

Université de Montréal

**Expression du facteur neurotrophique HGF dans les motoneurones lombaires murins
suite à la lacération et à la stimulation électrique du nerf sciatique**

par Andrée-Anne Roy, MD

Département des sciences biomédicales, Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de
l'obtention du grade de maîtrise en sciences biomédicales
option musculo-squelettique

Septembre 2015

© Andrée-Anne Roy, 2015

Résumé

Objectifs: Hepatocyte Growth Factor (HGF) améliore la régénération axonale et la survie des motoneurons lors du développement embryonnaire. Son rôle dans la régénération des nerfs périphériques lésés chez l'adulte n'a pas encore été étudié. Notre objectif est de déterminer l'expression de HGF dans la moelle épinière murine suite à une axotomie, avec ou sans stimulation électrique, directe ou transcutanée.

Méthodes: Soixante souris C57BL/6 adultes ont été divisées en 5 groupes : Contrôle (n=12), Placebo (n=12), Axotomie (n=12, lacération et réparation immédiate du nerf sciatique), Directe (n=12, lacération, réparation immédiate et stimulation électrique directe proximale du nerf sciatique, 1h, 20 Hz) et Transcutanée (n=12, lacération, réparation immédiate et stimulation électrique transcutanée proximale du nerf sciatique, 1h, 20 Hz). Les moelles épinières ont été recueillies 1, 3, 7 et 14 jours suivant l'intervention. L'expression de HGF a été évaluée par technique d'hybridation *in situ*.

Résultats: Nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de HGF dans les moelles épinières murines suite à l'axotomie. Cette augmentation est plus rapide suite à la stimulation électrique, autant directe que transcutanée. L'expression de HGF devient localisée aux zones motrices de la moelle épinière murine dans les groupes Axotomie, Directe et Transcutanée.

Conclusions: HGF, facteur neurotrophique impliqué de le développement et la survie des motoneurons, a une expression altérée suite à la lacération du nerf sciatique. Ceci suggère fortement qu'il participe aussi à la régénération des nerfs moteurs. De plus, l'expression plus rapide de HGF suite à la stimulation électrique suggère son implication dans l'augmentation de la régénération nerveuse.

Mots-clés : atteinte nerveuse, régénération des nerfs périphériques, facteurs neurotrophiques, HGF, BDNF, trkB, stimulation électrique, stimulation électrique transcutanée, hybridation *in situ*, modèle murin

Abstract

Purpose: Hepatocyte Growth Factor (HGF) plays a role in promoting axonal growth and survival of motoneurons during embryonic development. This factor might also be important in directing the regeneration of adult motoneurons following laceration. We aim to identify the expression patterns of HGF following axotomy, with or without direct or transcutaneous electrical nerve stimulation in a mouse model.

Methods: Sixty adult C57BL/6 mice were divided into 5 groups: Control (n=12), Sham (n=12), Axotomy (n=12, sciatic nerve laceration and immediate repair), Direct (n=12, sciatic nerve laceration, immediate repair and application of direct electrical stimulation on the proximal nerve end, 1h, 20 Hz) and Transcutaneous (n=12, nerve laceration and immediate repair followed by proximal transcutaneous electrical stimulation, 1h, 20 Hz). Spinal cords were harvested at 1, 3, 7 and 14 days post-surgery. The expression patterns of HGF were measured using *in situ* hybridization.

Results: Our results showed an upregulation of HGF expression in mouse spinal cords following sciatic nerve axotomy. This occurred more quickly following electrical stimulation in both Direct and Transcutaneous groups. The expression pattern of HGF became localized to the motor neuron pools in the Axotomy, Direct and Transcutaneous groups.

Conclusions: HGF, a growth factor involved in directing the outgrowth of motor axons in development, has an altered expression pattern following sciatic nerve laceration, suggesting it may also play a role in directing motoneuron regeneration. Furthermore, rapid change in the expression pattern of HGF following electrical stimulation suggests it may also be involved in the upregulation of nerve regeneration following electrical stimulation.

Key words : nerve injury, peripheral nerve regeneration, neurotrophic factors, HGF, BDNF, trkB, electrical stimulation, transcutaneous electrical stimulation, *in situ* hybridization, mouse model

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles.....	ix
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xi
CHAPITRE 1.....	1
1. Introduction.....	1
1.1 Contexte clinique.....	1
1.2 Facteurs limitant la régénération des nerfs périphériques.....	1
1.2.1 Âge.....	2
1.2.2 Type de lésion.....	2
1.2.2.1 Anatomie des nerfs périphériques.....	2
1.2.2.2 Classification des atteintes nerveuses selon Sunderland, modifiée par Mackinnon, avec correspondances par Seddon.....	3
1.2.3 Niveau de l'atteinte nerveuse.....	6
1.2.4 Vitesse de régénération nerveuse.....	6
1.2.4.1 Régénération axonale décalée.....	7
1.2.5 Mauvaise direction de la régénération axonale.....	7
1.2.6 Délai de régénération nerveuse.....	7
1.2.6.1 Perte de la capacité régénérative axonale des neurones lésés.....	7
1.2.6.2 Perte de la capacité de la partie distale du nerf lésé à supporter la régénération axonale.....	8
1.2.6.3 Atrophie musculaire.....	8
1.3 Dégénération et régénération des nerfs périphériques.....	8
1.3.1 Réponse du corps neuronal afin de soutenir la régénération nerveuse.....	10
1.3.2 Dégénérescence wallérienne de la partie distale du nerf.....	11
1.3.2.1 Phagocytose des débris axonaux et de la myéline.....	11
1.3.2.2 Formation des bandes de Büngner.....	12
1.3.3 Régénération de la partie proximale du nerf.....	12
1.3.3.1 Bourgeons axonaux.....	12
1.3.3.2 Unité de régénération.....	13
1.3.3.3 Régénération axonale décalée.....	14
1.3.3.4 Mauvaise direction de la régénération axonale.....	14
1.3.3.4.1 Réinnervation motrice préférentielle.....	14
1.3.4 Production des facteurs neurotrophiques par les cellules de Schwann.....	15
1.3.4.1 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF).....	17
1.3.4.1.1 Rôle de BDNF.....	17
1.3.4.1.2 Expression de BDNF.....	18

1.3.4.2 Hepatocyte Growth Factor (HGF)	19
1.3.4.2.1 Expression et mécanisme d'action de HGF	19
1.3.4.2.2 Rôle de HGF	21
1.4 L'impact de la stimulation électrique sur la régénération nerveuse	22
1.4.1 L'expression de BDNF suite à la stimulation électrique	23
1.4.2 Les mécanismes d'action de BDNF et <i>trkB</i> suite à la stimulation nerveuse	23
1.5 La stimulation électrique transcutanée	25
1.5.1 Paramètres de la stimulation nerveuse transcutanée	25
1.6 Objectifs de recherche	26

CHAPITRE 2..... 28

2. Résultats:..... 28

2.1. Abstract	29
2.2. Introduction	30
2.3. Methods.....	31
2.3.1 <i>Animals and surgical procedures</i>	31
2.3.1.1 Groups.....	31
2.3.1.2 Surgical protocol	32
2.3.2 <i>In situ hybridization</i>	33
2.3.2.1 Pretreatment of tissue sections	33
2.3.2.2 Tissue preparation	34
2.3.2.3 Pre-hybridization, Hybridization and Washing of Tissue Sections.....	34
2.3.2.4 Immunological Staining	35
2.3.3 <i>Data analysis</i>	35
2.4 Results.....	36
2.4.1 <i>BDNF expression in murine lumbar motoneurons</i>	36
2.4.1.1 BDNF expression following axotomy	36
2.4.1.2 BDNF expression following direct and transcutaneous electrical stimulation.....	36
2.4.2 <i>TrkB expression in murine lumbar motoneurons</i>	38
2.4.2.1 TrkB expression following axotomy	38
2.4.2.2 TrkB expression following direct and transcutaneous electrical stimulation	38
2.4.3 <i>HGF expression in murine lumbar motoneurons</i>	40
2.4.3.1 HGF expression following axotomy	40
2.4.3.2 HGF expression following direct and transcutaneous electrical stimulation.....	40
2.5 Discussion	42
2.5.1 <i>BDNF and trkB</i>	42
2.5.1.1 BDNF and trkB following axotomy.....	42
2.5.1.2 BDNF and trkB following electrical stimulation.....	43
2.5.1.3 BDNF mechanism of action.....	44
2.5.2 <i>HGF</i>	45
2.5.2.1 HGF following axotomy	45
2.5.2.2 HGF following electrical stimulation	46
2.5.2.3 HGF mechanism of action.....	47
2.6 Conclusion.....	48
2.7 Acknowledgements	49
2.8 Disclosure	49

CHAPITRE 3	50
3. Discussion	50
3.1 BDNF et trkB	50
3.1.1 <i>BDNF et trkB suite à l'axotomie nerveuse</i>	50
3.1.2 <i>BDNF et trkB suite à la stimulation électrique</i>	51
3.1.3 <i>Mécanisme d'action de BDNF</i>	53
3.2 HGF	55
3.2.1 <i>HGF suite à l'axotomie nerveuse</i>	55
3.2.2 <i>HGF suite à la stimulation électrique</i>	57
3.2.3 <i>Mécanisme d'action de HGF</i>	58
CONCLUSION	61
Les sources documentaires	xx

Liste des tableaux

Table 1.1	Différents rôles de BDNF in vitro et in vivo.....	18
Table 1.2	Différents rôles de HGF in vitro et in vivo	22
Table 2.1	Number of mice for each group and their different studied timepoints	32

Liste des figures

Figure 1.1	Anatomie nerveuse	3
Figure 1.2	Classification des atteintes nerveuses	5
Figure 1.3	Régénération nerveuse	9
Figure 1.4	Classification des différents facteurs neurotrophiques par famille	16
Figure 1.5	Représentation schématique des voies de signalisation activées par HGF et ses actions potentiellement synergiques avec CNTF et NGF	20
Figure 1.6	Mécanismes moléculaires d'augmentation de la régénération nerveuse grâce à la stimulation électrique.....	24
Figure 2.1	BDNF expression in murine lumbar motoneurons, in normal mice, following axotomy and following direct and transcutaneous (TC) electrical stimulation at different timepoints (1, 3, 7 and 14 days post-intervention)	37
Figure 2.2	TrkB expression in murine lumbar motoneurons, in normal mice, following axotomy and following direct and transcutaneous (TC) electrical stimulation at different timepoints (1, 3, 7 and 14 days post-intervention)	39
Figure 2.3	HGF expression in murine lumbar motoneurons, in normal mice, following axotomy and following direct and transcutaneous (TC) electrical stimulation at different timepoints (1, 3, 7 and 14 days post-intervention)	41
Figure 3.1	Autres voies de signalisation impliquées dans l'augmentation d'expression de BDNF et trkB.....	55
Figure 3.2	Les zones motrices contenant les motoneurons de la moelle épinière lombaire murine	57

Liste des sigles

°C : Celsius
h : heure (hour)
Hz : hertz
kg : kilogramme
i.p. : intrapéritonéal (intraperitoneal)
mg : milligramme
ml : millilitre
s.c. : sous-cutané (subcutaneous)
ul : microlitre
um : micromètre (micrometre)
V : volt

Liste des abréviations

AC : courant alternatif (alternative courant, AC)
Akt : protéine kinase spécifique à la serine/threonine (serine/threonine-specific protein kinase)
AMPc : adénosine monophosphate cyclique (cyclic monophosphate adenosine, cAMP)
BCARE : élément de réponse au Ca^{2+} de BDNF (BDNF Ca^{2+} response element)
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain-derived neurotrophic factor)
CaM kinase IV : protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante IV (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV)
ChAT : acétyltransférase choline (choline acetyltransferase)
CNTF : facteur neurotrophique ciliaire (Ciliary neurotrophic factor)
CRE : élément de réponse au Ca^{2+} (Ca^{2+} response element)
CREB : protéine CREB (cAMP response element-binding protein)
DC : courant continu (direct courant, DC)
Erk : kinase régulée par signal extracellulaire (extracellular signal-regulated kinase)
Gab1 : protéine 1 de liaison à GRB2 (GRB2-associated-binding protein 1)
GAP : protéines associées à la croissance (growth associated proteins)
GDNF : facteur neurotrophique dérivé de cellules gliales (Glial cell-derived neurotrophic factor)
Grb2 : protéine 2 associée à un récepteur de facteur de croissance (Growth factor receptor-bound protein 2)
HGF : facteur de croissance des hépatocytes (Hepatocyte Growth Factor)
IL-1 β : interleukine-1 β (interleukin-1 β)
IL-6 : interleukine-6 (interleukin-6)
ISH : hybridation *in situ* (*in situ* hybridation)
JNK : kinase c-Jun N-terminal (c-Jun N-terminal kinase)

LIF : facteur inhibiteur de la leucémie (leukemia inhibitory factor)
MAG : glycoprotéine associée à la myéline (myelin-associated glycoprotein)
MAP : protéine activée par mitogène (mitogen-activated protein)
MCP-1 : protéine chimiotactique des monocytes-1 (monocyte chemoattractant protein-1)
Nck : protéine Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1)
NGF : facteur de croissance nerveuse (Nerve Growth Factor)
NT 4/5 : neurotrophine-4/5 (neurotrophin-4/5)
NT-3 : neurotrophine-3 (neurotrophin-3)
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase
PLC γ : phospholipase C γ
PKA : protéine kinase A (protein kinase A)
RAG : gènes associés à la régénération (regeneration associated genes)
Ras : protéine associée au sarcome de rat (Rat sarcoma protein)
RhoA : gène RhoA (Ras homolog gene family member A)
SAP : protéine activée par le stress (stress-activated protein)
SHP2 : protéine SHP2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2)
STAT : protéines de transduction et d'activation de transcription (signal transducer and activator of transcription protein)
TNF- α : facteur de nécrose tumorale α (tumor necrosis factor α)
trkA : récepteur de la tyrosine kinase A (tyrosine receptor kinase A)
trkB : récepteur de la tyrosine kinase B (tyrosine receptor kinase B)

Remerciements

Dr Jenny C. Lin, pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce projet de maîtrise sous sa supervision, pour sa disponibilité, sa confiance, ses conseils et la haute qualité de la formation scientifique et chirurgicale qu'elle m'a transmise

Dr Anne-Marie Pion, souris sénior, pour son organisation, sa détermination, sa générosité, sa complicité et sa camaraderie tout au long de notre maîtrise

Dr Éric Beaumont, pour sa supervision technique, son support et ses bons conseils durant l'élaboration du projet et les expérimentations chirurgicales à HSCM

Michel Paquet, pour son soutien autant technique que scientifique, sa grande disponibilité et sa compréhension d'un horaire de résidente

Dr Artur Kania, pour nous avoir permis d'effectuer une grande partie de nos expérimentations dans son laboratoire à l'IRCM

Meirong Liang, pour son support technique à l'IRCM

Ma famille, pour leur amour et leur soutien, autant dans mon choix de carrière, que dans ma façon d'y parvenir, ainsi que dans toutes les autres sphères de ma vie

Stéphane Lavallée, partenaire de vie et d'étude, pour son soutien incomparable au cours des dernières années

CHAPITRE 1

1. Introduction

1.1 Contexte clinique

Les lésions des nerfs périphériques sont une condition médicale fréquente, rapportée dans plus de 3% des traumatismes (1-4). Aux États-Unis seulement, 50 000 procédures de réparation de nerfs périphériques ont lieu annuellement (National Center for Health Statistics 1995) (5). Le système nerveux périphérique est principalement endommagé par une lésion traumatique, une chirurgie ou une compression répétitive, telle que les syndromes du tunnel carpien ou cubital. Les lésions traumatiques peuvent se produire suite à un étirement, un écrasement, une lacération ou une ischémie. Les lésions nerveuses d'origine chirurgicale comprennent les manipulations chirurgicales et les transections inévitables, telles que la résection tumorale (6). La perte d'une fonction pouvant survenir suite à cette condition médicale a des conséquences importantes puisque la plupart des patients sont au sommet de leur productivité au travail (7). La qualité et le délai de récupération de ces lésions sont extrêmement variables d'un patient à l'autre. Malheureusement, pour la majorité des lésions de nerfs périphériques, la fonction récupérée est faible et invalidante, malgré la rapidité d'intervention et la haute qualité des avancées médicales en réparation microchirurgicale (8-28).

1.2 Facteurs limitant la régénération des nerfs périphériques

Plusieurs facteurs ont été décrits comme étant responsables des mauvais résultats de la régénération nerveuse. Ces facteurs limitants incluent l'âge du patient, le type et le niveau de la lésion, la vitesse de régénération nerveuse, la mauvaise direction des axones dans la partie distale du nerf atteint, l'échec de chacune des parties proximale et distale à la lésion du nerf à supporter la régénération au fil du temps, puis l'atrophie de l'organe cible de la réinnervation, rendant ainsi la récupération fonctionnelle encore plus difficile.

1.2.1 Âge

Les résultats des chirurgies des nerfs périphériques chez les enfants ont été observés comme étant supérieurs à ceux chez les adultes (29-31) ; la différence ayant été attribuée à une capacité de réorganisation centrale par compensation liée à l'âge (21, 32-34), à la vitesse de régénération accrue chez l'enfant (35, 36) et aux plus courtes distances à couvrir afin d'atteindre l'organe cible, tel qu'étudié chez le lapin (37) (ce sujet sera approfondi au chapitre 1.2.3).

1.2.2 Type de lésion

La sévérité de l'atteinte fonctionnelle suite à un traumatisme nerveux varie selon l'ampleur de la lésion (12, 14, 15, 38, 39). Ces lésions sont présentées selon 2 classifications: la description pathologique de Seddon (neurapraxie, axonotmèse et neurotmèse), ainsi que les degrés de perturbation anatomique et le potentiel régénératif (1^{er} au 6^e degré) par Sunderland, modifié par Mackinnon (4, 12, 39-41) (ce sujet sera approfondi au chapitre 1.2.2.2).

1.2.2.1 Anatomie des nerfs périphériques

Les atteintes peuvent perturber plusieurs structures nerveuses. L'anatomie d'un nerf périphérique est illustrée à la Figure 1.1. Les axones sont regroupés en fascicules supportés par l'endonèvre qui est composé de collagène. Chaque fascicule est délimité par une gaine de périnèvre, une barrière hémato-nerveuse créée par les cellules périneurales. L'élasticité du nerf est assurée par la combinaison du périnèvre et de l'endonèvre. En fonction du type de nerf et de sa localisation, ce dernier peut contenir plusieurs fascicules (polyfasciculaire) ou seulement quelques-uns (oligofasciculaire). L'architecture du nerf est définie par une gaine de tissus conjonctifs lâches, l'épinèvre. L'épinèvre externe entoure les faisceaux, alors que l'épinèvre interne, principalement composé de collagène, fournit un support mécanique pour les fascicules nerveux et les vaisseaux sanguins. Le mésoneurium est le tissu conjonctif le plus à l'extérieur du nerf, qui relie l'épinèvre au tissu avoisinant. Il permet l'expansion et la contraction du nerf lié au mouvement des extrémités. Par exemple, une flexion et une extension maximale du poignet nécessitent un mouvement longitudinal du nerf médian allant jusqu'à 3 centimètres. La circulation sanguine d'un nerf pénètre via le mésoneurium, puis suit

l'épinèvre et le périnèvre de façon longitudinale pour se terminer en capillaires dans l'endonèvre (4, 28, 42, 43).

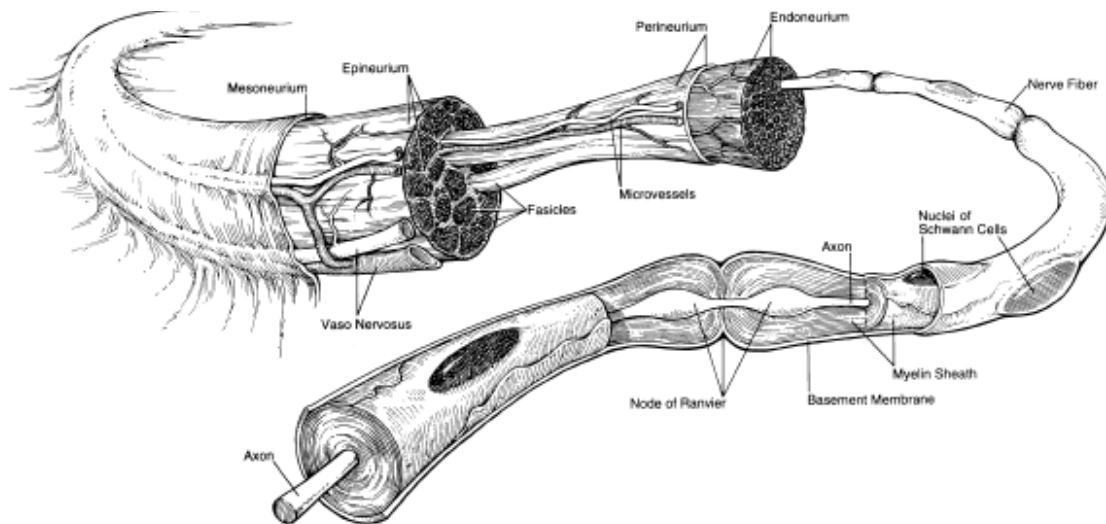


Figure 1.1 Anatomie nerveuse. Tirée et adaptée de l'ouvrage Mackinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery, 6th edition (Chapter 9), 2005

1.2.2.2 Classification des atteintes nerveuses selon Sunderland, modifiée par Mackinnon, avec correspondances par Seddon

Les lésions nerveuses du **premier degré** équivalent à une neurapraxie selon Seddon. La conduction nerveuse est bloquée à un site précis, caractérisé par un court épisode de lésion de myéline et de dysfonction sans altération physique du tissu nerveux ou des axones. Ces lésions légères peuvent être provoquées par compression, par diminution de l'apport sanguin, ou par légères contusions. La conduction nerveuse reprend habituellement dans les jours ou les mois qui suivent (4, 12, 39-41, 44).

Le **deuxième degré** correspond à l'axonotmèse. Les atteintes axonales et la dégénérescence wallérienne du nerf distal se produisent, tout en maintenant l'intégrité du périnèvre et de l'épinèvre. Les dommages sont produits au niveau des axones. Par conséquent, l'architecture distale et les cellules de Schwann de la lame basale restent intactes, fournissant le soutien

neurotrophique nécessaire et un guide physique pour les extrémités proximales de l'axone (45-47). Ainsi, ceci permet une régénération plus précise et un meilleur pronostic (48). Les lésions sont typiquement causées par un écrasement ou un étirement, causant une interruption dans le fonctionnement axonal moteur, sensoriel et autonome. La récupération est généralement complète ou quasi-complète. La persistance d'un déficit serait dû à une distance de régénération trop importante, entraînant l'atrophie du muscle cible avant qu'il ne puisse être réinnervé (4, 12, 39-41).

Une atteinte de **troisième degré** implique une rupture des cellules de Schwann de la lame basale en plus de la section de l'axone et la cicatrisation potentielle de l'endonèvre. Les axones doivent croître à travers le tissu endommagé et cicatriciel, ce qui peut mener à une perte axonale et une direction axonale inadéquate (misdirection). La régénération est maintenue dans les fascicules, puisque le périnèvre est intact. Suite à ces lésions, la récupération est variable, allant de faible à complète, tout dépendant du degré de fibrose intrafasciculaire (4, 12, 39-41) .

Une atteinte de **quatrième degré** entraîne une perturbation additionnelle du périnèvre. La continuité à l'intérieur même de l'épinèvre est constituée d'un tissu cicatriciel avec peu ou pas de tissu architectural fasciculaire. Ceci conduit à une interruption de la régénération des axones. La récupération est généralement impossible sans intervention chirurgicale (4, 12, 39-41) .

Une atteinte de **cinquième degré** correspond à la neurotmèse, qui se caractérise par une section complète de l'épinèvre et d'une encapsulation du tissu conjonctif, nécessitant une intervention chirurgicale. Par conséquent, une axotomie du nerf est une lésion nerveuse qui sépare l'axone du corps cellulaire du neurone (49, 50) et fait partie d'une atteinte de cinquième degré. Les axones qui régénèrent ont un risque plus élevé d'être dirigés dans les mauvais tubes endoneuraux dans la partie distale du nerf sectionné. Ceci entraîne la réinnervation de cibles inappropriées, ce qui crée des déficits sévères ou permanents (9, 12, 14, 51-53), comme une perte complète des fonctions motrices et sensorielles (4, 12, 39-41, 54).

