

Université de Montréal

Rôle des Smads lors du processus de régénération chez
Ambystoma mexicanum

par Jean-François Denis

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en Biochimie

Février, 2017

© Jean-François Denis, 2017

Université de Montréal

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire
Faculté de Médecine

La présente thèse intitulée : Rôle des Smads lors du processus de régénération chez
Ambystoma mexicanum

Présentée par :
Jean-François Denis

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Alain Moreau – Président-rapporteur
Stéphane Roy – Directeur
André Tremblay – Membre du jury
Marie-Andrée Akimenko – Examineur externe
Zoha Kibar – Représentant du doyen

Résumé

Les capacités de guérison humaine étant limitées et grandement associées à la fibrose, la possibilité de régénérer tous tissus contribueraient grandement à l'amélioration de la santé des patients. Dans le cadre de ce projet de doctorat, nous avons publié un article montrant les limitations de certains modèles de recherche en ce qui a trait à la guérison des plaies. Ces limitations sont d'autant plus importantes lorsque la recherche traite de régénération tissulaire. Aussi, cette publication positionne l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) comme un excellent modèle pour étudier le processus de régénération épimorphique ainsi que l'importance de la signalisation TGF- β .

La cytokine multifonctionnelle TGF- β est impliquée dans la guérison, l'induction des cicatrices, la différenciation, la croissance et la migration cellulaire. Cette cytokine est responsable de la guérison quasi parfaite des muqueuses buccales chez les mammifères, mais est aussi liée à la cicatrisation de plusieurs autres types tissulaires. La famille des TGF- β est aussi impliquée dans la régénération épimorphique chez l'échinoderme, ainsi que dans la régénération hépatique (hyperplasie compensatoire), ce qui confirme son rôle régulateur de la guérison parfaite.

Des travaux précédents ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la signalisation des TGF- β (SB-431542) empêche la régénération (Lévesque et al., 2007). Comme la voie canonique de signalisation de TGF- β s'opère via les protéines Smads (Smad2 & 3), l'étude de ces deux protéines est au cœur du second article. Lors du processus de régénération, Smad2 est phosphorylé entre 6h et 48h post-amputation (pa), ce qui correspond à la phase de migration cellulaire et au début de la prolifération. D'un autre côté, Smad3 est phosphorylé plus tôt, entre 3h et 6h pa, alors que la quantité de protéine totale diminue lors de la phase de préparation. L'administration de l'inhibiteur SB-431542 au moment de l'amputation bloque l'activation de Smad2 et de Smad3. Aucun blastème ne se forme, bien que la plaie ferme normalement. L'utilisation des inhibiteurs SIS3 et Naringenin (spécifique à Smad3) réduisent la phosphorylation de Smad3 d'environ 50 % (lorsque mesurée par immunobuvardage). Le processus de régénération ne semble toutefois pas affecté. La régulation différentielle des Smads est donc centrale au processus de régénération de l'axolotl.

Dans le cadre de ce projet, nous avons aussi tenté de bloquer spécifiquement l'expression, ainsi que l'activation de Smad2. J'ai premièrement établi que Smad2 et Smad3 étaient présents dans la lignée cellulaire AL-1 et qu'ils peuvent être phosphorylés. J'ai ensuite tenté, par différentes techniques, de réduire l'activation spécifique de Smad2, sans succès. D'autre part, plusieurs expériences complémentaires confirment que l'activation de Smad3 est difficilement détectable et est peu importante pour la formation du blastème.

La capacité exceptionnelle de régénération de l'axolotl est intimement liée à une activation différentielle des protéines Smad2 et Smad3. L'activation de Smad2 est associée à une prolifération cellulaire importante. D'autre part, l'absence de fibrose est potentiellement due à la faible activation de Smad3 au cours du processus de régénération.

Mots-clés : Axolotl, TGF- β , Smad2, Smad3, régénération

Abstract

Since wound healing in human is imperfect and associated with fibrosis, understanding how regeneration works would be a great asset to improve patient's health. During this PhD project, we have published a paper exposing the weaknesses of certain research models when studying wound healing. Those limitations are even more striking when studying regeneration. This publication sets the stage for the use of the axolotl (*Ambystoma mexicanum*) as an excellent model to study regeneration and the importance of TGF- β for the process.

The multifunctional cytokine TGF- β is involved in healing, scarring, cellular differentiation, growth and migration. This cytokine is associated with the near perfect healing of oral tissues in humans, but is also associated with scarring of multiple tissue types. TGF- β is also associated with epimorphic regeneration in echinoderm and liver hyperplasia.

Previous work had shown that treatment of regenerating axolotl limbs with a specific inhibitor of TGF- β canonical signalling (SB-431542) prevents regeneration (Lévesque et al., 2007). Since canonical signaling goes through Smad2 and Smad3, those two proteins are at the center of the second publication. During limb regeneration, Smad2 is phosphorylated at 6h-48h post-amputation (pa), which corresponds to the cellular migration phase and the beginning of the proliferative phase. On the other hand, Smad3 phosphorylation happens earlier (3h-6h pa), while the total protein expression is lower. Treatment with SB-421543 blocks the phosphorylation of both Smad2 and Smad3. No blastema is formed, but the wound closes at the same rate. Treatment with other inhibitors, SIS3 or Naringenin (specifically targeting Smad3), blocks approximately 50% of Smad3 phosphorylation (as determined by western blotting), but regeneration is not affected. Differential regulation of Smads is essential for proper regeneration to occur.

Lastly, we have tried multiple approaches to diminish specifically the activation of Smad2. Using the only axolotl cell line available (AL-1), we have tried inhibition with LNA molecules, long antisense and overexpression of a competitor. None of these approaches specifically reduced the levels of Smad2. In addition, other experiments confirmed that activation of Smad3 during the regeneration process is limited.

The extraordinary ability to regenerate that the axolotl possesses is tightly linked to a differential activation of Smad2 and Smad3 proteins. Smad2 phosphorylation is associated with cellular proliferation and migration, hence blastema formation, while the apparent lack of Smad3 activity might partly explain why these animals do not form scar tissues.

