, Litingtung et al., 2002, Roy and Gardiner, 2002, Stopper and Wagner, 2007, Guimond et al.).

In axolotl, cyclopamine, a pharmacological antagonist of the hedgehog signalling pathway, can inhibit the anterior posterior pattern formation and reproduce the hypomorphic limb

phenotype of knockout mice for *Shh* (Crews et al., 1995, Simon et al., 1995). Koshiba et al. (1998) have shown by whole mount *in situ* hybridization during limb epimorphosis in axolotl that the onset of *MSX-1* expression started when the pattern of the limb was already specified. At first sight, it seems unlikely that *MSX-1* would regulate the pattern formation of the regenerating blastema in axolotl. On the other hand, other studies in the newt have shown different results by Northern blot analysis and RNA protection assay. In these latter studies, it was found that *MSX-1* was expressed earlier during regeneration prior to pattern formation while cells are still dedifferentiating and in a highly proliferative state (Koshiba et al., 1998). The difference in *MSX-1* expression between axolotl and newt is very surprising since both species are from the urodele order, with nearly identical regenerative capacities. Therefore, the primary aim of this paper is to validate the spatiotemporal expression of *MSX-1* as previously reported by another group in axolotl (Yonei-Tamura et al., 1999, Christensen and Tassava, 2000, Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001, Gardiner et al., 2002, Han et al., 2005), from amputation to completion of regeneration, and to test if that expression is modulated by the inhibition of the *Shh* signalling pathway with the hedgehog antagonist cyclopamine.

3.5.1 *MSX-1* expression pattern during epimorphosis of the limb

Whole mount *in situ* hybridization for *MSX-1* was performed on regenerating limbs at different stages (determined from the staging system of Iten *et al.* (1973)) from amputation

to completion of regeneration. The expression of *MSX-1* was first detected at the Early Bud (EB) stage in the whole blastema (Fig. 1A). This expression was maintained as the blastema was growing and reached the Medium Bud (MB) and Late Bud (LB) stages (Fig. 1B-C). At the beginning of the Palette (Pal) stage, the expression of *MSX-1* started to fade in the region where the first two digits will eventually form, but was maintained in their interdigital space and the rest of the blastema (Fig. 1D). This pattern is more obvious at the end of the Palette stage (Fig. 1E). At the Early Differentiation (ED) stage the expression was mainly surrounding the forming digits and was faintly expressed in the interdigital spaces and the rest of the blastema (Fig. 1F). Throughout the whole process of regeneration, from EB stage to ED stage, the expression of *MSX-1* is virtually identical to the expression of *BMP-2* at each corresponding stage (Guimond et al., 2010). The latter results suggest that they could potentially interact during the process of regeneration in axolotl. The expression onset of *MSX-1* at the EB stage does not support a role of *MSX-1* in the dedifferentiation process since dedifferentiation onset is a few days before, just after the formation of the apical ectoderm cap (a structure very similar to the apical ectodermal ridge in other vertebrates (Torok et al., 1999)). However, the dedifferentiation role of *MSX-1* cannot be ruled out in axolotl since *in situ* hybridization is not a highly sensitive technique. On the other hand, the expression onset of *MSX-1* at the EB stages and its maintained expression up to the LB stage in the whole blastema supports a role of *MSX-1* in maintaining the cells of the blastema in an undifferentiated state. Indeed, at the EB stage, the cells of the newly

formed blastema initiate a period of intense proliferation that will last up to the LB stage.

At that stage, cells of the blastema will undertake redifferentiation.

Figure 3.1: Expression pattern by whole mount *in situ* hybridization for *MSX-1* during different stages of limb regeneration

All pictures show a dorsal view of the regenerating limbs with posterior side on the left. EB; Early Bud (A). MB; Medium Bud (B). LB; Late Bud (C). Pal; Palette (D-E). ED; Early Differentiation (F).

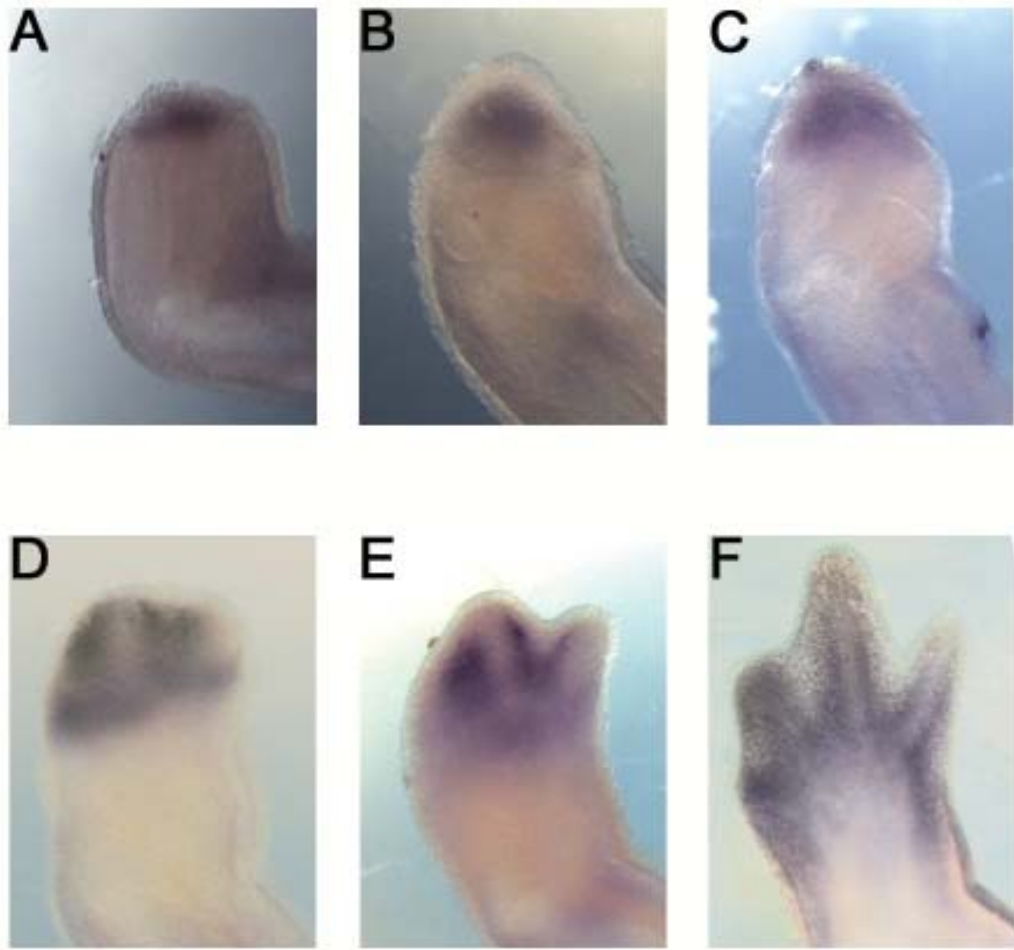


Figure 3.1

3.5.2 Effects of blocking Hh signalling on the expression of *MSX-1*

To assess the effects of blocking Hh signalling pathway on the expression of *MSX-1*, the pharmacological antagonist of the hedgehog signalling pathway cyclopamine was used. The expression of *MSX-1* was determined in animals treated with 1 µg/mL and 2 µg/mL of cyclopamine at amputation time, and the assessment was performed at the MB stage, the stage at which *Shh* expression is peaking (Roy and Gardiner, 2002, Guimond et al.). It was previously shown that both concentrations affect the anterior posterior patterning of the regenerating limb in a dose dependent manner (Lallemand et al., 2005). The *MSX-1* expression was not affected at either concentrations of cyclopamine treatments (fig. 3.2 B-C) and in both cases it was undistinguishable from control animals treated with EtOH (fig. 3.2 A). Therefore, in regenerating axolotl limbs, it is unlikely that the expression of *MSX-1* is related to the hypomorphic phenotype that results from cyclopamine treatment administered throughout the entire process of regeneration. In the knockout mice for *Shh*, the expression of *MSX-1* is weakly affected in the limb bud compared to the expression of *MSX-2* which could mean that *MSX-2* has a predominant effect on patterning. However, the autopods of knockout mice for *MSX-1* (-/-) or for *MSX-2* (-/-) or for double knockout *MSX-1* (-/-) & *MSX-2* (-/-), do not show an anterior posterior patterning defect comparable to that of *Shh* knockout mice (Gardiner et al., 1995). For instance, in the limbs of double mutant mice, at least three digits are always able to form.

Figure 3.2: Expression pattern by whole mount in situ hybridization for *MSX-1* at the MB stage in regenerating limb treated with cyclopamine from the time of amputation

All pictures show a dorsal view of the regenerating limbs with the posterior side on the left. A, control animals treated with the carrier (0.4 μ L EtOH/mL). B, animal treated with 1 μ g/mL of cyclopamine. C, animals treated with 2 μ g/mL of cyclopamine.

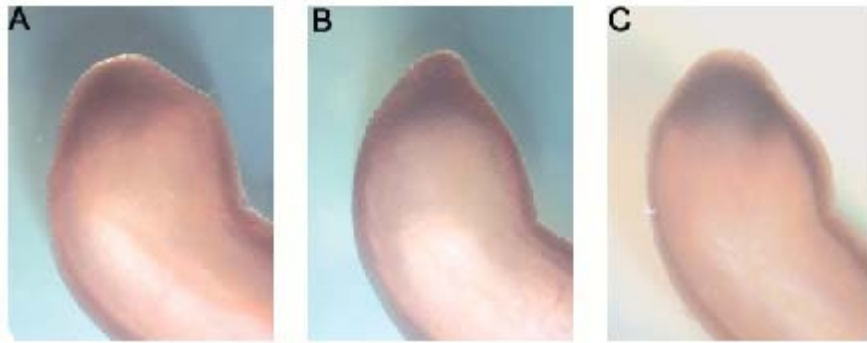


Figure 3.2

3.6 Conclusion

The results presented in this study show that the expression of *MSX-1* correlated with its known capacity to maintain cells in an undifferentiated state since its expression is strong in the whole blastema during the period when the undifferentiated cells of the blastema are in a highly proliferative state. However, the expression of *MSX-1* was not correlated to the dedifferentiation period which occurs a few days before the onset of *MSX-1* expression. The dedifferentiation role of *MSX-1* during epimorphosis cannot be ruled out since *in situ* hybridization is not a highly sensitive technique and negative results are always to be taken carefully. The virtually identical expressions of *MSX-1* and *BMP-2* throughout the whole process of the epimorphosis suggest that these two genes may interact during the process of regeneration in axolotl. Finally, the absence of modulation of *MSX-1* expression pattern in axolotl deprived of Shh signalling suggest that unlike the developing mouse limb, *MSX-1* is not involved in patterning regenerating limbs.

3.7 Experimental procedures

3.7.1 Animal maintenance and surgery

Axolotl larvae (2.0 cm to 4.0 cm from snout to tip of the tail) were purchased from the *Ambystoma* Genetic Stock Center (Lexington, KY, USA). Animals were kept in 20%

Holtfreter's solution at a temperature varying from 19-22°C with a photoperiod cycle of 12 hours of light and 12 hours of darkness. For amputation or fixation to perform whole mount *in situ* hybridization, axolotls were anaesthetized in 0.1% MS222 (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma-Aldrich, MO, USA) in Holtfreter's solution at pH 7.0. Axolotls were allowed to recover from anaesthesia in 20% Holtfreter's or were euthanized/fixed for subsequent experiments. All animal care and experiments were performed in conformity with the Université de Montréal animal care committee's guidelines.

3.7.2 Whole-mount *in situ* hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed as described in Gardiner *et al.* (Iten and Bryant, 1973) with a few modifications: The axolotls were anaesthetized and euthanized/fixed in 1X MEMFA (10X MEM salt (1M MOPS pH 7.4, 20mM EGTA, 10mM MgSO₄), 3,7% formaldehyde in DEPC treated H₂O) then transferred to 100% methanol and stored at -20°C until needed. A fragment of 383bp obtained by RT-PCR on total RNA, isolated from regenerating blastemas, was cloned into the pCRII-TOPO cloning vector (Invitrogen, CA, USA). The vector was then linearized using the appropriate restriction enzymes and used as template for generating antisense RNA probes. Digoxigenin (DIG) labelled antisense RNA probes were generated using T7 RNA polymerase (Invitrogen, CA, USA) and DIG RNA labelling mix (Roche Diagnostics, QC.,

Canada). For permeabilization of regenerating tissues, limbs were incubated with 30 μ g/mL proteinase K for 1 h on ice and then at 37°C for 45 min. Probes were hybridized for 72h. Prehybridization and hybridization were both done at 60°C. Finally, BM purple (Roche) was used as the alkaline phosphatase substrate for the colorimetric reaction. Each time point presented was performed at least 3 times.

3.7.3 Cycloamine treatments

Cycloamine powder (Cedarlane, ON., Canada) was dissolved in 100% ethanol at a concentration of 5 mg/mL and stored at -20°C. Cycloamine was administered by adding directly to the Holtfreter's solution to the desired concentrations (1 and 2 μ g/mL). For each of the conditions studied in this paper, 5 animals were treated with cycloamine or ethanol (control). Treatments began at the time of amputation and animals were fixed when the controls reached the MB stage (see (Han et al., 2003) for stage descriptions). Control animals were treated with the same volume of 100% ethanol that was used to dissolve the cycloamine. Controls were done for both volumes of ethanol (0.2 μ L/mL and 0.4 μ L/mL) used for the 1 and 2 μ g/mL cycloamine treatment. There was no difference in limb regeneration between these two control conditions (data not shown). All solutions were changed daily. When the control animals with ethanol were compared with animals bathing in ethanol free solution, there was no difference in the limb patterning and gene expression. Animals were euthanized at the end of the experiment and fixed.

3.7.4 Image treatments

Pictures of whole mounts were taken by a digital infinity 2 camera (Lumenera corporation, ON., Canada) through a Leica MZ-16F binocular (Leica Microsystems Ltd., Switzerland). Images were treated using Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Inc., CA, USA).

3.8 Acknowledgements

This work was funded by a grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada. S. R. is a Chercheur Boursier Junior 1 from the Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and J.-C.G. was supported by a Ph.D. scholarship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Chapitre 3 – Discussion

4.0 Analyse des résultats

Les résultats présentés dans cette thèse se concentrent principalement sur l'étude de la protéine BMP-2. Ce gène a été choisi pour son interaction potentielle avec l'expression de *MSX-1* durant l'épimorphose de la patte chez l'axolotl et pour ses propriétés régénératrices. Le gène *MSX-1* est indispensable pour l'épimorphose de l'extrémité de la dernière phalange chez la souris (Han et al., 2003). Chez les souris mutantes pour *MSX-1* (-/-) qui sont incapables de régénération de la dernière phalange, la protéine BMP-4, qui est très semblable structurellement et fonctionnellement à la protéine BMP-2 (annexe 1), peut restaurer la régénération et compenser l'absence de *MSX-1* (Yu et al., 2010). De plus, une amputation proximale à la région d'expression de *MSX-1* (région normalement incapable de régénération endogène) peut régénérer grâce à l'application de la protéine BMP-2 sur le moignon d'amputation (Healy et al., 1999). La protéine BMP-4 n'a pas encore été clonée chez les urodèles mais plusieurs laboratoires à travers le monde, incluant le notre, tentent d'obtenir la séquence du gène depuis plusieurs années (annexe 1). Dans notre laboratoire, nous sommes toutefois parvenus à cloner le gène de la protéine BMP-2 et nous avons établi son patron d'expression spatiotemporel durant le développement embryonnaire (appendice 2) et durant le développement et la régénération de la patte chez l'axolotl. De plus, nous avons effectué une analyse fonctionnelle de BMP-2 durant l'épimorphose de la patte. Cette thèse présente donc les résultats de la première étude d'un gène de la famille des *BMPs* chez les urodèles.

Au chapitre un, nos résultats ont démontré que l'expression de *BMP-2* et *SOX-9* durant le développement et la régénération de l'autopode chez l'axolotl est très similaire à l'expression des deux gènes durant le développement du membre chez les autres vertébrés (*e.g.* la souris, la chauve-souris et le poulet). Puisque *SOX-9* est le marqueur le plus précoce connu de la chondrogenèse, et que la surexpression de *BMP-2* peut induire l'expression de *SOX-9*, il a été suggéré que l'expression de *SOX-9* est dépendante de *BMP-2* durant la chondrogenèse (Bandyopadhyay et al., 2006). Cette hypothèse est appuyée par nos résultats qui nous ont amené à suggérer deux rôles de *BMP-2* durant le développement et la régénération de la patte:

1) L'induction de la condensation des cellules qui formeront le squelette de la patte. L'expression de *BMP-2*, dans les cellules du mésenchyme bordant le futur squelette de la patte, induirait la condensation cellulaire et l'expression de *SOX-9* dans les cellules qui deviendront le squelette. Les cellules exprimant *BMP-2* ne participeraient pas elles-même à la formation du squelette mais enverraient les signaux à partir des cellules du mésenchyme adjacent.

2) L'induction d'apoptose dans le mésenchyme adjacent aux cellules qui formeront le squelette du membre.

L'expression de *BMP-2* et *SOX-9* durant la formation des phalanges représente bien ces deux rôles suggérés de *BMP-2*. Durant la formation des phalanges de l'autopode de l'axolotl (développement ou régénération), *BMP-2* est exprimé dans le mésenchyme interdigital présomptif (*i.e.*, entre les futures phalanges). Cet espace doit être découpé pour éventuellement séparer les phalanges en voie de développement pour obtenir des doigts indépendants, ce qui correspondrait avec la fonction d'apoptose de *BMP-2*. Simultanément, les cellules du squelette des futures phalanges recevraient un signal des cellules exprimant *BMP-2*, se condenseraient, exprimeraient *SOX-9* et formeraient éventuellement le squelette des phalanges.

Chez la souris mutante pour *Shh* (-/-), le seul doigt se formant dans le membre hypomorphique exprime *BMP-2* et possède un cartilage normal (Litingtung et al., 2002, Roy and Gardiner, 2002, Stopper and Wagner, 2007). Chez les souris mutantes pour *BMP-2* (-/-), il a été démontré que *BMP-2* n'est pas impliqué dans la formation du patron de développement de la patte (Litingtung et al., 2002) comme on le croyait auparavant à cause de l'expression chevauchante de *BMP-2* avec *Shh*. Ces résultats démontrent que *BMP-2* n'est pas le signal secondaire de *Shh* dans la formation du patron de développement du membre.