Le **sixième degré** a été ajouté par Mackinnon et se caractérise par une atteinte des multiples fascicules nerveux à différents degrés (1^{er} au 5^e degré) (4, 12, 28, 39-41). La classification des atteintes nerveuses est illustrée à la Figure 1.2.

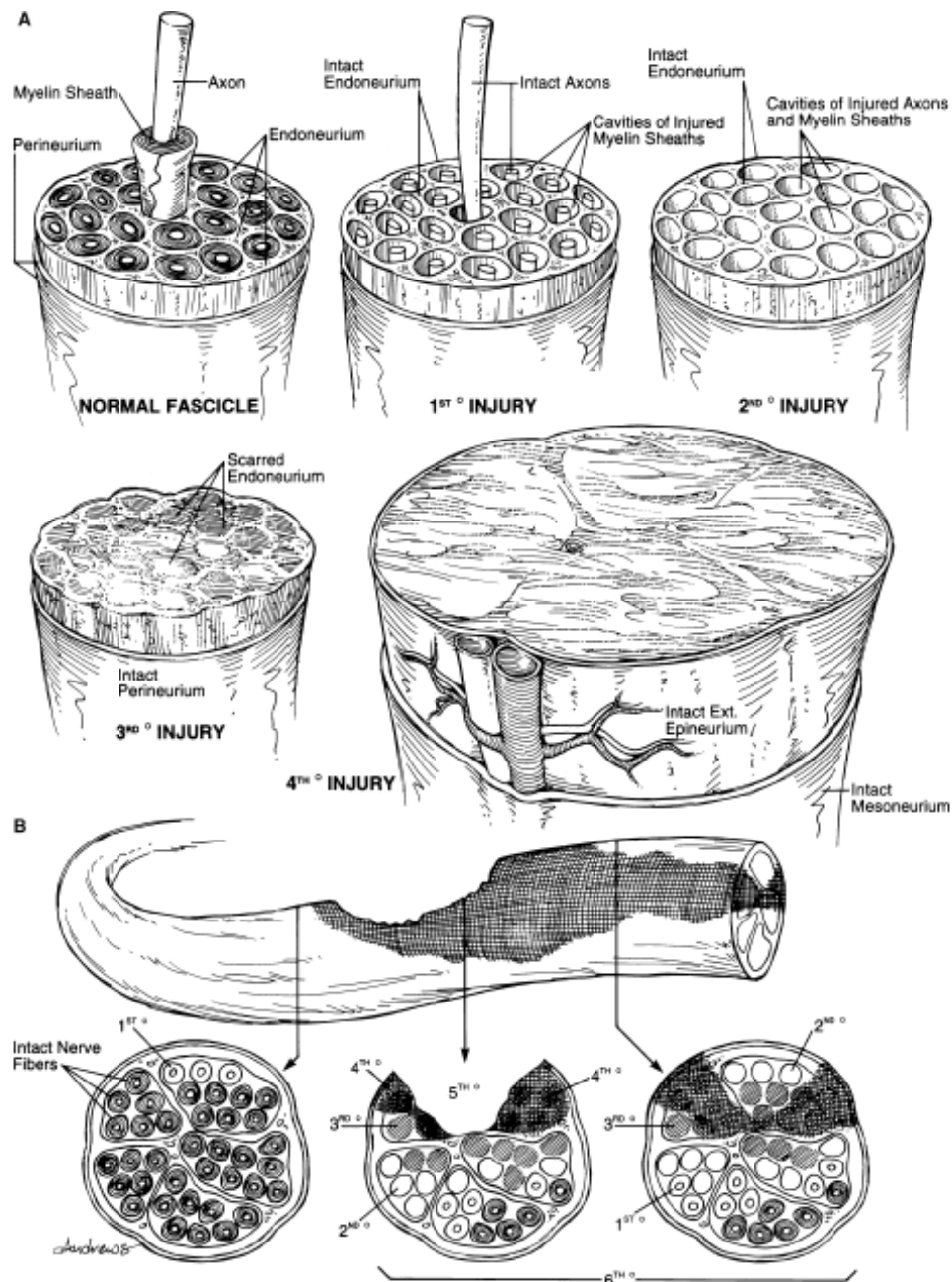


Figure 1.2 Classification des atteintes nerveuses. A : Un nerf intact comprend les axones myélinisés, entourés d'endonèvre, regroupés en fascicules et recouverts de périnèvre. Une

atteinte de premier degré contient des nerfs démyélinisés. Une atteinte de deuxième degré contient des axones qui se dégèrent. Une atteinte de troisième degré comprend une atteinte des axones, de la myéline et de l'endonèvre. Une atteinte de quatrième degré entraîne une perturbation du périnèvre qui empêche la régénération. Une atteinte de cinquième degré comprend une section complète du nerf. B : Une atteinte de sixième degré comprend plusieurs degrés d'atteintes en même temps. Tirée et adaptée de l'ouvrage Makinon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery, 6th edition (Chapter 9), 2005

1.2.3 Niveau de l'atteinte nerveuse

Les lésions des nerfs périphériques qui surviennent au niveau des extrémités proximales ont été démontrées comme étant un facteur de mauvaise neurorégénération (12, 14-16, 38, 39, 55-57). Les lésions nerveuses plus proximales nécessitent une régénération sur de plus longues distances, pouvant prendre des mois ou des années à atteindre leur cible, provoquant une dénervation des cellules de Schwann pour une longue période dans la partie distale du nerf et diminuant les chances de récupération fonctionnelle (12, 15, 16, 58-63) (ce sujet sera approfondi aux chapitres suivants).

1.2.4 Vitesse de régénération nerveuse

Les neurones régèrent leurs axones à la vitesse très lente de 1 à 3 millimètres par jour, dépendant des espèces (12, 16, 37, 64-68). Considérant cette vitesse de régénération, le rétablissement d'une unité fonctionnelle motrice ou sensitive de la réinnervation d'un organe peut pendre plusieurs mois, voire plusieurs années (12, 27, 57, 69).

De plus, lorsque les axones ont atteint leur cible, celle-ci peut ne plus être de qualité adéquate pour accepter une réinnervation à nouveau, se traduisant par une atteinte de la récupération fonctionnelle (12, 14, 51, 52) (ce sujet sera approfondi au chapitre 1.2.6.2).

1.2.4.1 Régénération axonale décalée

De plus, la vitesse de régénération est entravée par la traversée des axones à travers le site de suture après une réparation chirurgicale. Ce processus se nomme la régénération axonale décalée (staggered axonal regeneration) et retarde l'allongement axonal d'un mois (10, 53, 65, 66, 70-74) (ce sujet sera approfondi au chapitre 1.3.3.3).

1.2.5 Mauvaise direction de la régénération axonale

Durant la régénération nerveuse, les axones peuvent être détournés vers une voie différente de la partie distale du nerf et conséquemment, ils peuvent réinnerver les mauvaises cibles (75-78). Cette mauvaise direction des axones (axonal misdirection) peut faire en sorte que les axones sensoriels réinnervent des cibles motrices, occasionnant une perte de spécificité sensori-motrice (12, 79). Ceci peut aussi mener à une réinnervation des muscles par les motoneurones ayant précédemment innervé leur antagoniste fonctionnel, donnant lieu à de la dyskinésie et une faible récupération fonctionnelle (12, 16, 61, 80-83). De plus, les axones ayant établi de mauvais contacts avec leurs cibles distales empêchent les axones appropriés d'entrer dans cette voie (84) (ce sujet sera approfondi au chapitre 1.3.3.4).

1.2.6 Délai de régénération nerveuse

Le délai de la réparation nerveuse, ajouté à une lésion proximale et une faible vitesse de régénération, entraîne la perte de la capacité des neurones lésés à se régénérer, la perte de la capacité de la partie distale du nerf à soutenir la régénération nerveuse, ainsi que la perte de la capacité des muscles dénervés à accepter la réinnervation (15, 50, 59, 61, 69, 78, 85-88).

1.2.6.1 Perte de la capacité régénérative axonale des neurones lésés

Les neurones lésés sur une longue période perdent leur capacité à développer leurs axones (59). Xu et al. (89) ont démontré que seulement la moitié des motoneurones ayant survécu maintiennent la capacité à se régénérer suite à une axotomie chronique. En ce sens, certains motoneurones ne parviennent pas à se régénérer de manière optimale vers leur cible distale, même si une deuxième chance de se régénérer leur est offerte.

1.2.6.2 Perte de la capacité de la partie distale du nerf lésé à supporter la régénération axonale

Après une lésion nerveuse, les cellules de Schwann dénervées perdent leur myéline, se multiplient et tapissent les tubules endoneuraux de la partie distale du nerf afin de guider et soutenir les axones qui régénèrent (50). Si la partie distale n'est pas réinnervée et que les cellules de Schwann restent dénervées, elles s'atrophient progressivement et leur capacité à supporter la régénération des axones diminue de manière importante (49, 50, 59, 60, 70, 78, 86, 90-93). Les cellules de Schwann dénervées de la portion distale du nerf perdent aussi leur capacité à synthétiser et à libérer des facteurs neurotrophiques nécessaires à l'induction de la régénération des axones (61, 86, 90, 94, 95), causant une diminution de la récupération fonctionnelle.

1.2.6.3 Atrophie musculaire

La faible récupération axonale se traduit par l'atrophie progressive des muscles cibles et leur remplacement par des cellules adipeuses (10, 12, 68, 96). Cependant, c'est la détérioration de la capacité des neurones à se régénérer, plutôt que l'incapacité des muscles dénervés à récupérer de leur atrophie après leur réinnervation, qui cause une diminution de la récupération fonctionnelle (59, 61, 63, 69). En effet, les muscles chroniquement dénervés ont un effet rétrograde négatif sur la capacité des motoneurones à régénérer leurs axones et ne parviennent pas à se remettre complètement de leur atrophie de dénervation malgré leur réinnervation (97-101).

1.3 Dégénération et régénération des nerfs périphériques

Les lésions des nerfs périphériques peuvent impliquer des dommages à n'importe quelle structure nerveuse décrite à la section 1.2.2.1. Le neurone est considéré comme axotomisé après que l'axone soit sectionné et avant que l'axone qui régénère atteigne les organes cibles dénervés (50). La lésion qui interrompt la continuité de l'axone au corps cellulaire déclenche une réponse de la part du corps cellulaire. Si la lésion est trop près du corps cellulaire, le neurone ne survivra pas. La partie distale du nerf conserve toutefois la capacité de transmettre

les potentiels d'action pour plusieurs heures après la section du nerf, une capacité qui a été utilisée de façon expérimentale depuis plusieurs années afin d'étudier la transmission synaptique et la fonction musculaire dans des préparations isolées de nerfs et de muscles (102-104). Si l'atteinte est éloignée du corps cellulaire, le motoneurone survivra (50, 89, 105) et plusieurs événements cellulaires et moléculaires auront lieu afin de supporter la régénération du neurone et la réinnervation de l'organe cible (16, 50, 106). Les étapes de la régénération nerveuse sont schématisées brièvement à la Figure 1.3.

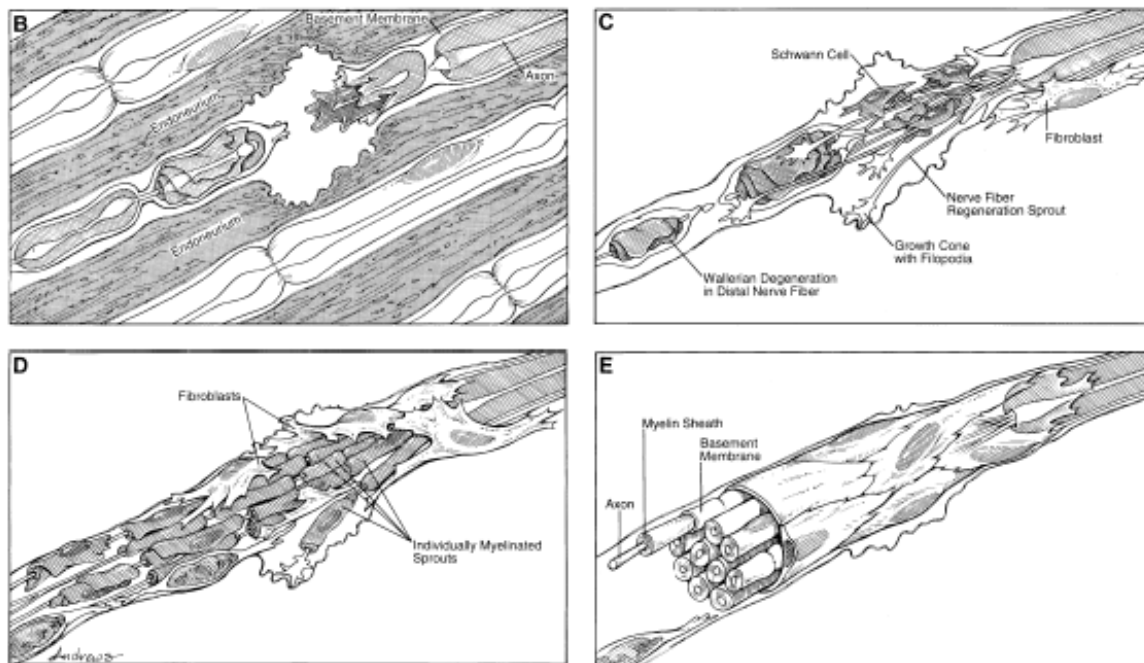


Figure 1.3 Régénération nerveuse. B : Dégénération proximale et distale suite à la lésion d'un nerf myélinisé. C : Plusieurs bourgeons des axones qui se régèrent dans la partie proximale du nerf lésé, qui forment l'unité de régénération. Les cônes de croissance sont présents au bout de chaque axone qui se régère afin d'allonger distalement. D : Les cellules de Schwann assurent la myélinisation des axones qui se régèrent. E : Chaque axone d'une unité de régénération peut former un contact avec un organe cible. Tirée et adaptée de l'ouvrage Makinnon SE. Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts. Grabb and Smith's Plastic Surgery, 6th edition (Chapter 9), 2005

1.3.1 Réponse du corps neuronal afin de soutenir la régénération nerveuse

Le premier événement qui a lieu est la chromatolyse (107, 108), définie par des changements morphologiques dans les corps cellulaires qui comprennent un gonflement cellulaire (swelling), le mouvement du noyau et du nucléole vers une position excentrique, et la dissolution des corps de Nissl composés de réticulum endoplasmique rugueux (15, 107, 109). Cela déclenche l'expression altérée de nouveaux gènes et protéines qui sont impliqués dans la régénération (110), telle que l'augmentation de l'activation des gènes associés à la régénération (regeneration associated genes, RAGs) et la régulation négative des gènes qui transcrivent les protéines responsables du fonctionnement normal du neurone adulte, comme la choline acétyltransférase, c'est-à-dire l'enzyme limitant la vitesse de synthèse de l'acétylcholine dans les motoneurons (50, 111, 112). Les protéines produites lors de la régulation positive sont les mêmes que celles associées avec la croissance axonale dans les embryons. Les substances qui sont abondantes dans les axones en développement, comme les protéines associées à la croissance (growth associated proteins, GAP), la tubuline et l'actine, voient leur synthèse augmentée, alors que la protéine de neurofilament, qui apparaît surtout dans le développement lorsque les axones ont rejoint leur cible et qu'ils élargissent leur diamètre, est diminuée (110, 113-116). L'actine est spécifiquement impliquée dans la motilité de la pointe de l'axone, tandis que la tubuline fournit un support structurel additionnel pour les portions d'axones nouvellement formées (117) et facilite le transport de matériel à travers l'axone pour la régénération de l'axone sectionné (118). Le profil de synthèse des composantes du cytosquelette récapitule aussi celui retrouvé lors du développement embryonnaire (9, 50, 115, 119, 120). L'altération d'expression des gènes dans les neurones moteurs, sensoriels et sympathiques permet au neurone de passer d'un état de transmission chimique à un état de croissance nerveuse et de régénération (110, 111). Les changements ont également été décrits comme une sorte de dédifférenciation vers une forme de développement du neurone moins mature, dont l'axone aurait la capacité de croître et de former des contacts fonctionnels avec les cibles (110, 112).

1.3.2 Dégénérescence wallérienne de la partie distale du nerf

Les fibres nerveuses dans la partie distale du nerf subissent une dégénérescence wallérienne, initialement observée et décrite par Augustus Waller en 1850 (121). La dégénérescence axonale est causée par un influx de calcium via des canaux ioniques spécifiques qui, à leur tour, activent les protéases axonales. La désintégration et la dégénérescence de l'axolemme, la membrane cellulaire entourant l'axone, et de l'axoplasme, le cytoplasme de l'axone, surviennent dans les 24 premières heures dans le cas des petites fibres nerveuses, et 48 heures dans le cas des grosses fibres nerveuses (73, 116, 122, 123). La fragmentation progressive avec la désintégration de la gaine de myéline de l'axone est aussi causée par les cellules de Schwann qui perdent leur gaine de myéline et subissent une prolifération cellulaire à même l'endonèvre (4, 50, 111). En conséquence, l'axone et la myéline se dégèrent, laissant derrière des cellules de Schwann en division cellulaire à l'intérieur du tube endoneural qui entourait la fibre nerveuse originale (9).

1.3.2.1 Phagocytose des débris axonaux et de la myéline

Les cellules de Schwann sont les cellules responsables de la phagocytose des débris de l'axone dans les trois premiers jours, les débris étant mitogènes pour les cellules et ainsi jouant un rôle important dans leur prolifération post-lésionnelle (124, 125). Trois jours après la lésion, la barrière hémato-nerveuse se décompose de manière uniforme le long du nerf, ce qui permet l'invasion des macrophages et la poursuite de leur phagocytose active (73, 126, 127). Ils s'infiltrèrent dans le neurone en réponse aux facteurs chimiotactiques, incluant les cytokines comme l'interleukine-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β), le facteur inhibiteur de la leucémie (leukemia inhibitory factor, LIF), le facteur de nécrose tumorale α (tumor necrosis factor α , TNF- α) et la protéine chimiotactique des monocytes-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), qui sont libérés par les cellules de Schwann (128). Les macrophages atteignent l'ensemble de la partie distale du nerf où ils restent durant un mois et sont responsables de retirer la majorité des débris de myéline (86, 126), tels que la glycoprotéine associée à la myéline (myelin-associated glycoprotein, MAG) (129) qui a été démontrée comme ayant un important effet inhibiteur sur la croissance axonale (130). Le nettoyage des débris de myéline et d'axones du tube endoneural de la partie distale du nerf est primordiale, puisque les axones qui régèrent

ne peuvent être dirigés dans des nerfs distaux qui ne sont pas complètement dégénérés (50).

1.3.2.2 Formation des bandes de Büngner

Les cellules de Schwann s'alignent progressivement sur la lame basale de la fibronectine et la laminine pour former les bandes de Büngner (131). Ces bandes fournissent l'environnement de croissance optimal à la régénération des axones qui émergent de la partie du nerf proximal (132-134) et guident la régénération de l'axone dans les tubes endoneuraux de la partie nerveuse distale vers les cibles appropriées (50, 73, 112).

1.3.3 Régénération de la partie proximale du nerf

Dans la première heure suivant une lésion, les axones de la partie proximale du nerf ayant survécu se dégènèrent jusqu'au premier nœud de Ranvier (44, 67). La partie proximale du nerf doit ensuite développer des cônes de croissance pour atteindre les cellules de Schwann en prolifération dans la partie distale du nerf.

1.3.3.1 Bourgeons axonaux

Initialement, la formation des cônes de croissance repose sur les éléments cytosquelettiques disponibles localement dans la partie proximale du nerf (135). Ces éléments préexistants sont transportés le long des microtubules fournissant ainsi la matière nécessaire à la phase initiale de la croissance axonale (136, 137). Cependant, les éléments du cytosquelette disponibles au cône de croissance s'épuisent rapidement et ne sont pas remplacés étant donné la synthèse de protéines limitée dans les axones (138). Par conséquent, la croissance et l'allongement axonal dépendent de la capacité subséquente des corps cellulaires des neurones lésés à réguler positivement les protéines du cytosquelette, l'actine et la tubuline. Ceci permet le transport de la matière nécessaire à la régénération, du corps cellulaire au cône de croissance (44, 78, 139).

Les cônes de croissance qui émergent des axones de la partie proximale du nerf progressent jusqu'à l'atteinte des tubes endoneuraux, le long de la surface des cellules de Schwann et de la surface interne des bandes de Büngner de la partie distale du nerf (9, 73). Les neurones

expriment plusieurs molécules d'adhésion dans la membrane des cônes de croissance, y compris la molécule d'adhésion neurale, en plus des intégrines qui se lient à des protéines de la matrice extracellulaires, telles que la laminine (73).

1.3.3.2 Unité de régénération

Chaque axone lésé élabore plusieurs cônes de croissance donnant naissance à plusieurs branches axonales (44). Plusieurs de ces branches axonales subissent une sélection négative (pruning) (140); ceux qui survivent, 5 en moyenne, commencent le processus d'allongement à travers la partie distale du nerf, compétitionnant pour un nombre limité de tubes endoneuraux tapissés de cellules de Schwann (9, 78, 141). Les bourgeons axonaux qui parviennent à pénétrer la partie distale du nerf constituent des unités de régénération (regenerating units) (142).

Au départ, l'allongement axonal est lent, mais il s'accélère pour atteindre une vitesse constante à partir du troisième jour suivant la lésion (50). L'axone se régénère à un taux de 1 à 3 millimètres par jour (37, 68) tel que discuté dans la section 1.2.4., ce qui correspond à la vitesse de transport des protéines cytosquelettiques (117).

Les axones en croissance grossissent progressivement en diamètre, proportionnellement à la taille de leur axone parent dans la partie proximale du nerf (40). Une fois que la cible nerveuse est atteinte par un axone, tous les autres axones filles sont progressivement éliminés, le processus s'échelonnant sur plusieurs mois voire années (9, 50, 143). L'axone qui s'est connecté à la cible distale élargit ensuite son diamètre et atteint la maturité axonale (143-145). Son diamètre final dépend de la taille de l'axone parent, de l'épaisseur de la gaine de myéline autour de l'axone et de la taille de la cible réinnervée (78). Les distances internodales des nerfs myélinisés nouvellement régénérés sont beaucoup plus courtes initialement et prennent plusieurs mois voire des années à se normaliser, ce qui cause une récupération lente de la vitesse de conduction nerveuse (15, 146).

1.3.3.3 Régénération axonale décalée

Au moment où l'apposition chirurgicale de la partie proximale et distale du nerf a lieu après la rupture de l'endonèvre, la régénération axonale décalée (staggered axonal regeneration) survient au site de réparation (67). Les axones traversent le site de réparation chirurgicale de façon asynchrone et décalée sur une période prolongée de quatre semaines chez le rat (65, 66). Cette croissance décalée (staggered outgrowth) était précédemment connue comme étant la période de latence (147), causant des retards significatifs dans la régénération nerveuse. C'est seulement une fois que les axones parviennent à la partie distale du nerf qu'ils se régénèrent à une vitesse de transport de 1 à 3 millimètres par jour.

1.3.3.4 Mauvaise direction de la régénération axonale

Tel qu'abordé dans la section 1.2.5, les bourgeons axonaux qui émanent de la partie proximale du nerf peuvent entrer dans des tubes endoneuraux avec des destinations cibles qu'ils ne desservait pas auparavant. Par exemple, des axones moteurs pourraient régénérer dans des voies cutanées ou atteindre des muscles inappropriés (78, 83, 140). Un seul neurone peut envoyer des axones à de multiples tubes endoneuraux, fournissant une direction erronée aux axones régénérés et créant une réinnervation aléatoire des cibles dénervées (61).

1.3.3.4.1 Réinnervation motrice préférentielle

Toutefois, il semble exister une réinnervation motrice préférentielle (preferential motor reinnervation) de la partie distale du nerf. Cette réinnervation privilégie la croissance des neurones moteurs vers les tubes endoneuraux des cibles musculaires plutôt que des cibles sensorielles cutanées (21, 65, 66, 140). Même si la réinnervation des nerfs moteurs et sensoriels est initialement aléatoire, les motoneurones qui régénèrent progressivement leurs axones à travers le site de suture envoient leurs axones spécifiquement dans la branche motrice appropriée (66, 140). Un acide glycan particulier qui est reconnu par un anticorps monoclonal L2/HNK-1 chez la souris a été démontré comme étant associé au profil de myéline des axones moteurs, mais pas aux axones sensoriels, et a aussi été démontré comme étant le substrat préféré à l'extension des neurites des motoneurones (78, 129). Ceci suggère que la

composition chimique de certaines protéines, telles que les MAG pourrait induire le phénomène de réinnervation motrice préférentielle (78).