Keywords: Axolotl, TGF- β , Smad2, Smad3, regeneration

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
Préface.....	1
1- Introduction.....	2
1.1 Capacité de guérison chez l'humain.....	2
1.1.1 Voie canonique des TGF- β	4
1.1.2 Les meilleurs exemples de guérison chez l'humain et leurs limites.....	7
1.2 Modèles permettant de mieux comprendre la guérison des plaies et la régénération des tissus.....	9
1.2.1 Guérison et régénération pour divers modèles de recherche : Souris, Cochon, Xénope et Poisson zèbre.....	9
1.2.2 Axolotl, un excellent modèle pour étudier la régénération.....	11
1.3 Signalisation TGF- β , essentielle à la guérison et pour la régénération.....	16
1.3.1 Importance de la signalisation TGF- β lors de la guérison chez les vertébrés.....	16
1.3.2 Effets négatifs de la signalisation TGF- β lors de la guérison.....	19
1.4 Différences entre les Smads de la voie canonique.....	22
1.4.1 Smad2.....	25
1.4.2 Smad3.....	26
1.4.3 Smad7.....	27
1.4.4 Mécanismes permettant des fonctions différentielles pour Smad2 et Smad3.....	28
1.5 Voies non canoniques des TGF-beta.....	32
1.6 Objectifs et hypothèses.....	34
2- Chapitre 1 -Article 1.....	36
2.1 Mise en contexte.....	37

2.2 Contributions des auteurs.....	38
2.3 Texte de l'article - Axolotl as a model to study scarless wound healing in vertebrates: Role of TGF- β signaling pathway.	39
2.3.1 Scope.....	39
2.3.2 Translational Relevance.....	39
2.3.3 Clinical Relevance	39
2.3.4 Introduction.....	40
2.3.5 Experimental Models:	41
2.3.6 Conclusion	56
2.3.7 Take home message	56
2.3.8 Acknowledgments.....	57
2.3.9 Author disclosure and ghostwriting.....	57
2.3.10 Mises à jour.....	57
3. Chapitre 2 – Article 2.....	59
3.1 Mise en contexte	60
3.2 Contribution des auteurs	61
3.3 Texte de l'article - Activation of Smad2 but not Smad3 is required to mediate TGF- β signaling during axolotl limb regeneration.....	62
3.3.1 Abstract.....	62
3.3.2 Introduction.....	62
3.3.3 Results.....	65
3.3.4 Discussion.....	77
3.3.6 Materials and methods.....	80
3.3.7 Acknowledgements.....	84
3.3.8 Competing interests	84
3.3.9 Author contributions	84
3.3.10 Funding	85
3.3.11 Data availability.....	85
3.3.12 Supplementary information	85
3.3.13 Supplementary Materials and Methods:	86
3.3.14 Supplementary figures	91

4. Chapitre 3 – Expériences supplémentaires	103
4.1 Présentation.....	103
4.2 Matériel et Méthodes	104
4.2.1 Protocole pour préparation de protéines (phospho-Smads) dans les AL-1.....	104
4.2.2 LNA et antisens.....	105
4.2.3 Blessure par excision de peau d’axolotl.....	105
4.3 Résultats.....	107
4.3.1 Phosphorylation différentielle des Smads dans d’autres modèles	107
4.3.2 Diminution de l’expression de Smad2 par LNA, long antisens et compétiteur non-phosphorylable.....	113
5. Discussion.....	117
6. Conclusion	125
Bibliographie.....	127
Annexe 1	i
Expériences supplémentaires : Moduler l’activité de Smad3	i
Annexe 2	vi
Expériences supplémentaires : Voie non canonique de p38.....	vi

Liste des tableaux

Introduction

Tableau I. Gènes cibles de Smad2 et de Smad3.....	23
---	----

Chapitre 2

Tableau I. Supplementary Table 1: List of primers	88
---	----

Tableau II. Supplementary Table 2: Antibodies and blotting conditions.....	89
--	----

Tableau III. Supplementary Table 3: Plasmids used in injection/electroporation experiment ..	90
--	----

Liste des figures

Introduction

Figure 1.	Exemple de guérison d'une plaie par excision	3
Figure 2.	Signalisation canonique des TGF- β	6
Figure 3.	Modèles de recherche pour la guérison des plaies et la régénération	14
Figure 4.	Stades de régénération	15
Figure 5.	Figure comparative entre Smad2 et Smad3	24
Figure 6.	Résumé des mécanismes pouvant expliquer une régulation différentielle de Smad2 et Smad3.....	31
Figure 7.	Représentation simple de la signalisation TGF- β	33

Chapitre 1

Figure 8.	Figure 1: Rooted phylogenetic tree depicting evolutionary relationships between various organisms.	43
Figure 9.	Figure 2: Axolotl can regenerate after injury or amputation throughout the animal's life.....	48
Figure 10.	Figure 2: Whole-mount in situ hybridization of wound healing genes	52
Figure 11.	Figure 4: Wound healing after oral surgery in human	55

Chapitre 2

Figure 12.	Figure 1: The basement membrane does not prematurely reform when TGF- β signaling is blocked in regenerating axolotl limbs.	66
Figure 13.	Figure 2: Expression of Smads during normal limb regeneration.	69
Figure 14.	Figure 3: Inhibition of Smad3 phosphorylation has minimal effect on limb regeneration.....	72
Figure 15.	Figure 4: SB-431542 prevents phosphorylation of Smad2 in regenerating limbs.....	73
Figure 16.	Figure 5: SIS3 treatment reduces p-Smad3 in regenerating limbs.	74
Figure 17.	Figure 6: SB-431542 treatment reduces expression of canonical TGF- β target MMPs.....	76

Figure 18.	Supplementary Figure 1: SB-431542 does not affect basement membrane reformation in regenerating limbs.....	92
Figure 19.	Supplementary Figure 2 : Protein alignment of Smad2.....	94
Figure 20.	Supplementary Figure 3: Protein alignment of Smad3.....	96
Figure 21.	Supplementary Figure 4: Overexpression of axolotl Smad3 leads to increased apoptosis in AL-1 cell line.....	97
Figure 22.	Supplementary Figure 5: Overexpression of axolotl Smad3 in vivo leads to apoptosis.....	99
Figure 23.	Supplementary Figure 6: SB-431542 prevents phosphorylation of p-Smad2 in regenerating limbs.....	100
Figure 24.	Supplementary Figure 7: SIS3 treatment reduces phosphorylation of p-Smad3.....	101
Figure 25.	Supplementary Figure 8: p-Smad2 and p-Smad3 are not detected at Medium Bud and Palette stages	102

Chapitre 3

Figure 26.	Schéma des blessures par excision	106
Figure 27.	Activation des Smads dans les cellules AL-1	110
Figure 28.	Activation des Smads suite à une blessure par excision.....	112
Figure 29.	Inhibition de Smad2 dans les AL-1	116

Discussion

Figure 30.	Résumé de la phosphorylation des Smads lors de la phase de préparation	122
------------	---	-----

Annexes

Figure 31.	Les traitements avec la Naringénine réduisent l'expression de Smad3, mais n'affectent pas la régénération	iv
Figure 32.	Injection in vivo de SIS3 et du rapporteur luciférase CAGA ₁₂ lux	v
Figure 33.	Rôle de la voie non canonique p38 lors de la fermeture de la plaie	viii

Liste des sigles et abréviations

A549 : Adenocarcinome à cellules basales épithéliales humaines

AEC : Coiffe apicale épithéliale

AGE : Advanced Glycation End products

AL-1 : Axolotl Limb 1

EB : Early Bud

ED : Early differentiation

EMT : Transition épithéliale mésenchymateuse

HaCat : Kératinocytes humains immortalisés

Hek293 : Cellules embryonnaires de rein humain

HepG2 : Cellules cancéreuses hépatiques humaines

K.O. : Knock Out

ARNm : ARN messenger

MB : Medium bud

MH1 : MAD homology 1

MH2 : MAD homology 2

Mv1Lu : Cellules épithéliales de poumon de vison

L15 : milieu Leibovitz's L-15

LNA : Lock Nucleic Acid

pa : post-amputation

Pal : Palette

ROS : Reactive Oxygen Species

SBE : Smad binding element

SCC : Carcinome à Cellules Squameuses

TID : Transactivational Inhibitory Domain

À Normand et Françoise,

au moment où j'écris ces lignes, je pense à vous...