Chez l'axolotl, le nombre de phalanges se formant durant le développement ou la régénération de la patte chez des animaux traités à la cyclopamine est dose-dépendant, et à

forte concentration, un seul doigt se forme tel que chez la souris mutante *Shh* (-/-) (Litingtung et al., 2002, Roy and Gardiner, 2002, Stopper and Wagner, 2007). Dans ce doigt, l'expression de *BMP-2*, *SOX-9* et la formation du cartilage sont également normaux (fig. 2.2 et 2.4) comme chez la souris mutante pour *Shh* (-/-) (Barlow and Francis-West, 1997, Wang et al., 1999, Bei et al., 2000, Rachmiel et al., 2004, Murashima-Suginami et al., 2008, Chen et al., 2009). Ces résultats suggèrent donc que, comme chez la souris, *BMP-2* n'est pas le signal secondaire de *Shh* dans la formation du patron de développement. Ceci est également appuyé par les expressions opposées de *BMP-2* et *Shh* durant le développement (fig. 2.1) et la régénération (fig. 2.3 G & M) de la patte d'axolotl.

Globalement les résultats présentés au chapitre un suggèrent que durant la phase de redéveloppement de la régénération de la patte chez l'axolotl, l'expression de *BMP-2* est impliquée dans la condensation cellulaire précédant la chondrogénèse et dans l'activation d'apoptose, mais n'affecte pas la morphogénèse de la patte et est indépendante de la signalisation *Shh*, qui elle, joue au contraire un rôle important sur la morphogénèse de la patte comme chez les amniotes (Han et al., 2003).

Au chapitre deux, nos résultats ont démontré que l'expression de *MSX-1* était clairement détectée dans le blastème de régénération durant les phases de préparation et de redéveloppement de la patte. Le patron d'expression spatiotemporel de *MSX-1* était très similaire à celui de *BMP-2* (chapitre un). Les deux gènes initiaient leur expression au stade

EB et maintenaient leur expression jusqu'à ce que le patron de la patte soit complètement formé. Puisque la signalisation de BMP-2 semble avoir une interaction avec l'expression de *MSX-1* durant le développement et la régénération chez les vertébrés (Han et al., 2003), ces résultats suggèrent que les deux gènes pourraient interagir, indirectement, durant la régénération. Chez la souris, les expressions de *MSX-1* et *BMP-4* sont également corrélées dans le blastème de régénération de la dernière phalange de l'autopode (Wozney et al., 1988, Geiger et al., 2003, Chen et al., 2004). Il a également été démontré que la protéine BMP-4 est sous le contrôle de MSX-1 (Harty et al., 2003). Les expériences d'interactions BMP-2/MSX-1 durant l'épimorphose demeurent à faire chez l'axolotl, mais comme la protéine BMP-2 est très semblable structurellement et fonctionnellement à la protéine BMP-4 (annexe 1) et que BMP-2, BMP-4 et MSX-1 sont associées à la régénération de la dernière phalange chez la souris, il pourrait y avoir, chez l'axolotl, une interaction entre la signalisation de BMP-2 et l'expression de *MSX-1* durant la régénération.

Nos résultats au chapitre deux montrent également que le patron d'expression spatiotemporel de *MSX-1* durant l'épimorphose supporte son rôle connu de maintien des cellules dans un état non différencié. Les expériences d'inhibition à la cyclopamine suggèrent que contrairement à la patte de souris en développement, l'expression de *MSX-1* était in affectée par l'inhibition de la signalisation Shh durant la régénération de la patte d'axolotl. L'ensemble des résultats du chapitre deux suggèrent que MSX-1 n'a pas d'implication dans la dédifférenciation et dans la formation du patron de développement du

blastème. Toutefois, des méthodes de détection quantitative (Buvardage de type Northern ou PCR) de l'expression de *MSX-1* seront nécessaires pour confirmer ces résultats.

4.1 Perspectives de recherche dans notre laboratoire

Afin de poursuivre l'étude des interactions entre la signalisation BMP-2 et *MSX-1* durant l'épimorphose chez l'axolotl et de mieux comprendre leurs rôles, des expériences de gain et de perte de fonction des gènes *BMP-2* et *MSX-1* sont à prévoir. Pour ce faire, une technique qui est maintenant au point dans le laboratoire pourra être utilisée. Cette technique permet la génération d'axolotls transgéniques à l'aide de la méganucléase ISceI utilisée pour intégrer des séquences d'intérêts dans le génome des œufs fécondés d'axolotls. Cette méthode permet d'avoir rapidement des animaux surexprimant un gène d'intérêt ou des animaux où l'on peut bloquer l'expression d'un gène (« knockdown ») par un ARN interférant. L'induction de l'ARN interférant contre *BMP-2* et/ou *MSX-1* au moment désiré serait possible en plaçant l'ARN interférant contre le gène désiré sous le contrôle d'un promoteur inductible du type *Hsp-70*. Un court choc thermique sur une seule patte permettrait de conserver l'autre patte en contrôle interne. La même méthode pourrait également être utilisée pour la surexpression des gènes *BMP-2* et *MSX-1*.

Par cette méthode, il sera possible de vérifier si *MSX-1* ou *BMP-2* est essentiel à la régénération de la patte. Advenant le cas où l'un des deux (ou les deux) soit indispensable,

des expériences de restauration de la régénération pourront être tentées. Par exemple, si *BMP-2* s'avère indispensable à la régénération, son expression pourrait être bloquée par l'activation d'un ARN interférant et des tentatives pour restaurer la régénération pourraient être tentées en électroporant *MSX-1*. Alternativement, un axolotl double transgénique exprimant un ARN interférant pour *BMP-2* sous le contrôle du promoteur inductible de *Hsp-70* et exprimant également le gène *MSX-1* mais sous le contrôle d'un gène inductible à la tetracycline pourrait être utilisé. Ce type d'expérience permettrait sûrement de mieux comprendre les interactions *BMP-2/MSX-1* mais également les interactions impliquant plusieurs autres BMPs à mesure que leur séquence sera disponible.

4.2 Perspectives de recherche en biologie de la régénération

L'objectif visé par les recherches fondamentales en biologie de la régénération est l'élaboration de thérapies régénératrices applicables chez l'humain. L'objectif ultime est la régénération parfaite d'un membre amputé ou d'un organe entier. Il est difficile de prédire dans combien de temps cela sera possible mais il est légitime de croire que cela sera possible un jour. À moins d'une découverte majeure, une personne pariant que ce ne sera pas dans les cinq prochaines années aurait probablement d'excellentes chances de gagner son pari! Toutefois, les recherches effectuées jusqu'à présent en biologie de la régénération ont permis le développement de traitements qui peuvent être considérés comme solutions intermédiaires pendant que la recherche se poursuit. Par exemple, il existe déjà sur le

marché des tissus bioartificiels, commercialisés sous le nom d'Apligraf® et Dermagraft®. Lorsque ces tissus sont appliqués sur la plaie ulcérée du pied d'un diabétique, ils favorisent la guérison de la plaie. Il existe également des produits de substitution à la greffe osseuse qui utilisent entre autres, les protéines BMP-2 et BMP-7 et qui ont démontré leur utilité pour le traitement des déficiences osseuses (Harty et al., 2003, Han et al., 2005). Par exemple, une éponge de collagène contenant la protéine BMP-2 est commercialisée sous le nom de « INFUSE® Bone Graft » et est utilisée comme alternative à la greffe osseuse pour le traitement de la dégénérescence discale de la colonne vertébrale. Ces exemples de produits commercialisés démontrent que les recherches en biologie de la régénération ont surtout mené jusqu'à maintenant à des traitements améliorant les capacités de guérison chez l'humain. Ces solutions sont très intéressantes et offrent dans certains cas des résultats plus qu'acceptables, mais ne remplacent jamais la fonction de la structure d'origine à 100%. C'est pourquoi la recherche avec des modèles animaux tel que la salamandre, capable de régénération parfaite, se poursuit dans le but d'induire un jour la régénération parfaite chez l'humain.

L'une des choses apparaissant essentielle pour le futur des recherches chez les urodèles, et qui permettra sûrement l'avancement rapide des connaissances en biologie de la régénération, est la création d'un projet de séquençage complet du génome des urodèles. Lorsque ce sera fait, il y aura alors possibilité d'avoir accès à des biopuces à ADN « microarray » beaucoup plus complètes que ce qui existe actuellement. Ces biopuces à

ADN pourront être utilisés afin d'identifier les gènes exprimés ou inhibés durant les différentes étapes de la régénération. Ceci est vraiment essentiel pour le futur des recherches en biologie de la régénération chez les urodèles puisque le succès de la régénération pourrait être le résultat de l'activation de gènes particuliers, mais également, le résultat de l'inhibition de certains gènes dont l'expression doit être absente pour créer un environnement pseudo-embryonnaire.

Dans les études en biologie de la régénération, en général, l'une des raisons les plus citées pour l'inhabilité de régénération chez les mammifères est probablement la présence de fibrose menant à la formation de cicatrice (Thornton, 1957, Brockes and Kumar, 2002). En effet, chez les mammifères, suite à une blessure profonde impliquant l'épiderme et le derme de la peau, un tissu cicatriciel s'installe entre l'épithélium de guérison et le derme sous jacent. Il s'agit ici d'un facteur d'importance car la formation d'une cicatrice entre l'épithélium de guérison et le mésoderme sous jacent ne permettra pas d'interactions épithélio-mésenchymateuses qui sont reconnues comme essentielles à la régénération chez les urodèles (Bryant et al., 2002, Kumar et al., 2007). Chez les urodèles, l'interaction entre la CAE et le mésenchyme sous jacent au site d'amputation est essentielle à la dédifférenciation, la prolifération et la migration des cellules qui formeront le blastème (Odelberg, 2005). Une meilleure compréhension des mécanismes menant à la fibrose sera donc importante, et la capacité de bloquer ce processus chez les mammifères pourrait être un des éléments favorisant le processus de régénération. D'ailleurs, même chez les urodèles

qui possèdent la capacité de régénération parfaite, l'amputation d'une patte dénervée, produira de la fibrose dans le moignon, la migration des cellules dédifférenciées sera inhibée et la régénération sera complètement stoppée (Crews et al., 1995, Simon et al., 1995, Koshiba et al., 1998, Odelberg et al., 2000). Puisque durant l'épimorphose la présence des nerfs est essentielle à la régénération uniquement durant la phase de préparation et que c'est durant cette phase que la fibrose s'installe si une patte est dénervée, la comparaison des signaux moléculaires provenant des nerfs chez les mammifères avec ceux des urodèles pourrait apporter des éléments de réponse expliquant la capacité des urodèles à ne pas former de fibrose et peut-être, expliquer la capacité de régénérer. Même si l'on sait que les interactions épithélio-mésenchymateuses sont essentielles à la dédifférenciation cellulaire chez les urodèles, les signaux moléculaires permettant ce phénomène sont encore peu compris (Akimenko et al., 1995, Poss et al., 2000, Beck et al., 2006). Le gène *MSX-1* est un excellent candidat pour ce rôle puisqu'il parvient à induire la dédifférenciation cellulaire *in vitro* et est exprimé dans le blastème de régénération durant l'épimorphose chez les urodèles (Hu et al., 2001, Lee et al., 2004a) De plus, il est associé au succès de la régénération chez les modèles animaux capables d'épimorphose (Han et al., 2003). En plus d'induire la dédifférenciation cellulaire, la protéine MSX-1 possède également la capacité de maintenir les cellules dans un état non différencié (Reginelli et al., 1995, Han et al., 2003). Ceci pourrait expliquer son indispensabilité pour la régénération de l'extrémité des phalanges chez la souris (Crews et al., 1995, Simon et al., 1995, Koshiba et al., 1998). En effet, une différence significative entre la capacité de régénération des

phalanges distales chez la souris et de la patte chez les urodèles est que chez la souris, la régénération s'opère dans la région exprimant déjà *MSX-1* (Han et al., 2003) alors que chez les urodèles adultes, l'expression de *MSX-1* est absente dans toute la patte mais est réactivée suite à l'amputation (Han et al., 2003). Étant donné les rôles connus de *MSX-1* pour la dédifférenciation et le maintien des cellules dans un état non différencié, il est donc possible que chez la souris, la régénération soit activée parce que des cellules dans un état non différencié sont disponibles en raison de la présence de *MSX-1*. D'ailleurs, si l'amputation est proximale à l'expression de *MSX-1*, il n'y a pas de régénération. Chez les urodèles, l'expression de *MSX-1* est induite par l'amputation peu importe le niveau d'amputation. Alors ici, *MSX-1* peut jouer un double rôle, soit d'induire la dédifférenciation cellulaire et de maintenir ces cellules dans un état non différencié. Ceci suggère que les capacités différentes de régénération entre les souris et les urodèles, proviendraient peut être de l'incapacité des mammifères d'activer l'expression de *MSX-1* suite à un traumatisme. Les recherches futures concernant le gène *MSX-1* pourraient donc se concentrer, entre autres, sur les mécanismes de régulation de la transcription de *MSX-1* chez les mammifères et les urodèles. Une expérience qui pourrait être tentée dans ce sens serait de produire des souris transgéniques dont le promoteur endogène de *MSX-1* serait remplacé par le promoteur du gène *MSX-1* d'urodèle. On sait déjà que la protéine *MSX-1* de souris peut induire la dédifférenciation de cellules mammifère et soutenir leur état non différencié. On sait également que *MSX-1* est essentielle à la régénération de la dernière phalange chez la souris. Donc, en utilisant le promoteur du gène *MSX-1* d'axolotl pour

contrôler l'expression du gène *MSX-1* chez la souris, il serait intéressant de voir premièrement le patron d'expression dans une patte non amputée d'une souris adulte. Le gène serait-il toujours exprimé dans l'extrémité de la phalange, dans toute la patte, ou encore, disparaîtrait-il complètement tel que c'est le cas chez l'axolotl? Deuxièmement, serait-il ré-exprimé suite à une amputation à n'importe quel niveau de la patte de souris et induirait-t-il la régénération? Même si une telle expérience ne parvenait pas à induire la régénération chez la souris, l'étude du contrôle de l'expression de *MSX-1* chez les mammifères et chez les urodèles apporterait sûrement des informations qui permettraient peut-être de remonter encore plus haut dans la cascade des événements pouvant déclencher le processus d'épimorphose. La recherche dans cette direction est celle qui pourrait mener à l'induction de l'épimorphose d'un membre complet chez les mammifères. On sait également que chez une souris mutante pour *MSX-1*(-/-) qui est incapable de régénérer le bout de ses phalanges, l'application directe de la protéine BMP-4 restaure la régénération et l'expression des gènes *MSX-2* et *BMP-4* dans le blastème (l'expression de ces deux gènes est absente dans le blastème des souris mutante pour *MSX-1* (-/-) (Xu et al., 1998, Cohn and Bright, 1999, Yonei-Tamura et al., 1999, Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001). De plus, on sait que l'inhibition de tous les BMPs dans une souris sauvage (exprimant les gènes *MSX-1* et *MSX-2*) inhibe la régénération de l'extrémité des phalanges (Xu et al., 1998). Ces résultats nous indiquent que les effecteurs de la régénération sont apparemment les BMPs puisque même en présence de *MSX-1* et *MSX-2*, la régénération est inhibée (en prenant pour acquis que la présence des ARN messagers des deux gènes assure la présence des

protéines correspondantes, ce qui n'a pas été démontré dans cette étude). À tout le moins, ces résultats nous indiquent que les BMPs agissent en aval des MSXs durant la régénération chez la souris. Mais une autre information très intéressante peut également être extraite de ces résultats. En effet, l'absence de *MSX-2* et *BMP-4* dans le blastème de régénération chez les souris mutantes pour *MSX-1(-/-)* est renversée par la protéine BMP-4 et la régénération peut se poursuivre. Cette situation rappelle un phénomène qui se produit durant le développement embryonnaire du membre chez les amniotes en général. Chez ces derniers, lorsque le bourgeon du membre commence à émerger de la lame latérale du mésoderme, les cellules mésodermiques relâchent le facteur de croissance FGF-10 dans l'ectoderme pour le transformer en AER et y activer un autre facteur de croissance, soit FGF-8 (Carlson et al., 1998, Koshiba et al., 1998). Ensuite, FGF-8 maintient l'expression de FGF-10 dans le mésoderme sous-jacent à l'AER et les deux gènes se maintiennent ainsi activés tout au long du développement du membre (Brunet et al., 1998, Capdevila and Johnson, 1998, Merino et al., 1998, D'Souza and Patel, 1999, Merino et al., 1999, Zhang et al., 2002, Han et al., 2003). Dans le cas de la souris mutante pour *MSX-1(-/-)*, l'application directe de la protéine BMP-4 rétroactive sa propre transcription dans le mésenchyme ainsi que la transcription de *MSX-2* dans le mésenchyme apicale et dans l'épiderme. Donc l'application directe de BMP-4 remplacerait l'action initiale de MSX-1. Il s'établirait alors une boucle $BMP-4 \Leftrightarrow MSX-2$. Une fois la boucle mise en marche, l'absence de MSX-1 n'aurait plus d'effet sur la régénération puisque la boucle serait maintenue par les interactions mutuelles entre BMP-4 et MSX-2. Ceci est d'ailleurs appuyé par le fait que

chez l'axolotl, *MSX-2* est exprimé dans l'heure qui suit une amputation, et est maintenu principalement dans la CAE et plus tard dans les cellules épidermiques jusqu'à la fin de la régénération (Han et al., 2003). Enfin, chez les souris sauvages capables de régénérer l'extrémité de leurs phalanges, la protéine Noggin et d'autres antagonistes de la signalisation BMP ne sont pas exprimés dans les parties distales de la phalange capable de régénérer, mais sont exprimés proximalelement dans la région incapable de régénérer la phalange (Yu et al., 2010). L'expression de multiples antagonistes de la signalisation BMP suggère donc que l'inaptitude à régénérer des phalanges proximales soit une conséquence de la régulation à la baisse des BMPs associées avec la différenciation squelettique (Wallace, 1981). D'ailleurs, il semble que l'expression des multiples antagonistes de la signalisation BMP peut être contrée par l'application directe des protéines BMP-2 et BMP-7 sur le moignon, et induire l'épimorphose dans cette région normalement réfractaire à la régénération (Wallace, 1981). Non seulement les BMPs agissent en aval des MSXs, ils ont de toute évidence des rôles à jouer sur la régulation de l'expression des MSXs par des boucles de rétroaction. L'ensemble de tous ces résultats démontre clairement que la compréhension de l'épimorphose au niveau moléculaire nécessitera certainement une analyse exhaustive des multiples interactions possibles entre les BMPs et les MSXs durant l'épimorphose.