1.3.4 Production des facteurs neurotrophiques par les cellules de Schwann

Suite à la lésion axonale, les cellules de Schwann de la partie distale du nerf induisent une régulation augmentée de protéines associées à la croissance, telles que les facteurs neurotrophiques (50, 88, 148-152), les molécules d'adhésion cellulaire et les éléments composant la membrane basale (50), afin de favoriser la survie neuronale et la régénération axonale (153, 154).

Les gènes qui sont régulés positivement incluent les facteurs neurotrophiques, les récepteurs de la tyrosine kinase et le récepteur p57 (88). Les facteurs neurotrophiques appartiennent à trois familles : les neurotrophines, les facteurs neurotrophiques dérivés de cellules gliales (Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) et les cytokines neuropoïétiques (88). La classification de ces familles est illustrée à la Figure 1.4 La famille des neurotrophines comprend le facteur de croissance nerveuse (Nerve growth factor, NGF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF), la neurotrophine-3 (neurotrophin-3, NT-3), et la neurotrophine-4/5 (neurotrophin-4/5, NT 4/5). La famille des GDNF comprend le facteur GDNF lui-même, la neurturine, la persephine et l'artemine (73). Ces facteurs neurotrophiques se lient aux récepteurs de tyrosine kinase (trk) avec une forte affinité et au récepteur p57 avec une plus faible affinité (50). Les facteurs NGF, BDNF, GDNF et les cytokines, l'interleukine-6 (interleukin-6, IL-6) et le facteur inhibiteur de la leucémie (leukemia inhibitory factor, LIF), sont régulés de façon augmentée par les cellules de Schwann de la partie nerveuse distale (50). Chaque facteur neurotrophique présente une expression différente dans le temps suite à une lésion nerveuse (155, 156). Ces facteurs de croissance jouent un rôle dans la prolifération et la migration des cellules de Schwann à travers le site lésionnel et guident la croissance des neurites vers les tubules endoneuraux distaux à l'aide de la réinnervation préférentielle des voies motrices et sensibles (65, 84, 140, 157-161).

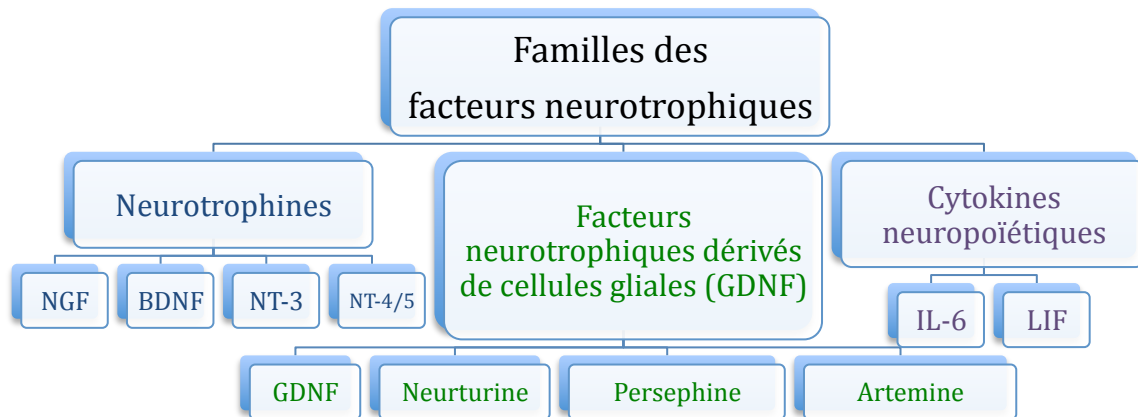


Figure 1.4 Classification des différents facteurs neurotrophiques par famille

Le rôle des différents facteurs neurotrophiques dans la régénération des nerfs périphériques n'est pas encore complètement élucidé. La fonction de ces facteurs a principalement été étudiée au niveau des cellules neuronales du système nerveux central, le plus communément dans un modèle rongeur. Il est suspecté que les facteurs neurotrophiques du système nerveux périphérique ont un rôle similaire à celui du système nerveux central. Toutefois, ces facteurs ont été peu étudiés dans le système nerveux périphérique. L'étude de ces facteurs permettra d'établir leur moment et leur amplitude d'expression, déterminant ainsi leur rôle et leur impact dans la cascade de régénération des nerfs périphériques.

Notre étude porte sur l'analyse de 2 de ces facteurs neurotrophiques, soit BDNF et Hepatocyte Growth Factor (HGF). BDNF est un des facteurs les plus étudiés du système nerveux périphérique et a été démontré comme étant impliqué dans l'amélioration de la régénération nerveuse (149, 157, 162). Son rôle sera discuté plus en détail dans la section 1.3.4.1. Quant au facteur HGF, il s'agit d'un facteur neurotrophique qui n'a pas encore été étudié dans un modèle de système nerveux périphérique adulte. Il a toutefois été démontré comme étant un facteur de survie des motoneurones et un agent promoteur de la croissance axonale dans un modèle embryonnaire. Il est suspecté que la régénération nerveuse adulte se produise en utilisant les mêmes facteurs neurotrophiques que ceux observés durant le développement

embryonnaire. Le rôle de HGF dans la régénération nerveuse périphérique adulte reste à être établi. Ce facteur a donc été sélectionné afin de déterminer son expression et son implication dans la régénération nerveuse périphérique adulte. Son rôle sera expliqué de façon plus approfondie dans la section 1.3.4.2.

1.3.4.1 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

BDNF est un membre de la famille des neurotrophines (50, 66, 152). Il est transporté par les neurones moteurs de façon rétrograde (163) et son transport est augmenté suite à une lésion nerveuse (155). BDNF a une forte affinité pour le récepteur de la tyrosine kinase B (tyrosine kinase B receptor, trkB) (164). La liaison de BDNF à trkB induit l'autophosphorylation du récepteur, ce qui permet à ce dernier de se lier et de phosphoryler les résidus de tyrosine des protéines cibles. Ceci cause l'activation des protéines qui permettent la croissance et la différenciation cellulaire (22, 165).

1.3.4.1.1 Rôle de BDNF

BDNF est un facteur de croissance qui promouvoit la survie des motoneurones *in vitro*, autant chez l'embryon (166) que chez l'adulte (167). Il promouvoit aussi la survie des motoneurones *in vivo*, autant chez l'embryon du modèle rongeur et aviaire (168-171) que chez l'adulte du modèle rongeur (172-174). De plus, un environnement qui ne comprend pas BDNF compromet la croissance axonale (167). BDNF a aussi démontré sa capacité d'augmentation de la croissance des neurites et de réinnervation *in vitro* des motoneurones spinaux des rats (175). De plus, BDNF joue un rôle dans la formation de myéline des cellules de Schwann et le maintien de la régénération des plus gros axones chez le rat adulte (167, 176). BDNF favorise aussi le maintien phénotypique des motoneurones du rat adulte post-axotomie (177), régule la fonction des synapses neuromusculaires *in vitro* chez l'embryon du *Xenopus* (178) et améliore la régénération axonale suite à une axotomie chronique de motoneurone adulte chez le rat (179). Ces fonctions démontrent l'implication de BDNF dans la régénération nerveuse périphérique (22, 167). La Table 1.1 résume les différents rôle de BDNF, autant *in vitro* que *in vivo*.

Facteur neurotrophique	BDNF
Famille	Neurotrophines
Récepteur	trkB
Rôle <i>in vitro</i>	Facteur de survie des motoneurones embryonnaires Facteur de survie des motoneurones adultes Croissance des neurites et réinnervation des motoneurones Formation de la myéline des cellules de Schwann Régulation de la fonction des synapses neuromusculaires
Rôle <i>in vivo</i>	Facteur de survie des motoneurones embryonnaires Facteur de survie des motoneurones adultes Maintien phénotypique des motoneurones post-axotomie Amélioration de la régénération post-axotomie chronique

Table 1.1 Différents rôles de BDNF *in vitro* et *in vivo*

Il a été tenté d'augmenter la régénération nerveuse périphérique suite à la section et la réparation du nerf sciatique par l'application de BDNF de manière exogène (22, 70, 180, 181). Cependant, les résultats ont été jusqu'à présent inconsistents, contradictoires et difficiles à interpréter étant donnée la variabilité des doses et des méthodes d'administration de BDNF dans chacune des études (50, 88, 152). Il est probable que BDNF nécessite d'autres facteurs et d'autres interactions, afin de permettre la régénération axonale.

1.3.4.1.2 Expression de BDNF

Dans des conditions normales, l'expression d'ARNm de BDNF est faible, mais présente dans les motoneurones et les interneurones de la corne ventrale de la moelle épinière normale (162) alors que trkB y est fortement exprimé (182). Toutefois, l'expression de BDNF et de trkB est augmentée suivant l'axotomie des motoneurones (149, 162, 173, 182), ce qui suggère leur implication dans la régénération des motoneurones lésés adultes (66). Les cellules de Schwann dénervées de la partie distale du nerf lésé démontrent aussi une augmentation de l'expression de BDNF suite à une atteinte nerveuse (149, 162), ce qui favoriserait la réinnervation de la cible dénervée (167).

Le rôle de BDNF est complexe et continue d'être étudié autant chez l'embryon que chez l'adulte. Sa présence seule ne peut permettre une régénération nerveuse complète. BDNF fait partie d'une cascade moléculaire spécifique qui implique de nombreux autres facteurs dont les rôles et le moment d'apparition dans la séquence de régénération n'ont pas encore été établis. HGF est un facteur de croissance qui démontre un potentiel de régénération nerveuse périphérique très important (183-185). Cependant, il n'a pas encore été suffisamment étudié dans un modèle de système nerveux périphérique adulte. Démontrer sa participation à la régénération nerveuse périphérique est donc nécessaire afin de contribuer à élucider les différents mécanismes moléculaires impliqués.

1.3.4.2 Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Le facteur de croissance des hépatocytes (Hepatocyte Growth Factor, HGF) est une cytokine pléiotrophique, initialement découverte (186) et purifiée comme étant un mitogène puissant pour les hépatocytes matures en culture (187) et un facteur favorisant la motilité des cellules épithéliales (188). Ce facteur a ensuite été démontré comme étant impliqué dans de multiples fonctions biologiques, telles que la régénération d'organes, l'angiogénèse, l'invasion tumorale et le développement et le fonctionnement du système nerveux et des muscles squelettiques des membres et du tronc (183, 189-192). Lorsque sécrétée, cette protéine agit sur plusieurs types de cellules à travers son récepteur c-Met (184, 193). HGF et c-Met sont aussi exprimés par les cellules non-neuronales, telles que les cellules de Schwann et la microglie (194, 195).

1.3.4.2.1 Expression et mécanisme d'action de HGF

HGF et son récepteur c-Met sont retrouvés dans le système nerveux central en développement, ou embryonnaire, ainsi que dans le système nerveux central mature, ou adulte (195-200). Leur expression dans le système nerveux périphérique a toutefois été peu rapporté (194). Leur rôle et leur voie de signalisation dans le système nerveux demeurent à être établis. Il a été suggéré que HGF, à l'aide de son récepteur unique c-Met, pourrait remplir une fonction similaire aux facteurs neurotrophiques, tels que BDNF, NGF et GDNF, qui favorisent la survie neuronale et la régénération des nerfs lésés par des mécanismes autocrines et paracrines via leur récepteur

(201-203). Il a été démontré que HGF agit de façon synergique avec le facteur neurotrophique ciliaire (Ciliary neurotrophic factor, CNTF) afin de favoriser la survie des motoneurons (189), et avec NGF afin de favoriser la survie des neurones sensitifs et la croissance des axones sensitifs et sympathiques (189, 204, 205). Ces données indiquent une convergence des voies de signalisation de c-Met et du récepteur de la tyrosine kinase A (tyrosine kinase receptor A, trkA), et les récepteurs de CNTF et NGF. En effet, ces récepteurs partagent des protéines effectrices en aval, tels que la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), la phospholipase C γ (PLC γ), les protéines de transduction et d'activation de transduction (signal transducer and activator of transcription protein, STAT) et la voie de signalisation Ras/MAP kinase. La Figure 1.5 est une représentation schématique des voies de signalisation de HGF.

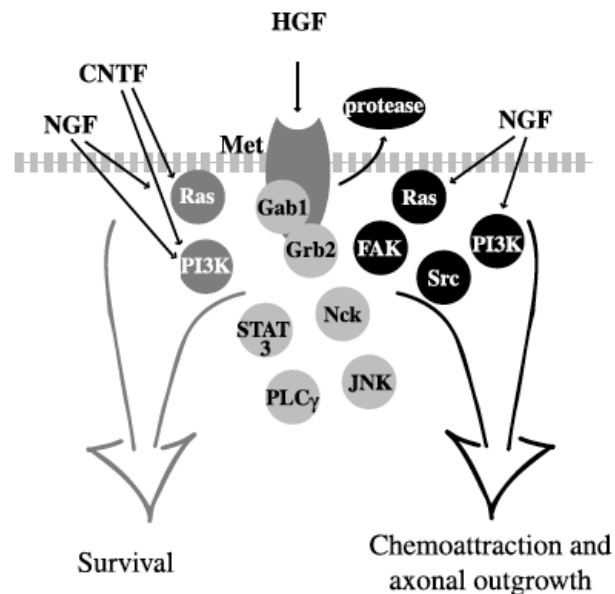


Figure 1.5 Représentation schématique des voies de signalisation activées par HGF et ses actions potentiellement synergiques avec CNTF et NGF. Tirée et adaptée de Maina F, Klein R. Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. Nature neuroscience. 1999;2(3):213-7.

1.3.4.2.2 Rôle de HGF

In vitro, HGF a été démontré comme étant un facteur neurotrophique dans les neurones moteurs, sensitifs et parasymphatiques d'embryons aviaires (183). Il favorise la survie et la régénération des nerfs lésés dans les motoneurones embryonnaires murins et aviaires (184, 185, 204, 206) et agit en tant qu'agent chimiotactique pour les axones en croissance afin de les guider vers leurs organes cibles dans les cellules neuronales embryonnaires aviaires et les motoneurones, les cellules épithéliales et les cellules myogéniques embryonnaires de rat (183, 184, 196). En effet, chez l'embryon du rat, HGF est exprimé dans les régions qui correspondent aux muscles en développement et permet l'amélioration de la croissance et de la direction des axones moteurs (207). HGF augmente aussi la croissance des neurites des ganglions spinaux et des neurones sympathiques en culture avec NGF (205, 208).

In vivo, il a aussi été démontré que HGF favorise la survie et la régénération des nerfs lésés dans les motoneurones embryonnaires murins (184, 209) et agit aussi en tant qu'agent chimiotactique pour les axones en croissance afin de les guider vers leurs organes cibles dans les embryons murins (184). Les embryons murins qui n'expriment pas HGF meurent *in utero* suite à l'échec de prolifération hépatique et placentaire (210-212). Quant aux embryons de rats mutants (knockout) pour c-Met, ils démontrent des atteintes des arborisations nerveuses motrices des extrémités, provoquant un échec de la migration des myoblastes jusqu'aux membres et à la paroi thoracique (184, 211, 212). La cascade de signalisation impliquant HGF et son récepteur c-Met promouvoit donc la croissance axonale *in vitro* et *in vivo* dans le modèle embryonnaire (213, 214). Leur rôle demeure à être déterminé dans un modèle de régénération nerveuse adulte. Les différents rôles de HGF, autant *in vitro* que *in vivo*, sont résumés à la Table 1.2.

Facteur neurotrophique	HGF
Famille	Cytokine pléiotrophique
Récepteur	c-Met
Rôle <i>in vitro</i>	Facteur de survie des motoneurones embryonnaires Agent chimiotactique pour la croissance axonale des motoneurones embryonnaires Croissance des neurites ganglionnaires spinaux et des neurones sympathiques embryonnaires
Rôle <i>in vivo</i>	Facteur de survie et de régénération des motoneurones embryonnaires Agent chimiotactique pour la croissance des axones des motoneurones embryonnaires

Table 1.2 Différents rôles de HGF *in vitro* et *in vivo*

1.4 L'impact de la stimulation électrique sur la régénération nerveuse

La stimulation électrique est utilisée depuis le milieu du dix-huitième siècle pour le traitement des troubles du système nerveux (215, 216). Le but était principalement de prévenir les changements musculaires liés à la dénervation. Dans ce contexte, la stimulation électrique contrebalance la perte d'excitabilité musculaire et l'atrophie musculaire qui résultent d'une non-utilisation (92, 217-224). Puisque les résultats de ces études étaient controversés (92), des traitements alternatifs ont été développés en utilisant différents types de stimulation électrique, allant des champs magnétiques pulsés, aux faibles courants continus (direct courant, DC), en passant par les courants alternatifs (alternative courant, AC) (225-231). L'application d'un courant dépolarisant à la partie proximale d'un nerf lésé a été introduite par Nix et Hopf (232) et Pockett et Gavin (233), avec des résultats démontrant une amélioration de la réinnervation fonctionnelle. Une approche spécifique et clinique a ensuite été développée par Al Majed et al. (65, 66) afin d'améliorer la régénération des nerfs périphériques. Cette approche utilise la stimulation électrique brève et à basse fréquence (1h à 20 Hz) sur la partie proximale du nerf immédiatement suivant son axotomie. Ceci permet une dépolarisation des motoneurones, ce qui diminue la période de croissance axonale décalée en améliorant la synchronisation de la croissance des axones de la partie proximale à la partie distale du nerf périphérique lésé (65),

et qui accélère la réinnervation préférentielle motrice chez le rat (65, 66, 160).

La stimulation électrique a été démontrée comme ayant de multiples effets bénéfiques sur la régénération nerveuse ; elle permet la croissance des neurites (234, 235) et elle accroît le nombre de neurones moteurs (234) et sensitifs (160) qui traversent le site de suture nerveuse. De plus, elle accélère la récupération des réflexes et de la contraction musculaire élicitee par les nerfs (65, 232, 236, 237). Elle améliore aussi la réponse du corps cellulaire des neurones sensitifs (160) et la spécificité sensitive de la régénération nerveuse (158). De plus, elle augmente la taille du soma, ou corps cellulaire, des motoneurones régénérés, et améliore l'épaisseur et la myélination des neurones régénérés (92). La stimulation électrique a aussi été associée à une amélioration de la réinnervation sélective des organes cibles (158). La stimulation électrique des nerfs a aussi la capacité d'accélérer la récupération fonctionnelle (74, 238).

1.4.1 L'expression de BDNF suite à la stimulation électrique

Les effets bénéfiques de la stimulation électrique sont aussi associés à l'augmentation d'expression de BDNF et de son récepteur trkB dans les motoneurones, qui se produit au niveau du corps cellulaire du neurone (66, 88, 157, 160). L'augmentation de BDNF et trkB est suivie d'une accélération de l'augmentation de production des protéines cytosquelettiques tubuline, actine et GAP-43 (239). Ceci facilite la croissance des bourgeons axonaux puisque les protéines cytosquelettiques permettent l'extension des bourgeons et préviennent leur arrêt de croissance prématuré (61, 67).

1.4.2 Les mécanismes d'action de BDNF et trkB suite à la stimulation nerveuse

Le mécanisme par lequel la stimulation électrique active la voie de transduction du signal de BDNF et trkB n'est pas complètement élucidé (65, 240). Il est décrit que BDNF et trkB dans le corps neuronal sont liés à l'activité de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Pour ce faire, l'AMPC active la protéine kinase A (PKA), qui à son tour active la protéine CREB (cAMP response element-binding protein, CREB). Cette dernière déclenche la transcription de l'actine et de la tubuline, qui sont nécessaires à l'assemblage du cytosquelette des axones qui

régénèrent. Grâce à l'activation de PKA, l'AMPc encourage aussi la croissance des neurites en inhibitant RhoA (Ras homolog gene family member A), une protéine qui empêche l'assemblage du cytosquelette (65, 66, 70, 239, 241).

Il a aussi été établi que l'influx de Ca^{2+} intracellulaire causé par la stimulation électrique se lie à l'élément de réponse au Ca^{2+} (Ca^{2+} response element, CRE) à l'intérieur du gène BDNF, ce qui déclenche la phosphorylation de CREB par la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante IV (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV, CaM kinase IV) et active la transcription de BDNF et donc, l'augmentation de son expression. Adjacent au CRE, l'élément de réponse au Ca^{2+} de BDNF (BDNF Ca^{2+} response element, BCARE) a aussi été démontré comme étant un activateur de la transcription de BDNF (242-244). Le mécanisme d'action de BDNF est schématisé à la Figure 1.6.

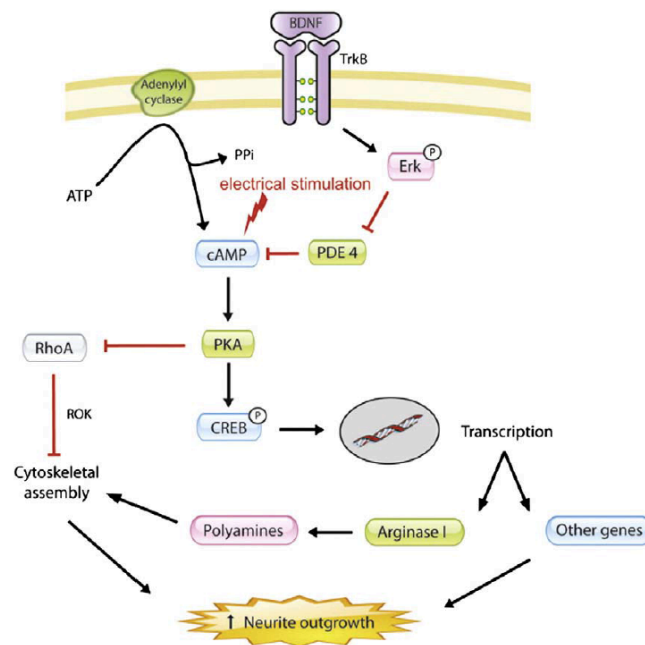


Figure 1.6 Mécanismes moléculaires d'augmentation de la régénération nerveuse grâce à la stimulation électrique. Tirée et adaptée de Gordon T, Amirjani N, Edwards DC, Chan KM. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Experimental neurology*. 2010;223(1):192-202.

1.5 La stimulation électrique transcutanée

Il a été démontré que la stimulation électrique améliore la régénération nerveuse. Néanmoins, elle implique une stimulation directe de la partie proximale du nerf suivant la lésion et sa réparation, ce qui impose des limitations à son application clinique.

La stimulation électrique transcutanée est un traitement couramment utilisé pour une multitude de conditions, car elle est non invasive, peu coûteuse, sûre et facile à utiliser (245, 246). Toutefois, son mécanisme d'action demeure incertain. Il a été démontré que la stimulation électrique améliore la croissance osseuse et la synthèse du collagène (247-249). Il a également été démontré qu'elle améliore la cicatrisation des plaies en augmentant la vitesse d'épithélialisation et la contraction des plaies (250-253). De plus, il a été démontré qu'elle améliore la survie des tissus ischémiques dans les lambeaux musculocutanés chez le rat (254). La stimulation électrique transcutanée est aussi grandement utilisée et étudiée dans le contexte de douleurs neuropathiques (255-257) dont les résultats démontrent une diminution de 53 à 81% de la douleur (258-260). Il a été démontré qu'elle diminue l'hypersensitivité, particulièrement pour la main (257); elle réduit l'allodynie thermique (261, 262), ainsi que l'hyperalgésie mécanique et thermique (263).