Remerciements

Au cours de mes études doctorales, j'ai eu la chance de travailler et de rencontrer des gens exceptionnels. J'aimerais les remercier pour leur support tout au long de ces années passées au Doctorat.

Tout d'abord, merci Stéphane pour la confiance que tu m'as accordée et les conseils toujours judicieux que tu as partagés avec moi. J'ai eu la chance de découvrir une personne rigoureuse qui sait défendre ses idéaux, mais aussi quelqu'un de très sympathique et de très agréable.

Merci aux gens du laboratoire Roy. Nous avons passés plusieurs moments agréables à travailler, autour d'une partie de Diablo II ou encore à jouer à Magic. Merci Étienne de m'avoir introduit à cette équipe de recherche. Ton amitié m'est précieuse et je te souhaite tout le succès que tu mérites. Merci Éric de jouer les DJ et de nous régaler avec tes histoires. Tu as toujours été là pour me remonter le moral quand les journées s'étirent et que nous ne n'en voyons pas la fin. Finalement, merci Fadi d'avoir partagé mes projets et mes idées les plus farfelus. Avec un peu de chance, je devrais déposer cette thèse sous peu et j'aimerais pouvoir te dire, une dernière fois, «and that's how we shave!». Vous avez été comme une famille et je vous avoue que je vais m'ennuyer. Merci aussi aux gens du laboratoire de Gerardo, du laboratoire Barbeau et du laboratoire Nanci avec qui j'ai collaboré et avec qui j'ai pu échanger des idées. Votre aide a toujours été très appréciée.

Un grand merci aux membres de mon comité de thèse, Gerardo et Anie. Vos conseils, mais surtout votre enthousiasme lorsque nous discutons de mon projet fait chaud au cœur et m'a donné un peu plus d'énergie pour faire avancer ce projet.

À ma famille et à mes amis, un merci tout spécial pour le support dans cette quête du doctorat qui n'a pas toujours été simple. Vous avez été mon support moral dans les périodes plus intenses. Finalement, merci Émilie, je pourrais difficilement imaginer ma vie sans toi. Je vous aime tous et chacun.

Préface

Quand j'ai commencé mon doctorat, la régénération tenait plus de la légende que de la science. Dans notre littérature et dans notre cinéma, il existe un bon nombre de créatures capables de régénérer parfaitement. Ce sont des héros bienveillants ou des animaux étranges. Quoi qu'il en soit, notre capacité à trouver de nouvelles idées doit être alimentée par des exemples que nous pouvons percevoir.

Aussi, on retrouve dans la nature des animaux capables de régénérer parfaitement et cette capacité a su intriguer plusieurs scientifiques au cours des âges. Comprendre ce processus n'est toutefois pas une mince affaire. Même Thomas Morgan, gagnant d'un Nobel et père de la génétique moderne, nous a laissé dans ses écrits que la compréhension de ce phénomène était hors de sa portée. Il nous écrit, à la blague, qu'à la suite de ses travaux sur la régénération, il s'est attardé à une problématique plus simple soit la compréhension de l'hérédité.

Je crois toutefois que la régénération mérite d'être étudiée et que la compréhension de ce processus aura des impacts importants sur notre façon d'utiliser la médecine dans l'avenir. Il s'agit définitivement d'un phénomène excessivement complexe qui ne pourra être résolu par le travail d'une seule personne. C'est un casse-tête dont les morceaux doivent être assemblés un à un et où le progrès est parfois très lent.

Quant à la façon de répondre à la question « comment ça marche ? », j'estime que nous devons faire comme nos auteurs et cinéastes en nous inspirant de la nature pour trouver nos réponses. Mon directeur de thèse a une bien belle pensée à ce sujet ; il croit que la nature est un grand laboratoire qui a effectué plus d'expériences au cours du temps que nous ne pourrions jamais en faire. Dans cette diversité d'espèces qui peuplent notre monde, il existe sûrement un exemple qui pourra nous guider vers la compréhension de la régénération. Pour moi, notre amphibien modèle est cette source d'inspiration et de réponses. Avec son aide, je pense avoir été en mesure de placer une pièce dans ce grand casse-tête qu'est la régénération.

1- Introduction

1.1 Capacité de guérison chez l'humain

Les capacités de guérison de l'humain, bien qu'impressionnantes dans certains cas, sont loin d'être parfaites. L'exemple des tissus osseux est particulièrement intéressant. Les os sont en remodelage constant et sont capables de se reformer suite à une brisure. Cependant, si la distance entre les deux bouts d'os atteint une distance critique, ils ne pourront pas se ressouder¹. De manière similaire, la guérison de la peau s'effectue de manière presque parfaite lorsque la blessure est superficielle, mais ce n'est pas le cas pour une blessure qui touche au derme. Dans ce dernier cas, la guérison des plaies mène, le plus souvent, à la cicatrisation, ce qui entraîne une perte de fonction des organes touchés (voir l'exemple d'une plaie par excision, Figure 1). Il s'agit toutefois d'un processus essentiel pour la survie, puisque la guérison d'une plaie protège l'organisme de l'intrusion par des micro-organismes et autres molécules potentiellement dangereuses.

La guérison est un processus complexe. Par exemple, suite à une blessure de la peau, il doit tout d'abord y avoir une accumulation de plaquettes sanguines qui vont fermer la plaie. Cette première étape est cruciale pour démarrer le processus de guérison, car ces cellules représentent la première source de facteurs de croissance. Elle permet aussi de limiter le saignement. Ensuite, il y a une phase d'inflammation qui joue un rôle important dans la défense de l'organisme (premièrement les neutrophiles, puis les macrophages), mais aussi pour le recrutement des cellules qui permettront le dépôt de nouveaux tissus. S'en suit une phase de dépôt de tissu de granulation qui permet la migration des kératinocytes (réépithélisation) qui, sous l'influence des facteurs de croissance présents, vont migrer pour fermer la plaie. Une fois la plaie fermée, la matrice extracellulaire, qui forme la charpente des tissus normaux, est déposée au site de la blessure. On retrouve, entre autres, l'expression de collagène de type I qui est liée à la formation de cicatrice. La phase finale est une phase de maturation où le remodelage de la nouvelle matrice s'opère. Bien que le collagène soit remodelé, comme l'on peut voir sur la figure 1, les glandes et les follicules pileux ne sont pas régénérés (voir²⁻⁴).