Le développement de nouvelles thérapies en médecine régénérative exigera vraisemblablement une meilleure compréhension des processus cellulaires et moléculaires

menant à l'induction de l'épimorphose. En activant les mécanismes endogènes, possiblement latents chez l'humain, pour l'épimorphose, le corps risque de prendre la relève pour supporter tous les aspects du processus. Par exemple, il est maintenant possible d'obtenir des cellules souches induites *in vitro*, mais ces cellules ont un potentiel oncogène élevé. Si la dédifférenciation est induite directement dans les cellules résidentes à un site de lésion, les mécanismes de contrôle endogènes auront potentiellement une meilleure protection contre la formation d'un cancer. Il est donc important de comprendre les interactions moléculaires soutenant l'épimorphose. Dans cette optique, l'étude des interactions *MSXs/BMPs* pourraient aider à comprendre les mécanismes de support de la dédifférenciation cellulaire et du maintien des cellules dans un état non différencié.

La capacité d'induire l'épimorphose chez l'humain ne se limitera certainement pas au traitement de l'amputation d'un membre. En effet, l'axolotl possède la capacité de régénérer sa peau, sa mâchoire, son cerveau, sa moelle épinière, l'apex de son cœur et bien sur, ses pattes. Il est donc facile d'imaginer le nombre de conditions pathologiques ou traumatiques qui pourraient être traitées: récupération post infarctus, Alzheimer, Parkinson, grands brûlés, tétraplégie traumatique, etc. Les personnes atteintes de l'une ou l'autre de ces conditions verraient leur vie grandement transformée et pour le mieux.

Conclusion

Cette thèse présente les résultats de la première étude d'un membre de la famille des « Bone Morphogenetic Proteins » chez l'axolotl; soit la protéine BMP-2. La séquence complète du gène a été clonée, et son expression a été déterminée exhaustivement durant le développement et la régénération de la patte ainsi que durant l'embryogénèse. L'expression de *BMP-2* durant le développement embryonnaire est comparable à son expression durant le développement chez la plupart des vertébrés. L'expression de *BMP-2* dans le membre en développement chez l'axolotl est virtuellement identique à son expression chez les autres vertébrés. Nos résultats fonctionnels et l'expression de *BMP-2* durant la régénération de la patte démontrent que les rôles connus de BMP-2 durant le développement de la patte chez les autres vertébrés sont conservés durant la régénération de la patte. Les expériences de surexpression du gène *BMP-2* durant la régénération de la patte ont démontré son implication dans la formation du squelette, dans l'apoptose et dans l'activation de la condensation cellulaire. Ces résultats sont supportés par nos expériences de surexpression de l'antagoniste des BMPs, la protéine *Noggin*, durant la régénération de la patte. La surexpression de *Noggin* a démontré une absence de formation des éléments squelettiques, une absence d'apoptose, de condensation cellulaire ainsi que l'absence de prolifération cellulaire. Nos résultats ont également démontré que BMP-2 n'est pas impliqué dans la formation du patron de développement de la patte tel qu'on le croyait jusqu'à récemment. Ces résultats confirment les résultats obtenus récemment chez la souris mutante pour *BMP-2* (-/-) qui ne présentait pas de défaut du patron de formation antéropostérieur de la patte. L'inhibition complète de la régénération par l'expression de *Noggin* dans la totalité du

blastème de régénération démontre clairement la nécessité de la signalisation des BMPs dans la régénération épimorphique tel qu'il a également été démontré durant l'épimorphose de la dernière phalange de la patte de souris sauvages. De plus chez leurs frères et sœurs mutantes pour *MSX-1* (-/-), la régénération était inhibée mais pouvait être restaurée par l'application directe de la protéine BMP-4 qui est pratiquement identique à la protéine BMP-2 (annexe 1). Ceci est également corrélé avec nos résultats présentés au chapitre 2 où le patron d'expression spatiotemporel de *MSX-1* était comparable à celui de *BMP-2* à chaque stade de régénération. Le gène *MSX-1* est capable de maintenir les cellules dans un état non différencié, il peut induire la dédifférenciation cellulaire, il est exprimé durant les deux phases de l'épimorphose chez l'axolotl et il est essentiel à la régénération de la dernière phalange chez la souris. Ainsi, son patron d'expression spatiotemporel comparable à celui de *BMP-2* à chaque stade de l'épimorphose chez l'axolotl mérite que l'on porte attention aux interactions entre ces deux gènes durant l'épimorphose de la patte. La génération d'animaux transgéniques étant maintenant une technologie applicable chez l'axolotl, la poursuite de l'étude des interactions entre BMP-2 et *MSX-1* et éventuellement entre les BMPs et les *MSXs* en général pourraient ouvrir la voie à de nouvelles percées qui permettront de comprendre d'avantage les mécanismes moléculaires soutenant l'épimorphose chez l'axolotl. Ultimement, ces recherches permettront peut-être un jour d'induire l'épimorphose menant à la régénération de tissus complexes chez l'humain.

Bibliographie

- Agata, K., Saito, Y. and Nakajima, E., 2007. Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Dev Growth Differ.* 49, 73-78.
- Akimenko, M. A., Johnson, S. L., Westerfield, M. and Ekker, M., 1995. Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish. *Development.* 121, 347-357.
- Akimenko, M. A., Mari-Beffa, M., Becerra, J. and Geraudie, J., 2003. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev Dyn.* 226, 190-201.
- Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. and de Crombrugge, B., 2002. The transcription factor *Sox9* has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of *Sox5* and *Sox6*. *Genes Dev.* 16, 2813-2828.
- Akiyama, H., Stadler, H. S., Martin, J. F., Ishii, T. M., Beachy, P. A., Nakamura, T. and de Crombrugge, B., 2007. Misexpression of *Sox9* in mouse limb bud mesenchyme induces polydactyly and rescues hypodactyly mice. *Matrix Biol.* 26, 224-233.
- Alaoui-Ismaili, M. H. and Falb, D., 2009. Design of second generation therapeutic recombinant bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 501-507.
- Alappat, S., Zhang, Z. Y. and Chen, Y. P., 2003. *Msx* homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res.* 13, 429-442.
- Allan, C. H., Fleckman, P., Fernandes, R. J., Hager, B., James, J., Wisecarver, Z., Satterstrom, F. K., Gutierrez, A., Norman, A., Pirrone, A., Underwood, R. A., Rubin, B. P., Zhang, M., Ramay, H. R. and Clark, J. M., 2006. Tissue response and *Msx1* expression after human fetal digit tip amputation *in vitro*. *Wound Repair Regen.* 14, 398-404.
- Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K. and Hoffman, R. M., 2008. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle.* 7.
- Andeol, Y., Lefresne, J., Simard, C., Seguin, C., Mouton, C. and Signoret, J., 1998. Post-transcriptional control of *c-myc* RNA during early development analyzed *in vivo* with a *Xenopus-axolotl* heterologous system. *Differentiation.* 63, 69-79.

- Annes, J. P., Munger, J. S. and Rifkin, D. B., 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 116, 217-224.**
- Armstrong, J. B. and Malacinski, G. M., 1989. *Developmental Biology of the Axolotl.* Oxford University Press Inc., New York.**
- Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M. and Sporn, M. B., 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 258, 7155-7160.**
- Attisano, L. and Wrana, J. L., 2002. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science.* 296, 1646-1647.**
- Badylak, S. F. and Gilbert, T. W., 2008. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin Immunol.* 20, 109-116.**
- Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V. and Tabin, C. J., 2006. Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis. *PLoS Genet.* 2, e216.**
- Barlow, A. J. and Francis-West, P. H., 1997. Ectopic application of recombinant BMP-2 and BMP-4 can change patterning of developing chick facial primordia. *Development.* 124, 391-398.**
- Beauchemin, M., Noiseux, N., Tremblay, M. and Savard, P., 1994. Expression of Hox A11 in the limb and the regeneration blastema of adult newt. *Int J Dev Biol.* 38, 641-649.**
- Beck, C. W., Christen, B., Barker, D. and Slack, J. M., 2006. Temporal requirement for bone morphogenetic proteins in regeneration of the tail and limb of *Xenopus* tadpoles. *Mech Dev.***
- Bei, M., Kratochwil, K. and Maas, R. L., 2000. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development.* 127, 4711-4718.**
- Bell, D. M., Leung, K. K., Wheatley, S. C., Ng, L. J., Zhou, S., Ling, K. W., Sham, M. H., Koopman, P., Tam, P. P. and Cheah, K. S., 1997. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet.* 16, 174-178.**
- Bell, E., Rosenberg, M., Kemp, P., Gay, R., Green, G. D., Muthukumaran, N. and Nolte, C., 1991. Recipes for reconstituting skin. *J Biomech Eng.* 113, 113-119.**

- Bellairs, d. A., Bryant, S. V., , Gans, C. and Billet, F., 1985. Autotomy and regeneration in reptiles. In: Sons, J. W. a. (Ed.), *Biology of the reptilia*, vol.15, New York, pp. 301–410.
- Bendall, A. J. and Abate-Shen, C., 2000. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene*. 247, 17-31.
- Bendall, A. J., Ding, J., Hu, G., Shen, M. M. and Abate-Shen, C., 1999. Msx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors. *Development*. 126, 4965-4976.
- Bianco, P. and Robey, P. G., 2001. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 414, 118-121.
- Bienz, M., 1984a. Developmental control of the heat shock response in *Xenopus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81, 3138-3142.
- Bienz, M., 1984b. *Xenopus* hsp 70 genes are constitutively expressed in injected oocytes. *EMBO J*. 3, 2477-2483.
- Bininda-Emonds, O. R., Jeffery, J. E., Sanchez-Villagra, M. R., Hanken, J., Colbert, M., Pieau, C., Selwood, L., Ten Cate, C., Raynaud, A., Osabutey, C. K. and Richardson, M. K., 2007. Forelimb-hindlimb developmental timing changes across tetrapod phylogeny. *BMC Evol Biol*. 7, 182.
- Blobe, G. C., Schiemann, W. P. and Lodish, H. F., 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 342, 1350-1358.
- Borgens, R. B., 1982. Mice regrow the tips of their foretoes. *Science*. 217, 747-750.
- Brawley, C. and Matunis, E., 2004. Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. *Science*. 304, 1331-1334.
- Brookes, J. P. and Kumar, A., 2002. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3, 566-574.
- Brookes, J. P. and Kumar, A., 2008. Comparative Aspects of Animal Regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Brundin, P., Karlsson, J., Emgard, M., Schierle, G. S., Hansson, O., Petersen, A. and Castilho, R. F., 2000. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant*. 9, 179-195.

- Brunet, L. J., McMahon, J. A., McMahon, A. P. and Harland, R. M., 1998. Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton. *Science*. 280, 1455-1457.
- Brunst, V. V., 1955. The axolotl (*Siredon mexicanum*). I. As material for scientific research. *Lab Invest*. 4, 45-64.
- Bryant, S. V., Endo, T. and Gardiner, D. M., 2002. Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. *Int J Dev Biol*. 46, 887-896.
- Bryant, S. V. and Iten, L. E., 1974. The regulative ability of the limb regeneration blastema of *Notophthalmus viridescens*: Experiments in situ. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*. 174, 90-101.
- Cai, J., Yi, F. F., Yang, X. C., Lin, G. S., Jiang, H., Wang, T. and Xia, Z., 2007. Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytherapy*. 9, 283-291.
- Cao, Y., Ohwatari, N., Matsumoto, T., Kosaka, M., Ohtsuru, A. and Yamashita, S., 1999. TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts. *Pflugers Arch*. 438, 239-244.
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J. C., 2001. Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 17, 87-132.
- Capdevila, J. and Johnson, R. L., 1998. Endogenous and ectopic expression of noggin suggests a conserved mechanism for regulation of BMP function during limb and somite patterning. *Dev Biol*. 197, 205-217.
- Capon, A. and Mordon, S., 2003. Can thermal lasers promote skin wound healing? *Am J Clin Dermatol*. 4, 1-12.
- Carlson, B. M., 1974. Morphogenetic interactions between rotated skin cuffs and underlying stump tissues in regenerating axolotl forelimbs. *Dev Biol*. 39, 263-285.
- Carlson, B. M., 2007a. Brief History. In: Inc., E. (Ed.), *Principles of Regenerative Biology*, Burlington, pp. 1-2.
- Carlson, B. M., 2007b. Reparative regeneration. In: Inc., E. (Ed.), *Principles of Regenerative Biology*, Burlington, pp. 4-11.

- Carlson, M. R., Bryant, S. V. and Gardiner, D. M., 1998. Expression of Msx-2 during development, regeneration, and wound healing in axolotl limbs. *J Exp Zool.* 282, 715-723.**
- Carlson, M. R., Komine, Y., Bryant, S. V. and Gardiner, D. M., 2001. Expression of Hoxb13 and Hoxc10 in developing and regenerating Axolotl limbs and tails. *Dev Biol.* 229, 396-406.**
- Carpenter, M. K., Rosler, E. and Rao, M. S., 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells.* 5, 79-88.**
- Carpenter, M. K., Rosler, E. S., Fisk, G. J., Brandenberger, R., Ares, X., Miura, T., Lucero, M. and Rao, M. S., 2004. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn.* 229, 243-258.**
- Catron, K. M., Wang, H., Hu, G., Shen, M. M. and Abate-Shen, C., 1996. Comparison of MSX-1 and MSX-2 suggests a molecular basis for functional redundancy. *Mech Dev.* 55, 185-199.**
- Catron, K. M., Zhang, H., Marshall, S. C., Inostroza, J. A., Wilson, J. M. and Abate, C., 1995. Transcriptional repression by Msx-1 does not require homeodomain DNA-binding sites. *Mol Cell Biol.* 15, 861-871.**
- Chen, B., Hu, D. H., Jia, C. Y., Ding, G. B., Yao, Q. J. and Liu, Y. L., 2007. [Management of a patient with massive and deep burns: early care and reconstruction after convalescence]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 23, 112-116.**
- Chen, D., Zhao, M. and Mundy, G. R., 2004. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 22, 233-241.**
- Chen, J., Lan, Y., Baek, J. A., Gao, Y. and Jiang, R., 2009. Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Dev Biol.* 334, 174-185.**
- Chen, J., Park, H. C., Addabbo, F., Ni, J., Pelger, E., Li, H., Plotkin, M. and Goligorsky, M. S., 2008. Kidney-derived mesenchymal stem cells contribute to vasculogenesis, angiogenesis and endothelial repair. *Kidney Int.***
- Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K. and Beachy, P. A., 2002. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev.* 16, 2743-2748.**

- Chen, Y. and Zhao, X., 1998. Shaping limbs by apoptosis. *J Exp Zool.* 282, 691-702.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature.* 383, 407-413.
- Christen, B. and Slack, J. M., 1998. All limbs are not the same. *Nature.* 395, 230-231.
- Christensen, R. N. and Tassava, R. A., 2000. Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Dev Dyn.* 217, 216-224.
- Cirillo, L. and Zaret, K., 2004. Developmental biology. A linker histone restricts muscle development. *Science.* 304, 1607-1609.
- Clause, A. R. and Capaldi, E. A., 2006. Caudal autotomy and regeneration in lizards. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 305, 965-973.
- Cohn, M. J. and Bright, P. E., 1999. Molecular control of vertebrate limb development, evolution and congenital malformations. *Cell Tissue Res.* 296, 3-17.
- Crews, L., Gates, P. B., Brown, R., Joliot, A., Foley, C., Brockes, J. P. and Gann, A. A., 1995. Expression and activity of the newt *Msx-1* gene in relation to limb regeneration. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 259, 161-171.
- Crotwell, P. L., Sommervold, A. R. and Mabee, P. M., 2004. Expression of *bmp2a* and *bmp2b* in late-stage zebrafish median fin development. *Gene Expr Patterns.* 5, 291-296.
- Cygan, J. A., Johnson, R. L. and McMahon, A. P., 1997. Novel regulatory interactions revealed by studies of murine limb pattern in *Wnt-7a* and *En-1* mutants. *Development.* 124, 5021-5032.
- da Silva, S. M., Gates, P. B. and Brockes, J. P., 2002. The newt ortholog of *CD59* is implicated in proximodistal identity during amphibian limb regeneration. *Dev Cell.* 3, 547-555.
- Dahn, R. D. and Fallon, J. F., 2000. Interdigital regulation of digit identity and homeotic transformation by modulated BMP signaling. *Science.* 289, 438-441.

- De Luca, F., Barnes, K. M., Uyeda, J. A., De-Levi, S., Abad, V., Palese, T., Mericq, V. and Baron, J., 2001. Regulation of growth plate chondrogenesis by bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology*. 142, 430-436.
- Deans, R. J. and Moseley, A. B., 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 28, 875-884.
- Deierborg, T., Soulet, D., Roybon, L., Hall, V. and Brundin, P., 2008. Emerging restorative treatments for Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*.
- DeWees, S. and Geiger, J. H., 1999. Structural studies of the Msx-1 homeodomain-DNA complex I. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 55 (Pt 12), 2039-2040.
- Diez-Fernandez, C., Andres, D. and Cascales, M., 2002. Attenuating effects of heat shock against TGF-beta1-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med*. 33, 835-846.
- Dinsmore, C. E., 1991. Lazzaro Spallanzini: concepts of generation and regeneration. In: Press, C. U. (Ed.), *A History of Regeneration Research*, Cambridge, pp. 67-90.
- Dinsmore, C. E., 1996. Urodele limb and tail regeneration in early biological thought: an essay on scientific controversy and social change. *Int J Dev Biol*. 40, 621-627.
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A. and Howard, G. A., 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*. 14, 1115-1122.
- Dodig, M., Tadic, T., Kronenberg, M. S., Dacic, S., Liu, Y. H., Maxson, R., Rowe, D. W. and Lichtler, A. C., 1999. Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol*. 209, 298-307.
- Douglas, B. S., 1972. Conservative management of guillotine amputation of the finger in children. *Aust Paediatr J*. 8, 86-89.
- Dressel, R., Schindehutte, J., Kuhlmann, T., Elsner, L., Novota, P., Baier, P. C., Schillert, A., Bickeboller, H., Herrmann, T., Trenkwalder, C., Paulus, W. and Mansouri, A., 2008. The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS ONE*. 3, e2622.