1.5.1 Paramètres de la stimulation nerveuse transcutanée

La stimulation électrique transcutanée est utilisée à des 1) **fréquences**, 2) **intensités** et 3) **durées de pulsation** différentes. 1) La **fréquence** de stimulation peut être classifiée en trois catégories : haute fréquence, basse fréquence et en rafale. 2) **L'intensité** est divisée en niveaux sensoriel et moteur, et est déterminée par la réponse du patient à la stimulation électrique transcutanée. Le niveau sensoriel est déterminé par l'augmentation du voltage jusqu'à ce que le patient sente soit une sensation de « tapping » sans contraction motrice ou un picotement inconfortable, démontrant une faible intensité. Le niveau moteur est déterminé par l'augmentation du voltage pour produire une contraction motrice, ce qui démontre une haute intensité. La stimulation électrique transcutanée conventionnelle est habituellement appliquée à une haute fréquence et à une basse intensité, alors que les stimulations électriques transcutanées similaires à l'acupuncture sont appliquées avec des basses fréquences à une

haute intensité et produisent une contraction musculaire (246). 3) La **durée de pulsation** peut être soit monophasique ou biphasique (264). Les courants monophasiques sont considérés comme donnant une orientation aux protéines de la membrane cellulaire vers la cathode et dirigeant la régénération (265). Les pulsations biphasiques utilisées par Al-Majed et al. (65, 66, 157, 239) ont été démontrées comme améliorant la vitesse et la précision de la régénération nerveuse et améliorant l'expression de plusieurs facteurs comme BDNF et trkB. Les paramètres de la stimulation électrique peuvent être utilisés autant par méthode transcutanée que par méthode directe.

1.6 Objectifs de recherche

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régénération des nerfs périphériques ne sont pas tout à fait bien compris. Il est suspecté que la régénération nerveuse se produise par les mêmes voies de signalisation, en utilisant les mêmes facteurs neurotrophiques que ceux observés dans le développement embryonnaire. Plusieurs facteurs de croissance, tels que BDNF et son récepteur trkB ont été identifiés comme étant impliqués dans la régénération des nerfs périphériques et leur expression a été démontrée comme étant augmentée dans le contexte d'une lésion nerveuse (149). HGF est un autre facteur de croissance impliqué dans la régénération nerveuse. Son rôle n'est pas encore complètement élucidé. Toutefois, son implication dans la croissance et la survie neuronale *in vitro* et chez l'embryon démontre un potentiel important pour la régénération nerveuse périphérique adulte.

La stimulation électrique, utilisant une brève exposition à une fréquence de 20 Hz durant une heure, a démontré une amélioration de la régénération axonale et une régulation positive de BDNF et trkB (65, 66, 157, 160). Ceci suggère que les autres facteurs impliqués dans la cascade de régénération nerveuse pourraient aussi être affectés par la stimulation électrique. Le rôle de HGF, un facteur de survie des nerfs périphériques dans le développement embryonnaire (169, 184, 185, 204, 206, 209), n'a pas été étudié dans la régénération des nerfs périphériques chez l'adulte après une stimulation électrique. Chez l'embryon, HGF favorise la survie et la régénération des nerfs lésés (184, 185, 204, 206, 209) et agit en tant qu'agent chimiotactique pour les axones en croissance afin de les guider vers leurs organes cibles (183,

184, 196) ; il permet l'amélioration de la croissance et de la direction des axones moteurs (207). La voie de signalisation de HGF et c-Met promouvoit aussi la croissance axonale (213, 214). Le rôle de HGF dans la régénération des motoneurones adultes et suite à la stimulation électrique doit donc être déterminé. Ainsi, en établissant les différents rôles de ces facteurs neurotrophiques, il sera possible de développer des approches thérapeutiques ciblées afin d'améliorer la régénération nerveuse périphérique.

De plus, comme la stimulation électrique directe limite les applications cliniques par sa nature invasive, la possibilité d'utiliser la stimulation électrique transcutanée de manière interchangeable faciliterait grandement la disponibilité de ce traitement.

Les objectifs de cette étude sont donc multiples. Dans un premier temps, l'expression de BDNF dans la moelle épinière murine post-axotomie du nerf périphérique sciatique sera évaluée suite à une stimulation électrique directe. Cette expression sera comparée à celle d'une stimulation électrique transcutanée afin de déterminer l'interchangeabilité de ces deux approches, ce qui permettrait une plus grande applicabilité clinique. Dans un deuxième temps, nous étudierons l'expression de HGF dans la moelle épinière murine suite à une axotomie du nerf périphérique sciatique afin d'établir l'implication de ce facteur dans la régénération nerveuse périphérique adulte d'un modèle murin *in vivo*. Par la suite, son profil d'expression dans la moelle épinière murine sera observée suite à l'axotomie du nerf sciatique suivant une stimulation électrique directe et transcutanée. Ceci permettra de déterminer si la stimulation électrique a un impact sur l'expression de HGF suite à une atteinte nerveuse périphérique et si cet impact est le même, que l'approche utilisée soit directe ou transcutanée.

Ceci nous permettra d'améliorer notre compréhension des changements moléculaires impliqués dans la régénération axonale et des mécanismes en présence ou en l'absence d'une stimulation électrique, ainsi que d'établir l'efficacité de la stimulation électrique transcutanée afin de favoriser la régénération des nerfs périphériques chez la souris.

Les résultats de ce mémoire sont présentés sous la forme d'un article scientifique qui sera soumis au *Experimental Neurology*.

CHAPITRE 2

2. Résultats:

Hepatocyte Growth Factor Expression in Murine Lumbar Motoneurons Following Sciatic Nerve Laceration and Electrical Stimulation

Andrée-Anne Roy, MD^{1,2,3}, Anne-Marie Pion, MD^{1,2,3} and Jenny C. Lin, MD, PhD^{1,2,3}

¹Research Centre CHU-Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada

²Research Centre Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

³Plastic and Reconstructive Surgery, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Sources of support:

Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal (FESP), Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), Fonds de recherche J.A. de Sève de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal, Département de Chirurgie de l'Université de Montréal

Correspondence address and reprint request:

Jenny C. Lin, MD, PhD, FRCSC

Assistant Professor, Plastic and Reconstructive Surgery

Université de Montréal

3175 Côte-Ste-Catherine, #7916

Montréal, Qc, H3T 1C5

Phone : 514-345-4771

Fax : 514-345-4964

2.1. Abstract

Purpose: Hepatocyte Growth Factor (HGF) plays a role in promoting axonal growth and survival of motoneurons during embryonic development. This factor might also be important in directing the regeneration of adult motoneurons following laceration. We aim to identify the expression patterns of HGF following axotomy, with or without direct or transcutaneous electrical nerve stimulation in a mouse model.

Methods: Sixty adult C57BL/6 mice were divided into 5 groups: Control (n=12), Sham (n=12), Axotomy (n=12, sciatic nerve laceration and immediate repair), Direct (n=12, sciatic nerve laceration, immediate repair and application of direct electrical stimulation on the proximal nerve end, 1h, 20 Hz) and Transcutaneous (n=12, nerve laceration and immediate repair followed by proximal transcutaneous electrical stimulation, 1h, 20 Hz). Spinal cords were harvested at 1, 3, 7 and 14 days post-surgery. The expression patterns of HGF were measured using *in situ* hybridization.

Results: Our results showed an upregulation of HGF expression in mouse spinal cords following sciatic nerve axotomy. This occurred more quickly following electrical stimulation in both Direct and Transcutaneous groups. The expression pattern of HGF became localized to the motor neuron pools in the Axotomy, Direct and Transcutaneous groups.

Conclusions: HGF, a growth factor involved in directing the outgrowth of motor axons in development, has an altered expression pattern following sciatic nerve laceration, suggesting it may also play a role in directing motoneuron regeneration. Furthermore, rapid change in the expression pattern of HGF following electrical stimulation suggests it may also be involved in the upregulation of nerve regeneration following electrical stimulation.

Key words : nerve injury, peripheral nerve regeneration, neurotrophic factors, HGF, BDNF, trkB, electrical stimulation, transcutaneous electrical stimulation, *in situ* hybridization, mouse model

2.2. Introduction

Peripheral nerve injury is a commonly reported medical condition (1-4). Unfortunately, for the majority of peripheral nerve injuries, functional outcomes are poor and disabling, despite rapid intervention and excellent advances in microsurgical repair (8-28). The molecular mechanisms underlying peripheral nerve regeneration are not entirely well understood. It is suspected that they occur through the same signalling pathways, using the same neurotrophic factors as in embryonic development. Several growth factors, such as Brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor tyrosine kinase B (trkB) have been found to be implicated in peripheral nerve regeneration and their expression has been shown to be upregulated in the context of nerve injury (149). However, expression of neurotrophic factors progressively declines with time in both axotomized motoneurons and denervated Schwann (SC) cells in the distal stumps after nerve injuries (88, 90, 94), corresponding to a decline in the capacities of axotomized neurons to regenerate and of denervated SCs to support regenerating neurons and their axons. The prolonged axotomy of the proximal stump and denervation of SCs in the distal nerve stump significantly limit the functional recovery after nerve injuries (59-62). Therefore, upregulating the expression of neurotrophic factors would promote functional recovery after nerve injuries.

Using electrical stimulation at a low-frequency (20 Hz) during 1h has been shown to improve axonal regeneration and upregulation of BDNF and trkB (65, 66, 157, 160). However, the role of Hepatocyte Growth Factor (HGF), a peripheral nerve survival factor in embryonic development (169, 184, 185, 204, 206, 209), has not been studied in adult peripheral nerve regeneration following electrical stimulation. HGF is a soluble growth factor which acts through its tyrosine kinase receptor, c-Met. In the embryo, HGF improves survival and regeneration of injured nerves (184, 185, 204, 206, 209) and acts as a chemoattractant for regenerating axons directing them towards their appropriate target (183, 184, 196). HGF guides the axonal growth of motoneurons (207) and the HGF/c-Met signalling pathway also promotes axonal regeneration (213, 214). However, the role of HGF in adult regenerating motoneurons has not been determined.

Moreover, since direct electrical stimulation limits clinical application due to its invasive nature and technical difficulty, the possibility of using transcutaneous electrical stimulation interchangeably would greatly facilitate availability of this treatment.

Therefore, the purpose of this study is to determine if HGF is involved in adult peripheral nerve regeneration and to determine its expression pattern in the spinal cord of a mouse model following sciatic nerve axotomy and both direct and transcutaneous electrical stimulation.

This will allow us to improve our understanding of molecular changes during axonal regeneration and whether these mechanisms are altered by electrical stimulation.

2.3. Methods

2.3.1 Animals and surgical procedures

2.3.1.1 Groups

Sixty adult C57BL/6 female mice (20-35g) were used in this experiment and were subdivided into 5 groups : 1) Normal, 2) Sham, 3) Axotomy, 4) Direct and 5) Transcutaneous (TC), as seen in Table 2.1. To exclude the possibility that electrical stimulation might affect both sides of the spinal cord, a normal mice control group was included in this study and only the right side was studied for each mouse. The Sham group had nerve exploration only, without laceration and the Axotomy group had sciatic nerve laceration and immediate repair. The Stimulation groups underwent laceration and immediate repair of the sciatic nerve followed by one hour of electrical stimulation, either directly upon the proximal portion of the cut nerve (Direct group) or transcutaneously (TC group), at 20 Hz, as what had previously been described in the literature (66, 157, 266).

Growth factor expression was studied at the timepoints of 1, 3, 7 and 14 days post-intervention (66, 157). Each group of 12 mice were divided into groups of 3 mice per timepoint.

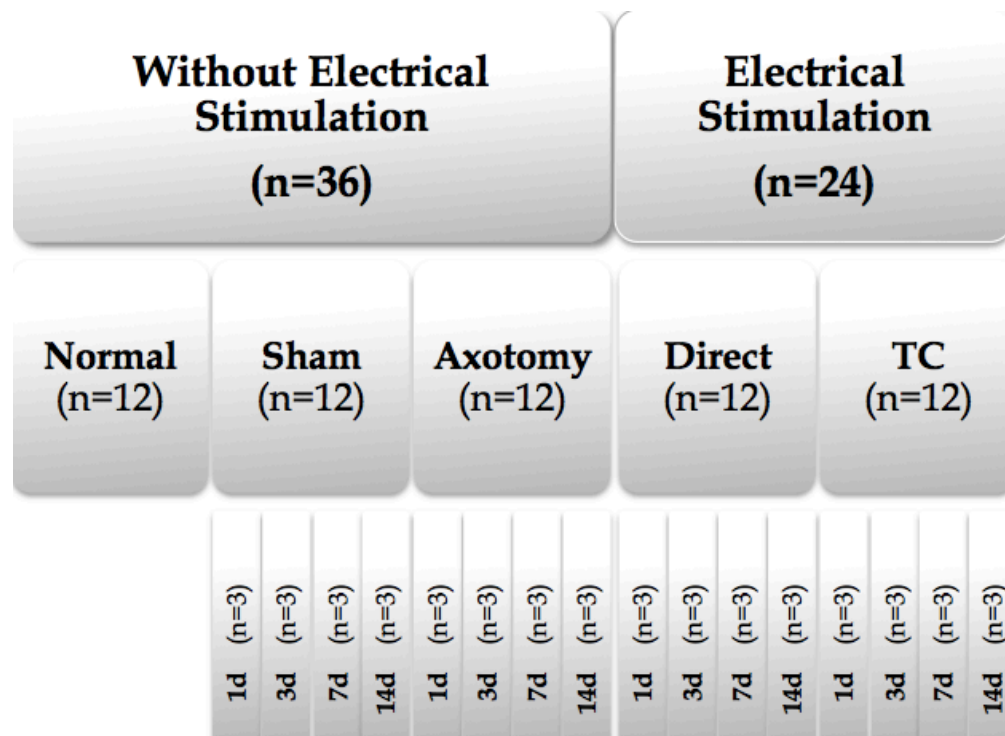


Table 2.1 Number of mice for each group and their different studied timepoints

2.3.1.2 Surgical protocol

Experiments, conducted according to the recommendations of the Canadian Council on Animal Care, were approved by the animal ethics committee of Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. All surgical procedures were performed under aseptic conditions on animals deeply anesthetized with ketamine/xylazine (120/10 mg/kg i.p.) and placed on a feedback-controlled heating blanket to prevent hypothermia during intervention, and ophthalmic ointment was applied to eyes to avoid drying.

For groups 2 through 5, each mouse was placed in the prone position with the legs secured at 45 degrees from the longitudinal axis of the body. The right hindlimb was shaved, an incision was made, and a retractor was installed to keep the surgery field open. The gluteus muscle was split to expose the sciatic nerve. In groups 3 to 5, the right sciatic nerve was completely sectioned with sharp scissors and resutured with 2 neurilon 10.0 single epineural sutures (Ethicon, Peterborough, ON, Canada) (0–180 degrees) under 40-power magnification (Aus

JENA 212 OPM microscope), correctly aligning the nerve fascicles. In group 4, a bipolar cuff electrode was installed around the proximal nerve stump for electrical stimulation at 20 Hz with 0.1 ms pulse duration at 5 V for 1 hour (Grass SD-9 Stimulator), as previously described by Al-Majed et al. (66, 157) and English et al. (266). The 20 Hz frequency correlates to the frequency of motor neuron firing frequency (267, 268). In group 5, electrodes were placed on the skin over the proximal stump of the sciatic nerve suture site and stimulation was set at 90% of motor threshold for 1 hour.

During the hour of stimulation, the site of surgery was kept moist with light mineral oil. After stimulation, electrodes were removed and all wounds were closed with 4-0 silk suture and « New Skin » silicone gel was applied to protect the wound and avoid infection. Duplocillin (0.2mg/kg s.c.), buprénorphine (0.1mg/kg s.c.) and sterile saline water (0.5ml s.c.) were given post-intervention to prevent infection, pain and dehydration. Mice were weighed daily to insure adequate weight. They were given standard laboratory food and water ad libitum, and had an artificial 12h light /darkness cycle.

2.3.2 *In situ* hybridization

In situ hybridizations were done in order to detect the mRNA of growth factor BDNF and its receptor trkB, as well as the neurotrophic factor HGF.

2.3.2.1 *Pretreatment of tissue sections*

At 1 day, 3 days, 7 days and 14 days, 3 mice from each treatment group was anesthetized with ketamine/xylazine (120/10 mg/kg i.p.). Mice were then perfused with paraformaldehyde 4%. The spinal cords were exposed by laminectomy and harvested from T11 to the sacrum. The spinal cords containing the cell bodies of the sciatic motoneurons were postfixed in paraformaldehyde 4% for 12-24 hours. They were then switched to a sucrose 30% solution and refrigerated for 2 to 4 days in order to preserve the integrity of the spinal cord. The spinal cords were mounted in OCT (Optimal Cut Temperature Compound, Tissue Tek 4583) and stored at -80°C until further processing. The lumbar spinal cords were cut transversely with a

cryostat at 20 μm thickness. Sections were serially mounted on glass slides (Superfrost Plus slides, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) ; 10 sections per slides at 800 μm apart to avoid repetitive sampling. Sections were air dried at room temperature for about 20 minutes (no longer than 3 hours to avoid mRNA degradation).

2.3.2.2 Tissue preparation

The sections were then fixed in 4% paraformaldehyde, freshly prepared in PBS (0.1 M phosphate buffer with 0.15 M NaCl, pH 7.4) for 10 minutes, washed three times with PBS for 3 minutes each, acetylated for 10 min (6 ml triethanolamine was added to 500 ml H_2O), stirred and sections were immersed; then 1,3 ml acetic anhydride was added dropwise over the sections and again washed three times with PBS for 5 minutes each.

2.3.2.3 Pre-hybridization, Hybridization and Washing of Tissue Sections

In situ hybridization histochemistry was performed (269) using RNA-digoxigenin probes for growth factor BDNF and its receptor trkB, as well as the neurotrophic factor HGF. The coding sequence for these factors were selected with Genbank : BDNF (Gene ID 12064), trkB (Gene ID 18212) and HGF (Gene ID 18212). Two slides of each group were selected for each probe.

Prehybridization was performed at room temperature with 500 μl hybridization solution (50% formamide, 5 x SSC (NaCl and sodium citrate at pH 7), 5 x Denhardtts, 0,5mg/ml salmon sperm DNA) on each slide, which were then incubated at room temperature in a humidified horizontal chamber for 2 hours without coverslips. The hybridization mixture was prepared by adding DIG-cRNA to the hybridization solution, then heated for 5 min at 80°C to denature the probe and chilled on ice. The prehybridization solution was removed and 105 μl of hybridization mixture (100 μl Hybridization solution and 5 μl RNA probe) was spread over the sections with parafilm. The sections were covered with siliconized coverslips (care was taken to avoid air bubbles) and sealed with Rubber Cement (Sanford, Bellwood, Ill., USA), which helps to maintain the concentration of salt and formamide in the hybridization buffer. The hybridization was done overnight at 72°C in a 5 x SSC humidified chamber. Slides were

washed by immersion in 5 x SSC at 72°C and the coverslips were allowed to slide off. Washing was performed in 0.2 x SSC at 72°C for 45 minutes twice and then the sections were adjusted to room temperature in 0.2 x SSC for 5 minutes.

2.3.2.4 Immunological Staining

Slides were transferred in buffer B1 (0.1M Tris pH 7.5 and 0.15M NaCl) for 5 minutes at room temperature. 1 ml of B1 with 10% Heat Inactivated Goat Serum (HINGGS) was then placed on horizontal slides at room temperature for 1h. Slides were then incubated overnight in 4°C humidified chamber with 1 ml anti-DIG antibody (1:5000 dilution in B1 and 1% HINGGS ; buffer B2) per slide. Slides were rinsed with buffer B1 for 5 minutes, three times and pH was equilibrated in buffer B3 (0.1M Tris pH 9.0, 0.1M NaCl and 50 ml MgCl₂) for 5 minutes.

To perform the colour reaction, slides were placed upside-down in a tray with 500 ul buffer B4 (2.4 ul levamisol, 3.5 ul BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 50 mg/ml in dimethyl formamid), 3.4 ul NBT (4-nitroblue tetrazolium chloride, 75 mg/ml in 70% dimethylformamide), and B3 buffer) per slide to block endogenous phosphatase activity. The buffer was prevented from contacting the air by placing a parafilm sheet over the surface to avoid the formation of nonspecific precipitate due to oxidation of the substrate. The colour reaction was performed in the dark and stopped by changing to buffer B5 (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) when the desired intensity was reached. Slides were washed with H₂O to remove coverslips and sections were mounted in DAKO glycergel.

2.3.3 Data analysis

Under microscope (Olympus BX-43) with an INFINITY2-1RM Lumenera camera, pictures of the lumbar spinal cord cuts were taken for all 3 probes, for the 5 groups at the 4 different timepoints and analyzed with The INFINITY Capture program.

2.4 Results

2.4.1 BDNF expression in murine lumbar motoneurons

2.4.1.1 BDNF expression following axotomy

In normal mice, BDNF is not expressed in the motoneurons of the lumbar spinal cord. The Sham group also does not present BDNF expression in the motoneurons at any timepoint. However, in the Axotomy group, BDNF is expressed in the ventral horns of the lumbar spinal cords at day 3. The expression is maintained at day 7 and starts wearing off at day 14 (see Figure 2.1).

2.4.1.2 BDNF expression following direct and transcutaneous electrical stimulation

After direct electrical stimulation, BDNF expression is seen as soon as day 1 and is maintained throughout day 3 and day 7. Expression is still present at day 14, but is wearing off. The TC group replicates the findings of the Direct group for each timepoint (see Figure 2.1).

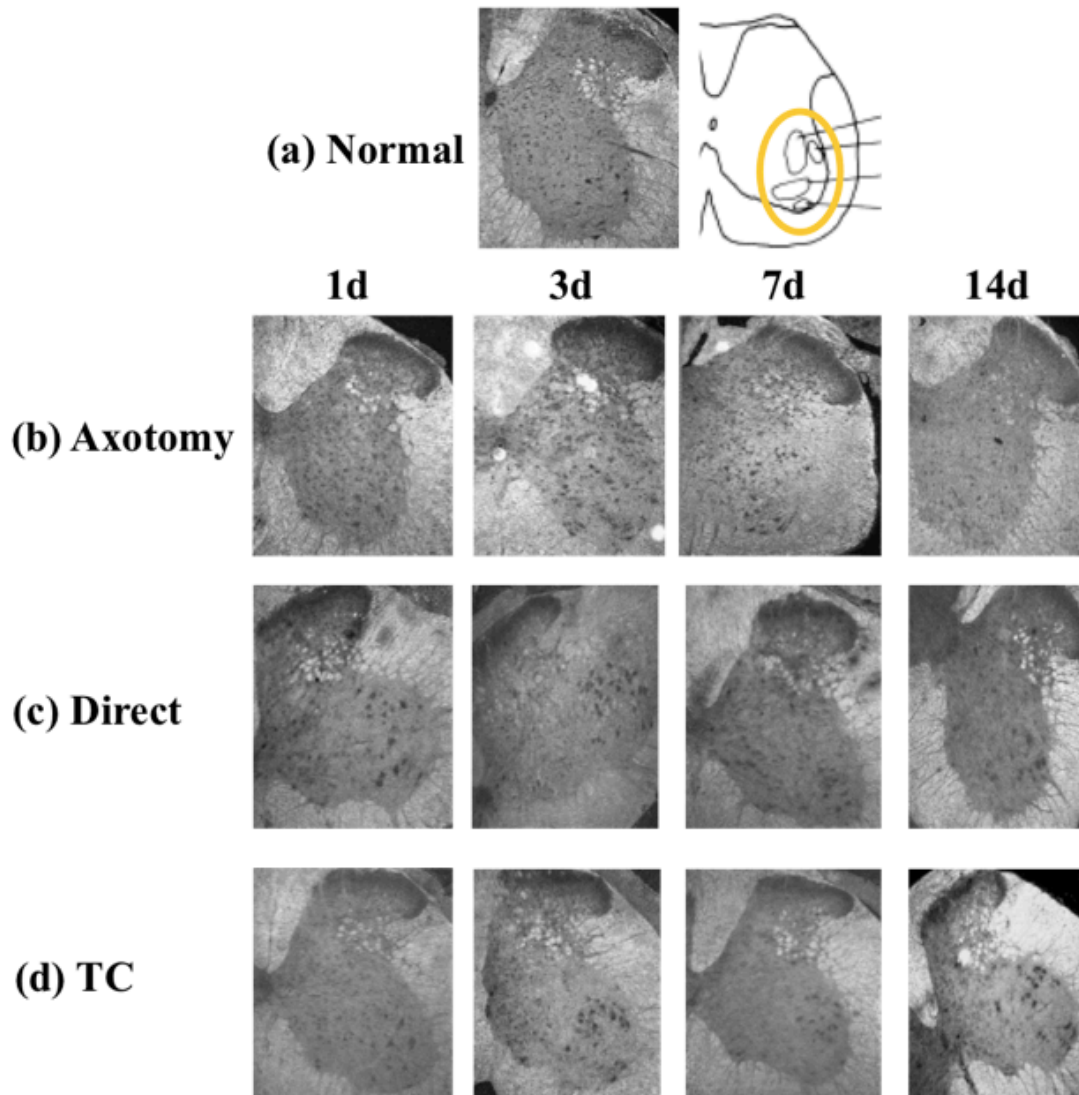


Figure 2.1 BDNF expression in murine lumbar motoneurons, in normal mice, following axotomy and following direct and transcutaneous (TC) electrical stimulation at different timepoints (1, 3, 7 and 14 days post-intervention). (a) The normal lumbar spinal cord is compared to the ipsilateral lumbar spinal cord (270) illustrating the localization of the motoneurons in the ventral horn. There is no expression of BDNF in normal mice motoneurons. (b) Following axotomy, BDNF is expressed from day 3 to day 7 with gradual decline at day 14. (c) Following direct electrical stimulation, BDNF expression is observed as soon as day 1 and is maintained until day 7. (d) Findings following transcutaneous electrical stimulation replicate those from direct electrical stimulation.