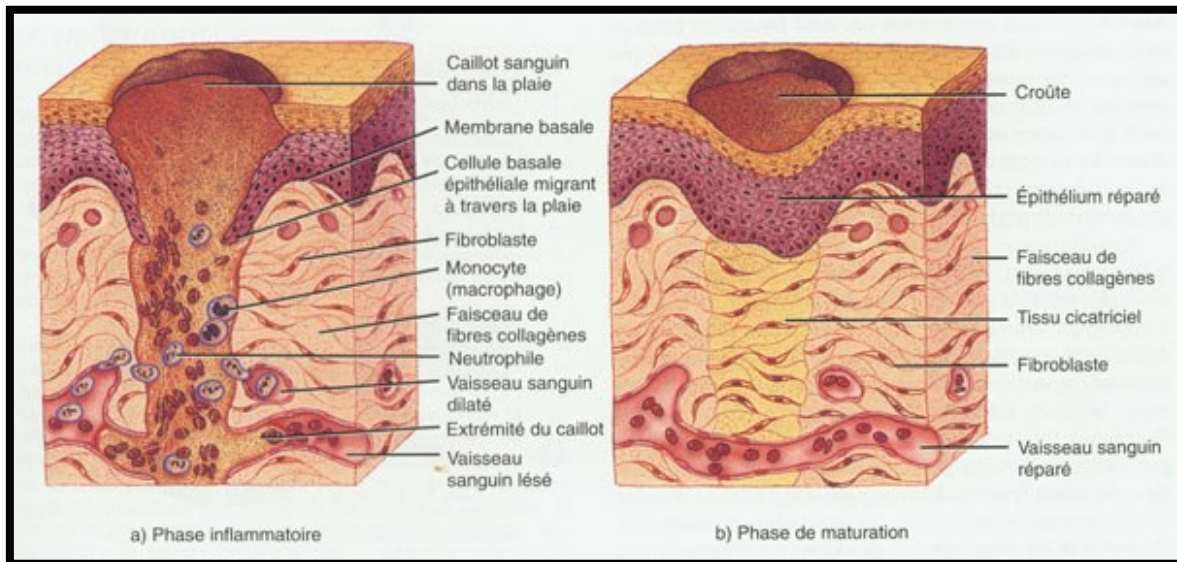


Figure 1. Exemple de guérison d'une plaie par excision

Figure modifiée de Tortera et al, 2009. a) La blessure représentée est une plaie par excision qui touche l'épiderme et le derme. Phase inflammatoire. Infiltration des cellules immunitaires et des fibroblastes au site de la blessure par excision. b) Phase de remodelage. L'épithélium et les vaisseaux sanguins sont reformés, mais un dépôt de collagène sous-épithélial est clairement apparent.

1.1.1 Voie canonique des TGF- β

La voie canonique de TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*) est l'une des mieux étudiée lors du processus de guérison. Cette voie participe au recrutement des macrophages et des fibroblastes au site de la plaie, régule la fermeture de la plaie par les kératinocytes, promeut la prolifération des fibroblastes au sein de la plaie et est aussi importante pour la formation de nouvelle matrice extracellulaire ⁵.

TGF- β 1 est un facteur de croissance sécrété sous forme d'un complexe inactif ^{6,7}. Le dimère doit être clivé pour se lier à la portion extracellulaire de son récepteur transmembranaire de type II (TGFBR2) (voir Figure 2). Une fois lié avec ce récepteur, le complexe se lie avec le récepteur de type I (TGFBR1) et l'active en le phosphorylant, permettant la transduction du signal vers l'intérieur de la cellule (via les Smads). Cette phosphorylation induit un changement de conformation qui permet à ce dernier de transmettre le signal via une phosphorylation du motif SSXS (Sérine-Sérine-acide aminé-Sérine) en N-terminal du domaine MH2 (*Mad Homology 2*) de Smad2 et de Smad3. Smad2 et Smad3 sont ensuite relâchés du récepteur et se lient avec Smad4 dans le cytoplasme de la cellule ⁸. Le complexe interagit avec d'autres facteurs de transcription comme ETS1, AP1 et AP2, FAST1, FAST2, Sip1 et recrutent des cofacteurs comme p300 et CBP ⁹⁻¹⁶ avant de participer à la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation.

La voie canonique des TGF- β utilise les facteurs de transcription Smads pour faire le relai des signaux extracellulaires vers le noyau des cellules. Il y a présentement huit protéines Smad connues et classées en trois groupes. Les R-Smads (1, 2, 3, 5, 8) sont des protéines phosphorylables par un récepteur de type I, aussi appelées Smad récepteur, agissant comme facteurs de transcription. Le co-Smad4 (médiateur commun) est capable de lier l'ADN via son domaine MH1 et comprend un signal de localisation nucléaire. Il doit s'associer avec deux R-Smads et il est commun aux différentes voies régulées par la superfamille des TGF- β . Finalement, les I-Smad (6,7) ne peuvent pas être phosphorylés et agissent comme inhibiteurs compétitifs des R-Smads, soit au récepteur, soit en recrutant des ubiquitines ligases menant les complexes au protéasome. Les isoformes de TGF- β (1, 2, 3 chez les mammifères ou 5 chez le xénope), ainsi que les Activines utilisent les R-Smad 2 et 3 pour transmettre leurs signaux, et

sont négativement régulés par le I-Smad 7. Les BMP utilisent les R-Smad 1, 5 et 8 et sont négativement régulés par le I-Smad 6^{9,17,18}.