- Drossopoulou, G., Lewis, K. E., Sanz-Ezquerro, J. J., Nikbakht, N., McMahon, A. P., Hofmann, C. and Tickle, C., 2000. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development*. 127, 1337-1348.**
- D'Souza, D. and Patel, K., 1999. Involvement of long- and short-range signalling during early tendon development. *Anat Embryol (Berl)*. 200, 367-375.**
- Duprez, D., Bell, E. J., Richardson, M. K., Archer, C. W., Wolpert, L., Brickell, P. M. and Francis-West, P. H., 1996a. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech Dev*. 57, 145-157.**
- Duprez, D. M., Kostakopoulou, K., Francis-West, P. H., Tickle, C. and Brickell, P. M., 1996b. Activation of Fgf-4 and HoxD gene expression by BMP-2 expressing cells in the developing chick limb. *Development*. 122, 1821-1828.**
- Echeverri, K. and Tanaka, E. M., 2002. Ectoderm to mesoderm lineage switching during axolotl tail regeneration. *Science*. 298, 1993-1996.**
- Echeverri, K. and Tanaka, E. M., 2003. Electroporation as a tool to study in vivo spinal cord regeneration. *Dev Dyn*. 226, 418-425.**
- Echeverri, K. and Tanaka, E. M., 2005. Proximodistal patterning during limb regeneration. *Dev Biol*. 279, 391-401.**
- Fausto, N., Campbell, J. S. and Riehle, K. J., 2006. Liver regeneration. *Hepatology*. 43, S45-53.**
- Felin, J. E., Mayo, J. L., Loos, T. J., Jensen, J. D., Sperry, D. K., Gaufin, S. L., Meinhart, C. A., Moss, J. B. and Bridgewater, L. C., 2010. Nuclear variants of bone morphogenetic proteins. *BMC Cell Biol*. 11, 20.**
- Finsson, K. W., Parker, W. L., ten Dijke, P., Thorikay, M. and Philip, A., 2008. ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res*. 23, 896-906.**
- Fitch, J. M., Mentzer, A., Mayne, R. and Linsenmayer, T. F., 1989. Independent deposition of collagen types II and IX at epithelial-mesenchymal interfaces. *Development*. 105, 85-95.**

- Francis, P. H., Richardson, M. K., Brickell, P. M. and Tickle, C., 1994. Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development*. 120, 209-218.
- Franke, M. B., M., 2009. A New Lightweight, Robust and Forceful Finger for an Artificial Limb. WC 2009, IFMBE Proceedings. 25/IX, 339-342.
- Franssen, R. A., Marks, S., Wake, D. and Shubin, N., 2005. Limb chondrogenesis of the seepage salamander, *Desmognathus aeneus* (amphibia: plethodontidae). *J Morphol*. 265, 87-101.
- 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.
- French, V., Bryant, P. J. and Bryant, S. V., 1976. Pattern regulation in epimorphic fields. *Science*. 193, 969-981.
- Fritz, D. T., Liu, D., Xu, J., Jiang, S. and Rogers, M. B., 2004. Conservation of Bmp2 post-transcriptional regulatory mechanisms. *J Biol Chem*. 279, 48950-48958.
- Gabai, V. L., Meriin, A. B., Mosser, D. D., Caron, A. W., Rits, S., Shifrin, V. I. and Sherman, M. Y., 1997. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem*. 272, 18033-18037.
- Gabouev, A. I., Schultheiss, D., Mertsching, H., Koppe, M., Schlote, N., Wefer, J., Jonas, U. and Stief, C. G., 2003. In vitro construction of urinary bladder wall using porcine primary cells reseeded on acellularized bladder matrix and small intestinal submucosa. *Int J Artif Organs*. 26, 935-942.
- Ganan, Y., Macias, D., Duterque-Coquillaud, M., Ros, M. A. and Hurle, J. M., 1996. Role of TGF beta s and BMPs as signals controlling the position of the digits and the areas of interdigital cell death in the developing chick limb autopod. *Development*. 122, 2349-2357.
- Garcia-Ararras, J. E., Diaz-Miranda, L., Torres, II, File, S., Jimenez, L. B., Rivera-Bermudez, K., Arroyo, E. J. and Cruz, W., 1999. Regeneration of the enteric nervous system in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *J Comp Neurol*. 406, 461-475.
- Gardiner, D. M., 2005. Ontogenetic decline of regenerative ability and the stimulation of human regeneration. *Rejuvenation Res*. 8, 141-153.

- Gardiner, D. M., Blumberg, B. and Bryant, S. V., 1993. Expression of homeobox genes in limb regeneration. *Prog Clin Biol Res.* 383A, 31-40.**
- Gardiner, D. M., Blumberg, B., Komine, Y. and Bryant, S. V., 1995. Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development.* 121, 1731-1741.**
- Gardiner, D. M., Carlson, M. R. and Roy, S., 1999. Towards a functional analysis of limb regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 10, 385-393.**
- Gardiner, D. M., Endo, T. and Bryant, S. V., 2002. The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new. *Semin Cell Dev Biol.* 13, 345-352.**
- Gardiner, D. M., Muneoka, K. and Bryant, S. V., 1986. The migration of dermal cells during blastema formation in axolotls. *Dev Biol.* 118, 488-493.**
- Gates, C. B., Karthikeyan, T., Fu, F. and Huard, J., 2008. Regenerative medicine for the musculoskeletal system based on muscle-derived stem cells. *J Am Acad Orthop Surg.* 16, 68-76.**
- Geetha-Loganathan, P., Nimmagadda, S., Huang, R., Scal, M. and Christ, B., 2006. Expression pattern of BMPs during chick limb development. *Anat Embryol (Berl).***
- Geiger, M., Li, R. H. and Friess, W., 2003. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev.* 55, 1613-1629.**
- Geraci, F., Agueli, C., Giudice, G. and 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.**
- Giampaoli, S., Bucci, S., Ragghianti, M., Mancino, G., Zhang, F. and Ferretti, P., 2003. Expression of FGF2 in the limb blastema of two Salamandridae correlates with their regenerative capability. *Proc Biol Sci.* 270, 2197-2205.**
- Gilbert, S. F., 2003. *Developmental Biology.* Sinauer associates Inc, 592.**
- Goldring, M. B., Birkhead, J. R., Suen, L. F., Yamin, R., Mizuno, S., Glowacki, J., Arbiser, J. L. and Apperley, J. F., 1994. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest.* 94, 2307-2316.**

- Gomez-Escobar, N., Lewis, E. and Maizels, R. M., 1998. A novel member of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) superfamily from the filarial nematodes *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Exp Parasitol.* 88, 200-209.
- Gos, M., Miloszewska, J. and Przybyszewska, M., 2009. [Epithelial-mesenchymal transition in cancer progression]. *Postepy Biochem.* 55, 121-128.
- Goss, R. J., 1966. Hypertrophy versus hyperplasia. *Science.* 153, 1615-1620.
- Goss, R. J., 1969. Heads and tails. In: Academic Press, I. (Ed.), *Principles of regeneration*, New York, pp. 191-222.
- Goss, R. J., 1984. Photoperiodic control of antler cycles in deer. VI. Circannual rhythms on altered day lengths. *J Exp Zool.* 230, 265-271.
- Grainger, D. J., Wakefield, L., Bethell, H. W., Farndale, R. W. and Metcalfe, J. C., 1995. Release and activation of platelet latent TGF-beta in blood clots during dissolution with plasmin. *Nat Med.* 1, 932-937.
- Grim, M. and Carlson, B. M., 1974. A comparison of morphogenesis of muscles of the forearm and hand during ontogenesis and regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). II. The development of muscular pattern in the embryonic and regenerating limb. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 145, 149-167.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A. N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W. W., Belmonte, J. C. and Choe, S., 2002. Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature.* 420, 636-642.
- Gudkov, A. V. and Komarova, E. A., 2005. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 331, 726-736.
- Guimond, J. C., Levesque, M., Michaud, P. L., Berdugo, J., Finnson, K., Philip, A. and Roy, S., 2010. BMP-2 functions independently of SHH signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs. *BMC Dev Biol.* 10, 15.
- Hadzhiev, Y., Lele, Z., Schindler, S., Wilson, S. W., Ahlberg, P., Strahle, U. and Muller, F., 2007. Hedgehog signaling patterns the outgrowth of unpaired skeletal appendages in zebrafish. *BMC Dev Biol.* 7, 75.
- Han, M., Yang, X., Farrington, J. E. and Muneoka, K., 2003. Digit regeneration is regulated by *Msx1* and *BMP4* in fetal mice. *Development.* 130, 5123-5132.

- Han, M., Yang, X., Taylor, G., Burdsal, C. A., Anderson, R. A. and Muneoka, K., 2005. Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anat Rec B New Anat.* 287, 14-24.
- Harty, M., Neff, A. W., King, M. W. and Mescher, A. L., 2003. Regeneration or scarring: an immunologic perspective. *Dev Dyn.* 226, 268-279.
- Hay, E. D., 1959. Electron microscopic observations of muscle dedifferentiation in regenerating *Ambystoma* limbs. *Dev Biol.* 1, 555-585.
- Hay, E. D. and Fischman, D. A., 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.
- Hayslett, J. P., Kashgarian, M. and Epstein, F. H., 1968. Functional correlates of compensatory renal hypertrophy. *J Clin Invest.* 47, 774-799.
- Healy, C., Uwanogho, D. and Sharpe, P. T., 1999. Regulation and role of Sox9 in cartilage formation. *Dev Dyn.* 215, 69-78.
- Heikkila, J. J., Ohan, N., Tam, Y. and Ali, A., 1997. Heat shock protein gene expression during *Xenopus* development. *Cell Mol Life Sci.* 53, 114-121.
- Helmbrecht, K., Zeise, E. and Rensing, L., 2000. Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Prolif.* 33, 341-365.
- Hemmati-Brivanlou, A. and Thomsen, G. H., 1995. Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev Genet.* 17, 78-89.
- Higgins, G. and Anderson, R., 1931. Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol.* 12, 186-202.
- Hill, R. E., Jones, P. F., Rees, A. R., Sime, C. M., Justice, M. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Graham, E. and Davidson, D. R., 1989. A new family of mouse homeo box-containing genes: molecular structure, chromosomal location, and developmental expression of Hox-7.1. *Genes Dev.* 3, 26-37.
- Hinchliffe, J. R. and Vorobyeva, E. I., 1999. Developmental basis of limb homology in urodeles: heterochronic evidence from the primitive hynobiid family. *Novartis Found Symp.* 222, 95-105; discussion 105-109.

- Hogan, B. L., 1996. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10, 1580-1594.
- Holder, N., 1989. Organization of connective tissue patterns by dermal fibroblasts in the regenerating axolotl limb. *Development.* 105, 585-593.
- Holtfreter, J., 1933. Der Einfluss von Wirtsalter und verschiedenen Organbezirken auf die Differenzierung von angelagertem Gastulaektodem. *W Roux Arch Entw Mech Org.* 127, 610-775.
- Hong, C. C. and Yu, P. B., 2009. Applications of small molecule BMP inhibitors in physiology and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 409-418.
- Honig, L. S. and Summerbell, D., 1985. Maps of strength of positional signalling activity in the developing chick wing bud. *J Embryol Exp Morphol.* 87, 163-174.
- Horiki, M., Imamura, T., Okamoto, M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui, A., Ochi, T., Miyazono, K., Yoshikawa, H. and Tsumaki, N., 2004. Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol.* 165, 433-445.
- Hovde, S., Abate-Shen, C. and Geiger, J. H., 2001. Crystal structure of the Msx-1 homeodomain/DNA complex. *Biochemistry.* 40, 12013-12021.
- Hu, G., Lee, H., Price, S. M., Shen, M. M. and Abate-Shen, C., 2001. Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1. *Development.* 128, 2373-2384.
- Huibregtse, B. A., Johnstone, B., Goldberg, V. M. and Caplan, A. I., 2000. Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Orthop Res.* 18, 18-24.
- Hutchison, C., Pilote, M. and Roy, S., 2006. The axolotl limb: A model for bone development, regeneration and fracture healing. *Bone.* 40(1):45-56.
- Illingworth, C. M., 1974. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *J Pediatr Surg.* 9, 853-858.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K., 1997. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature.* 389, 622-626.

- Imokawa, Y. and 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.**
- Imokawa, Y. and Yoshizato, K., 1998. Expression of sonic hedgehog gene in regenerating newt limbs. Wound Repair Regen. 6, 366-370.**
- Irintchev, A. and Wernig, A., 1987. Muscle damage and repair in voluntarily running mice: strain and muscle differences. Cell Tissue Res. 249, 509-521.**
- Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T. K., Kato, M. and Miyazono, K., 2000. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. J Biol Chem. 275, 6075-6079.**
- Iten, L. E. and Bryant, S. V., 1973. Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: length, rate, and stages. Wilhelm Roux' archiv. 173, 263-282.**
- Iten, L. E. and Bryant, S. V., 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.**
- Johnson, S. L. and Weston, J. A., 1995. Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in Zebrafish fin regeneration. Genetics. 141, 1583-1595.**
- Katchman, H., Tal, O., Eventov-Friedman, S., Shezen, E., Aronovich, A., Tchorsh, D., Cohen, S., Shtabsky, A., Hecht, G., Dekel, B., Freud, E. and Reisner, Y., 2008. Embryonic porcine liver as a source for transplantation: advantage of intact liver implants over isolated hepatoblasts in overcoming homeostatic inhibition by the quiescent host liver. Stem Cells. 26, 1347-1355.**
- Kawai, M., Bessho, K., Kaihara, S., Sonobe, J., Oda, K., Iizuka, T. and Maruyama, H., 2003. Ectopic bone formation by human bone morphogenetic protein-2 gene transfer to skeletal muscle using transcutaneous electroporation. Hum Gene Ther. 14, 1547-1556.**
- Kawakami, Y., Ishikawa, T., Shimabara, M., Tanda, N., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Kuwana, T., Ueki, A., Noji, S. and Nohno, T., 1996. BMP signaling during bone pattern determination in the developing limb. Development. 122, 3557-3566.**

- Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B. and Fauci, A. S., 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.**
- Khalil, N., 1999. TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect.* 1, 1255-1263.**
- Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., Ko, S., Yang, E., Cha, K. Y., Lanza, R. and Kim, K. S., 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell.* 4, 472-476.**
- Klingensmith, J., Matsui, M., Yang, Y. P. and Anderson, R. M., 2010. Roles of bone morphogenetic protein signaling and its antagonism in holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 154C, 43-51.**
- Knochel, S., Dillinger, K., Koster, M. and Knochel, W., 2001. Structure and expression of *Xenopus tropicalis* BMP-2 and BMP-4 genes. *Mech Dev.* 109, 79-82.**
- Komarov, P. G., Komarova, E. A., Kondratov, R. V., Christov-Tselkov, K., Coon, J. S., Chernov, M. V. and Gudkov, A. V., 1999. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science.* 285, 1733-1737.**
- Korchynskiy, O. and ten Dijke, P., 2002. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem.* 277, 4883-4891.**
- Koshiba, K., Kuroiwa, A., Yamamoto, H., Tamura, K. and Ide, H., 1998. Expression of Msx genes in regenerating and developing limbs of axolotl. *J Exp Zool.* 282, 703-714.**
- Kregel, K. C., 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol.* 92, 2177-2186.**
- Krone, P. H., 2003. Heat shock proteins in development, aging, and evolution. *Semin Cell Dev Biol.* 14, 249.**
- Kumar, A., Godwin, J. W., Gates, P. B., Garza-Garcia, A. A. and Brockes, J. P., 2007. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science.* 318, 772-777.**

- Kumar, A., Velloso, C. P., Imokawa, Y. and Brockes, J. P., 2004. The regenerative plasticity of isolated urodele myofibers and its dependence on MSX1. *PLoS Biol.* 2, E218.
- Kwon, S. B., Young, C., Kim, D. S., Choi, H. O., Kim, K. H., Chung, J. H., Eun, H. C., Park, K. C., Oh, C. K. and Seo, J. S., 2002. Impaired repair ability of hsp70.1 KO mouse after UVB irradiation. *J Dermatol Sci.* 28, 144-151.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- Laforest, L., Brown, C. W., Poleo, G., Geraudie, J., Tada, M., Ekker, M. and Akimenko, M. A., 1998. Involvement of the sonic hedgehog, patched 1 and bmp2 genes in patterning of the zebrafish dermal fin rays. *Development.* 125, 4175-4184.
- Lallemand, Y., Bensoussan, V., Cloment, C. S. and Robert, B., 2009. Msx genes are important apoptosis effectors downstream of the Shh/Gli3 pathway in the limb. *Dev Biol.* 331, 189-198.
- Lallemand, Y., Nicola, M. A., Ramos, C., Bach, A., Cloment, C. S. and Robert, B., 2005. Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development. *Development.* 132, 3003-3014.
- Landegren, T., Risling, M. and Persson, J. K., 2007. Local tissue reactions after nerve repair with ethyl-cyanoacrylate compared with epineural sutures. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 41, 217-227.
- Laplante, A. F., Moulin, V., Auger, F. A., Landry, J., Li, H., Morrow, G., Tanguay, R. M. and Germain, L., 1998. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 46, 1291-1301.
- Laufer, E., Nelson, C. E., Johnson, R. L., Morgan, B. A. and Tabin, C., 1994. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell.* 79, 993-1003.
- Laufer, E., Pizette, S., Zou, H., Orozco, O. E. and Niswander, L., 1997. BMP expression in duck interdigital webbing: a reanalysis. *Science.* 278, 305.
- Laufer, H., 1959. Immunochemical studies of muscle proteins in mature and regenerating limbs of the adult newt, *Triturus viridescens*. *J Embryol Exp Morphol.* 7, 431-458.