2.4.2 TrkB expression in murine lumbar motoneurons

2.4.2.1 TrkB expression following axotomy

Expression of trkB is seen throughout the normal murine lumbar spinal cord. The same is observed in the Sham group for all timepoints. However, this expression is increased 3 days following axotomy of the sciatic nerve and slowly returns to baseline levels at day 7 and 14 (see Figure 2.2).

2.4.2.2 TrkB expression following direct and transcutaneous electrical stimulation

Results for the Direct and TC groups can be overlapped. TrkB expression is seen as soon as day 1 in the ventral horns of the lumbar spinal cord. Expression of trkB remains specific to the motoneurons of the ventral horns through day 3 to 14, although slowly decreasing in intensity (see Figure 2.2).

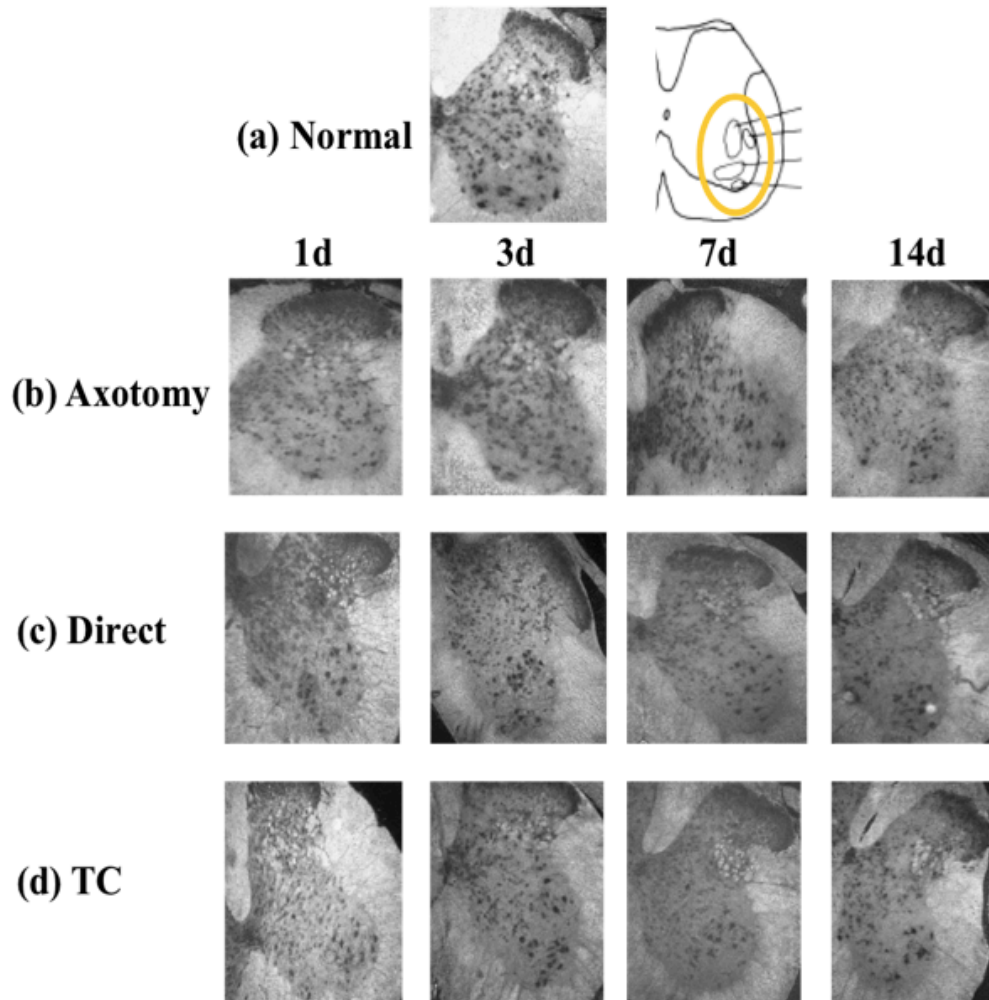


Figure 2.2 TrkB expression in murine lumbar motoneurons, in normal mice, following axotomy and following direct and transcutaneous (TC) electrical stimulation at different timepoints (1, 3, 7 and 14 days post-intervention). (a) The normal lumbar spinal cord is compared to the ipsilateral lumbar spinal cord (270) illustrating the localization of the motoneurons in the ventral horn. TrkB is expressed throughout the normal murine lumbar spinal cord. (b) Following axotomy, trkB expression is increased at day 3 and returns to baseline levels at day 7 and 14. (c) TrkB expression is seen as soon as day 1 in the ventral horns of the lumbar spinal cord and remains specific to the motor neurons of the ventral horns through day 3 to 14, although slowly decreasing in intensity. (d) Findings following transcutaneous electrical stimulation replicate those from direct electrical stimulation.

2.4.3 HGF expression in murine lumbar motoneurons

2.4.3.1 HGF expression following axotomy

In a normal murine lumbar spinal cord, HGF expression is seen in both the interneurons and the motor neurons. In the Sham group, HGF expression replicated the expression of the Normal group. In the Axotomy group, HGF expression 1 and 3 days following nerve laceration and repair is similar to that of a normal mouse. However, at days 7 and 14, expression becomes localized to the motor neurons in the ventral horns (see Figure 2.3).

2.4.3.2 HGF expression following direct and transcutaneous electrical stimulation

One day following both direct and transcutaneous electrical stimulation, HGF expression is decreased in the interneurons and becomes localized to the motoneurons in the ventral horn. This expression is maintained through days 3 to 7 and levels start dropping off at day 14 (see Figure 2.3).

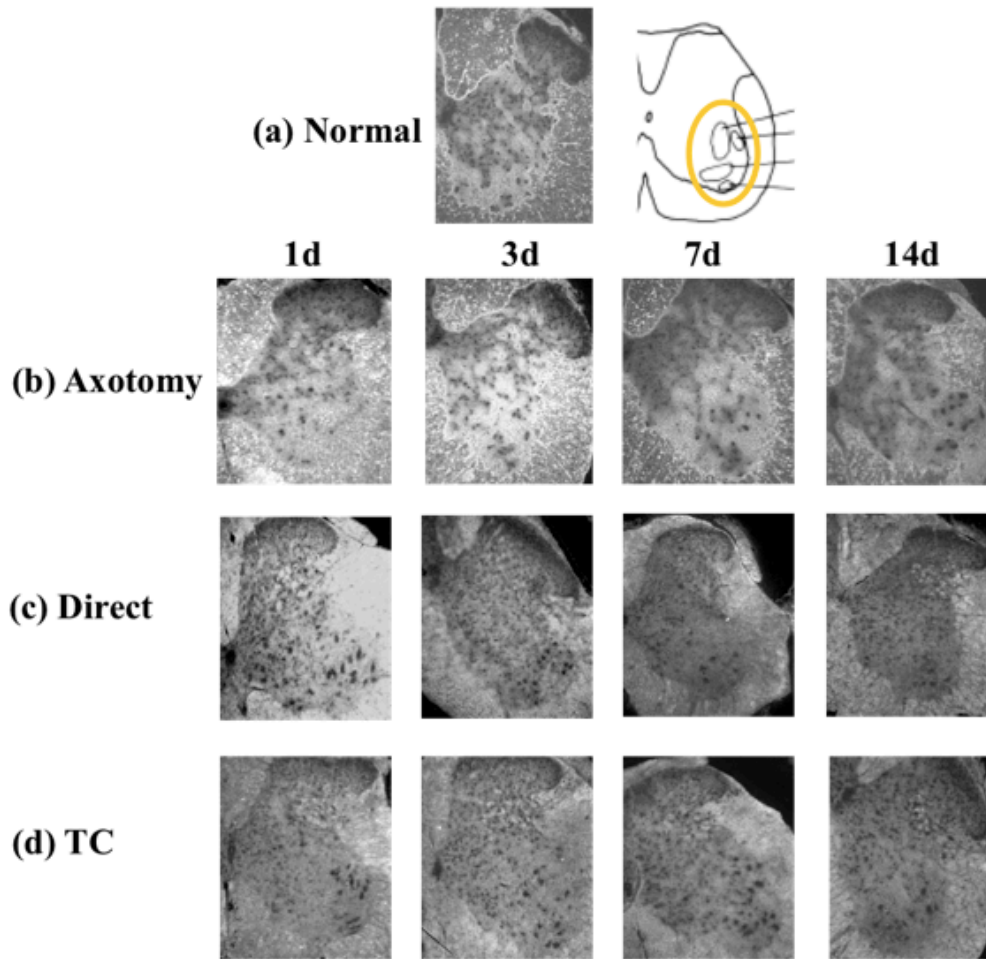


Figure 2.3 HGF expression in murine lumbar motoneurons, in normal mice, following axotomy and following direct and transcutaneous (TC) electrical stimulation at different timepoints (1, 3, 7 and 14 days post-intervention). (a) The normal lumbar spinal cord is compared to the ipsilateral lumbar spinal cord (270) illustrating the localization of the motoneurons in the ventral horn. In a normal murine lumbar spinal cord, HGF expression is seen in both the interneurons and the motor neurons. (b) Following axotomy, HGF expression is similar to that of a normal mouse. However, at days 7 and 14, expression becomes localized to the motor neurons in the ventral horns. (c) HGF expression is decreased in the interneurons and becomes localized to the motoneurons in the ventral horn day 1 following direct electrical stimulation. This expression is maintained through days 3 to 7 and levels start dropping off at day 14. (d) Findings following transcutaneous electrical stimulation replicate those from direct electrical stimulation.

2.5 Discussion

Normal nerve regeneration following injury depends on a coordinated growth factor response to allow appropriate neural tissue repair. The ability to accelerate this process necessitates extensive understanding of the complex regulatory events that lead to nerve regeneration. Among these aspects, a thorough mapping of the finely regulated growth factor expression and cascade represents a mandatory step. In this study, we have shown that the expression of BDNF and *trkB*, factors involved in peripheral nerve regeneration, is altered following axotomy and that this change occurs earlier following electrical stimulation. We have also demonstrated that HGF expression was found in the ventral horns of the spinal cord following adult peripheral nerve injury. Moreover, this expression occurred earlier if the sciatic nerve was electrically stimulated post-injury. Lastly, we have shown that the accelerated expression of BDNF, *trkB* and HGF following electrical stimulation was found in both direct and transcutaneous groups, suggesting that both forms of electrical stimulation induce similar changes at the level of the spinal cord.

2.5.1 BDNF and *trkB*

2.5.1.1 BDNF and *trkB* following axotomy

Our studies demonstrate that BDNF and *trkB* were present at low levels in normal murine sciatic motoneurons and increased after axotomy. These factors were also found to be expressed in other rodent motoneurons, such as rat sciatic, femoral and facial motoneurons following injury (66, 149, 150, 173, 271). We have observed an increase in BDNF and *trkB* expression in spinal motoneurons as soon as 3 days after sciatic nerve axotomy, which is comparable to the results of Kobayashi et al. (150) in the facial axotomized motoneurons and Piehl et al. (173) and Funakoshi et al. (149) in the sciatic axotomized motoneurons, reporting upregulation at days 2 and 3. Al-Majed et al. (157) found that BDNF upregulation occurred at 7 days following femoral nerve axotomy in rats. However, they also observed a decline in BDNF and *trkB* expression by day 14, which is slightly later than the 7 days reported in previous studies (149, 150).

Our results showing increased *trkB* expression is in accordance with study results from Al-Majed et al. (157) and Piehl et al. (166). The upregulation of BDNF by regenerating motoneurons is associated with an increase in expression of its receptor *trkB* 3 days after axotomy. *TrkB* expression then declines by 2 weeks post-injury, as has been described in other studies (149, 150, 182).

2.5.1.2 BDNF and *trkB* following electrical stimulation

Spinal motoneuron expression of BDNF and its receptor, *trkB*, has previously been studied in order to determine how electrical stimulation promotes regenerating axonal growth (157). Both these molecules have been shown to be upregulated by direct electrical stimulation of the proximal nerve stump in a rat sciatic nerve laceration model. This was associated with an acceleration in nerve regeneration. However, the clinical applicability of using direct peripheral nerve stimulation after nerve repair is limited due to the many logistic and efficiency constraints associated with prolongation of the operating room time required to administer this treatment. The ability to provide electrical stimulation through a transcutaneous approach would allow the patient to be able to undergo such treatment outside of the operating room setting. Our group has previously shown that transcutaneous electrical stimulation at 20 Hz for 1h is as equally able to accelerate the functional recovery of mice following sciatic nerve laceration and repair as does direct electrical stimulation (272). However, the pathways through which this occurred had not been determined.

In this study, we have measured the expression of the different growth factors involved in nerve tissue repair. An upregulation of BDNF and *trkB* was observed in both transcutaneous and direct electrical stimulation groups as soon as day 1 post-intervention, with a slow decline at day 14. Our results are in line with the increase in BDNF and *trkB* levels observed in motoneurons 2 days after direct electrical stimulation by Al-Majed (157). Our findings suggest that this event occurs as early as 24 hours after electrical stimulation, which is earlier than previously thought.

Using *in situ* hybridization, we demonstrated that continuous electrical stimulation, either directly on the nerve or transcutaneous stimulation at 20 Hz for 1 hour accelerates the expression of BDNF and its receptor trkB in sciatic motoneurons, from 3 days to 1 day post-intervention (Figures 2.1 and 2.2). Expression of these factors therefore occurs earlier in electrically stimulated groups than in non-stimulated groups, confirming results of previous studies (157).

2.5.1.3 BDNF mechanism of action

BDNF is present not only in the peripheral nerve with a predominant expression after axon injury (149, 162), but also in the spinal cord (273-275). Axotomized motoneurons expressing both BDNF and trkB, therefore, both the neurotrophic factor and its receptor, suggests that BDNF exerts an autocrine effect in motoneurons after axon injury, providing trophic support after axotomy and target deprivation (150). The increase in trkB expression in axotomized motoneurons may enhance their responsiveness to BDNF (66). Such autocrine actions have also been proposed for BDNF in cortical neurons (276) and dorsal root ganglion cells (277, 278). It has also been suggested that this autocrine mechanism is increased by electrical stimulation, which increases neuronal signalling of trkB and BDNF (157, 279). Therefore, electrical stimulation, through cell membrane depolarization, activates a signal transduction pathway accelerating and enhancing the expression and externalisation of BDNF and trkB in axotomized motoneurons (280, 281).

The mechanism by which electrical stimulation induces the BDNF and trkB signalling pathway is not entirely understood (240). However, it is known that electrical activity causes membrane depolarization, increasing calcium (Ca^{2+}) influx, which activates Ca^{2+} -dependent adenylate cyclase (282), which in turn increases intracellular cyclic AMP (cAMP) (283, 284). Elevated intracellular cAMP has been shown to be a potent stimulator of axonal regeneration *in vivo* (285-287). It has been found to activate protein kinase A (PKA), which in turns activates cAMP response element-binding (CREB) protein, triggering the transcription of actin and tubulin, which are necessary for cytoskeletal assembly of regenerating axon. Through activation of PKA, cAMP also promotes neurite outgrowth by inhibiting RhoA (Ras homolog gene family member A), a protein that prevents cytoskeletal assembly (65, 70, 157,

239). Intracellular cAMP has also been found to overcome the inhibitory effect of myelin-associated glycoproteins (MAG) on axonal growth in the distal nerve stump (65, 160, 288).

Electrical stimulation induced Ca^{2+} influx has also been shown to bind Ca^{2+} response element (CRE) within the BDNF gene, triggering phosphorylation of CREB via Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV (CaM kinase IV) and activating BDNF transcription (242-244), therefore upregulating BDNF expression. Adjacent to the CRE, the BDNF Ca^{2+} response element (BCARE) was also found to mediate BDNF transcription (242, 244).

Other pathways have been found to be involved in BDNF and trkB upregulation, but are still not completely understood. They include the Ras-Erk and the PI3K/Akt pathways, respectively promoting embryonic motoneuron differentiation through choline acetyltransferase (ChAT), and survival of embryonic motoneurons and neuronal regeneration (88, 108, 241, 289).

2.5.2 HGF

2.5.2.1 HGF following axotomy

Our data demonstrate a constitutive expression of HGF throughout the spinal cord of normal mice. HGF expression in the spinal cords has also been reported by Hashimoto et al. (202), while studying HGF expression in adult lumbar spinal cords after sciatic nerve crush by ligation. However, crush injury to the sciatic nerve did not modify HGF expression. This suggests that the nature of the peripheral nerve lesion is important in the tissue repair mechanism that is engaged.

Indeed, nerve ligation is a crush injury, 2nd degree nerve injury, which is a less severe nerve lesion (4, 12, 39-41) than a complete 5th degree nerve transection (9, 12, 14, 15, 39, 51-53). Since crush injuries maintain the integrity of the perineurium and epineurium, the distal cytoskeletal architecture and Schwann cell basal lamina remain intact, providing neurotrophic support and a physical guide for the proximal axonal ends (45-47). Thus, a crush lesion might require less neurotrophic upregulation than a nerve axotomy. The type of nerve injury used in

our study was a sciatic nerve transection, a 5th degree nerve injury (neurotmesis), which is a severe nerve lesion with complete dissociation of the axon from the cell body. This implies that there is no cytoskeletal architecture in continuity that would provide guidance for the regenerating axons and no basal lamina Schwann cells to promote nerve regeneration. Therefore, an axotomy injury might require increased neurotrophic upregulation post-injury compared to a crush injury, since the entire architectural support has to be rebuilt and Schwann cells have to be recruited to improve regeneration. The cause of the delayed upregulation of HGF in the motorpools up to one week post-axotomy is however unknown. It will be most interesting to investigate in future studies the underlying events leading to HGF expression in the ventral horns of the spinal cord at day 7 after axotomy and maintenance of this expression up to 14 days post-intervention.

The constitutive expression of HGF in normal spinal cord might indicate that a baseline level of HGF is required for normal neuronal function. The specific localisation of HGF expression to the motorpools of the lumbar spinal cord (270) following nerve injury, may indicate that a targeted upregulation of HGF in the affected motoneurons is required to promote axonal regeneration.

2.5.2.2 HGF following electrical stimulation

Spinal motoneuron expression of HGF following direct and transcutaneous electrical stimulation had not been studied previously. Our data demonstrated a faster localization of HGF expression to the motoneurons in the ventral horns of the stimulated spinal cord compared to the axotomy only groups, as expression could already be found at day 1. Expression was maintained for 2 weeks before a progressive decline in HGF levels was observed (Figure 2.3). These results were comparable in both the direct and the transcutaneous electrical stimulation groups, suggesting they act through the same, or a similar, pathway of induction for HGF signalling.

Our findings are crucial to optimize the administration of electrical stimulation. Indeed, electrical stimulation through a direct approach implies that the stimulation probes are in

direct contact with the proximal nerve stump. In order to achieve this, the subject requires an extra hour of stimulation in the operating room, prolonging operating time and increasing the risk for infection. However, electrical stimulation using a transcutaneous approach would simplify its administration since the stimulation probes are applied to the skin, proximal to the laceration site. This type of electrical delivery would allow shorter operating or recovery room time, decreasing infection risk and improving cost-effectiveness. Its administration would also be technically easier, less invasive, and would improve its availability.

Since electrical stimulation has already been shown to improve functional recovery with either direct and transcutaneous modalities with no statistical difference (272), our results demonstrating a consistency in molecular pattern of expression of BDNF, trkB and HGF in both groups of electrical stimulation also support the use of transcutaneous electrical stimulation as a less invasive and as effective method of improving nerve regeneration through electrical stimulation.

2.5.2.3 HGF mechanism of action

HGF and its receptor c-Met have been found in the developing and mature central nervous system (195-200), but few reports have described their expression in the peripheral nervous system (194). Their role in the signalling pathway in the adult peripheral nervous system has yet to be established. It has been suggested that HGF, using its unique receptor c-Met, may perform a function similar to neurotrophic factors, such as Nerve growth factor (NGF), BDNF and Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), which promote neuronal survival and regeneration of injured nerves via autocrine or paracrine mechanisms through their receptor (201-203). HGF has been shown to act synergistically with Ciliary neurotrophic factor (CNTF) to promote motor neuron survival (189), and with NGF to promote sensory neuron survival and outgrowth of sensory and sympathetic axons (189, 204, 205). These findings suggest that there must be a convergence among the downstream signalling pathways of Met and of the CNTF receptor and the NGF receptor (trkA). Indeed, these receptors share some downstream effectors, including phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), phospholipase C γ (PLC γ), signal transducer and activator of transcription proteins (STATs) and the Ras/MAPK pathway.

The neurogenic effects of HGF and its receptor c-Met on signalling that have been found so far include the binding of HGF to its receptor c-Met, activating effectors in the cytoplasm through a multifunctional docking site (290). In non-neuronal cells, c-Met binding can activate multiple signalling pathways such as the Ras/MAP kinase and JNK/SAP kinase pathways via Grb2 and Gab1, phospholipid pathways through binding of PI3K and PLC γ , phosphotyrosine-mediated pathways through interaction with Src tyrosine kinase, SHP2 tyrosine phosphatase, Nck and the STAT pathway (290-293). It is unclear, however, which of these signalling pathways are involved in motoneuron survival and axonal growth (189).

According to our results, BDNF is expressed at low levels in a normal spinal cord. HGF is also constitutively expressed throughout the lumbar spinal cord. Following peripheral nerve axotomy, increased BDNF expression is seen at day 3, while HGF expression is seen at day 7. This might suggest that HGF is involved in later stages of the regeneration cascade. Following electrical stimulation however, both BDNF and HGF expression is seen at day 1 post-intervention, either direct or transcutaneous. Since there is no delay between the time of expression of the 2 factors, this might suggest that the electrical stimulation causes a change in the molecular sequence of events at the level of the cell body that alters timing of involvement of BDNF and HGF, and therefore their impact on nerve regeneration and functional recovery. This finding is particularly important since it suggests that an alteration in the sequence of events rather than their expression level would enhance their tissue repair potential. Other factors involved in nerve regeneration and their expression following electrical stimulation would have to be studied in order to furthermore elucidate the molecular sequence of events of peripheral nerve regeneration.

2.6 Conclusion

Our results confirm an accelerated expression of BDNF and trkB in the spinal cord following direct electrical stimulation. This increase in expression was also present following transcutaneous electrical stimulation. In addition, our results suggest a role for HGF in adult peripheral nerve regeneration. We demonstrated a localization of HGF expression to the

motoneurons in the ventral horns of the spinal cord after sciatic nerve axotomy. This specific localization of expression was accelerated when the nerve was electrically stimulated in both the direct and transcutaneous stimulation groups.

Our data has identified another potential molecular pathway that might be involved in peripheral nerve regeneration. Changes in expression of BDNF, trkB and HGF also occurred faster following electrical stimulation, either direct or transcutaneous. Our findings suggest that electrical stimulation has a direct impact on neurotrophic factor expression and their effect on peripheral axonal regeneration acceleration. Therefore, electrical stimulation following peripheral nerve injury is a very promising and concrete approach to promoting nerve regeneration in human patients.

2.7 Acknowledgements

We would like to thank Michel Paquet and Meirong Liang for their technical assistance. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Fonds de recherche J.A. de Sève de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. A.A.Roy was supported by the Fonds de recherche en santé du Québec (FRSQ) and the Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal (FESP).

2.8 Disclosure

Authors report no conflict of interest.