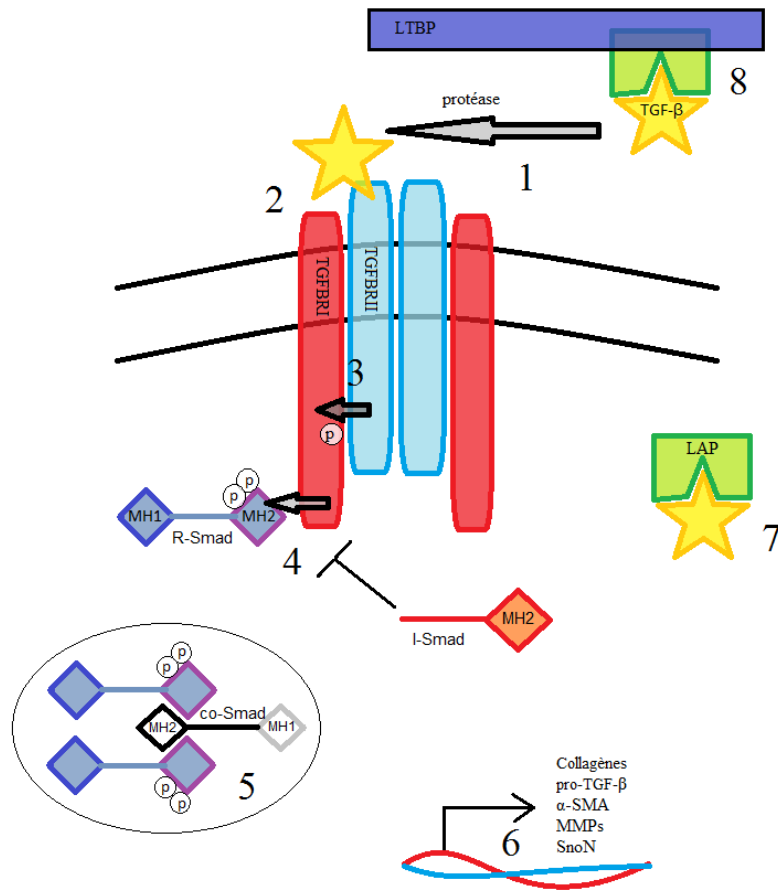


Figure 2. Signalisation canonique des TGF-β

Suite à une blessure, **1**) des protéases sont activées et libèrent le TGF-β de la matrice extracellulaire. **2**) La cytokine se lie avec son récepteur de type II **3**) qui active le récepteur de type I par phosphorylation. Le récepteur de type I **4**) active les R-Smads (2 ou 3) en phosphorylant deux sérines de leur domaine MH2. Une fois activés, ces R-Smads **5**) forment un complexe avec le co-Smad via leur domaine MH2 respectif. Ces complexes **6**) sont importés au noyau où ils régulent l'expression de gènes comme TGF-β. **7**) TGF-β est exprimé sous forme d'une pré-pro-protéine qui doit être clivée pour former un complexe de latence (LAP) contenant le TGF-β actif. Avant d'être sécrété, le peptide de TGF-β actif est clivé de la pro-protéine par l'enzyme Furine. Ce complexe contient le TGF-β latent qui est excrété pour **7**) se lier à LTBP (*Latent TGF-β binding protein*) dans la matrice extracellulaire.

1.1.2 Les meilleurs exemples de guérison chez l'humain et leurs limites

1.1.2.1 Régénération musculaire

Il s'agit d'un processus très efficace en jeune âge, mais dont l'efficacité est grandement diminuée avec l'âge. Les muscles sont capables de se réparer et de retrouver leur force contractile, et ce, même suite à une déchirure. Ce sont les cellules souches musculaires (aussi nommées cellules satellites) qui mènent le processus de guérison et permettent le rétablissement des muscles. Cette capacité est cependant limitée par la signalisation qui s'altère et par le bassin de cellules souches disponible qui diminue avec l'âge. On rapporte, dans la littérature, une implication de la voie de signalisation TGF- β /p-Smad3, dont l'expression augmente avec l'âge du tissu musculaire et qui cause de l'inflammation, de la cicatrisation et une perte de capacité à reformer de nouvelles fibres musculaires. De plus, la capacité de guérison est aussi liée à la gravité de la blessure. Une déchirure importante d'un muscle peut mener au dépôt de tissus cicatriciels empêchant la guérison optimale de ce muscle¹⁹⁻²¹. On devrait donc plutôt parler d'une excellente capacité de réparation des muscles que de régénération.

1.1.2.2 La guérison des tissus fœtaux

La capacité exceptionnelle de guérison du fœtus est intimement liée au stade de développement embryonnaire de l'animal (incluant l'humain) et se perd avec l'âge. Plusieurs explications ont été fournies afin de comprendre les raisons d'une guérison aussi parfaite. Ces observations ont été faites tant chez l'humain que dans les modèles de souris, de rats, de lapins, de cochons, de singes ou de moutons. On observe tout d'abord que le ratio entre collagène de type III et collagène de type I est plus élevé dans la guérison fœtale que dans la guérison de tissus adultes. Il y a aussi plus de fibronectine et d'acide hyaluronique lors de la guérison fœtale comparativement à la guérison des tissus adultes. Ces composantes de la matrice extracellulaire sont dites pro-régénératrices²². Le système immunitaire adaptatif fœtal est relativement naïf et la réponse immunitaire n'est pas aussi soutenue que durant la guérison chez les adultes. D'autre part, le niveau de TGF- β 3 comparativement à celui de TGF- β 1 et de TGF- β 2 est beaucoup plus élevé dans la guérison des tissus fœtaux comparativement au ratio observé lors de la guérison des tissus adultes. Il ne semble pas non plus que les tissus fœtaux aient beaucoup de TGF- β en réserve dans leur matrice extracellulaire, ce qui limite l'action de cette voie de signalisation suite

à une blessure. De plus, on observe aussi que la réponse à la stimulation par TGF- β des fibroblastes fœtaux n'est pas la même que celle des fibroblastes adultes. L'auto-induction de TGF- β (l'activation de la voie de signalisation de TGF- β est liée à l'expression de la cytokine TGF- β , donc la voie de signalisation de TGF- β est capable de s'auto-réguler positivement, voir figure 2) est plus courte, ce qui limite la prolifération des cellules, diminue l'expression des collagènes et minimise la transformation de fibroblastes en myofibroblastes. Cela a pour impact de réduire la force contractile au sein du tissu fœtal lors de la guérison. Il ne faut pas exclure que cette capacité soit liée au fait que l'embryon, encore en développement, possède une quantité appréciable de cellules souches et conséquemment une capacité d'homéostasie supérieure à celle retrouvée chez les organismes adultes (voir ²²⁻²⁵). D'autre part, la réponse des cellules âgées comparativement aux cellules fœtales n'est pas la même ²⁶. Par exemple, la prolifération des fibroblastes de la peau de provenance fœtale est inhibée par l'action de TGF- β , alors que la prolifération des fibroblastes de la peau adulte est augmentée ²⁶. Toutes ces évidences peuvent expliquer la capacité exceptionnelle de guérison que présentent les embryons comparativement aux adultes.

1.1.2.3 La guérison des tissus oraux comparativement à la guérison de la peau

La guérison des muqueuses orales est impressionnante. Après le remodelage des tissus, on peut difficilement distinguer l'endroit où le dommage a eu lieu. Plusieurs observations nous rappellent ce qui arrive lors de la guérison des tissus fœtaux. Premièrement, il y a moins de collagène de type I comparativement au collagène de type III ²⁷ lors de la guérison des muqueuses comparativement à la guérison de la peau. On observe aussi une activation plus importante de TGF- β 3 comparativement à TGF- β 1 ²⁸. Cependant, la qualité de guérison est préservée, même à un âge avancé ²⁹. Ce processus n'est toutefois pas parfait, il y a présence d'un peu de tissus cicatriciels suite à une intervention chirurgicale. En comparaison, la peau (un autre épithélium) ne guérit pas aussi bien chez une personne âgée. Cela est dû à la perte d'expression de certains gènes importants pour la guérison, dont TGF- β , CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) et le procollagène de type I ³⁰.