- Leask, A. and Abraham, D. J., 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J.* 18, 816-827.
- Lee, H., Habas, R. and Abate-Shen, C., 2004a. MSX1 cooperates with histone H1b for inhibition of transcription and myogenesis. *Science.* 304, 1675-1678.
- Lee, J. E., Kim, Y. J., Kim, J. Y., Lee, W. T., Yenari, M. A. and Giffard, R. G., 2004b. The 70 kDa heat shock protein suppresses matrix metalloproteinases in astrocytes. *Neuroreport.* 15, 499-502.
- Lee, T., Bradley, M. E. and Walowitz, J. L., 1998. Influence of promoter potency on the transcriptional effects of YY1, SRF and Msx-1 in transient transfection analysis. *Nucleic Acids Res.* 26, 3215-3220.
- Lenhoff, H. M. and Lenhoff, H. M., 1991. Abraham Trembly and the origins of research on regeneration in animals. In: Press, C. U. (Ed.), *A history of Regeneration Research*, Cambridge, pp. 47-66.
- Levesque, M., Gatién, S., Finnson, K., Desmeules, S., Villiard, E., Pilote, M., Philip, A. and Roy, S., 2007. Transforming growth factor: Beta signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PLoS ONE.* 2, e1227.
- Li, C. Y., Lee, J. S., Ko, Y. G., Kim, J. I. and Seo, J. S., 2000. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 275, 25665-25671.
- Lin, S. L., Li, B., Rao, S., Yeo, E. J., Hudson, T. E., Nowlin, B. T., Pei, H., Chen, L., Zheng, J. J., Carroll, T. J., Pollard, J. W., McMahon, A. P., Lang, R. A. and Duffield, J. S., 2010. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 4194-4199.
- Litingtung, Y., Dahn, R. D., Li, Y., Fallon, J. F. and Chiang, C., 2002. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature.* 418, 979-983.
- Liu, Y., Helms, A. W. and Johnson, J. E., 2004. Distinct activities of Msx1 and Msx3 in dorsal neural tube development. *Development.* 131, 1017-1028.
- Loomis, C. A., Kimmel, R. A., Tong, C. X., Michaud, J. and Joyner, A. L., 1998. Analysis of the genetic pathway leading to formation of ectopic apical ectodermal ridges in mouse Engrailed-1 mutant limbs. *Development.* 125, 1137-1148.

- Loones, M. T. and Morange, M., 1998. Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo. *Cell Stress Chaperones*. 3, 237-244.**
- Lopez-Martinez, A., Chang, D. T., Chiang, C., Porter, J. A., Ros, M. A., Simandl, B. K., Beachy, P. A. and Fallon, J. F., 1995. Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage. *Curr Biol*. 5, 791-796.**
- Lord, E. A., Martin, S. K., Gray, J. P., Li, C. and Clark, D. E., 2007. Cell cycle genes PEDF and CDKN1C in growing deer antlers. *Anat Rec (Hoboken)*. 290, 994-1004.**
- Ludke, J. and Lakes-Harlan, R., 2008. Regeneration of the tibia and somatotopy of regenerated hair sensilla in *Schistocerca gregaria* (Forskal). *Arthropod Struct Dev*. 37, 210-220.**
- Luna, L., 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Blakiston Division (McGraw Hill), New York.**
- Macias, D., Ganan, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E., Ros, M. A. and Hurle, J. M., 1997. Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development*. 124, 1109-1117.**
- MacKay, S. M., Funke, A. J., Buffington, D. A. and Humes, H. D., 1998. Tissue engineering of a bioartificial renal tubule. *Asaio J*. 44, 179-183.**
- Maden, M., 1977. The role of Schwann cells in paradoxical regeneration in the axolotl. *J Embryol Exp Morphol*. 41, 1-13.**
- Madhavan, L., Ourednik, V. and Ourednik, J., 2005. Grafted neural stem cells shield the host environment from oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*. 1049, 185-188.**
- Madhavan, L., Ourednik, V. and Ourednik, J., 2008. Neural stem/progenitor cells initiate the formation of cellular networks that provide neuroprotection by growth factor-modulated antioxidant expression. *Stem Cells*. 26, 254-265.**
- Markintantova Iu, V., 2006. [Euroconference on the molecular pathways leading to regeneration "cellular and molecular bases of regeneration"]. *Ontogenez*. 37, 66-70.**

- Martin, P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R. and McKercher, S. R., 2003. Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol.* 13, 1122-1128.**
- Martinez-Barbera, J. P., Toresson, H., Da Rocha, S. and Krauss, S., 1997. Cloning and expression of three members of the zebrafish Bmp family: Bmp2a, Bmp2b and Bmp4. *Gene.* 198, 53-59.**
- Massague, J., 1990. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 6, 597-641.**
- Massague, J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67, 753-791.**
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D., 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783-2810.**
- Matsuda, H., Yokoyama, H., Endo, T., Tamura, K. and Ide, H., 2001. An epidermal signal regulates Lmx-1 expression and dorsal-ventral pattern during *Xenopus* limb regeneration. *Dev Biol.* 229, 351-362.**
- McGann, C. J., Odelberg, S. J. and Keating, M. T., 2001. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 13699-13704.**
- McGlinn, E. and Tabin, C. J., 2006. Mechanistic insight into how Shh patterns the vertebrate limb. *Curr Opin Genet Dev.* 16, 426-432.**
- Merino, R., Ganan, Y., Macias, D., Economides, A. N., Sampath, K. T. and Hurle, J. M., 1998. Morphogenesis of digits in the avian limb is controlled by FGFs, TGFbetas, and noggin through BMP signaling. *Dev Biol.* 200, 35-45.**
- Merino, R., Rodriguez-Leon, J., Macias, D., Ganan, Y., Economides, A. N. and Hurle, J. M., 1999. The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development.* 126, 5515-5522.**
- Mescher, A. L., 1976. Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *J Exp Zool.* 195, 117-128.**
- Mescher, A. L., 1996. The cellular basis of limb regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol.* 40, 785-795.**

- Mescher, A. L. and Neff, A. W., 2006. Limb regeneration in amphibians: immunological considerations. *ScientificWorldJournal*. 6 Suppl 1, 1-11.
- Mescher, A. L., White, G. W. and Brokaw, J. J., 2000. Apoptosis in regenerating and denervated, nonregenerating urodele forelimbs. *Wound Repair Regen*. 8, 110-116.
- Michael, M. I., Aziz, F. K. and Fahmy, G. H., 1993. Effect of cyclophosphamide on limb regeneration in stages of *Bufo regularis reuss*. *Prog Clin Biol Res*. 383A, 213-222.
- Michalik, L., Feige, J. N., Gelman, L., Pedrazzini, T., Keller, H., Desvergne, B. and Wahli, W., 2005. Selective expression of a dominant-negative form of peroxisome proliferator-activated receptor in keratinocytes leads to impaired epidermal healing. *Mol Endocrinol*. 19, 2335-2348.
- Mina, M., Gluhak, J. and Rodgers, B., 1996. Downregulation of Msx-2 expression results in chondrogenesis in the medial region of the avian mandible. *Connect Tissue Res*. 35, 79-84.
- Minina, E., Wenzel, H. M., Kreschel, C., Karp, S., Gaffield, W., McMahon, A. P. and Vortkamp, A., 2001. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development*. 128, 4523-4534.
- Mito, T., Inoue, Y., Kimura, S., Miyawaki, K., Niwa, N., Shinmyo, Y., Ohuchi, H. and Noji, S., 2002. Involvement of hedgehog, wingless, and dpp in the initiation of proximodistal axis formation during the regeneration of insect legs, a verification of the modified boundary model. *Mech Dev*. 114, 27-35.
- Mohan, R. R., Kim, W. J., Chen, L. and Wilson, S. E., 1998. Bone morphogenic proteins 2 and 4 and their receptors in the adult human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 39, 2626-2636.
- Monaghan, J. R., Walker, J. A., Page, R. B., Putta, S., Beachy, C. K. and Voss, S. R., 2007. Early gene expression during natural spinal cord regeneration in the salamander *Ambystoma mexicanum*. *J Neurochem*. 101, 27-40.
- Monsoro-Burq, A. H., Duprez, D., Watanabe, Y., Bontoux, M., Vincent, C., Brickell, P. and Le Douarin, N., 1996. The role of bone morphogenetic proteins in vertebral development. *Development*. 122, 3607-3616.
- Morgan, T. H., 1901. Regeneration and Liability to Injury. *Science*. 14, 235-248.

- Moseley, P. L., 1997. Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J Appl Physiol.* 83, 1413-1417.
- Moseley, T. A., Zhu, M. and Hedrick, M. H., 2006. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 118, 121S-128S.
- Mosser, D. D. and Morimoto, R. I., 2004. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene.* 23, 2907-2918.
- Mullen, L. M., Bryant, S. V., Torok, M. A., Blumberg, B. and Gardiner, D. M., 1996. Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development.* 122, 3487-3497.
- Muneoka, K. and Bryant, S. V., 1982. Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. *Nature.* 298, 369-371.
- Muneoka, K., Fox, W. F. and Bryant, S. V., 1986. Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. *Dev Biol.* 116, 256-260.
- Munoz-Sanjuan, I. and Brivanlou, A. H., 2002. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 3, 271-280.
- Murashima-Suginami, A., Takahashi, K., Sakata, T., Tsukamoto, H., Sugai, M., Yanagita, M., Shimizu, A., Sakurai, T., Slavkin, H. C. and Bessho, K., 2008. Enhanced BMP signaling results in supernumerary tooth formation in USAG-1 deficient mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 369, 1012-1016.
- Nieuwkoop, P. D., 1996. What are the key advantages and disadvantages of urodele species compared to anurans as a model system for experimental analysis of early development? *Int J Dev Biol.* 40, 617-619.
- Nishio, Y., Koda, M., Kamada, T., Someya, Y., Yoshinaga, K., Okada, S., Harada, H., Okawa, A., Moriya, H. and Yamazaki, M., 2006. The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. *J Neurosurg Spine.* 5, 424-433.
- Niswander, L. and Martin, G. R., 1993. FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature.* 361, 68-71.

- Norman, W. P. and Schmidt, A. J., 1967. The fine structure of tissues in the amputated-regenerating limb of the adult newt, *Diemictylus viridescens*. *J Morphol.* 123, 271-311.
- Ny, A., Autiero, M. and Carmeliet, P., 2006. Zebrafish and *Xenopus* tadpoles: small animal models to study angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 312, 684-693.
- Nye, H. L., Cameron, J. A., Chernoff, E. A. and Stocum, D. L., 2003. Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development. *Dev Dyn.* 226, 555-560.
- Oberringer, M., Baum, H. P., Jung, V., Welter, C., Frank, J., Kuhlmann, M., Mutschler, W. and Hanselmann, R. G., 1995. Differential expression of heat shock protein 70 in well healing and chronic human wound tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 214, 1009-1014.
- O'Connell-Rodwell, C. E., Shriver, D., Simanovskii, D. M., McClure, C., Cao, Y. A., Zhang, W., Bachmann, M. H., Beckham, J. T., Jansen, E. D., Palanker, D., Schwettman, H. A. and Contag, C. H., 2004. A genetic reporter of thermal stress defines physiologic zones over a defined temperature range. *FASEB J.* 18, 264-271.
- Odelberg, S. J., 2005. Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B New Anat.* 287, 25-35.
- Odelberg, S. J., Kollhoff, A. and Keating, M. T., 2000. Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by *msx1*. *Cell.* 103, 1099-1109.
- O'Kane, S. and Ferguson, M. W., 1997. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol.* 29, 63-78.
- O'Toole, R. V., Castillo, R. C., Pollak, A. N., MacKenzie, E. J. and Bosse, M. J., 2008. Determinants of patient satisfaction after severe lower-extremity injuries. *J Bone Joint Surg Am.* 90, 1206-1211.
- Page, R. B., Monaghan, J. R., Samuels, A. K., Smith, J. J., Beachy, C. K. and Voss, S. R., 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.

- Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C., Mishina, Y. and Lewandoski, M., 2007. BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development*. 134, 2359-2368.**
- Pallas, P. S., 1774. *Spicilegia zoologica quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur. Berolini, Prostant, Apud Gottl.***
- Park, K., Kim, K., Rho, S. B., Choi, K., Kim, D., Oh, S. H., Park, J., Lee, S. H. and Lee, J. H., 2005. Homeobox Msx1 interacts with p53 tumor suppressor and inhibits tumor growth by inducing apoptosis. *Cancer Res*. 65, 749-757.**
- Parr, B. A. and McMahon, A. P., 1995. Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*. 374, 350-353.**
- Parsell, D. A. and Lindquist, S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet*. 27, 437-496.**
- Patruno, M., Thorndyke, M. C., Candia Carnevali, M. D., Bonasoro, F. and Beesley, P. W., 2001. Growth factors, heat-shock proteins and regeneration in echinoderms. *J Exp Biol*. 204, 843-848.**
- Pearl, E. J., Barker, D., Day, R. C. and Beck, C. W., 2008. Identification of genes associated with regenerative success of *Xenopus laevis* hindlimbs. *BMC Dev Biol*. 8, 66.**
- Peng, H. and Huard, J., 2004. Muscle-derived stem cells for musculoskeletal tissue regeneration and repair. *Transpl Immunol*. 12, 311-319.**
- Pietenpol, J. A., Holt, J. T., Stein, R. W. and Moses, H. L., 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.**
- Piskin, E., 2002. Biodegradable polymeric matrices for bioartificial implants. *Int J Artif Organs*. 25, 434-440.**
- Pizette, S., Abate-Shen, C. and Niswander, L., 2001. BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb. *Development*. 128, 4463-4474.**

- Pizette, S. and Niswander, L., 2000. BMPs are required at two steps of limb chondrogenesis: formation of prechondrogenic condensations and their differentiation into chondrocytes. *Dev Biol.* 219, 237-249.**
- Pizette, S. and Niswander, L., 2001. Early steps in limb patterning and chondrogenesis. *Novartis Found Symp.* 232, 23-36; discussion 36-46.**
- Porter, R. M., 2003. Mouse models for human hair loss disorders. *J Anat.* 202, 125-131.**
- Poss, K. D., Shen, J. and Keating, M. T., 2000. Induction of *lef1* during zebrafish fin regeneration. *Dev Dyn.* 219, 282-286.**
- Powell, C. A., Smiley, B. L., Mills, J. and Vandeburgh, H. H., 2002. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 283, C1557-1565.**
- Prudhomme, C., Moreau, N. and Angelier, N., 1997. Conditions for a heat shock response during oogenesis and embryogenesis of the amphibian *Pleurodeles waltl*. *Dev Growth Differ.* 39, 477-484.**
- Quint, E., Smith, A., Avaron, F., Laforest, L., Miles, J., Gaffield, W. and Akimenko, M. A., 2002. Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and *bmp2b* or exposure to cyclopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 8713-8718.**
- Rachmiel, A., Aizenbud, D. and Peled, M., 2004. Enhancement of bone formation by bone morphogenetic protein-2 during alveolar distraction: an experimental study in sheep. *J Periodontol.* 75, 1524-1531.**
- Reaumur, R.-A. F., 1712. Sur les diverses reproductions qui se font dans les ecrivisses, les omars, les crabes, etc. et entre autres sur celles de leurs jambes et de leurs ecailles. *Memoires de l'Academie Royale des Sciences*, 226-245.**
- Redd, M. J., Cooper, L., Wood, W., Stramer, B. and Martin, P., 2004. Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359, 777-784.**
- Reddi, A. H. and Huggins, C., 1972. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 69, 1601-1605.**

- Reginelli, A. D., Wang, Y. Q., Sassoon, D. and Muneoka, K., 1995. Digit tip regeneration correlates with regions of Msx1 (Hox 7) expression in fetal and newborn mice. *Development*. 121, 1065-1076.**
- Repesh, L. A. and Oberpriller, J. C., 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.**
- Repesh, L. A. and Oberpriller, J. C., 1980. Ultrastructural studies on migrating epidermal cells during the wound healing stage of regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Am J Anat*. 159, 187-208.**
- Riddle, R. D., Johnson, R. L., Laufer, E. and Tabin, C., 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*. 75, 1401-1416.**
- Ripamonti, U. and Petit, J. C., 2009. Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 20, 489-499.**
- Robert, B., 2007. Bone morphogenetic protein signaling in limb outgrowth and patterning. *Dev Growth Differ*. 49, 455-468.**
- Robert, B., Sassoon, D., Jacq, B., Gehring, W. and Buckingham, M., 1989. Hox-7, a mouse homeobox gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. *Embo J*. 8, 91-100.**
- Rodriguez-Esteban, C., Schwabe, J. W., Pena, J. D., Rincon-Limas, D. E., Magallon, J., Botas, J. and Izpisua Belmonte, J. C., 1998. Lhx2, a vertebrate homologue of apterous, regulates vertebrate limb outgrowth. *Development*. 125, 3925-3934.**
- Roy, S. and Gardiner, D. M., 2002. Cyclopamine induces digit loss in regenerating axolotl limbs. *J Exp Zool*. 293, 186-190.**
- Roy, S., Gardiner, D. M. and Bryant, S. V., 2000. Vaccinia as a tool for functional analysis in regenerating limbs: ectopic expression of Shh. *Dev Biol*. 218, 199-205.**
- Roy, S. and Levesque, M., 2006. Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? *ScientificWorldJournal*. 6 Suppl 1, 12-25.**
- Roy, S., Martel, J., Ma, S. and Tenenhouse, H. S., 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.

Sanchez Alvarado, A., 2006. Planarian regeneration: its end is its beginning. *Cell*. 124, 241-245.

Sanchez Alvarado, A. and Tsonis, P. A., 2006. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet*. 7, 873-884.

Sato, T., Araki, M., Nakajima, N., Omori, K. and Nakamura, T., 2009. Biodegradable polymer coating promotes the epithelization of tissue-engineered airway prostheses. *J Thorac Cardiovasc Surg*.

Sato, Y. and Rifkin, D. B., 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.

Satoh, A., Graham, G. M., Bryant, S. V. and Gardiner, D. M., 2008. Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Biol*. 319, 321-335.

Saunders, J. W., Jr. and Gasseling, M. T., 1968. Ectodermal–mesenchymal interactions in the origin of limb symmetry. In: Wilkins, W. (Ed.), *Epithelial–Mesenchymal Interactions* (R. Fleishmajer and R. E., Baltimore, pp. 78–97.

Schmierer, B. and Hill, C. S., 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 970-982.

Schnapp, E., Kragl, M., Rubin, L. and Tanaka, E. M., 2005. Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration. *Development*. 132, 3243-3253.

Sears, K. E., Behringer, R. R., Rasweiler, J. J. t. and Niswander, L. A., 2006. Development of bat flight: morphologic and molecular evolution of bat wing digits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 6581-6586.