CHAPITRE 3

3. Discussion

La régénération nerveuse normale suite à une axotomie dépend d'une réponse des facteurs de croissance qui nécessite une coordination exacte afin de permettre la réparation adéquate des tissus neuronaux. L'accélération de ce processus nécessite une compréhension extensive des événements régulateurs complexes qui mènent à la régénération nerveuse. Parmi ces aspects, une cartographie approfondie de la régulation précise de l'expression et de la cascade des facteurs de croissance représente une étape cruciale. Dans cette étude, nous avons démontré que l'expression de BDNF et *trkB*, des facteurs impliqués dans la régénération nerveuse périphérique, est altérée suite à une axotomie et que cette altération se produit plus tôt suite à la stimulation électrique. Nous avons aussi démontré que l'expression de HGF est retrouvée dans les cornes ventrales de la moelle épinière suite à une atteinte nerveuse périphérique chez la souris adulte. De plus, cette expression se produit plus tôt si le nerf sciatique est stimulé électriquement suite au traumatisme. Finalement, nous avons démontré que l'accélération de l'expression de BDNF, *trkB* et HGF suite à la stimulation électrique était retrouvée autant dans les groupes directs que transcutanés, démontrant ainsi le potentiel de la stimulation électrique transcutanée, une approche plus facile et moins invasive afin de promouvoir la régénération nerveuse par la stimulation électrique.

3.1 BDNF et *trkB*

3.1.1 BDNF et *trkB* suite à l'axotomie nerveuse

Nos résultats démontrent que BDNF et *trkB* sont faiblement détectés dans les motoneurones sciatiques d'une souris normale et augmentés suite à l'axotomie. Ces facteurs étaient aussi exprimés dans les motoneurones d'autres rongeurs, tels que les motoneurones des nerfs sciatiques, fémoraux et faciaux chez le rat (66, 149, 150, 173, 271). Le timing de cette expression de facteur demeure un sujet de débat. Nous avons visualisé une augmentation de l'expression de BDNF et *trkB* dès le troisième jour suivant l'axotomie, ce qui est comparable

aux résultats d'axotomie des motoneurones faciaux de Kobayashi et al. (150) et sciatiques de Piehl et al. (173) et Funakoshi et al. (149), qui rapportent une augmentation d'expression aux jours 2 ou 3. Toutefois, Al-Majed et al. (66) ont rapporté une augmentation de l'expression beaucoup plus tardive, à 7 jours suivant l'axotomie du nerf fémoral chez le rat. Cette augmentation était cependant transitoire. De plus, ils ont observé un déclin à partir du jour 14, ce qui était légèrement plus tard que les études précédentes (149, 150).

L'expression de trkB de notre étude est comparable à celle des études de Al-Majed et al. (66) et Piehl (173). L'augmentation de BDNF par les motoneurons qui régénèrent est associée à l'augmentation d'expression de son récepteur trkB 3 jours suivant son axotomie. L'expression de trkB diminue après 14 jours, tel que précédemment décrit (149), (150), (182).

3.1.2 BDNF et trkB suite à la stimulation électrique

L'expression de BDNF et de son récepteur trkB dans les motoneurones spinaux était étudiée afin d'identifier la façon dont la stimulation électrique favorise la régénération axonale. Nous avons aussi utilisé cette stratégie afin d'investiguer une approche alternative qui permettrait une application clinique plus grande. En effet, la stimulation électrique directe des nerfs périphériques offre un processus expérimental fiable et robuste, mais son usage clinique est limité par plusieurs contraintes d'efficacité et de logistique associées à la prolongation du temps opératoire ou en salle de réveil afin d'administrer ce traitement. La possibilité de fournir une stimulation électrique par approche transcutanée changerait complètement la suite des choses. En effet, le patient pourrait recevoir un tel traitement à l'extérieur du cadre extrêmement confiné de la salle d'opération ou de la salle de réveil. La stimulation électrique transcutanée doit toutefois être investiguée de façon intensive afin d'assurer qu'elle offre la même promesse de succès. Ceci ne peut être atteint que si les résultats finaux moléculaires et cliniques sont surveillés attentivement. Notre modèle murin fournit un cadre idéal afin d'investiguer cette approche prometteuse. En effet, nos souris C57BL/6 femelles ont fourni un modèle animal adulte constant et les chirurgies ont été effectuées sous la visualisation directe des 2 mêmes résidents de chirurgie plastique, utilisant des techniques de neuroraphie microchirurgicale établies, assurant ainsi la constance de la nature des lésions et de leur

réparation. L'environnement contrôlé des expériences d'ISH, exécutées par une seule technicienne, confirme davantage la validité de nos résultats. De plus, nos résultats sont observés de façon constante chez notre modèle, confirmant la reproductibilité de notre procédure et de nos observations.

Afin de déterminer si la stimulation électrique transcutanée produit les mêmes effets biologiques que la stimulation électrique directe, nous avons évalué l'expression de différents facteurs de croissance impliqués dans la réparation tissulaire nerveuse. Une augmentation de l'expression de BDNF et trkB a été observée dans chacun des groupes de stimulation électrique, que ce soit directe ou transcutanée, dès le jour 1 suivant l'intervention, avec un déclin lent jusqu'au jour 14. Nos résultats correspondent à l'augmentation de BDNF et trkB observée dans les motoneurons 2 jours suivant la stimulation électrique directe décrite par Al-Majed (153). Nos résultats suggèrent que cette augmentation survient aussi tôt que 24h suivant la stimulation électrique, soit encore plus rapidement que ce qui avait été précédemment décrit.

À l'aide d'hybridation *in situ*, nous avons confirmé que la stimulation électrique, autant directe que transcutanée, à 20 Hz pour une heure accélère l'expression de BDNF et de son récepteur trkB dans les motoneurons du nerf sciatique de 3 jours à 1 jour suivant l'intervention (se référer aux Figures 2.1 et 2.2). L'expression de ces facteurs se produit donc plus tôt dans les groupes stimulés électriquement que dans les groupes non-stimulés, ce qui confirme les résultats d'études antérieures (157). Cette accélération n'est pas aussi marquée que celle rapportée par Al-Majed, Brushart et Gordon (157) qui démontraient une expression maximale passée de 7 jours à 2 jours post stimulation électrique. Ceci est expliqué par le fait que notre moment d'expression post-axotomie était aussi tôt qu'au jour 3, comparé au jour 7 dans le groupe d'Al-Majed (153). Étant donné, qu'ils n'avaient pas étudié le jour 3, ils pourraient avoir manqué l'augmentation que nous avons pu observer et donc leur accélération peut sembler plus grande. Ces résultats renforcent l'implication de BDNF et trkB dans la régénération nerveuse périphérique (66) et suggèrent leur lien à l'accélération de cette régénération par la stimulation électrique. La période de stimulation électrique continue d'une heure a accéléré la traversée des motoneurons régénérés à travers le site d'axotomie (65, 66,

157, 158, 160, 239) et a aussi accéléré l'expression de BDNF (157). Ceci démontre une corrélation entre l'expression de BDNF et trkB dans les motoneurones stimulés électriquement et l'accélération de la régénération des motoneurones (66). Étant donné que BDNF, par son récepteur trkB, promouvoit la survie des motoneurones, la croissance axonale (165-167, 169) et la formation de myéline des cellules de Schwann (169, 171), ce facteur exprimé plus tôt suggère une accélération de la régénération nerveuse, ce qui pourrait jouer un rôle dans une régénération fonctionnelle plus rapide suite à une atteinte nerveuse périphérique.

De plus, l'expression de BDNF et trkB était aussi augmentée suite à une heure de stimulation électrique transcutanée à 20 Hz, suivant ainsi le même schéma d'expression que la stimulation électrique directe. Ceci suggère que cette modalité de stimulation électrique pourrait potentiellement être utilisée de façon interchangeable avec la stimulation électrique directe puisque leur impact sur l'expression des facteurs de croissance est comparable. Effectuer la stimulation transcutanée dans un cadre moins astreignant que celui de la salle d'opération représente un avantage majeur à la stimulation électrique directe en termes d'applicabilité clinique et d'utilisation à grande échelle.

3.1.3 Mécanisme d'action de BDNF

BDNF est présent non seulement dans les nerfs périphériques où il est exprimé de façon prédominante suivant une lésion axonale (149, 162), mais aussi dans la moelle épinière (273-275). Les motoneurones qui subissent une axotomie expriment autant BDNF que trkB, donc autant le facteur neurotrophique que son récepteur. Ceci suggère que BDNF exerce un effet autocrine suivant la lésion axonale afin de fournir un support trophique suite à l'axotomie et la privation de la cible (150). L'expression accrue de trkB dans les motoneurones axotomisés pourrait augmenter leur réponse à BDNF (66). Ces actions autocrines ont aussi été proposées comme étant impliquées dans l'expression de BDNF dans les neurones corticaux (276) et les ganglions spinaux (277, 278). Ce mécanisme autocrine est aussi supposément encouragé par la stimulation électrique, qui à son tour augmente la signalisation neuronale de BDNF et trkB (157, 279). Ainsi, la stimulation électrique, grâce à sa dépolarisation de la membrane cellulaire, active la voie de transduction du signal et augmente l'expression et l'externalisation

de BDNF et trkB dans les motoneurones axotomisés (280, 281).

Tel que décrit à la section 1.4.2, le mécanisme par lequel la stimulation électrique active la voie de transduction du signal de BDNF et trkB n'est pas complètement élucidé (240). Toutefois, il est établi que l'activité électrique cause une dépolarisation de la membrane cellulaire, ce qui augmente l'influx de calcium (Ca^{2+}), activant l'adénylate cyclase dépendant au calcium (Ca^{2+} -dependent adenylate cyclase) (282), ce qui augmente l'AMPc (283, 284). L'augmentation intracellulaire d'AMPc a été démontrée comme étant un stimulateur puissant de la régénération axonale *in vivo* (285-287). Il a été prouvé que l'AMPc active la PKA, qui à son tour active la protéine CREB. Cette dernière déclenche la transcription de l'actine et de la tubuline, qui sont nécessaires à l'assemblage du cytosquelette des axones qui régénèrent. Grâce à l'activation de PKA, l'AMPc encourage aussi la croissance des neurites en inhibant RhoA, une protéine qui empêche l'assemblage du cytosquelette (se référer à la Figure 1.6) (65, 70, 157, 239). Il a aussi été démontré que l'AMPc réussit à surmonter l'effet inhibiteur des MAG sur la croissance axonale dans la partie distale du nerf lésé (65, 160, 288).

Il a aussi été établi que l'influx de Ca^{2+} intracellulaire causé par la stimulation électrique se lie à l'élément de réponse au Ca^{2+} (Ca^{2+} response element, CRE) à l'intérieur du gène BDNF, ce qui déclenche la phosphorylation de CREB par la protéine CaM kinase IV et active la transcription de BDNF (242-244) et donc, l'augmentation de son expression. Adjacent au CRE, l'élément de réponse BCARE a aussi été démontré comme étant un activateur de la transcription de BDNF (242, 244).

D'autres voies de signalisation ont été démontrées comme étant impliquées dans l'augmentation d'expression de BDNF et trkB. Toutefois, celles-ci ne sont pas entièrement élucidées. Elles incluent la voie Ras-Erk ainsi que la voie PI3K/Akt qui, respectivement, favorise la différenciation des motoneurones embryonnaires par l'acétyltransférase choline (choline acetyltransferase, ChAT), et permet la survie des motoneurones embryonnaires et la régénération neuronale adulte (88, 108, 241, 289), tel qu'illustré à la Figure 3.1.

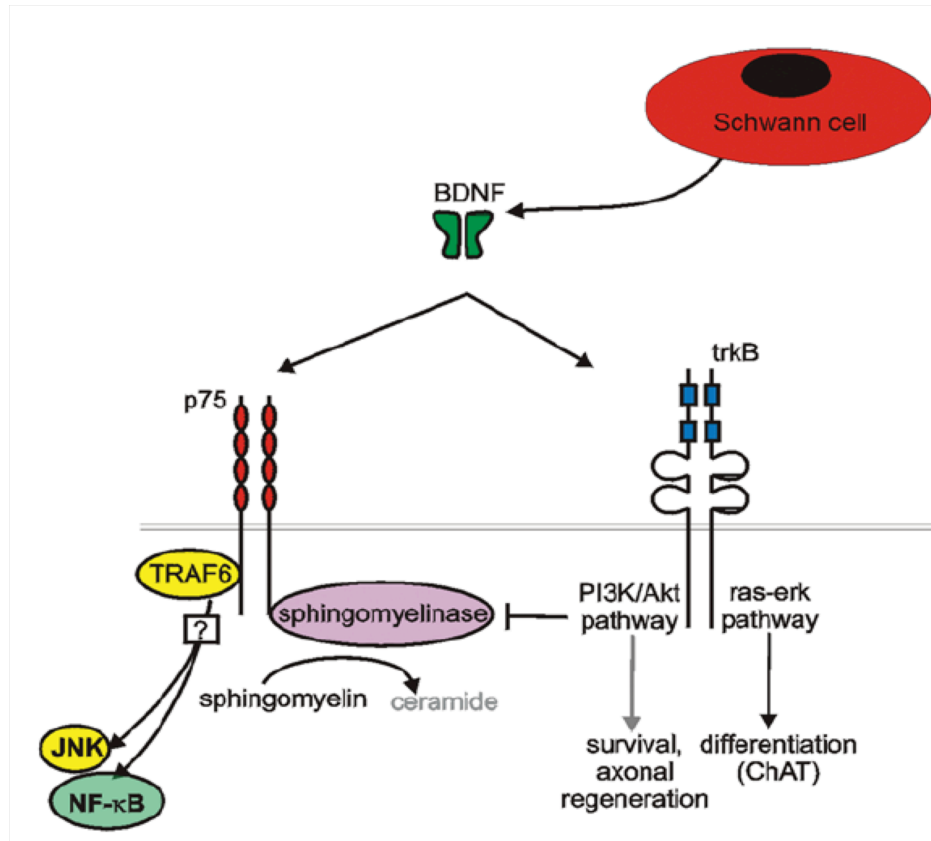


Figure 3.1 Autres voies de signalisation impliquées dans l'augmentation d'expression de BDNF et trkB. Tirée et adaptée de Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Molecular neurobiology*. 2003;27(3):277-324.

3.2 HGF

3.2.1 HGF suite à l'axotomie nerveuse

Nos résultats démontrent une expression constitutive de HGF à travers la moelle épinière de la souris normale. Ces résultats sont comparables à ceux de Hashimoto (202), l'une des rares études étudiant l'expression de HGF dans la régénération axonale périphérique chez l'adulte, par écrasement du nerf sciatique à l'aide de ligature. Toutefois, l'atteinte nerveuse par écrasement n'a pas modifié l'expression de HGF. Ceci suggère que la nature de l'atteinte nerveuse périphérique est importante dans le mécanisme de réparation tissulaire impliqué.

En effet, la ligature du nerf sciatique est une atteinte par écrasement de 2^e degré, donc une lésion nerveuse moins sévère (4, 12, 39-41) qu'une transection nerveuse complète de 5^e degré (9, 12, 14, 15, 39, 51-53). Étant donné qu'une lésion par écrasement maintient l'intégrité du périnerve et de l'épinerve, l'architecture cytosquelettique ainsi que la lame basale des cellules de Schwann demeurent intactes, fournissant ainsi le support neurotrophique et physique à la régénération axonale (45-47). Ainsi, une lésion par écrasement pourrait nécessiter moins de facteurs de croissance axonale que les lésions par transection. Le type d'atteinte nerveuse utilisé dans notre étude était la section complète du nerf sciatique, une atteinte nerveuse de 5^e degré (neurotmèse). Cette lésion nerveuse sévère implique une dissociation complète de l'axone de son corps cellulaire. Ceci implique qu'il n'y a aucune continuité dans l'architecture cytosquelettique afin de guider les axones qui se régénèrent et aucune lame basale des cellules de Schwann afin de promouvoir la régénération nerveuse. Ainsi, une lésion par axotomie pourrait nécessiter une augmentation plus importante des facteurs de croissance qu'une lésion par écrasement, puisque le support architectural doit être entièrement reconstruit et les cellules de Schwann doivent être recrutées afin d'améliorer la régénération. La raison derrière le délai de 7 jours avant la localisation de HGF aux aires motrices suite à l'axotomie nerveuse demeure toutefois inconnue. Dans les études futures, il sera intéressant d'investiguer les événements qui causent l'expression de HGF dans les cornes ventrales de la moelle épinière 7 jours suivant l'axotomie et le maintien de cette expression jusqu'à 14 jours suivant l'intervention.

L'expression constitutive de HGF dans la moelle épinière normale pourrait indiquer qu'un niveau de base de HGF est requis au fonctionnement neuronal. La localisation spécifique de l'expression de HGF aux zones motrices de la moelle épinière (270) suite à la lésion nerveuse pourrait indiquer qu'une augmentation ciblée de HGF dans les motoneurons affectés est nécessaire afin de favoriser la régénération axonale. Les zones motrices contenant les motoneurons de la moelle épinière lombaire murine sont représentées dans la Figure 3.2.

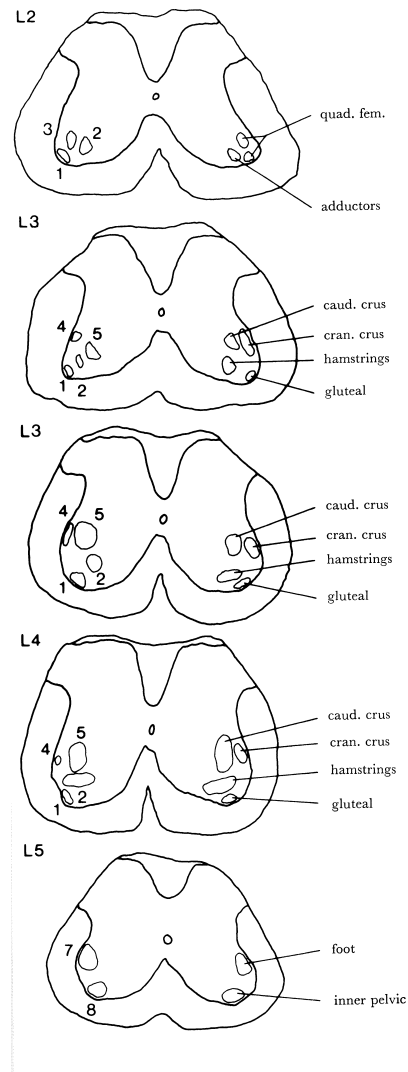


Figure 3.2 Les zones motrices contenant les motoneurones de la moelle épinière lombaire murine. Tirée et adaptée de McHanwell S, Biscoe TJ. The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences. 1981;293(1069):477-508.

3.2.2 HGF suite à la stimulation électrique

L'expression de HGF dans les motoneurones spinaux suite à une stimulation électrique directe ou transcutanée d'une heure à 20 Hz n'a pas été précédemment décrite. À l'aide d'hybridation *in situ*, nos données ont démontré une localisation plus rapide de l'expression de HGF aux motoneurones des cornes ventrales de la moelle épinière. Cette expression était observée dès le premier jour suivant l'intervention. L'expression persistait jusqu'à 2 semaines après

l'intervention avant d'observer une diminution de HGF (se référer à la Figure 2.3). Ces résultats étaient comparables dans les 2 groupes de stimulation électrique, suggérant que les modalités de stimulation directe et transcutanée pourraient agir à travers une voie de signalisation de HGF identique, ou du moins similaire.

Nos résultats sont cruciaux afin d'optimiser l'administration de la stimulation électrique. En effet, la stimulation électrique par approche directe implique que les électrodes de stimulation soient en contact direct avec l'extrémité proximale du nerf. Pour ce faire, le sujet requiert une heure de stimulation électrique supplémentaire dans la salle d'opération ce qui nécessite un environnement spécifique et du personnel formé. Toutefois, la stimulation électrique par approche transcutanée simplifierait l'administration de ce traitement puisque les électrodes de stimulation sont appliquées à la peau, proximal au site de lacération. Ce type d'administration de stimulation électrique permettrait de raccourcir le temps opératoire ou le temps en salle de réveil, ce qui diminue le risque d'infection et améliore le rapport coût-efficacité. Son application serait aussi techniquement plus simple, moins invasive et permettrait une plus grande disponibilité.

L'amélioration de la récupération fonctionnelle par la stimulation électrique a été démontrée autant par approche directe que transcutanée et ce, sans différence statistique (272). Nos résultats indiquent une constance dans les profils d'expression moléculaire de BDNF, trkB et HGF dans les 2 groupes de stimulation électrique et donc démontrent aussi que la stimulation électrique transcutanée est une méthode moins invasive et plus efficace afin d'améliorer la régénération nerveuse par la stimulation électrique.

3.2.3 Mécanisme d'action de HGF

Tel que précédemment décrit dans la section 1.3.4.2.1, HGF et son récepteur c-Met sont retrouvés dans le système nerveux central en développement, ou embryonnaire, ainsi que dans le système nerveux central mature, ou adulte (195-200). Leur expression dans le système nerveux périphérique a toutefois été peu rapporté (194). Leur rôle et leur voie de signalisation dans le système nerveux demeure à être établi. Il a été suggéré que HGF, à l'aide de son

récepteur unique c-Met, pourrait remplir une fonction similaire aux facteurs neurotrophiques, tels que BDNF, NGF et GDNF, qui favorisent la survie neuronale et la régénération des nerfs lésés par des mécanismes autocrine et paracrine via leur récepteur (201-203). Il a été démontré que HGF agit de façon synergique avec CNTF afin de favoriser la survie des motoneurons (189), et avec NGF afin de favoriser la survie des neurones sensitifs et la croissance des axones sensitifs et sympathiques (189, 204, 205). Ces données indiquent une convergence des voies de signalisation de c-Met et de trkA, et les récepteurs de CNTF et NGF. En effet, ces récepteurs partagent des protéines effectrices en aval, tels que PI3 kinase, PLC γ , STATs et la voie de signalisation Ras/MAP kinase (se référer à la Figure 1.5).

Les effets neurogènes de HGF et c-Met sur les voies de signalisation qui ont été décrits jusqu'à présent incluent la liaison de HGF à son récepteur c-Met, activant les protéines effectrices du cytoplasme via un site d'accueil multifonctionnel (multifunctional docking site) (290). Dans les cellules non-neuronales, la liaison de c-Met permet l'activation de nombreuses voies de signalisation, tels que la voie de Ras/MAP kinase, la voie de JNK/SAP kinase (via Grb 2 et Gab1), la voie médiée par les phospholipides (via PI3K et PLC γ), la voie médiée par la phosphotyrosine (via Src tyrosine kinase, SHP2 tyrosine phosphatase et Nck) et la voie des STAT (290-293). Cependant, il est difficile de déterminer quelle voie de signalisation est associée à la survie des motoneurons et à leur régénération (189).

Selon nos résultats, BDNF est exprimé faiblement dans une moelle épinière murine normale. HGF est exprimé de façon constitutive à travers la moelle épinière lombaire. Suite à une axotomie nerveuse périphérique, une expression augmentée de BDNF est visualisée au jour 3, tandis que l'expression de HGF est notée au jour 7. Ceci pourrait suggérer que HGF est impliqué dans les étapes ultérieures de la cascade de régénération. Toutefois, suite à la stimulation électrique, l'expression de BDNF et HGF est observée au jour 1 suivant l'intervention, autant par approche directe que par approche transcutanée. Étant donné qu'il n'y a pas de délai entre les moments d'expression de ces 2 facteurs, ceci pourrait suggérer que la stimulation électrique cause un changement dans la séquence moléculaire des événements au niveau du corps cellulaire qui altérerait le moment d'implication de BDNF et HGF, et donc

leur impact sur la régénération nerveuse et la récupération fonctionnelle. Cette découverte est particulièrement importante puisqu'elle suggère qu'une altération dans la séquence des événements au lieu d'une altération du niveau d'expression des facteurs pourrait améliorer le potentiel de régénération neuronale. D'autres facteurs impliqués dans la régénération nerveuse et leur expression suite à la stimulation électrique devront être étudiés afin d'élucider davantage la cascade des événements menant à la régénération nerveuse périphérique.

CONCLUSION

Nos résultats confirment une accélération de l'expression de BDNF et trkB dans la moelle épinière suite à la stimulation électrique directe d'une heure à 20Hz. Cette augmentation d'expression est aussi présente suite à une stimulation électrique transcutanée. De plus, nos données suggèrent que HGF joue un rôle dans la régénération nerveuse périphérique adulte. Nous avons démontré la localisation de HGF dans les motoneurons présents dans les cornes ventrales de la moelle épinière suite à une axotomie du nerf sciatique murin. Cette spécificité de localisation de l'expression de HGF a été accélérée par la stimulation électrique, autant directe que transcutanée. Afin de documenter l'ampleur de l'accélération de l'expression de HGF, une analyse quantitative de ces données est requise. De plus, afin d'acquérir une meilleure compréhension de la voie de signalisation impliquée dans cette augmentation d'expression neurotrophique suite à une axotomie et une stimulation électrique, l'étude de l'expression du récepteur de HGF, c-Met, est de mise.