1.1.2.4 Le bout de doigt

Suite à une amputation, le bout de doigts de jeunes enfants est capable de régénérer³¹. Malheureusement, il s'agit aussi d'une capacité qui se perd avec l'âge. Plusieurs cas ont été publiés et montrent que la fermeture de la plaie à l'aide de sutures empêche ce processus d'opérer. Pour qu'il y ait régénération, la plaie doit rester ouverte et propre (voir³²). La souris est un bon modèle pour étudier le fonctionnement de ce phénomène. L'amputation de la phalangette mène à un processus de régénération qui est intimement lié à la signalisation des MSX (*Msh homeobox*) et des BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)³³. Plus récemment, des efforts ont mené à l'amélioration de la capacité de régénération des doigts chez la souris par l'incorporation de billes contenant du BMP2³⁴. Ces travaux nous informent qu'il est possible de régénérer des bouts de doigts, même chez les mammifères. Nous ne comprenons toutefois pas quels signaux sont essentiels et comment la régulation de ces signaux s'opère. L'idéal serait donc d'avoir un modèle capable de régénération parfaite pour comparer au modèle n'en étant pas capable.

1.2 Modèles permettant de mieux comprendre la guérison des plaies et la régénération des tissus

Les modèles animaux sont indispensables à l'étude des fondements moléculaires des processus biologiques. Il n'est malheureusement pas toujours possible de le faire directement avec des tissus humains. Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour aider à la compréhension de la guérison. Chacun de ces modèles présente des avantages et des limites.

1.2.1 Guérison et régénération pour divers modèles de recherche : Souris, Cochon, Xénope et Poisson zèbre

La souris est le modèle animal le plus utilisé. Il existe une panoplie de lignées de souris avec différentes caractéristiques, de délétions géniques et de modifications génétiques. De grands projets de séquençage tant pour le génome que pour le protéome ont été effectués ou sont

en cours. Malgré tout, quand il est question de guérison ou de régénération, ce modèle n'est pas le plus approprié. L'architecture de sa peau est loin de celle de l'humain. La peau de la souris n'est pas attachée au derme comme chez l'humain et la fermeture de la plaie s'opère majoritairement par l'action d'un muscle sous épithélial, le *panniculus carnosus*³⁵. Cependant, tout comme l'humain, le bout du doigt de la souris régénère^{36,37}, ce qui en fait un modèle intéressant pour comprendre ce phénomène. Certaines lignées de souris sont aussi connues pour être plus efficaces pour guérir leurs plaies, comme les souris Smad3^{-/-}³⁸ et les souris TGFBR1^{-/-}³⁹.

Le cochon présente une peau plus similaire à celle de l'humain^{27,28,40}. Les trois isoformes de TGF- β sont aussi détectables dans leur peau et le processus de guérison est comparable à celui de l'humain⁴¹. Cependant, les outils ne sont pas aussi développés que chez la souris et le coût de chaque cochon est beaucoup plus élevé.

Le xénope et le poisson zèbre sont des modèles vertébrés phylogénétiquement plus éloignés de l'humain. Ils présentent tous deux des capacités de guérison intéressantes. Le têtard de xénope possède une capacité de régénération qui est progressivement perdue chez l'adulte. Ce modèle a donc des capacités de régénération transitoires qui ne sont pas présentes chez l'adulte. Plusieurs outils génétiques sont disponibles pour le poisson zèbre et plusieurs études ont été menées pour comprendre la guérison parfaite et la régénération dans ce modèle, particulièrement au niveau des nageoires⁴²⁻⁴⁶, du cœur⁴⁷, de la peau^{48,49} et des muscles^{50,51}. Cependant, ce modèle n'est pas un tétrapode, ce qui l'éloigne de l'humain phylogénétiquement.

Un nouveau modèle très intéressant pour la guérison est le genre *Acomys*. Il s'agit d'un clade de rongeurs ressemblant à une souris, mais présentant des poils hérissés qui rappellent ceux du hérisson. Suite à une blessure, les glandes et les différents types de tissus semblent tous régénérer sans cicatrisation^{52,53}. Plus récemment, il a aussi été montré que le *panniculus*

carneus est capable de régénérer⁵⁴. Il sera intéressant de voir si ces organismes possèdent des qualités de guérison parfaite dans l'ensemble de leurs organes et de leurs tissus.

Utiliser un modèle qui guérit parfaitement toute sa vie pourra nous permettre de mieux comprendre comment l'humain perd ses capacités de guérison avec l'âge.

1.2.2 Axolotl, un excellent modèle pour étudier la régénération

L'utilisation d'un modèle vertébré capable de régénérer parfaitement est très utile pour le perfectionnement de nos connaissances (voir Figure 3). Chez les amphibiens, les salamandres comme le *Notophthalmus viridescens* ou l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) sont des modèles de prédilection. Ces amphibiens de l'ordre des urodèles sont capables de régénérer avec exactitude plusieurs organes complexes (c.-à-d. la patte : comprends de la peau, des os, des nerfs, des vaisseaux sanguins, des muscles), et ce, tout au long de sa vie^{55,56}. Les outils présentement disponibles ne sont pas comparables à ceux disponibles pour la souris. Toutefois, pour l'axolotl, il y a eu des progrès notables dans les dernières années avec une augmentation du nombre de séquences de gènes disponibles (voir Salsite,⁵⁷), des outils pour surexprimer des gènes ou des antisens (électroporation et infection)⁵⁸⁻⁶⁰, de notre capacité à faire des animaux transgéniques⁶¹⁻⁶⁵ et à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques^{56,66}.

Le processus de régénération de la patte chez l'axolotl est épimorphique ; la régénération est possible grâce à la prolifération de cellules qui reformeront l'organe perdu. Le processus est connu et bien décrit depuis plus d'une centaine d'années⁶⁷. Il a été divisé en deux phases et subdivisé en plusieurs stades bien décrits⁶⁸. La phase de préparation implique la fermeture de la plaie par la migration de kératinocytes⁶⁹. Cet épithélium de guérison devient permissif et se nomme cap épithélial apical (AEC). Il est essentiel à la régénération^{70,71}. Suite à la fermeture de la plaie et l'instauration de l'AEC, une importante phase de migration et de prolifération de cellules du mésenchyme à lieu. Cette étape mène à la formation d'une structure unique à la régénération que l'on nomme blastème. Ce blastème est composé majoritairement de fibroblastes ayant des caractéristiques similaires à des cellules dédifférenciées⁷². La formation du blastème est dépendante des nerfs. En effet, il a été montré qu'une dénervation de la patte chez l'axolotl et chez le triton prévient la formation du blastème et cause aussi une régression

de celui-ci. Cependant, le processus devient indépendant des nerfs lorsqu'il atteint la deuxième phase ; la phase de redéveloppement. Lors de cette phase, le blastème ne régresse pas lorsque la patte est dénervée ^{73,74}. Les cellules se redifférencient et l'organe perdu est régénéré ^{67,68,75}. Toute la signalisation et les cellules essentielles sont localisées à un maximum de 2mm du site d'amputation ⁶⁷.