Shubin, N. and Alberch, P., 1986. A morphogenetic approach to the origin and basic organisation of the tetrapod limb. *Evolutionary Biology*. 20, 319-387.

Simon, H. G., Nelson, C., Goff, D., Laufer, E., Morgan, B. A. and Tabin, C., 1995. Differential expression of myogenic regulatory genes and *Msx-1* during dedifferentiation and redifferentiation of regenerating amphibian limbs. *Dev Dyn*. 202, 1-12.

- Simon, H. G. and Tabin, C. J., 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.**
- Singer, M., 1949. The invasion of the epidermis of the regenerating forelimb of the urodele, *Triturus*, by nerve fibers. *J Exp Zool*. 111, 189-209.**
- Singer, M., 1974. Trophic functions of the neuron. VI. Other trophic systems. Neurotrophic control of limb regeneration in the newt. *Ann N Y Acad Sci*. 228, 308-322.**
- Smith, A., Avaron, F., Guay, D., Padhi, B. K. and Akimenko, M. A., 2006. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function. *Dev Biol*. 299, 438-454.**
- Song, K., Wang, Y. and Sassoon, D., 1992. Expression of Hox-7.1 in myoblasts inhibits terminal differentiation and induces cell transformation. *Nature*. 360, 477-481.**
- Spemann, H., 1921. Uber erzeugung tierischerchimaren durch heteroplastische embryonale transplantation zwischen triton cristatus und taeniatus. *W Roux Arch Entw Mech Org*. 48, 533-570.**
- Stocum, D. L., 1983. Amphibian limb regeneration: distal transformation. *Prog Clin Biol Res*. 110 Pt A, 467-476.**
- Stocum, D. L., 2006. A brief history of regenerative biology and medicine. In: Inc., E. (Ed.), *Regenerative Biology and Medicine*, Burlington, pp. 2-4.**
- Stone, L. S., 1967. An investigation recording all salamanders which can and cannot regenerate a lens from the dorsal iris. *J Exp Zool*. 164, 87-103.**
- Stopper, G. F. and Wagner, G. P., 2007. Inhibition of Sonic hedgehog signaling leads to posterior digit loss in *Ambystoma mexicanum*: parallels to natural digit reduction in urodeles. *Dev Dyn*. 236, 321-331.**
- Straube, W. L. and Tanaka, E. M., 2006. Reversibility of the differentiated state: regeneration in amphibians. *Artif Organs*. 30, 743-755.**
- Suzuki, A., Kaneko, E., Ueno, N. and Hemmati-Brivanlou, A., 1997. Regulation of epidermal induction by BMP2 and BMP7 signaling. *Dev Biol*. 189, 112-122.**

- Suzuki, A., Nishimatsu, S., Murakami, K. and Ueno, N., 1993. Differential expression of Xenopus BMPs in early embryos and tissues. *Zoolog Sci.* 10, 175-178.
- Takahashi, C., Akiyama, N., Matsuzaki, T., Takai, S., Kitayama, H. and Noda, M., 1996. Characterization of a human MSX-2 cDNA and its fragment isolated as a transformation suppressor gene against v-Ki-ras oncogene. *Oncogene.* 12, 2137-2146.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 126, 663-676.
- Takeo, M., Yoshida-Noro, C. and Tochinai, S., 2008. Morphallactic regeneration as revealed by region-specific gene expression in the digestive tract of *Enchytraeus japonensis* (Oligochaeta, Annelida). *Dev Dyn.* 237, 1284-1294.
- Tanaka, E. M., Gann, A. A., Gates, P. B. and Brockes, J. P., 1997. Newt myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol.* 136, 155-165.
- Tank, P. W., Carlson, B. M. and Connelly, T. G., 1976. A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J Morphol.* 150, 117-128.
- Tassava, R. A., Bennett, L. L. and Zitnik, G. D., 1974. DNA synthesis without mitosis in amputated denervated forelimbs of larval axolotls. *J Exp Zool.* 190, 111-116.
- Tassava, R. A., Goldhamer, D. J. and Tomlinson, B. L., 1987. Cell cycle controls and the role of nerves and the regenerate epithelium in urodele forelimb regeneration: possible modifications of basic concepts. *Biochem Cell Biol.* 65, 739-749.
- Tassava, R. A. and Mescher, A. L., 1975. The roles of injury, nerves, and the wound epidermis during the initiation of amphibian limb regeneration. *Differentiation.* 4, 23-24.
- Thombs, B. D., Notes, L. D., Lawrence, J. W., Magyar-Russell, G., Bresnick, M. G. and Fauerbach, J. A., 2008. From survival to socialization: a longitudinal study of body image in survivors of severe burn injury. *J Psychosom Res.* 64, 205-212.
- Thomson, S., Hollis, A., Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C., 2004. Distinct stimulus-specific histone modifications at hsp70 chromatin targeted by the transcription factor heat shock factor-1. *Mol Cell.* 15, 585-594.

- Thorndyke, M. C., Chen, W. C., Beesley, P. W. and Patruno, M., 2001. Molecular approach to echinoderm regeneration. *Microsc Res Tech.* 55, 474-485.**
- Thornton, C. S., 1957. The effect of apical cap removal on limb regeneration in *Ambystoma* larvae. *J Exp Zool.* 134, 357-381.**
- Tickle, C., Summerbell, D. and Wolpert, L., 1975. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature.* 254, 199-202.**
- Tomlinson, B. L. and Tassava, R. A., 1987. Dorsal root ganglia grafts stimulate regeneration of denervated urodele forelimbs: timing of graft implantation with respect to denervation. *Development.* 99, 173-186.**
- Torok, M. A., Gardiner, D. M., Izpisua-Belmonte, J. C. and Bryant, S. V., 1999. Sonic hedgehog (shh) expression in developing and regenerating axolotl limbs. *J Exp Zool.* 284, 197-206.**
- Trigona, W. L., Porter, C. M., Horvath-Arcidiacono, J. A., Majumdar, A. S. and Bloom, E. T., 2007. Could heme-oxygenase-1 have a role in modulating the recipient immune response to embryonic stem cells? *Antioxid Redox Signal.* 9, 751-756.**
- Tsonis, P. A., 1996. Prometheus Shrugged. In: Press, C. U. (Ed.), *Limb Regeneration*, Cambridge, pp. 1-2.**
- Ueda, Y., Kondoh, H. and Mizuno, N., 2005. Generation of transgenic newt *Cynops pyrrhogaster* for regeneration study. *Genesis.* 41, 87-98.**
- Urist, M. R., 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150, 893-899.**
- Uzawa, M., Grams, J., Madden, B., Toft, D. and Salisbury, J. L., 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.**
- Vargas, A. O. and Fallon, J. F., 2005. The digits of the wing of birds are 1, 2, and 3. a review. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 304, 206-219.**
- Vargas-Gonzalez, A., Prado-Zayago, E., Leon-Olea, M., Guarner-Lans, V. and Cano-Martinez, A., 2005. [Myocardial regeneration in *Ambystoma mexicanum* after surgical injury]. *Arch Cardiol Mex.* 75 Suppl 3, S3-21-29.**

- Veves, A., Falanga, V., Armstrong, D. G. and Sabolinski, M. L., 2001. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care*. 24, 290-295.
- Vidal, P. and Dickson, M. G., 1993. Regeneration of the distal phalanx. A case report. *J Hand Surg [Br]*. 18, 230-233.
- Villiard, E., Brinkmann, H., Moiseeva, O., Mallette, F. A., Ferbeyre, G. and Roy, S., 2007. Urodele p53 tolerates amino acid changes found in p53 variants linked to human cancer. *BMC Evol Biol*. 7, 180.
- Vlaskalin, T., Wong, C. J. and 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.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A. J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature*. 408, 307-310.
- Voss, S. R. and Shaffer, H. B., 2000. Evolutionary genetics of metamorphic failure using wild-caught vs. laboratory axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Mol Ecol*. 9, 1401-1407.
- Vousden, K. H. and Lu, X., 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2, 594-604.
- Wallace, H., 1981. *Descriptive*, Chichester.
- Wallace, H. and Watson, A., 1979. Duplicated axolotl regenerates. *J Embryol Exp Morphol*. 49, 243-258.
- Wan, M. and Cao, X., 2005. BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun*. 328, 651-657.
- Wang, Y. H., Rutherford, B., Upholt, W. B. and Mina, M., 1999. Effects of BMP-7 on mouse tooth mesenchyme and chick mandibular mesenchyme. *Dev Dyn*. 216, 320-335.
- Waymack, P., Duff, R. G. and Sabolinski, M., 2000. The effect of a tissue engineered bilayered living skin analog, over meshed split-thickness autografts on the healing of excised burn wounds. The Apligraf Burn Study Group. *Burns*. 26, 609-619.

- Weatherbee, S. D., Behringer, R. R., Rasweiler, J. J. t. and Niswander, L. A., 2006. Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15103-15107.
- Welch, W. J. and Suhan, J. P., 1986. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol.* 103, 2035-2052.
- Werner, S. and Grose, R., 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 83, 835-870.
- Weston, A. D., Hoffman, L. M. and Underhill, T. M., 2003. Revisiting the role of retinoid signaling in skeletal development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 69, 156-173.
- Willis, B. C. and Borok, Z., 2007. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 293, L525-534.
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H. K. and Nagy, A., 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 458, 766-770.
- Wozney, J. M., 2002. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine.* 27, S2-8.
- Wozney, J. M., Rosen, V., Byrne, M., Celeste, A. J., Moutsatsos, I. and Wang, E. A., 1990. Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl.* 13, 149-156.
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A., 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science.* 242, 1528-1534.
- Wu, J., Barisoni, D. and Armato, U., 1996. Prolongation of survival of alloskin grafts with no concurrent general suppression of the burned patient's immune system: a preliminary clinical investigation. *Burns.* 22, 353-358.
- Xiao, Y. T., Xiang, L. X. and Shao, J. Z., 2007. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 362, 550-553.

- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R. I., Ornitz, D. M., Leder, P. and Deng, C., 1998. Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development*. 125, 753-765.
- Yang, X. B., Bhatnagar, R. S., Li, S. and Oreffo, R. O., 2004. Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation. *Tissue Eng.* 10, 1148-1159.
- Yang, Y., Drossopoulou, G., Chuang, P. T., Duprez, D., Marti, E., Bumcrot, D., Vargesson, N., Clarke, J., Niswander, L., McMahon, A. and Tickle, C., 1997. Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. *Development*. 124, 4393-4404.
- Ye, L., Bokobza, S. M. and Jiang, W. G., 2009. Bone morphogenetic proteins in development and progression of breast cancer and therapeutic potential (review). *Int J Mol Med*. 24, 591-597.
- Yokouchi, Y., Sakiyama, J., Kameda, T., Iba, H., Suzuki, A., Ueno, N. and Kuroiwa, A., 1996. BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development*. 122, 3725-3734.
- Yonei-Tamura, S., Endo, T., Yajima, H., Ohuchi, H., Ide, H. and Tamura, K., 1999. FGF7 and FGF10 directly induce the apical ectodermal ridge in chick embryos. *Dev Biol*. 211, 133-143.
- Young, K. H., 1998. Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time. *Biol Reprod*. 58, 302-311.
- Yu, B. D., Mukhopadhyay, A. and Wong, C., 2008. Skin and hair: models for exploring organ regeneration. *Hum Mol Genet*. 17, R54-59.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II and Thomson, J. A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318, 1917-1920.
- Yu, L., Han, M., Yan, M., Lee, E. C., Lee, J. and Muneoka, K., 2010. BMP signaling induces digit regeneration in neonatal mice. *Development*. 137, 551-559.

- Yu, Q. and Stamenkovic, I., 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14, 163-176.**
- Zakany, J. and Duboule, D., 2007. The role of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev.* 17, 359-366.**
- Zehentner, B. K., Dony, C. and Burtscher, H., 1999. The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *J Bone Miner Res.* 14, 1734-1741.**
- Zhang, D., Ferguson, C. M., O'Keefe, R. J., Puzas, J. E., Rosier, R. N. and Reynolds, P. R., 2002. A role for the BMP antagonist chordin in endochondral ossification. *J Bone Miner Res.* 17, 293-300.**
- Zhu, J., Nakamura, E., Nguyen, M. T., Bao, X., Akiyama, H. and Mackem, S., 2008. Uncoupling Sonic hedgehog control of pattern and expansion of the developing limb bud. *Dev Cell.* 14, 624-632.**
- Ziegels, J., 1971. [The melanocytes of the Axolotl. Their modifications during skin regeneration]. *Arch Biol (Liege).* 82, 407-428.**
- Zou, H. and Niswander, L., 1996. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science.* 272, 738-741.**

Appendice 1 - Article publié en co-auteur

Cet appendice contient un article complet sur la caractérisation du gène *Hsp-70* durant le développement et la régénération de la patte chez l'axolotl. Cet article est présenté en annexe puisque la contribution de Jean-Charles Guimond n'était pas déterminante pour sa publication. Toutefois, une participation substantielle à la production des résultats de l'article et à la révision du manuscrit justifient son intégration dans la thèse.

Expression of Heat-Shock Protein 70 during Limb Development and Regeneration in the Axolotl

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.

PMID: 15965983

Reprinted with permission of John Wiley & Sons, Inc.

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

Mise en contexte

La protéine de choc thermique 70 (Hsp-70) est normalement induite rapidement suivant toute sorte de stress (traumatisme, chaleur, ou irradiation U.V.). Puisque l'amputation d'une patte représente un traumatisme important, l'étude d'une protéine comme Hsp-70 durant la régénération pourrait aider à mieux comprendre le processus de régénération. Les résultats présentés dans cet article montrent que *Hsp-70* est exprimé 24h post amputation et que l'expression est maintenue tout au long du processus de régénération. Les résultats montrent également que Hsp-70 est exprimé lors du développement embryonnaire de la patte. De plus, l'analyse de l'expression de Hsp-70 dans divers organes de l'axolotl a démontré que l'expression de Hsp-70 était absente dans l'œil de l'axolotl qui ne peut régénérer sa lentille. L'expression rapide de Hsp-70 durant la phase de préparation et l'absence d'expression dans l'œil d'axolotl suggère que Hsp-70 pourrait avoir un rôle spécifique pour la régénération.

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.

Ces auteurs ont révisé l'article: Mathieu Lévesque, Jean-Charles Guimond, Florina Moldovan et Stéphane Roy

**Autorisation de l'éditeur et des auteurs pour incorporer l'article
dans la thèse, en vue de son indexation et de sa diffusion**

Thank you for your request. John Wiley & Sons, Inc. has no objections to your proposed reuse of this material.

Credit to our Work must appear on every copy using the Material as follows: Title, volume number, issue number, year (e.g. Vol. 1, No. 1, 1996), page numbers. Copyright (year and owner); and the statement "Reprinted with permission of John Wiley & Sons, Inc."

NOTE: No rights are granted to use content that appears in the work with credit to another source.

Paulette Goldweber | Associate Manager, Permissions | Global Rights

Ce manuscrit est reproduit avec la permission écrite de: Mathieu Lévesque, Jean-Charles Guimond, Mireille Pilote, Séverine Leclerc, Florina Moldovan et Stéphane Roy.

Page couverture 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

E-mail: confidential

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.

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 (Simon and Tabin, 1993, Gardiner et al., 1995, Roy et al., 2000). 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 (Tanaka et al., 1997). 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 (Mullen et al., 1996), the cell cycle (Carlson et al., 1998, Koshiba et al., 1998), epithelio-mesenchymal interactions (Parsell and Lindquist, 1993), and finally cellular dedifferentiation (Parsell and Lindquist, 1993). 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 (Krone, 2003). They are mainly recognized for providing thermotolerance to organisms or cells (Parsell and Lindquist, 1993), but recent observations have shown they have multiple roles in embryogenesis, development and aging in organisms such as *Xenopus*, zebrafish, *drosophila* and mice (Bienz, 1984b). This study, focuses on *Heat-shock protein-70* (*Hsp-70*) an ATP-dependent molecular chaperone expressed in various species from *E. coli* to mammals (Capon and Mordon, 2003) 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 (Capon and Mordon, 2003). In fact the regulation of *Hsp-70* is very important in thermotolerance, but also in other processes like wound healing (O'Kane and Ferguson, 1997). *Hsp-70* was shown to be expressed in skin wound healing in rats, during laser-assisted treatments of scars (Cao et al., 1999, Diez-Fernandez et al., 2002). 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 (Kwon et al., 2002). Interestingly, *TGF- β* has been shown to regulate *Hsp-70* expression, therefore linking *Hsp-70* to a potential role in wound healing (Patruno et al., 2001). 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 (Armstrong and Malacinski, 1989).

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 (Nye et al., 2003), 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.

Results

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. 1 A-I) according to Armstrong and Malacinski (Beauchemin et al., 1994). *Hsp-70* was first detected at stage 10,5 (gastrula) in the ectoderm of the axolotl embryo (Fig. 1 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. 1 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. 1 C). We detected the expression of *Hsp-70* at stage 31, in the developing head, branchial arches and in the somites (Fig. 1 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. 1 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. 1 F). In the final stages, from 46 to 53, where the limb buds appeared, the expression pattern was very similar at each stage. *Hsp-70* was detected mainly in the gills, tail fins, lateral lines and limb buds (Fig. 1 H). Limb development stages were classified following the classification of Nye et al. (Bienz, 1984b, Bienz, 1984a). 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. 1 J). At stages 47, 48 and 50, the signal was weaker but still covered the entire limb bud and the developing fingers (Fig. 1 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. 1 N). At this stage we could also detect *Hsp-70* expression in the developing hindlimb bud (Fig. 1 O).

Figure 1: 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.