Nos données ont identifié une autre voie de signalisation moléculaire potentielle qui serait impliquée dans la régénération des nerfs périphériques. Nous avons aussi démontré que les changements d'expression de BDNF, trkB et HGF se produisent plus rapidement suite à la stimulation électrique, qu'elle soit directe ou transcutanée. Nos résultats suggèrent que la stimulation électrique a un impact direct sur l'expression de facteurs neurotrophiques, ainsi que sur l'effet des facteurs neurotrophiques sur l'accélération de la régénération axonale. Ainsi, la stimulation électrique suite à une lésion nerveuse est une approche prometteuse et concrète afin d'améliorer la régénération nerveuse périphérique chez l'humain.

Les sources documentaires

1. Robinson LR. Traumatic injury to peripheral nerves. *Muscle & nerve*. 2000;23(6):863-73.
2. Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *The Anatomical record*. 2001;263(4):396-404.
3. Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *International review of neurobiology*. 2009;87:141-72.
4. Pfister BJ, Gordon T, Loverde JR, Kochar AS, Mackinnon SE, Cullen DK. Biomedical engineering strategies for peripheral nerve repair: surgical applications, state of the art, and future challenges. *Critical reviews in biomedical engineering*. 2011;39(2):81-124.
5. Kim DH, Kam AC, Chandika P, Tiel RL, Kline DG. Surgical management and outcome in patients with radial nerve lesions. *Journal of neurosurgery*. 2001;95(4):573-83.
6. Scholz T, Krichevsky A, Sumarto A, Jaffurs D, Wirth GA, Paydar K, et al. Peripheral nerve injuries: an international survey of current treatments and future perspectives. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2009;25(6):339-44.
7. Whitlock EL, Tuffaha SH, Luciano JP, Yan Y, Hunter DA, Magill CK, et al. Processed allografts and type I collagen conduits for repair of peripheral nerve gaps. *Muscle & nerve*. 2009;39(6):787-99.
8. Happel LT, Kline, D.G. Nerve lesions in continuity. Gelberman, RH *Operative Nerve Repair and Reconstruction*. 1991;JB Lippincott, Philadelphia:pp. 601-6.
9. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annual review of neuroscience*. 1990;13:43-60.
10. Gordon T, Brushart TM, Amirjani N, Chan KM. The potential of electrical stimulation to promote functional recovery after peripheral nerve injury--comparisons between rats and humans. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2007;100:3-11.
11. Lundborg G. *Nerve injury and repair*. Churchill Livingstone. 1988;Edinburgh.
12. Sunderland S. *Nerve and nerve injuries*. Livingstone. 1978;Edinburgh.
13. Sunderland S. *Nerve injuries and their repair*. Churchill Livingstone. 1991;Edinburgh.
14. Terzis JK, Smith, K. L. *The Peripheral Nerve: Structure, Function and Reconstruction*. Raven. 1990;New York.
15. Gordon T, Fu SY. Long-term response to nerve injury. *Advances in neurology*. 1997;72:185-99.
16. Kline DG, Hudson, A. R. *Nerve injuries: operative results for entrapments and tumors*. Saunders. 1995;Philadelphia.
17. Weber RV, Mackinnon SE. Bridging the neural gap. *Clinics in plastic surgery*. 2005;32(4):605-16, viii.
18. Moldovan M, Sorensen J, Krarup C. Comparison of the fastest regenerating motor and sensory myelinated axons in the same peripheral nerve. *Brain : a journal of neurology*. 2006;129(Pt 9):2471-83.

19. Johnson EO, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. *Injury*. 2008;39 Suppl 3:S30-6.
20. Kim DH, Cho YJ, Tiel RL, Kline DG. Outcomes of surgery in 1019 brachial plexus lesions treated at Louisiana State University Health Sciences Center. *Journal of neurosurgery*. 2003;98(5):1005-16.
21. Brushart TM, Gerber J, Kessens P, Chen YG, Royall RM. Contributions of pathway and neuron to preferential motor reinnervation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(21):8674-81.
22. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*. 1998;18(7):397-405.
23. Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *The Journal of trauma*. 1998;45(1):116-22.
24. Battiston B, Raimondo S, Tos P, Gaidano V, Audisio C, Scevola A, et al. Chapter 11: Tissue engineering of peripheral nerves. *International review of neurobiology*. 2009;87:227-49.
25. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *The Journal of hand surgery*. 2000;25(3):391-414.
26. Lundborg G, Rosen B. Hand function after nerve repair. *Acta physiologica*. 2007;189(2):207-17.
27. Sulaiman OAR, Midha, R., Gordon, T. Pathophysiology of surgical nerve disorders. Win, H R 2010; Youmans' Neurological Surgery, 6th edition: Chapter 2.
28. Mackinnon SE, Dellon, A. L. . *Surgery of the peripheral nerve*. Thieme Medical Publishers. 1988; New York.
29. Onne L. Recovery of sensibility and sudomotor activity in the hand after nerve suture. *Acta chirurgica Scandinavica Supplementum*. 1962;Suppl 300:1-69.
30. Almquist E, Eeg-Olofsson O. Sensory-nerve-conduction velocity and two-point discrimination in sutured nerves. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1970;52(4):791-6.
31. Millesi H. Factors affecting the outcome of peripheral nerve surgery. *Microsurgery*. 2006;26(4):295-302.
32. Almquist EE, Smith OA, Fry L. Nerve conduction velocity, microscopic, and electron microscopy studies comparing repaired adult and baby monkey median nerves. *The Journal of hand surgery*. 1983;8(4):406-10.
33. Barrios C, de Pablos J. Surgical management of nerve injuries of the upper extremity in children: a 15-year survey. *Journal of pediatric orthopedics*. 1991;11(5):641-5.
34. Wakefield AR. Hand Injuries in Children. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1964;46:1226-34.
35. Bolitho DG, Boustred M, Hudson DA, Hodgetts K. Primary epineural repair of the ulnar nerve in children. *The Journal of hand surgery*. 1999;24(1):16-20.
36. Duteille F, Petry D, Poure L, Dautel G, Merle M. A comparative clinical and electromyographic study of median and ulnar nerve injuries at the wrist in children and adults. *Journal of hand surgery*. 2001;26(1):58-60.
37. Gutmann E, Guttmann, L., Medawar, P.B., Young, J.Z.,. The rate of regeneration of nerve. *J Exp Biol* 1942;19:14-44.

38. Seddon HJ, Medawar PB, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. *The Journal of physiology*. 1943;102(2):191-215.
39. Seddon HJ. *Surgical disorders of the peripheral nerves*. Churchill Livingstone. 1975;London.
40. Wood MD, Kemp SW, Weber C, Borschel GH, Gordon T. Outcome measures of peripheral nerve regeneration. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2011;193(4):321-33.
41. Makinon SE. *Microsurgical repair of peripheral nerves and nerve grafts*. Grabb and Smith's Plastic Surgery. 2005;6th edition(Chapter 9).
42. Smith JW. Factors influencing nerve repair I. Blood supply of peripheral nerves. *Arch Surg*. 1966(93 (2): 335-41).
43. Smith JW. Factors influencing nerve repair II. Collateral circulation of peripheral nerves. *Arch Surg*. 1966(93 (3):433-7).
44. Sulaiman W, Gordon T. Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *The Ochsner journal*. 2013;13(1):100-8.
45. de Medinaceli L. Functional consequences of experimental nerve lesions: effects of reinnervation blend. *Experimental neurology*. 1988;100(1):166-78.
46. Bertelli JA, Mira JC. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1995;58(1-2):151-5.
47. Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain pathology*. 1999;9(2):313-25.
48. Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain : a journal of neurology*. 1951;74(4):491-516.
49. Gordon T. The physiology of neural injury and regeneration: The role of neurotrophic factors. *Journal of communication disorders*. 2010;43(4):265-73.
50. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Molecular neurobiology*. 1997;14(1-2):67-116.
51. Gutmann E, Young, K. L. The re-innervation of muscle after various periods of atrophy. *J Anat*. 1944(78:15-44).
52. Gutmann E. Effect of delay of innervation on recovery of muscle after nerve lesions. *J Neurophysiol*. 1948(11:279-294).
53. Irintchev A, Draguhn A, Wernig A. Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation. *Neuroscience*. 1990;39(1):231-43.
54. Zhu Y, Wang A, Patel S, Kurpinski K, Diao E, Bao X, et al. Engineering Bi-layer Nanofibrous Conduits for Peripheral Nerve Regeneration. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2011.
55. Kim DH, Murovic JA, Tiel RL, Kline DG. Penetrating injuries due to gunshot wounds involving the brachial plexus. *Neurosurgical focus*. 2004;16(5):E3.
56. Kline DG, Kim D, Midha R, Harsh C, Tiel R. Management and results of sciatic nerve injuries: a 24-year experience. *Journal of neurosurgery*. 1998;89(1):13-23.
57. Sulaiman WA, Kline DG. Nerve surgery: a review and insights about its future. *Clinical neurosurgery*. 2006;53:38-47.
58. Lundborg G, Richard P. Bunge memorial lecture. Nerve injury and repair--a challenge to the plastic brain. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2003;8(4):209-26.

59. Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(5 Pt 2):3886-95.
60. Fu SY, Gordon T. Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(5 Pt 2):3876-85.
61. Gordon T, Sulaiman O, Boyd JG. Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2003;8(4):236-50.
62. Huang J, Ye Z, Hu X, Lu L, Luo Z. Electrical stimulation induces calcium-dependent release of NGF from cultured Schwann cells. *Glia*. 2010;58(5):622-31.
63. Sulaiman OA, Gordon T. Transforming growth factor-beta and forskolin attenuate the adverse effects of long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration in vivo. *Glia*. 2002;37(3):206-18.
64. Danielsen N, Lundborg G, Frizell M. Nerve repair and axonal transport: outgrowth delay and regeneration rate after transection and repair of rabbit hypoglossal nerve. *Brain research*. 1986;376(1):125-32.
65. Brushart TM, Hoffman PN, Royall RM, Murinson BB, Witzel C, Gordon T. Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(15):6631-8.
66. Al-Majed AA, Neumann CM, Brushart TM, Gordon T. Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(7):2602-8.
67. Gordon T, Brushart TM, Chan KM. Augmenting nerve regeneration with electrical stimulation. *Neurological research*. 2008;30(10):1012-22.
68. Sunderland S. Rate of regeneration in human peripheral nerves; analysis of the interval between injury and onset of recovery. *Archives of neurology and psychiatry*. 1947;58(3):251-95.
69. Sulaiman OA, Gordon T. Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia*. 2000;32(3):234-46.
70. Gordon T, Sulaiman OA, Ladak A. Chapter 24: Electrical stimulation for improving nerve regeneration: where do we stand? *International review of neurobiology*. 2009;87:433-44.
71. Udina E, Ladak A, Furey M, Brushart T, Tyreman N, Gordon T. Rolipram-induced elevation of cAMP or chondroitinase ABC breakdown of inhibitory proteoglycans in the extracellular matrix promotes peripheral nerve regeneration. *Experimental neurology*. 2010;223(1):143-52.
72. Brushart TM, Tarlov EC, Mesulam MM. Specificity of muscle reinnervation after epineurial and individual fascicular suture of the rat sciatic nerve. *The Journal of hand surgery*. 1983;8(3):248-53.
73. Fenrich K, Gordon T. Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 2004;31(2):142-56.

74. Beaumont E, Cloutier FC, Atlan M, Rouleau DM, Beaumont PH. Chondroitinase ABC and acute electrical stimulation are beneficial for muscle reinnervation after sciatic nerve transection in rats. *Restorative neurology and neuroscience*. 2009;27(4):297-305.
75. Aldskogius H, Thomander L. Selective reinnervation of somatotopically appropriate muscles after facial nerve transection and regeneration in the neonatal rat. *Brain research*. 1986;375(1):126-34.
76. Esslen E. Electromyographic findings on two types of misdirection of regenerating axons. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1960;12:738-41.
77. Ito M, Kudo M. Reinnervation by axon collaterals from single facial motoneurons to multiple muscle targets following axotomy in the adult guinea pig. *Acta anatomica*. 1994;151(2):124-30.
78. Sulaiman OAR, Boyd, J. G., Gordon, T. Axonal regeneration in the peripheral system of mammals. Kettenman J, Ransom, BR (eds) *Neuroglia* 2nd edition. 2005;Oxford University Press(Chapter 36):pp 454-66.
79. Terzis J. Patterns of cutaneous innervation and reinnervation following nerve transection. *Posttraumatic Peripheral Nerve Regeneration* 1981;New York: Raven:pp.591-610.
80. de Ruitter GC, Malessy, M. J., Alaid, A. O., Spinner, R. J., Engelstad, J. K., Sorenson, E. J., Kaufman, K. R., Dyck, P. J., Windebank, A. J. . Misdirection of regenerating motor axons after nerve injury and repair in the rat sciatic nerve model. *Experimental neurology*. 2008(211:339-350).
81. Langley JN, Hashimoto M. On the suture of separate nerve bundles in a nerve trunk and on internal nerve plexuses. *The Journal of physiology*. 1917;51(4-5):318-46.
82. English AW. Enhancing axon regeneration in peripheral nerves also increases functionally inappropriate reinnervation of targets. *The Journal of comparative neurology*. 2005;490(4):427-41.
83. Brushart TM, Mesulam MM. Alteration in connections between muscle and anterior horn motoneurons after peripheral nerve repair. *Science*. 1980;208(4444):603-5.
84. Brushart TM. Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1988;8(3):1026-31.
85. Gordon T, Boyd, J. G., Sulaiman, O. A. R. Experimental approaches to promote functional recovery after severe peripheral nerve injuries. *Eur Surgery*. 2005(37: 193-203).
86. You S, Petrov T, Chung PH, Gordon T. The expression of the low affinity nerve growth factor receptor in long-term denervated Schwann cells. *Glia*. 1997;20(2):87-100.
87. Furey MJ, Midha R, Xu QG, Belkas J, Gordon T. Prolonged target deprivation reduces the capacity of injured motoneurons to regenerate. *Neurosurgery*. 2007;60(4):723-32; discussion 32-3.
88. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Molecular neurobiology*. 2003;27(3):277-324.
89. Xu QG, Forden J, Walsh SK, Gordon T, Midha R. Motoneuron survival after chronic and sequential peripheral nerve injuries in the rat. *Journal of neurosurgery*. 2010;112(4):890-9.

90. Hoke A, Gordon T, Zochodne DW, Sulaiman OA. A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Experimental neurology*. 2002;173(1):77-85.
91. Eroglu C, Hokelek M, Guneren E, Esen S, Pekbay A, Uysal OA. Bacterial flora of *Hirudo medicinalis* and their antibiotic sensitivities in the Middle Black Sea Region, Turkey. *Annals of plastic surgery*. 2001;47(1):70-3.
92. Ahlborn P, Schachner M, Irintchev A. One hour electrical stimulation accelerates functional recovery after femoral nerve repair. *Experimental neurology*. 2007;208(1):137-44.
93. Vuorinen V, Siironen J, Roytta M. Axonal regeneration into chronically denervated distal stump. 1. Electron microscope studies. *Acta neuropathologica*. 1995;89(3):209-18.
94. Li H, Terenghi G, Hall SM. Effects of delayed re-innervation on the expression of c-erbB receptors by chronically denervated rat Schwann cells in vivo. *Glia*. 1997;20(4):333-47.
95. Kuffler DP, Reyes O, Sosa IJ, Santiago-Figueroa J. Neurological recovery across a 12-cm-long ulnar nerve gap repaired 3.25 years post trauma: case report. *Neurosurgery*. 2011;69(6):E1321-6.
96. Anzil AP, Wernig A. Muscle fibre loss and reinnervation after long-term denervation. *Journal of neurocytology*. 1989;18(6):833-45.
97. Bain JR, Veltri KL, Chamberlain D, Fahnstock M. Improved functional recovery of denervated skeletal muscle after temporary sensory nerve innervation. *Neuroscience*. 2001;103(2):503-10.
98. Bain JR, Hason Y, Veltri K, Fahnstock M, Quartly C. Clinical application of sensory protection of denervated muscle. *Journal of neurosurgery*. 2008;109(5):955-61.
99. Zhao C, Veltri K, Li S, Bain JR, Fahnstock M. NGF, BDNF, NT-3, and GDNF mRNA expression in rat skeletal muscle following denervation and sensory protection. *Journal of neurotrauma*. 2004;21(10):1468-78.
100. Elsohemy A, Butler R, Bain JR, Fahnstock M. Sensory protection of rat muscle spindles following peripheral nerve injury and reinnervation. *Plastic and reconstructive surgery*. 2009;124(6):1860-8.
101. Gordon T, Tyreman N, Raji MA. The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(14):5325-34.
102. Miledi R, Slater CR. On the degeneration of rat neuromuscular junctions after nerve section. *The Journal of physiology*. 1970;207(2):507-28.
103. Jones R, Vrbova G. Two factors responsible for the development of denervation hypersensitivity. *The Journal of physiology*. 1974;236(3):517-38.
104. Charlton MP, Atwood HL. Modulation of transmitter release by intracellular sodium in squid giant synapse. *Brain research*. 1977;134(2):367-71.
105. Vanden Noven S, Wallace N, Muccio D, Turtz A, Pinter MJ. Adult spinal motoneurons remain viable despite prolonged absence of functional synaptic contact with muscle. *Experimental neurology*. 1993;123(1):147-56.
106. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical focus*. 2004;16(5):E1.

107. Lieberman AR. The axon reaction: a review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *International review of neurobiology*. 1971;14:49-124.
108. Gordon T, Udina E, Verge VM, de Chaves EI. Brief electrical stimulation accelerates axon regeneration in the peripheral nervous system and promotes sensory axon regeneration in the central nervous system. *Motor control*. 2009;13(4):412-41.
109. Hanz S, Fainzilber M. Retrograde signaling in injured nerve--the axon reaction revisited. *Journal of neurochemistry*. 2006;99(1):13-9.
110. Gordon T. Dependence of peripheral nerves on their target organs. Burnstock G, Vrbova, G, O'Brien, RA, eds *Somatic and autonomic nerve-muscle interactions*. 1983;Amsterdam(Elsevier):p.289-316.
111. Zigmond RE. Cytokines that promote nerve regeneration. *Experimental neurology*. 2012;238(2):101-6.
112. Gordon T. Neurotrophic factor expression in denervated motor and sensory Schwann cells: relevance to specificity of peripheral nerve regeneration. *Experimental neurology*. 2014;254:99-108.
113. Kreutzberg GW. Reaction of the neuronal cell body. Waxman, SG, Kocsis, JD, Stys, PK, eds *The Axon structure, function and pathophysiology*. 1995;New York, Oxford University Press:p 355-74.
114. Tetzlaff W, Bisby MA, Kreutzberg GW. Changes in cytoskeletal proteins in the rat facial nucleus following axotomy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1988;8(9):3181-9.
115. Tetzlaff W, Alexander SW, Miller FD, Bisby MA. Response of facial and rubrospinal neurons to axotomy: changes in mRNA expression for cytoskeletal proteins and GAP-43. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1991;11(8):2528-44.
116. Bisby MA. Regeneration of peripheral nervous system axons. Waxman, SG, Kocsis, JD, Stys, PK, eds *The Axon structure, function and pathophysiology*. 1995;New York, Oxford University Press:p.553-78.
117. Hoffman PN, Lasek RJ. Axonal transport of the cytoskeleton in regenerating motor neurons: constancy and change. *Brain research*. 1980;202(2):317-33.
118. Bisby MA, Tetzlaff W. Changes in cytoskeletal protein synthesis following axon injury and during axon regeneration. *Molecular neurobiology*. 1992;6(2-3):107-23.
119. Tetzlaff W, Bisby MA. Cytoskeletal protein synthesis and regulation of nerve regeneration in PNS and CNS neurons of the rat. *Restorative neurology and neuroscience*. 1990;1(3):189-96.
120. Tetzlaff W, Bisby MA. Neurofilament elongation into regenerating facial nerve axons. *Neuroscience*. 1989;29(3):659-66.
121. Waller A. Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. . *Phil Trans R Soc Lond* 1850(140: 423-429).
122. Makwana M, Raivich G. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *The FEBS journal*. 2005;272(11):2628-38.
123. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2002;7(1):13-27.

124. Beuche W, Friede RL. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *Journal of neurocytology*. 1984;13(5):767-96.
125. Scheidt P, Friede RL. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration. Properties of millipore diffusion chambers and immunohistochemical identification of cell populations. *Acta neuropathologica*. 1987;75(1):77-84.
126. Bruck W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain pathology*. 1997;7(2):741-52.
127. Skouras E, Ozsoy U, Sarikcioglu L, Angelov DN. Intrinsic and therapeutic factors determining the recovery of motor function after peripheral nerve transection. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*. 2011;193(4):286-303.
128. Tofaris GK, Patterson PH, Jessen KR, Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(15):6696-703.
129. Martini R. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *Journal of neurocytology*. 1994;23(1):1-28.
130. Filbin MT. Myelin-associated glycoprotein: a role in myelination and in the inhibition of axonal regeneration? *Current opinion in neurobiology*. 1995;5(5):588-95.
131. Bûngner O. Ueber die Degenerations-und Regenerationsvorgânge am Nerven nach Verletzungen. *Pathol Anat Allg Pathol*. 1891(10:21-393).
132. Chen YY, McDonald D, Cheng C, Magnowski B, Durand J, Zochodne DW. Axon and Schwann cell partnership during nerve regrowth. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2005;64(7):613-22.
133. Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Experimental neurology*. 2010;223(1):51-9.
134. Witzel C, Rohde C, Brushart TM. Pathway sampling by regenerating peripheral axons. *The Journal of comparative neurology*. 2005;485(3):183-90.
135. McQuarrie IG. Effect of conditioning lesion on axonal sprout formation at nodes of Ranvier. *The Journal of comparative neurology*. 1985;231(2):239-49.
136. Miller FD, Naus CC, Durand M, Bloom FE, Milner RJ. Isoforms of alpha-tubulin are differentially regulated during neuronal maturation. *The Journal of cell biology*. 1987;105(6 Pt 2):3065-73.
137. McQuarrie IG, Lasek RJ. Transport of cytoskeletal elements from parent axons into regenerating daughter axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1989;9(2):436-46.
138. Davis L, Dou P, DeWit M, Kater SB. Protein synthesis within neuronal growth cones. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1992;12(12):4867-77.
139. Kato S, Ide C. Axonal sprouting at the node of Ranvier of the peripheral nerve disconnected with the cell body. *Restorative neurology and neuroscience*. 1994;6(3):181-7.
140. Brushart TM. Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1993;13(6):2730-8.

141. Jiang BG, Yin XF, Zhang DY, Fu ZG, Zhang HB. Maximum number of collaterals developed by one axon during peripheral nerve regeneration and the influence of that number on reinnervation effects. *European neurology*. 2007;58(1):12-20.
142. Morris JH, Hudson AR, Weddell G. A study of degeneration and regeneration in the divided rat sciatic nerve based on electron microscopy. II. The development of the "regenerating unit". *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 1972;124(1):103-30.
143. Aitken JT. The effect of peripheral connexions on the maturation of regenerating nerve fibres. *J Anat*. 1949;83(Pt 1):32-43.
144. Gordon T, Stein RB. Time course and extent of recovery in reinnervated motor units of cat triceps surae muscles. *The Journal of physiology*. 1982;323:307-23.
145. Gordon T, Stein RB. Reorganization of motor-unit properties in reinnervated muscles of the cat. *J Neurophysiol*. 1982;48(5):1175-90.
146. Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP. Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model. *Muscle & nerve*. 1991;14(11):1116-22.
147. Forman DS, Wood DK, DeSilva S. Rate of regeneration of sensory axons in transected rat sciatic nerve repaired with epineurial sutures. *Journal of the neurological sciences*. 1979;44(1):55-9.
148. Averill S, Michael GJ, Shortland PJ, Leavesley RC, King VR, Bradbury EJ, et al. NGF and GDNF ameliorate the increase in ATF3 expression which occurs in dorsal root ganglion cells in response to peripheral nerve injury. *The European journal of neuroscience*. 2004;19(6):1437-45.
149. Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, et al. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *The Journal of cell biology*. 1993;123(2):455-65.
150. Kobayashi NR, Bedard AM, Hincke MT, Tetzlaff W. Increased expression of BDNF and trkB mRNA in rat facial motoneurons after axotomy. *The European journal of neuroscience*. 1996;8(5):1018-29.
151. Sendtner M, Kreutzberg GW, Jennekens FG. Workshop on Trophic Factors in the Peripheral Nervous System. Capri, October 1991. *Neuromuscular disorders : NMD*. 1992;2(1):11-7.
152. Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*. 1999;194 (Pt 1):1-14.
153. Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Progress in neurobiology*. 2012;98(1):16-37.
154. Cobianchi S, Casals-Diaz L, Jaramillo J, Navarro X. Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Experimental neurology*. 2013;240:157-67.
155. Curtis R, Tonra JR, Stark JL, Adryan KM, Park JS, Cliffer KD, et al. Neuronal injury increases retrograde axonal transport of the neurotrophins to spinal sensory neurons and motor neurons via multiple receptor mechanisms. *Molecular and cellular neurosciences*. 1998;12(3):105-18.
156. Gillen C, Korfhage C, Müller H.W. Gene expression in nerve regeneration. *Neuroscientist*. 1997(3:262-268).

157. Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and increases expression of BDNF and trkB mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. *The European journal of neuroscience*. 2000;12(12):4381-90.
158. Brushart TM, Jari R, Verge V, Rohde C, Gordon T. Electrical stimulation restores the specificity of sensory axon regeneration. *Experimental neurology*. 2005;194(1):221-9.
159. Brushart TM, Aspalter M, Griffin JW, Redett R, Hameed H, Zhou C, et al. Schwann cell phenotype is regulated by axon modality and central-peripheral location, and persists in vitro. *Experimental neurology*. 2013;247:272-81.
160. Geremia NM, Gordon T, Brushart TM, Al-Majed AA, Verge VM. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Experimental neurology*. 2007;205(2):347-59.
161. Hoke A, Redett R, Hameed H, Jari R, Zhou C, Li ZB, et al. Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(38):9646-55.
162. Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *The Journal of cell biology*. 1992;119(1):45-54.
163. DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, et al. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*. 1992;8(5):983-93.
164. Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, et al. trkB encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*. 1991;65(5):885-93.
165. Yin Q, Kemp GJ, Frostick SP. Neurotrophins, neurones and peripheral nerve regeneration. *Journal of hand surgery*. 1998;23(4):433-7.
166. Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M, et al. Neurotrophins promote motor neuron survival and are present in embryonic limb bud. *Nature*. 1993;363(6426):266-70.
167. Zhang JY, Luo XG, Xian CJ, Liu ZH, Zhou XF. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *The European journal of neuroscience*. 2000;12(12):4171-80.
168. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*. 1992;360(6406):757-9.
169. Oppenheim RW, Yin QW, Prevette D, Yan Q. Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature*. 1992;360(6406):755-7.
170. Vejsada R, Sagot Y, Kato AC. Quantitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factors on axotomized motoneurons in vivo. *The European journal of neuroscience*. 1995;7(1):108-15.
171. Vejsada R, Tseng JL, Lindsay RM, Acheson A, Aebischer P, Kato AC. Synergistic but transient rescue effects of BDNF and GDNF on axotomized neonatal motoneurons. *Neuroscience*. 1998;84(1):129-39.

172. Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience*. 1997;79(3):765-74.
173. Piehl F, Frisen J, Risling M, Hokfelt T, Cullheim S. Increased trkB mRNA expression by axotomized motoneurons. *Neuroreport*. 1994;5(6):697-700.
174. Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, Nakayama C, Noguchi H. BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Experimental neurology*. 1997;144(2):273-86.
175. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P. Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures. *Journal of the neurological sciences*. 1996;136(1-2):17-23.
176. Wan L, Xia R, Ding W. Short-term low-frequency electrical stimulation enhanced remyelination of injured peripheral nerves by inducing the promyelination effect of brain-derived neurotrophic factor on Schwann cell polarization. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(12):2578-87.
177. Yan Q, Matheson C, Lopez OT, Miller JA. The biological responses of axotomized adult motoneurons to brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1994;14(9):5281-91.
178. Lohof AM, Ip NY, Poo MM. Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF. *Nature*. 1993;363(6427):350-3.
179. Boyd JG, Gordon T. The bimodal effect of BDNF on chronically axotomized motoneurons may be explained by the presence of high and low affinity receptors. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000;30, 153.
180. Boyd JG, Gordon T. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *The European journal of neuroscience*. 2002;15(4):613-26.
181. Zheng LF, Wang R, Yu QP, Wang H, Yi XN, Wang QB, et al. Expression of HGF/c-Met is dynamically regulated in the dorsal root ganglions and spinal cord of adult rats following sciatic nerve ligation. *Neuro-Signals*. 2010;18(1):49-56.
182. Hammarberg H, Piehl F, Risling M, Cullheim S. Differential regulation of trophic factor receptor mRNAs in spinal motoneurons after sciatic nerve transection and ventral root avulsion in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 2000;426(4):587-601.
183. Davey F, Hilton M, Davies AM. Cooperation between HGF and CNTF in promoting the survival and growth of sensory and parasympathetic neurons. *Molecular and cellular neurosciences*. 2000;15(1):79-87.
184. Ebens A, Brose K, Leonardo ED, Hanson MG, Jr., Bladt F, Birchmeier C, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron*. 1996;17(6):1157-72.
185. Yamamoto Y, Livet J, Pollock RA, Garces A, Arce V, deLapeyriere O, et al. Hepatocyte growth factor (HGF/SF) is a muscle-derived survival factor for a subpopulation of embryonic motoneurons. *Development*. 1997;124(15):2903-13.
186. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochemical and biophysical research communications*. 1984;122(3):1450-9.

187. Gohda E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, et al. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(2):414-9.
188. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*. 1987;327(6119):239-42.
189. Maina F, Klein R. Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nature neuroscience*. 1999;2(3):213-7.
190. Stern CD, Ireland GW, Herrick SE, Gherardi E, Gray J, Perryman M, et al. Epithelial scatter factor and development of the chick embryonic axis. *Development*. 1990;110(4):1271-84.
191. Streit A, Stern CD, Thery C, Ireland GW, Aparicio S, Sharpe MJ, et al. A role for HGF/SF in neural induction and its expression in Hensen's node during gastrulation. *Development*. 1995;121(3):813-24.
192. Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *Journal of biochemistry*. 1996;119(4):591-600.
193. Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends in cell biology*. 1998;8(10):404-10.
194. Krasnoselsky A, Massay MJ, DeFrances MC, Michalopoulos G, Zarnegar R, Ratner N. Hepatocyte growth factor is a mitogen for Schwann cells and is present in neurofibromas. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1994;14(12):7284-90.
195. Di Renzo MF, Bertolotto A, Olivero M, Putzolu P, Crepaldi T, Schiffer D, et al. Selective expression of the Met/HGF receptor in human central nervous system microglia. *Oncogene*. 1993;8(1):219-22.
196. Takayama H, La Rochelle WJ, Anver M, Bockman DE, Merlino G. Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):5866-71.
197. Jung W, Castren E, Odenthal M, Vande Woude GF, Ishii T, Dienes HP, et al. Expression and functional interaction of hepatocyte growth factor-scatter factor and its receptor c-met in mammalian brain. *The Journal of cell biology*. 1994;126(2):485-94.
198. Thewke DP, Seeds NW. The expression of mRNAs for hepatocyte growth factor/scatter factor, its receptor c-met, and one of its activators tissue-type plasminogen activator show a systematic relationship in the developing and adult cerebral cortex and hippocampus. *Brain research*. 1999;821(2):356-67.
199. Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *The Journal of cell biology*. 1993;123(1):223-35.
200. Kitamura K, Iwanami A, Nakamura M, Yamane J, Watanabe K, Suzuki Y, et al. Hepatocyte growth factor promotes endogenous repair and functional recovery after spinal cord injury. *Journal of neuroscience research*. 2007;85(11):2332-42.
201. Xu L, Zhou S, Feng GY, Zhang LP, Zhao DM, Sun Y, et al. Neural stem cells enhance nerve regeneration after sciatic nerve injury in rats. *Molecular neurobiology*. 2012;46(2):265-74.

202. Hashimoto N, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Mashimo T, et al. Expression of HGF and cMet in the peripheral nervous system of adult rats following sciatic nerve injury. *Neuroreport*. 2001;12(7):1403-7.
203. Kato S, Funakoshi H, Nakamura T, Kato M, Nakano I, Hirano A, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-Met in the anterior horn cells of the spinal cord in the patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALS): immunohistochemical studies on sporadic ALS and familial ALS with superoxide dismutase 1 gene mutation. *Acta neuropathologica*. 2003;106(2):112-20.
204. Novak KD, Prevette D, Wang S, Gould TW, Oppenheim RW. Hepatocyte growth factor/scatter factor is a neurotrophic survival factor for lumbar but not for other somatic motoneurons in the chick embryo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(1):326-37.
205. Maina F, Hilton MC, Ponzetto C, Davies AM, Klein R. Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. *Genes & development*. 1997;11(24):3341-50.
206. Wong V, Glass DJ, Arriaga R, Yancopoulos GD, Lindsay RM, Conn G. Hepatocyte growth factor promotes motor neuron survival and synergizes with ciliary neurotrophic factor. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(8):5187-91.
207. Caton A, Hacker A, Naeem A, Livet J, Maina F, Bladt F, et al. The branchial arches and HGF are growth-promoting and chemoattractant for cranial motor axons. *Development*. 2000;127(8):1751-66.
208. Maina F, Hilton MC, Andres R, Wyatt S, Klein R, Davies AM. Multiple roles for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development. *Neuron*. 1998;20(5):835-46.
209. Koyama J, Yokouchi K, Fukushima N, Kawagishi K, Higashiyama F, Moriizumi T. Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on neonatal facial motor neurons. *Neurological research*. 2003;25(7):701-7.
210. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 1995;373(6516):699-702.
211. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 1995;376(6543):768-71.
212. Maina F, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R, et al. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell*. 1996;87(3):531-42.
213. Hamanoue M, Takemoto N, Matsumoto K, Nakamura T, Nakajima K, Kohsaka S. Neurotrophic effect of hepatocyte growth factor on central nervous system neurons in vitro. *Journal of neuroscience research*. 1996;43(5):554-64.
214. Naeem A, Abbas L, Guthrie S. Comparison of the effects of HGF, BDNF, CT-1, CNTF, and the branchial arches on the growth of embryonic cranial motor neurons. *Journal of neurobiology*. 2002;51(2):101-14.
215. Du Bois-Reymond E. *Untersuchungen uber Thierische Electricitat*. Berlin: Verlag. 1848.
216. Boulogne Dd. *De l'électrisation localisée, et de son application à la physiologie, à la pathologie et à la thérapeutique*. Paris: Bailliere. 1855.

217. al-Amood WS, Lewis DM, Schmalbruch H. Effects of chronic electrical stimulation on contractile properties of long-term denervated rat skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 1991;441:243-56.
218. Carraro U, Rossini K, Mayr W, Kern H. Muscle fiber regeneration in human permanent lower motoneuron denervation: relevance to safety and effectiveness of FES-training, which induces muscle recovery in SCI subjects. *Artificial organs*. 2005;29(3):187-91.
219. Mokrusch T, Engelhardt A, Eichhorn KF, Prischenk G, Prischenk H, Sack G, et al. Effects of long-impulse electrical stimulation on atrophy and fibre type composition of chronically denervated fast rabbit muscle. *Journal of neurology*. 1990;237(1):29-34.
220. Nemoto K, Williams HB, Nemoto K, Lough J, Chiu RC. The effects of electrical stimulation on denervated muscle using implantable electrodes. *Journal of reconstructive microsurgery*. 1988;4(4):251-5, 7.
221. Nix WA, Dahm M. The effect of isometric short-term electrical stimulation on denervated muscle. *Muscle & nerve*. 1987;10(2):136-43.
222. Williams HB. The value of continuous electrical muscle stimulation using a completely implantable system in the preservation of muscle function following motor nerve injury and repair: an experimental study. *Microsurgery*. 1996;17(11):589-96.
223. Kern H, Salmons S, Mayr W, Rossini K, Carraro U. Recovery of long-term denervated human muscles induced by electrical stimulation. *Muscle & nerve*. 2005;31(1):98-101.
224. Ashley Z, Salmons S, Boncompagni S, Protasi F, Russold M, Lanmuller H, et al. Effects of chronic electrical stimulation on long-term denervated muscles of the rabbit hind limb. *Journal of muscle research and cell motility*. 2007;28(4-5):203-17.
225. Politis MJ, Zanakis MF. Short term efficacy of applied electric fields in the repair of the damaged rodent spinal cord: behavioral and morphological results. *Neurosurgery*. 1988;23(5):582-8.
226. Kerns JM, Fakhouri AJ, Weinrib HP, Freeman JA. Electrical stimulation of nerve regeneration in the rat: the early effects evaluated by a vibrating probe and electron microscopy. *Neuroscience*. 1991;40(1):93-107.
227. Pollock M. Nerve regeneration. *Current opinion in neurology*. 1995;8(5):354-8.
228. Kelleher MO, Al-Abri RK, Lenihan DV, Glasby MA. Use of a static magnetic field to promote recovery after peripheral nerve injury. *Journal of neurosurgery*. 2006;105(4):610-5.
229. Pomeranz B. Effects of applied DC fields on sensory nerve sprouting and motor-nerve regeneration in adult rats. *Progress in clinical and biological research*. 1986;210:251-60.
230. Roman GC, Strahlendorf HK, Coates PW, Rowley BA. Stimulation of sciatic nerve regeneration in the adult rat by low-intensity electric current. *Experimental neurology*. 1987;98(2):222-32.
231. Rozman J, Zorko B, Seliskar A. Regeneration of the radial nerve in a dog influenced by electrical stimulation. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2000;439(3 Suppl):R184-6.
232. Nix WA, Hopf HC. Electrical stimulation of regenerating nerve and its effect on motor recovery. *Brain research*. 1983;272(1):21-5.
233. Pockett S, Gavin RM. Acceleration of peripheral nerve regeneration after crush injury in rat. *Neuroscience letters*. 1985;59(2):221-4.

234. Singh B, Xu QG, Franz CK, Zhang R, Dalton C, Gordon T, et al. Accelerated axon outgrowth, guidance, and target reinnervation across nerve transection gaps following a brief electrical stimulation paradigm. *Journal of neurosurgery*. 2012;116(3):498-512.
235. Udina E, Furey M, Busch S, Silver J, Gordon T, Fouad K. Electrical stimulation of intact peripheral sensory axons in rats promotes outgrowth of their central projections. *Experimental neurology*. 2008;210(1):238-47.
236. Eberhardt KA, Irintchev A, Al-Majed AA, Simova O, Brushart TM, Gordon T, et al. BDNF/TrkB signaling regulates HNK-1 carbohydrate expression in regenerating motor nerves and promotes functional recovery after peripheral nerve repair. *Experimental neurology*. 2006;198(2):500-10.
237. Eberstein A, Pachter BR. The effect of electrical stimulation on reinnervation of rat muscle: contractile properties and endplate morphometry. *Brain research*. 1986;384(2):304-10.
238. Zhang X, Xin N, Tong L, Tong XJ. Electrical stimulation enhances peripheral nerve regeneration after crush injury in rats. *Molecular medicine reports*. 2013;7(5):1523-7.
239. Al-Majed AA, Tam SL, Gordon T. Electrical stimulation accelerates and enhances expression of regeneration-associated genes in regenerating rat femoral motoneurons. *Cellular and molecular neurobiology*. 2004;24(3):379-402.
240. Goldberg JL, Barres BA. The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annual review of neuroscience*. 2000;23:579-612.
241. Gordon T, Amirjani N, Edwards DC, Chan KM. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Experimental neurology*. 2010;223(1):192-202.
242. Finkbeiner S, Greenberg ME. Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression. *Journal of neurobiology*. 1998;37(1):171-89.
243. Shieh PB, Ghosh A. Molecular mechanisms underlying activity-dependent regulation of BDNF expression. *Journal of neurobiology*. 1999;41(1):127-34.
244. Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*. 1998;20(4):709-26.
245. Khalil Z, Merhi M. Effects of aging on neurogenic vasodilator responses evoked by transcutaneous electrical nerve stimulation: relevance to wound healing. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2000;55(6):B257-63.
246. Sluka KA, Walsh D. Transcutaneous electrical nerve stimulation: basic science mechanisms and clinical effectiveness. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2003;4(3):109-21.
247. Treharne RW, Brighton CT, Korostoff E, Pollack SR. An in vitro study of electrical osteogenesis using direct and pulsating currents. *Clinical orthopaedics and related research*. 1979(145):300-6.
248. Hellinger J, Kleditzsch J. Electrical stimulation of the callus formation by means of bipolar rectangular pulse sequences. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery Archiv fur orthopadische und Unfall-Chirurgie*. 1980;96(4):241-6.
249. Burssens P, Forsyth R, Steyaert A, Van Ovost E, Praet M, Verdonk R. Influence of burst TENS stimulation on collagen formation after Achilles tendon suture in man. A

- histological evaluation with Movat's pentachrome stain. *Acta orthopaedica Belgica*. 2005;71(3):342-6.
250. Alvarez OM, Mertz PM, Smerbeck RV, Eaglstein WH. The healing of superficial skin wounds is stimulated by external electrical current. *The Journal of investigative dermatology*. 1983;81(2):144-8.
251. Brown M, McDonnell MK, Menton DN. Polarity effects on wound healing using electric stimulation in rabbits. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1989;70(8):624-7.
252. Cruz NI, Bayron FE, Suarez AJ. Accelerated healing of full-thickness burns by the use of high-voltage pulsed galvanic stimulation in the pig. *Annals of plastic surgery*. 1989;23(1):49-55.
253. Stromberg BV. Effects of electrical currents on wound contraction. *Annals of plastic surgery*. 1988;21(2):121-3.
254. Kjartansson J, Lundeberg T, Samuelson UE, Dalsgaard CJ. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) increases survival of ischaemic musculocutaneous flaps. *Acta physiologica Scandinavica*. 1988;134(1):95-9.
255. Leem JW, Park ES, Paik KS. Electrophysiological evidence for the antinociceptive effect of transcutaneous electrical stimulation on mechanically evoked responsiveness of dorsal horn neurons in neuropathic rats. *Neuroscience letters*. 1995;192(3):197-200.
256. Somers DL, Clemente FR. Transcutaneous electrical nerve stimulation for the management of neuropathic pain: the effects of frequency and electrode position on prevention of allodynia in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Physical therapy*. 2006;86(5):698-709.
257. Cheing GL, Luk ML. Transcutaneous electrical nerve stimulation for neuropathic pain. *Journal of hand surgery*. 2005;30(1):50-5.
258. Cauthen JC, Renner EJ. Transcutaneous and peripheral nerve stimulation for chronic pain states. *Surgical neurology*. 1975;4(1):102-4.
259. Johansson F, Almay BG, Von Knorring L, Terenius L. Predictors for the outcome of treatment with high frequency transcutaneous electrical nerve stimulation in patients with chronic pain. *Pain*. 1980;9(1):55-61.
260. Meyler WJ, de Jongste MJ, Rolf CA. Clinical evaluation of pain treatment with electrostimulation: a study on TENS in patients with different pain syndromes. *The Clinical journal of pain*. 1994;10(1):22-7.
261. Somers DL, Clemente FR. High-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation alters thermal but not mechanical allodynia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1998;79(11):1370-6.
262. Sun RQ, Wang HC, Wan Y, Jing Z, Luo F, Han JS, et al. Suppression of neuropathic pain by peripheral electrical stimulation in rats: mu-opioid receptor and NMDA receptor implicated. *Experimental neurology*. 2004;187(1):23-9.
263. Dai Y, Kondo E, Fukuoka T, Tokunaga A, Miki K, Noguchi K. The effect of electroacupuncture on pain behaviors and noxious stimulus-evoked Fos expression in a rat model of neuropathic pain. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society*. 2001;2(3):151-9.
264. Baptista AF, Gomes JR, Oliveira JT, Santos SM, Vannier-Santos MA, Martinez AM. High- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation delay sciatic

- nerve regeneration after crush lesion in the mouse. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS*. 2008;13(1):71-80.
265. McCaig CD, Allan, D. X., Erskine, L., Rajnicsek, A.M., Stewart, R. Growing nerves in an electric field. *Neuroprotocols* 4: 134-141. 1994;*Physiol Rev* 85: 943-978.
 266. English AW, Schwartz G, Meador W, Sabatier MJ, Mulligan A. Electrical stimulation promotes peripheral axon regeneration by enhanced neuronal neurotrophin signaling. *Developmental neurobiology*. 2007;67(2):158-72.
 267. Loeb GE, Marks WB, Hoffer JA. Cat hindlimb motoneurons during locomotion. IV. Participation in cutaneous reflexes. *J Neurophysiol*. 1987;57(2):563-73.
 268. Macefield VG, Gandevia SC, Bigland-Ritchie B, Gorman RB, Burke D. The firing rates of human motoneurons voluntarily activated in the absence of muscle afferent feedback. *The Journal of physiology*. 1993;471:429-43.
 269. Schaeren-Wiemers N, Gerfin-Moser A. A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry*. 1993;100(6):431-40.
 270. McHanwell S, Biscoe TJ. The localization of motoneurons supplying the hindlimb muscles of the mouse. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1981;293(1069):477-508.
 271. Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Winslow JW, Cayouette MH, Price DL. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron*. 1993;10(3):359-67.
 272. Pion A-M, Roy, A.-A., Lin, J. Axonal regeneration and functional recovery following sciatic nerve axotomy and direct and transcutaneous electric stimulation in mice: Université de Montréal; 2015.
 273. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron*. 1990;5(4):501-9.
 274. Schecterson LC, Bothwell M. Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron*. 1992;9(3):449-63.
 275. Timmusk T, Palm K, Metsis M, Reintam T, Paalme V, Saarma M, et al. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron*. 1993;10(3):475-89.
 276. Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*. 1994;263(5153):1618-23.
 277. Acheson A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron*. 1991;7(2):265-75.
 278. Pruginin-Bluger M, Shelton DL, Kalcheim C. A paracrine effect for neuron-derived BDNF in development of dorsal root ganglia: stimulation of Schwann cell myelin protein expression by glial cells. *Mechanisms of development*. 1997;61(1-2):99-111.
 279. Geremia NM, Gordon, T., Al-Majed, A. A., Brushart, T. M., Verge, V. M. K. . Brief electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and intrinsic growth-associated gene expression. *Soc Neurosci Program No2826*. 2005.

280. Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., et al. Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron*. 1998;21(4):681-93.
281. Balkowiec A, Katz DM. Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA in situ. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2000;20(19):7417-23.
282. Xia Z, Storm DR. Calmodulin-regulated adenylyl cyclases and neuromodulation. *Current opinion in neurobiology*. 1997;7(3):391-6.
283. Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA. Retinal ganglion cells lose trophic responsiveness after axotomy. *Neuron*. 1999;23(2):285-95.
284. Hempel CM, Vincent P, Adams SR, Tsien RY, Selverston AI. Spatio-temporal dynamics of cyclic AMP signals in an intact neural circuitm. *Nature*. 1996;384(6605):166-9.
285. Pichichero M, Beer B, Clody DE. Effects of dibutyryl cyclic AMP on restoration of function of damaged sciatic nerve in rats. *Science*. 1973;182(4113):724-5.
286. Gershenbaum MR, Roisen FJ. The effects of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on the degeneration and regeneration of crush-lesioned rat sciatic nerves. *Neuroscience*. 1980;5(9):1565-80.
287. Kilmer SL, Carlsen RC. Forskolin activation of adenylate cyclase in vivo stimulates nerve regeneration. *Nature*. 1984;307(5950):455-7.
288. Cai D, Shen Y, De Bellard M, Tang S, Filbin MT. Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition of axonal regeneration by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. *Neuron*. 1999;22(1):89-101.
289. Liu Y, Grumbles RM, Thomas CK. Electrical stimulation of embryonic neurons for 1 hour improves axon regeneration and the number of reinnervated muscles that function. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2013;72(7):697-707.
290. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell*. 1994;77(2):261-71.
291. Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, et al. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature*. 1998;391(6664):285-8.
292. Weidner KM, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*. 1996;384(6605):173-6.
293. Rodrigues GA, Park M, Schlessinger J. Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. *The EMBO journal*. 1997;16(10):2634-45.