Le processus de régénération s'apparente à deux processus distincts. La phase de préparation est grandement similaire à ce que l'on observe au cours de la guérison des plaies chez les mammifères. La phase de redéveloppement est, pour sa part, similaire à ce qui est observé lors du développement ⁷⁶⁻⁷⁸.

a)



b)



c)



d)



e)



f)

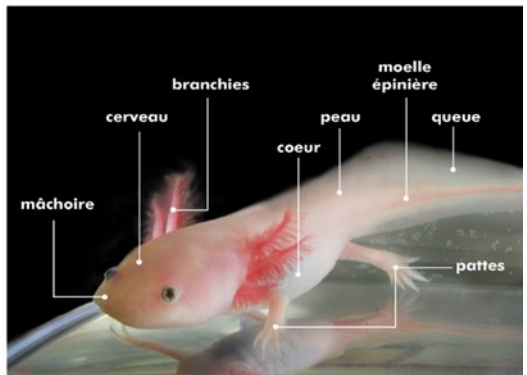


Figure 3. Modèles de recherche pour la guérison des plaies et la régénération

Il existe plusieurs modèles de recherche utiles pour l'étude de la guérison des plaies. Leurs ressemblances avec l'humain et leurs compétences régénératives varient beaucoup. a) La souris est un mammifère. La guérison de sa peau est principalement due à la contraction d'un muscle, le *panniculus carnosus*, qui n'est pas présent chez l'humain. Ce modèle ne régénère pas parfaitement. b) Le cochon présente une peau très similaire à celle de l'humain, ce qui en fait un bon modèle pour certaines études. Plus spécifiquement, le Duroc est un bon modèle pour l'étude de la sclérodémie. Ce modèle ne régénère pas. c) Le xénope est un amphibien. Il guérit sa peau de manière similaire à l'humain. À l'état embryonnaire, il est capable de régénérer ses pattes, mais perd progressivement cette capacité. d) Le poisson zèbre est aussi un vertébré. Tout comme le xénope, il guérit sa peau de manière similaire à l'humain. Il est aussi capable de régénérer un nombre important de tissus dont l'apex de son cœur, les nageoires. e) Le genre *Acomys* est composé de petits mammifères à la peau épaisse. Ils guérissent leur peau de manière étonnante et sont capables de régénérer des structures complexes comme des follicules pileux ou des glandes. Leurs capacités de régénération pour d'autres organes ne sont pas encore bien étudiées, mais elles pourraient surpasser celles observées chez leurs cousines, les souris. f) L'axolotl est un amphibien néotène capable de guérir parfaitement sa peau. Les mécanismes de guérison sont similaires à ceux observés chez l'humain à la différence qu'ils ne causent pas de cicatrisation. Ce modèle est aussi capable de régénérer parfaitement tout au long de sa vie (voir les structures pointées), même s'il est soumis à la métamorphose.

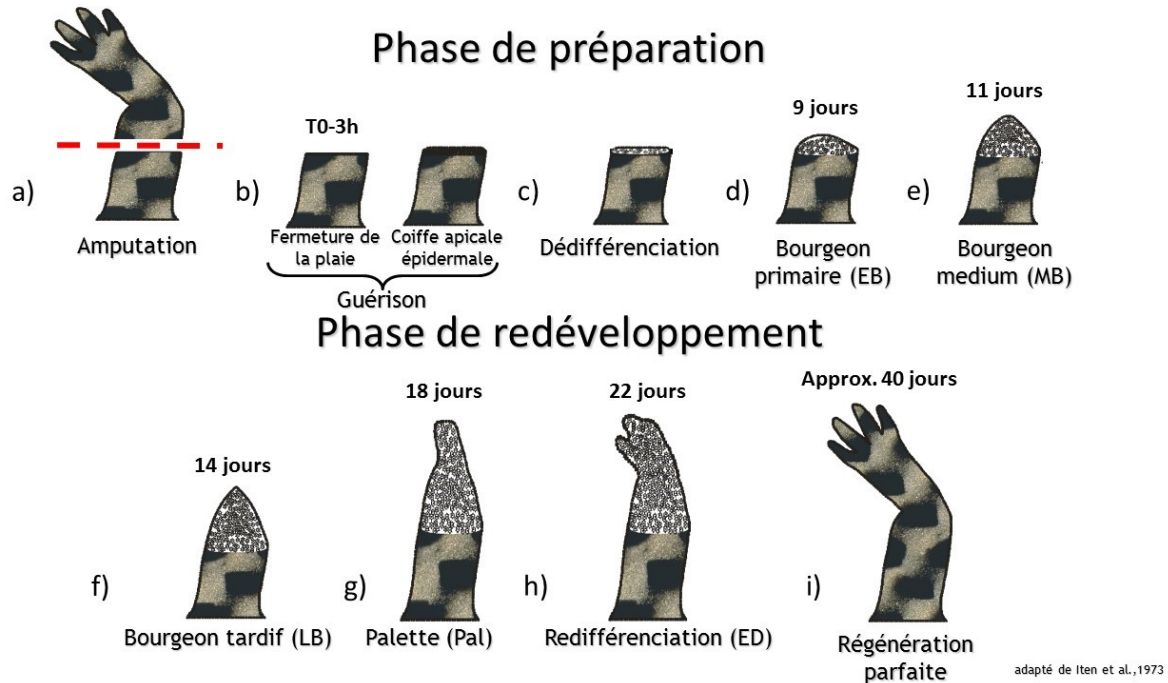


Figure 4. Stades de régénération

Le processus de régénération est divisé en deux phases. Nous effectuons nos amputations avec des ciseaux propres, au travers du cubitus/radius. Nous coupons ensuite les os pour qu'ils ne dépassent pas. **a)** Suite à l'amputation, **b)** les kératinocytes migrent rapidement pour fermer la plaie (environ 3h). L'épithélium qui couvre la blessure devient un centre important de signalisation : la coiffe apicale épidermale, une structure essentielle au processus. Sous l'action de cette structure, **c)** les cellules du mésenchyme sous-jacent vont se dédifférencier et migrer vers le site d'amputation. **d)** Après quelques jours de migration et de prolifération, on peut voir une structure que l'on nomme blastème **e)** qui continue à grossir **f)** et dont le bout devient éventuellement plus aplati. C'est la fin de la phase de préparation et le début du redéveloppement. Le processus devient indépendant des nerfs et progresse vers la formation d'une nouvelle patte en passant **g)** par un stade où l'on commence à voir la condensation des cellules qui donneront de l'os, **h)** puis l'endroit où se développeront les doigts **i)** pour finalement redonner une patte complète. Figure adaptée de Iten et al., 1973