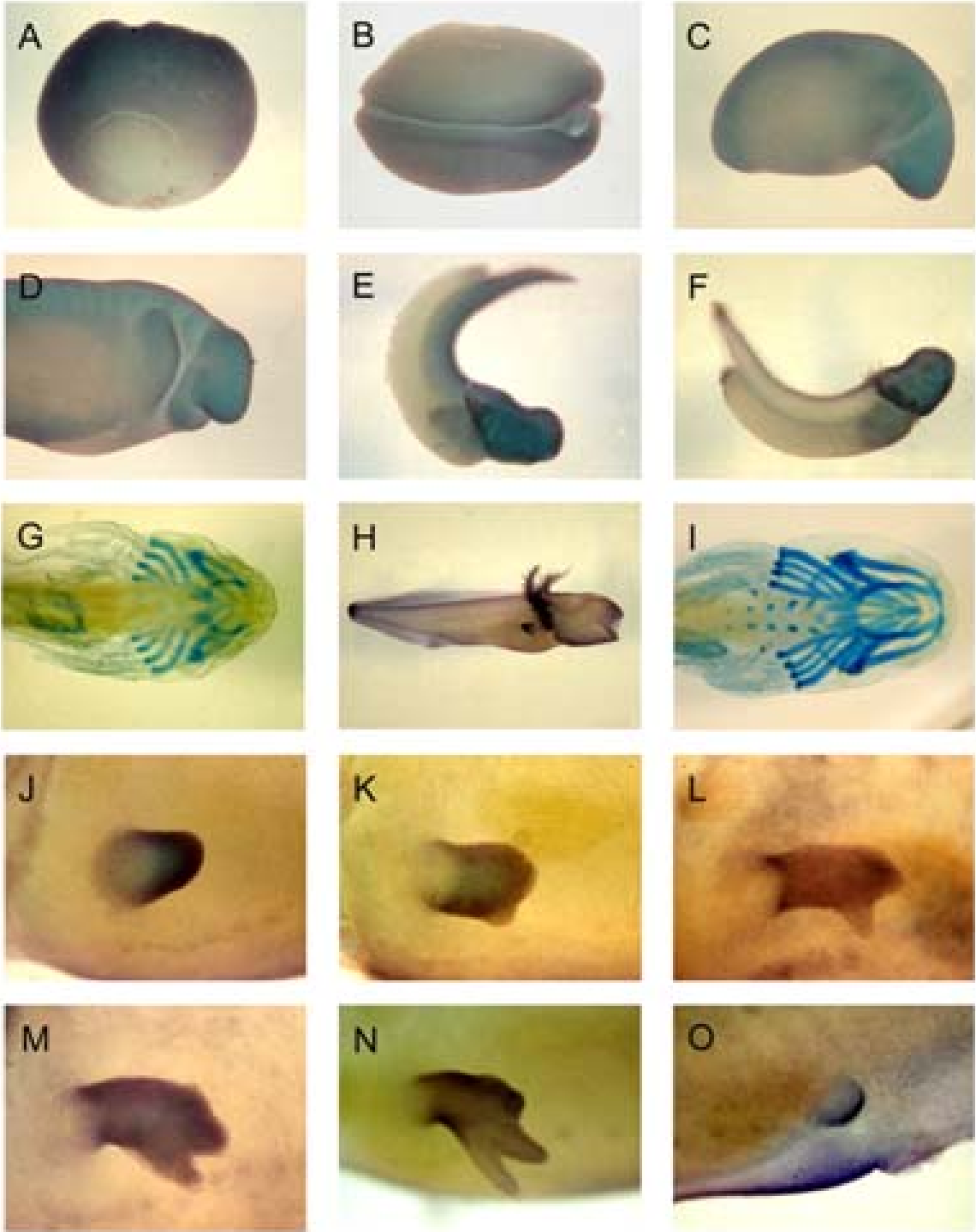


Figure 1

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. 2 B, J). 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. 2 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 proximal amputations (Fig. 2 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. 2 E, M and F, N). At palette stage, *Hsp-70* expression was maintained in the entire blastema (Fig. 2 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. 2 H, P). The expression of *Hsp-70* in hindlimb regeneration was identical with that of forelimbs (data not shown).

Figure 2: 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.

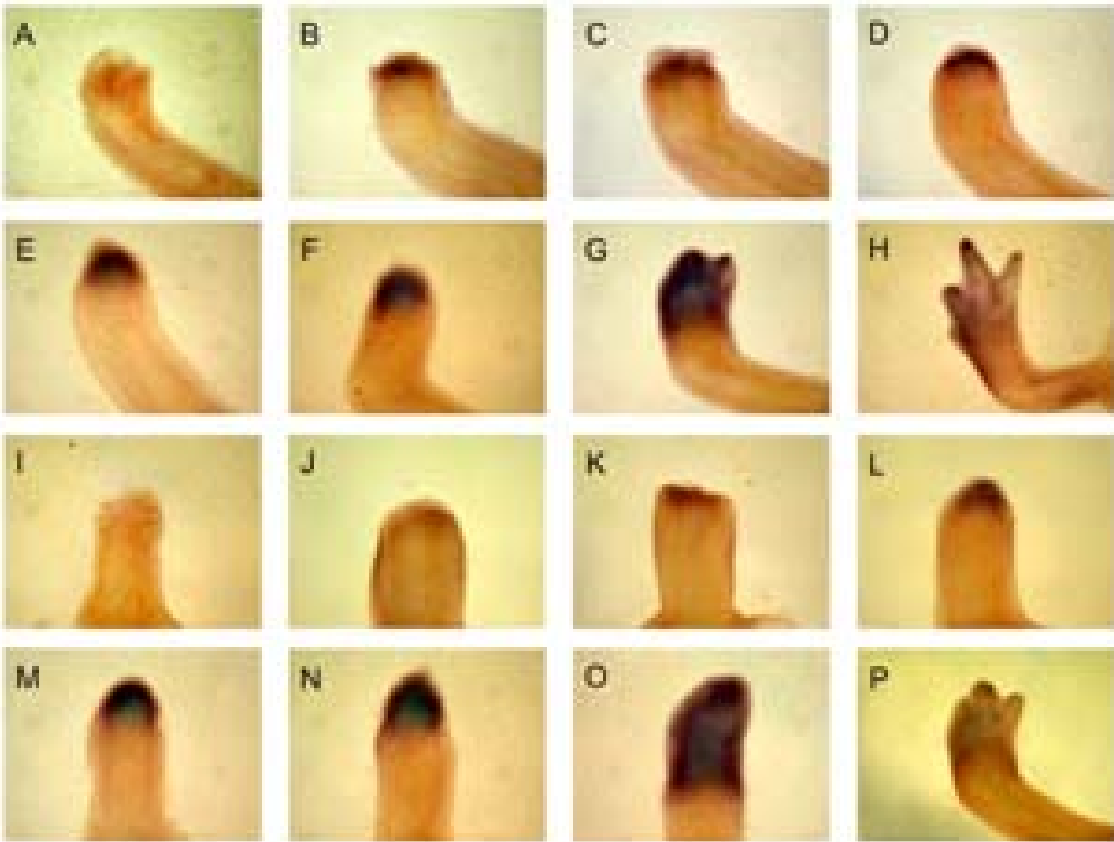


Figure 2

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. 3 A). 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. 3 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. 3 B). Similar results were observed in regenerating hindlimb (data not shown). 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 3 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. 3 B & D).

Figure 3: 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.

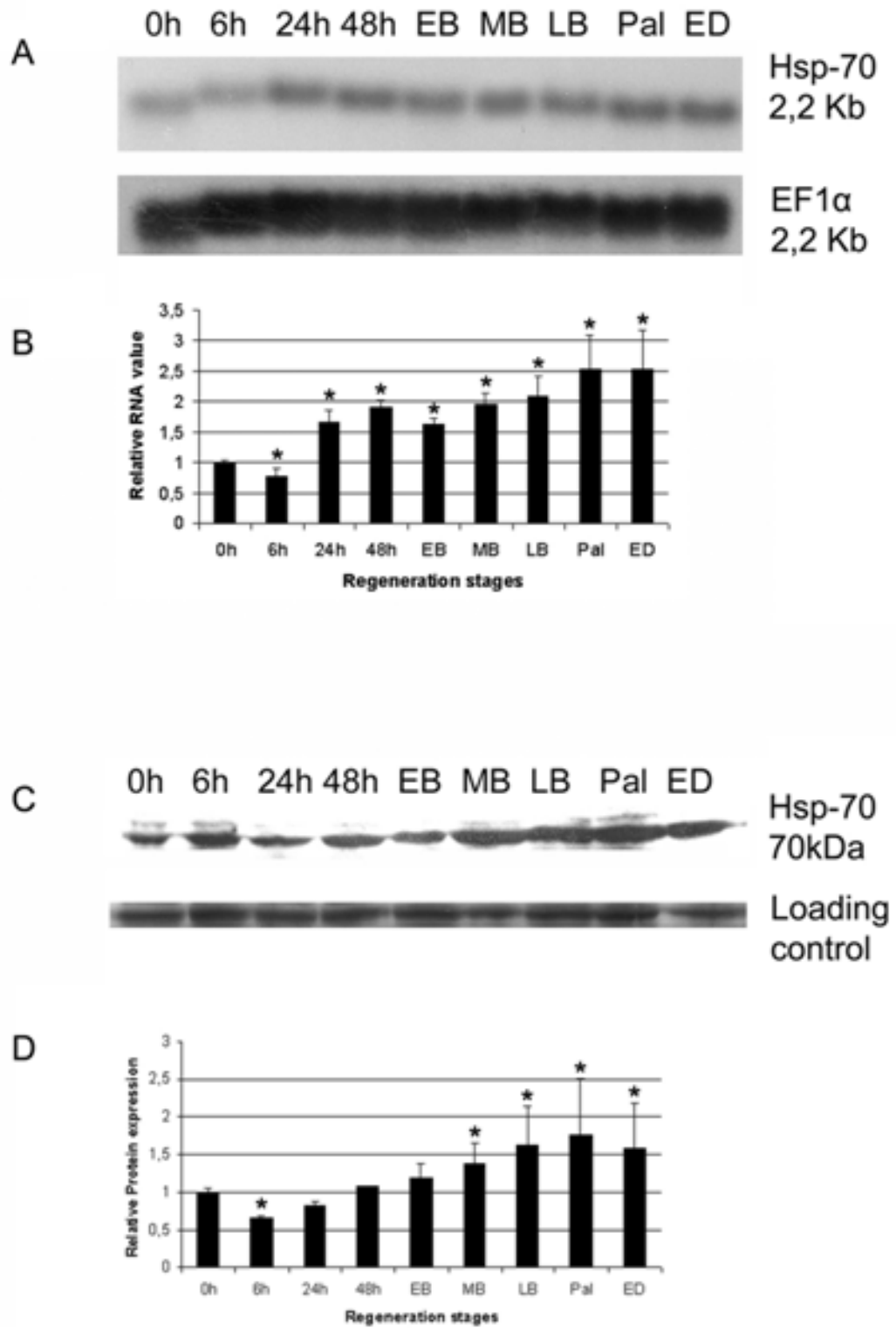


Figure 3

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. 4 A-B) which accounts for the transcript and protein detected at 0h (non regenerating mature tissue) with Northern and Western blot analyses (Fig. 4 A & C). In medium bud blastemas, we detected many positive cells, mostly found in the mesenchyme (Fig. 4 C- D). Control sense probe did not yield any signal (Fig. 4 E- F).

Figure 4: 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.

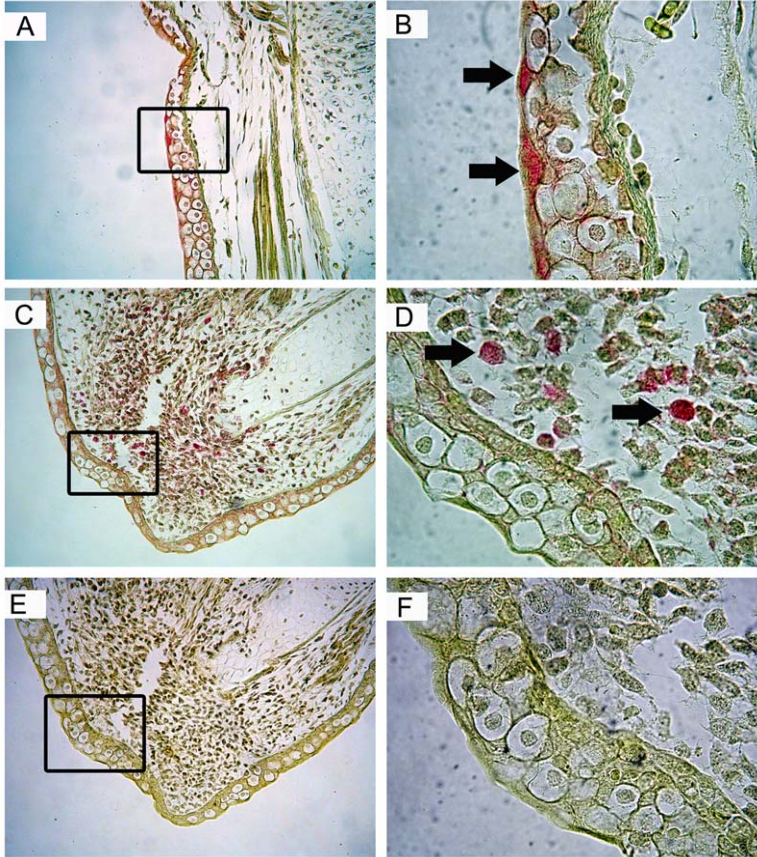


Figure 4

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

The relative gene expression of *Hsp-70* in various organs was determined by RT-PCR and results are depicted in figure Fig. 5 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. (Heikkila et al., 1997). Stomach, spleen, gonads and brain tissues presented a mid-intensity signal for *Hsp-70*, as the intestine expressed the transcript very strongly.

Figure 5: 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.

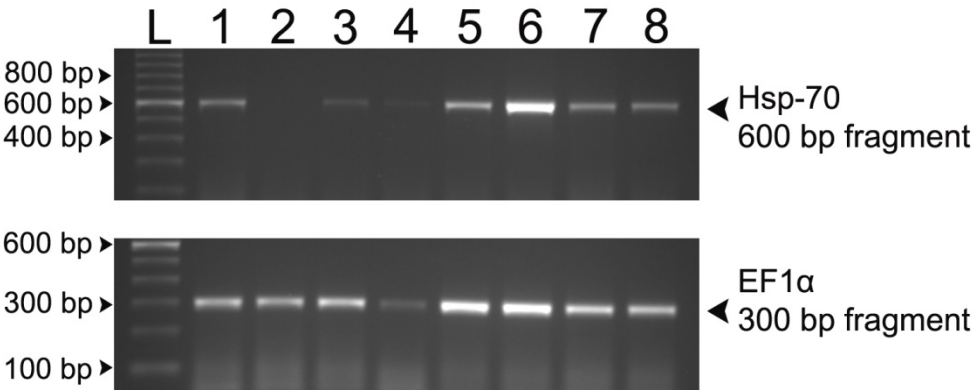


Figure 5

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 42oC compared to the control cells. The level of *Hsp-70* expression increased as early as 3 hours and was maintained at 6 and 9 hours following heat-shock (Fig. 6 A,). 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. 6 B, compare *Hsp-70* band with *EFl- α* band for control, 3h and 6h-post heat-shock). In embryos fixed 6 hours following heat-shock, *Hsp-70* expression 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. 6 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 6: 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.

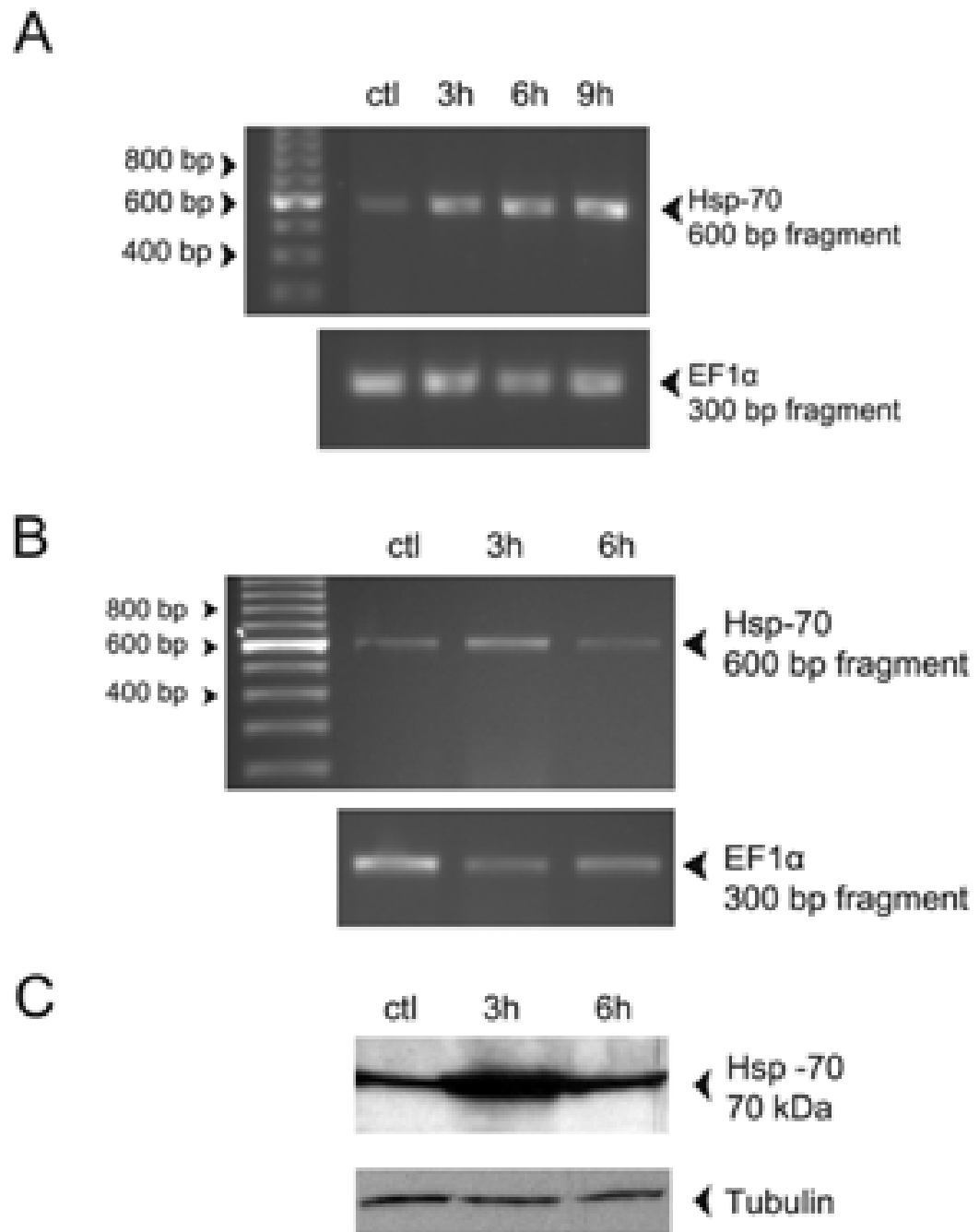


Figure 6

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 (Loones and Morange, 1998). 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 (Oberringer et al., 1995). In mice, *Hsp-70* expression is associated with cartilage and bone development (Kwon et al., 2002). Our expression data during axolotl development, where *Hsp-70* expression covers the entire head, corresponds to the appearance of cartilage (Fig. 1 F-I) 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 (Oberringer et al., 1995). It was also shown that knockout mice for *Hsp-70.1* displayed impaired skin wound healing following UV light exposure compared to normal littermates (Laplante et al., 1998). 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 (Thomson et al., 2004). Studies have also demonstrated that wounding induces a *Hsp-70* response similar to other stresses like heat, chemicals or UV light exposure (Vlaskalin et al., 2004). Interestingly, recent findings have shown that distinct stimuli (e.g. heat-shock and sodium arsenite) can activate *Hsp-70* expression via different pathways (Parsell and Lindquist, 1993, Uzawa et al., 1995, Helmbrecht et al., 2000, Geraci et al., 2003, Lee et al., 2004b). 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 (Stone, 1967). 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. 3 B & D). 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. 5 lane 6). Other organs like stomach, heart, liver, gonads, spleen and brain presented low to moderate levels of *Hsp-70* expression (Fig. 5 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 (Prudhomme et al., 1997, O'Connell-Rodwell et al., 2004). No expression of *Hsp-70* was detected in the eyes (Fig. 5 lane 2). This latter point is of particular interest since axolotls cannot regenerate their eye lens while newts are able to (Parsell and Lindquist, 1993, Gabai et al., 1997, Moseley, 1997, Li et al., 2000, Kregel, 2002, Mosser and Morimoto, 2004). 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. 6 B and C) (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 (Gardiner et al., 1999). 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 (Echeverri and Tanaka, 2003). 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. 1 & 4.4) 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 (Ueda et al., 2005). 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 (Gardiner et al., 1995) and the generation of transgenic Japanese newts (*Cynops pyrrhogaster*) (Tank et al., 1976) provide promising avenues to directly test the function of genes during limb regeneration.

Experimental procedures

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.

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 for Axolotl forward *Hsp-70* 56 (5'ATGTCGAAAGGACCATCAGTG 3') and ARH657 for 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.

Whole-mount in situ hybridization

Whole-mount *in situ* hybridization was performed as described in Gardiner et al. (Iten and Bryant, 1973) 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 30 μ g/ml proteinase K for 30-60 minutes on ice and then at 37 oC for 45-60 minutes with the time adjusted for blastema size. Embryos, above stage 30, were incubated with 20 μ g/ml proteinase K 15 minutes on ice and 5 minutes at 37oC. 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.

Northern blots

Limb regeneration stages were determined using Tank (Roy et al., 1994) and Iten (Laemmli, 1970) 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 -³²P]deoxy-CTP by the random hexamer method as in Roy et al. (Welch and Suhan, 1986). Northern blots were repeated 3 times with different RNA samples for each regeneration stage.

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 (Spemann, 1921, Holtfreter, 1933, Brunst, 1955, Nieuwkoop, 1996). 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* (Armstrong and Malacinski, 1989, Andeol et al., 1998, Nye et al., 2003), 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.

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 oC, post-fixed in 4% paraformaldehyde for 5 minutes at 4oC 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 46oC 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 46oC. 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 4oC 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.

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.

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.

Appendice 2 – Résultats supplémentaires

Présentation

Cette section contient des résultats qui avaient été générés avant d'entreprendre l'étude exhaustive de *BMP-2* durant le développement et la régénération de la patte. Puisqu'aucun BMP n'avait encore été étudié chez les urodèles, l'objectif était de comparer l'expression embryonnaire de *BMP-2* à celle observée chez le *Xénope* et non de caractériser le rôle de *BMP-2* durant le développement embryonnaire de l'axolotl. Ces résultats n'ont pas été incorporés dans l'article du chapitre un mais complètent l'étude de l'expression de *BMP-2* chez l'axolotl. L'expression semi-quantitative de *BMP-2* dans les organes d'axolotl a également été établie.

Résultats

Les embryons d'axolotl sont faciles à manipuler, on peut en obtenir un grand nombre suite à une seule ponte d'œufs et on peut facilement observer leur développement dans une binoculaire. Conséquemment, les urodèles ont souvent été utilisés comme modèle d'étude pour le développement des vertébrés (Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995). Les aspects morphologiques du développement des embryons d'axolotl sont également bien établis et l'expression d'un gène peut donc être précisément corrélée avec un changement morphologique particulier (Fritz et al., 2004). Ces caractéristiques des embryons d'axolotl ont permis de comparer l'expression du gène *BMP-2* durant le développement embryonnaire précoce avec l'expression de *BMP-2* chez le *Xénope* (Armstrong and Malacinski, 1989).

Expression de *BMP-2* durant le développement embryonnaire chez l'axolotl

Chez les amniotes, la séquence en acides aminés de la protéine *BMP-2* peut avoir jusqu'à 91 % de similarité avec celle de *BMP-4* (Wozney et al., 1990, Suzuki et al., 1993, Mohan et al., 1998, Kawai et al., 2003). Afin d'avoir un marquage spécifique pour *BMP-2*, des mesures préventives devaient être prises pour éviter la possibilité de marquage simultané de *BMP-2* et *BMP-4* avec une sonde non spécifique. Heureusement, tel qu'il est mentionné dans l'article numéro un, l'extrémité 3' non traduite du gène *BMP-2* est hautement conservée entre les différentes espèces, contrairement à *BMP-4* dont l'extrémité 3' non traduite est faiblement conservée. Cette particularité de *BMP-2* a donc été utilisée pour synthétiser une sonde spécifique pour *BMP-2* chevauchant l'extrémité 3' non traduite de l'ARN messager de *BMP-2* et une partie de l'extrémité 3' de la séquence codante. Une autre sonde contre une région différente du gène a également été synthétisée. L'expression obtenue avec les deux sondes était identiques tel que démontré dans les deux embryons au stade 29 de la figure 1. L'expression de *BMP-2* a été établie du stade gastrula (stade 10.5) jusqu'à ce que le bourgeon de la patte émerge du mésoderme latéral au stade 41 (selon Armstrong)(Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995, Knochel et al., 2001). Les résultats ont été confirmés avec les deux sondes pour chacun des stades illustrés à la figure 1. Toutefois, seuls les résultats obtenus avec la sonde contre la région 3' de l'ARN messager de *BMP-2* sont illustrés. Au stade 10.5 (gastrula précoce), aucun signal n'a été détecté dans l'embryon (non démontré). Au stade 16 (neurula), l'expression de *BMP-2* était confinée

dans la partie supérieure des crêtes neurales (fig. 1). À partir du stade 22 jusqu'au stade 32 (voir les stades 29 et 32 à la figure 1), *BMP-2* était exprimé dans la partie rostrale de l'embryon et le long de la région spinale. Enfin, au stade 41, *BMP-2* était faiblement exprimé dans la région de la tête, le long de la ligne dorsale, faisait le tour de la queue, et commençait à être exprimé dans le bourgeon de la patte supérieure (fig. 1). Ce patron d'expression était maintenu jusqu'au stade 44 où l'expression devenait exclusive à la patte (non démontré).

Figure 1: Patron d'expression du gène *BMP-2* durant le développement embryonnaire de l'axolotl

L'expression de *BMP-2* a été établie par hybridation *in situ* « whole mount » chez des embryons au stade 16, 25, 29, 32 et 41. Les stades de développement sont identifiés dans le coin supérieur gauche des photos. La figure montre deux exemples de marquage effectués avec deux sondes différentes au stade de développement 29. Le marquage de l'expression est identique avec les deux sondes.

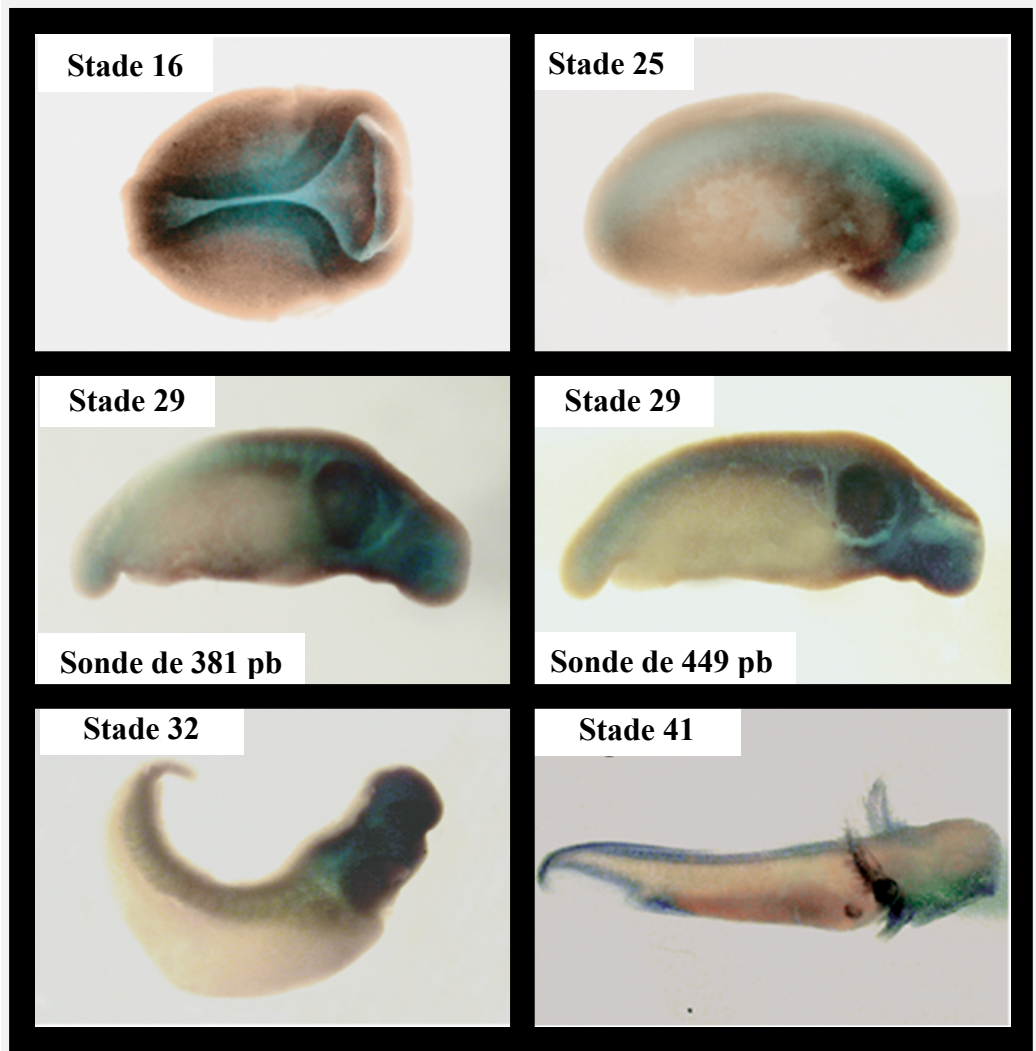


Figure 1

Analyse de l'expression de *BMP-2* dans les organes d'axolotls adultes par RT-PCR semi-quantitatif

Afin de terminer l'étude de l'expression de *BMP-2* chez l'axolotl, son expression a été déterminée dans les principaux organes de l'axolotl par RT-PCR semi-quantitatif (fig. 2). L'expression relative de *BMP-2* dans le cerveau, le cœur, l'estomac, le foie, le muscle squelettique, la rate et l'oeil était corrélé à l'expression de *BMP-2* chez le Xénope et les mammifères en général (Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995).

Figure 2: Expression de *BMP-2* dans les organes d'axolotls adultes

L'expression du gène *BMP-2* a été déterminée chez l'axolotl dans le cerveau, le cœur, l'estomac, le foie, le muscle squelettique, la rate et l'œil par RT-PCR semi quantitatif. –RT, contrôle négatif d'une réaction de transcription inverse en absence de la transcriptase inverse sur de l'ARN de cerveau. WB, second contrôle négatif, le produit de la transcription inverse est remplacé par de l'eau lors du PCR. *EF1 α* , gène de contrôle pour le chargement du gel.

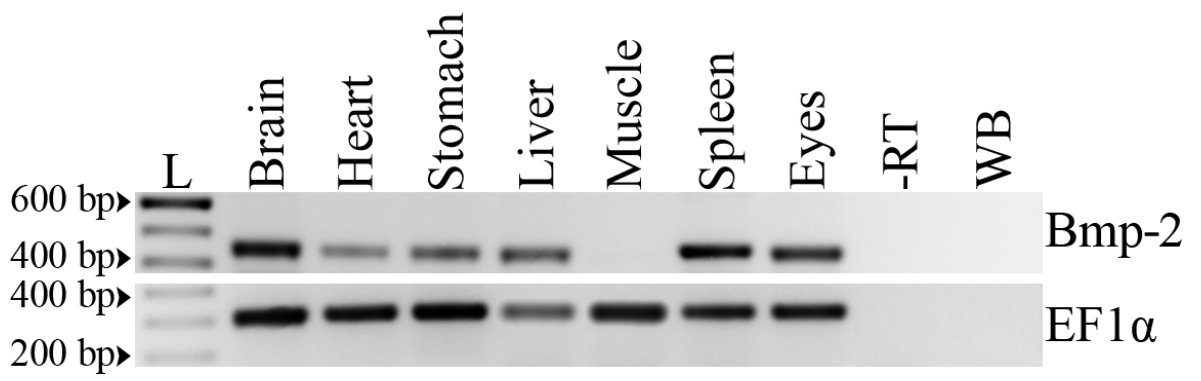


Figure 2

Discussion

L'objectif de ces résultats étant simplement de vérifier que l'expression de *BMP-2* correspondait bien à son expression chez le *Xénope*, la discussion se limitera ici à la description de la comparaison de *BMP-2* entre l'axolotl et le *Xénope*.

L'absence d'expression de *BMP-2* au stade 10.5 (gastrula précoce; non démontré) d'axolotl correspondent à ce qui a été observé chez le *Xénope* ou aucune expression n'est détectée par hybridation *in situ* ou par RT-PCR au stade gastrula (Hemmati-Brivanlou and Thomsen, 1995). Au stade 16 (neurula), l'expression de *BMP-2* correspondait exactement à l'expression de *BMP-2* au stade neurula chez le *Xénope* (Bininda-Emonds et al., 2007). L'expression de *BMP-2* chez l'axolotl à partir du stade 22 jusqu'au stade 32 coïncidait à son expression aux stades correspondants chez le *Xénope* (Wozney et al., 1990, Suzuki et al., 1993, Mohan et al., 1998, Kawai et al., 2003). Au stade 41, l'expression de *BMP-2* chez l'axolotl coïncidait avec le stade respectif chez le *Xénope* avec une seule différence: chez l'axolotl, il y avait un début d'expression dans le bourgeon du membre supérieur. Ce résultat est tout à fait attendu puisque le *Xénope* développe sa patte arrière en premier et à ce stade le primordium de sa patte avant n'est pas encore formé (Fritz et al., 2004). Afin de terminer l'étude de l'expression de *BMP-2* chez l'axolotl adulte, son expression a été déterminée dans les principaux organes de l'axolotl par RT-PCR semi-quantitatif et l'expression relative de *BMP-2* dans les organes était corrélée à son expression dans les organes correspondantes chez les autres vertébrés (Fritz et al., 2004). L'ensemble de ces résultats démontre que durant l'embryogénèse de même que dans les individus adultes,

l'expression de *BMP-2* ne présente pas de particularité d'expression par rapport aux autres vertébrés.

Annexe 1 – Similarités entre les protéines BMP-2 et BMP-4 et expériences effectuées afin d’isoler la séquence codante pour le gène BMP-4 chez l’axolotl

Durant le développement embryonnaire chez les souris mutantes pour *BMP-2* (-/-) ou *BMP-4* (-/-), la protéine BMP-2 ne peut pas compenser l'absence de la protéine BMP-4, et vice versa. Apparemment, cette absence de redondance entre les deux protéines s'explique par leurs expressions respectives dans des régions différentes (Bandyopadhyay et al., 2006). Ce qui revient à dire que leurs différentes fonctions durant le développement embryonnaire seraient dues à une différence du contrôle de leur transcription respective et non à la fonction de la protéine elle-même. Cette hypothèse est supportée par le fait que chez les vertébrés, la séquence en acides aminés de la protéine BMP-2 peut avoir jusqu'à 91 % de similarité avec celle de BMP-4 et que les deux protéines fonctionnent de la même façon dans les expériences *in vitro*. De plus, durant le développement du membre chez la souris, les deux protéines sont redondantes fonctionnellement (Bandyopadhyay et al., 2006). La protéine BMP-4 n'a pas encore été clonée chez les urodèles et pourtant plusieurs laboratoires à travers le monde tentent d'obtenir la séquence du gène. Dans notre laboratoire, plusieurs rondes de PCR à l'aide d'amorces dégénérées ont été effectuées sur différents tissus d'axolotl dans le but d'isoler le gène *BMP-4*. Les amorces utilisées pour les PCR étaient basées sur la séquence de *BMP-4* de *Xénope* et sur la seule séquence disponible potentiellement reliées à la séquence du gène *BMP-4* chez l'axolotl. La séquence en question avait été soumise directement à Genbank par le groupe de Dalglish, G. *et al.* (Accession number : AY326272). De toutes les rondes de PCR effectuées avec les amorces basées sur ces séquence, aucune n'a permis d'obtenir un seul fragment spécifique du gène *BMP-4*, mais les séquences codantes partielles des gènes *BMP-2/4*, *BMP-5*, et *BMP-7* ont pu être isolées. Plusieurs rondes de criblage d'une librairie d'ADNc d'axolotl ont également été effectuées pendant plus de deux ans avec des sondes synthétisées à partir de

la séquence du gène *BMP-2/4* obtenu par PCR et à partir de la séquence du gène *BMP-4* de *Xénope*. De toutes ces rondes, la séquence codante complète d'un seul gène a pu être obtenue et cette séquence était celle du gène *BMP-2*. Aucune ronde n'a permis d'isoler la séquence complète ou même un fragment du gène *BMP-4*.