1.3 Signalisation TGF- β , essentielle à la guérison et pour la régénération

Les mammifères ne guérissent pas leurs blessures de manière parfaite, ce qui provoque de la fibrose pouvant affecter l'apparence ou causer une perte de fonction (rôle) de l'organe blessé. Cette formation de cicatrices chez les mammifères est souvent associée à TGF- β . La famille des TGF- β est connue pour son rôle dans plusieurs aspects du développement, comme la prolifération et la migration cellulaire, la guérison des plaies, l'apoptose et le cancer. Les effets de TGF- β sont dépendants du type cellulaire en cause. Par exemple, la prolifération des cellules épithéliales est normalement inhibée alors que dans le cas des cellules du mésenchyme, leur prolifération est augmentée grâce à la signalisation TGF- β ⁷⁹. La migration des cellules épithéliales s'opère suite à une transition vers un phénotype plus mésenchymateux (EMT) qui est aussi contrôlé et favorisé par l'action de TGF- β . Il semble aussi évident que cette voie de signalisation est impliquée dans une multitude de processus régénératifs telle l'hyperplasie du foie⁸⁰⁻⁸² et lors de la régénération tissulaire chez plusieurs modèles animaux^{47,83-85}. Considérant l'importance de TGF- β lors du processus de régénération, le laboratoire s'est concentré à l'étudier dans un modèle de régénération parfaite, c'est-à-dire la régénération de la patte de l'axolotl.

1.3.1 Importance de la signalisation TGF- β lors de la guérison chez les vertébrés

1.3.1.1 Fermeture de la plaie

Lors de la fermeture de la plaie, TGF- β 1 est clairement régulé au niveau spatio-temporel⁸⁶. Il est important de comprendre que la signalisation canonique de TGF- β 1 joue un rôle différent dépendamment du type cellulaire impliqué. En temps normal, la prolifération des cellules épithéliales est inhibée par cette voie de signalisation. Cependant, la migration des cellules épithéliales qui formeront l'épithélium de guérison pourrait être associée à cette voie de signalisation, puisqu'une transition des cellules épithéliales vers un phénotype mésenchymateux (EMT) est nécessaire. On observe qu'une exposition aiguë de TGF- β 1 semble stimuler la

fermeture de la plaie alors qu'une application en continu cause une fibrose accrue ⁸⁷. On sait, entre autres, que la signalisation TGF- β contrôle l'expression de certaines métalloprotéinases matricielles (MMP) qui, à leur tour, favorisent la migration de l'épithélium de guérison de la cornée ⁸⁸.

1.3.1.2 Remodelage de la matrice extracellulaire

TGF- β 1 est lié à l'expression d'un ensemble de gènes permettant la création de la matrice extracellulaire ^{89,90}. Fait à noter, TGF- β 1 est aussi connu pour sa capacité de régulation des MMPs ⁹¹⁻⁹³, des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles (TIMP)^{92,94}, en plus de réguler l'expression de la fibronectine, et ce chez plusieurs espèces y compris l'axolotl ^{56,70,95}.

La régulation des MMPs est très importante pour une bonne qualité de guérison, ainsi que pour la régénération. L'expression des MMPs est essentielle à la guérison parfaite de *Tribolium castaneum* ⁹⁶. Dans le cas de la souris nue FOXP1 (*Forkhead box protein N1*) déficiente, l'expression des MMP9 et MMP13 et de plusieurs autres MMPs est plus élevée que pour les souris contrôles. On observe une meilleure guérison pour ce modèle de souris ⁹⁷. De plus, lors de la régénération du bout de doigt de souris, l'addition de MMP1 aide aussi à la fermeture de la plaie, à la régénération des tissus mous et à la réorganisation de la matrice extracellulaire ³⁷. D'autre part, lors de la régénération épimorphique d'un membre, plusieurs MMPs sont exprimées chez le triton ⁹⁸. L'expression de MMP2 et de MMP9 a aussi déjà été montrée chez l'axolotl lors de la régénération et de la guérison des plaies ^{55,99-101}. Il semble aussi que l'expression des MMP soit essentielle au processus de régénération, puisque l'inhibition des MMP avec l'inhibiteur de MMPs GM6001 empêche aussi la régénération ^{102,103}. L'axolotl, qui est capable de régénérer parfaitement, exprime aussi plus de MMPs. Ces MMPs sont plus actives dans son blastème suite à une amputation que ce que l'on observe dans une patte de xénope suite à une amputation similaire ¹⁰⁴.

Le remodelage de la matrice extracellulaire est un processus dynamique et très complexe. La guérison s'opère par le dépôt de matrice extracellulaire qui doit être remodelée pour redevenir fonctionnelle. Dans le cas de la régénération parfaite, plusieurs protéines sont associées à cette matrice de transition dont la ténascine C (TNC), l'acide hyaluronique (HA) et la fibronectine (FN) ⁴⁴. Les travaux effectués dans le laboratoire ont montré que la signalisation

TGF- β est essentielle pour l'expression de la fibronectine, pour la migration et pour la prolifération cellulaire lors de la phase de préparation dans les pattes en régénération ⁵⁶. Un autre exemple de matrice transitoire est la régénération cardiaque chez le poisson zèbre. En effet, suite à une blessure au cœur, il y a formation d'une cicatrice transitoire. La voie de signalisation de TGF- β est responsable 1) du dépôt initial de ces tissus cicatriciels 2) du remodelage de ce tissu pour que le muscle cardiaque reprenne ses fonctions normales ⁴⁷.

1.3.1.3 Chimiotactisme amenant les cellules immunitaires à la plaie

Les cytokines ont souvent été décrites comme ayant un rôle d'attraction des cellules immunitaires. L'activation rapide de TGF- β suite à une blessure est intimement liée à l'arrivée des neutrophiles et des macrophages qui produisent eux aussi du TGF- β pour accentuer cette réponse. L'inhibition du récepteur des TGF- β de type I (TGFBRI ou ALK5) mène à une diminution de cellules immunitaires dans les poumons ¹⁰⁵ et dans les fluides de lavage broncho-alvéolaire de rats ⁹⁰.

On a longtemps associé les phénotypes de guérison parfaite à une réponse immunitaire immature ^{106,107}. Par exemple, on rapporte que la guérison de la souris K.O. pour le facteur de transcription PU.1 est relativement normale, bien qu'elle s'opère avec un système immunitaire déficient et avec un afflux de cytokines très bas comparativement à une souris normale ¹⁰⁸. La réponse immunitaire est importante pour la régénération, mais elle ne doit pas être excessive. Par exemple, les têtards de xénope traités avec des anti-inflammatoires au stade 55 (où la régénération est perdue) retrouvent des capacités de régénération, quoiqu'imparfaite. D'un autre côté, si l'on empêche la résolution de l'inflammation en traitant à un stade où la régénération est possible avec du béryllium, on perd la capacité de régénération ¹⁰⁹. L'axolotl possède un système immunitaire complexe qui évolue avec l'âge de l'animal sans provoquer une perte de capacités régénératives ¹¹⁰. On sait maintenant que les macrophages (cellules immunitaires importantes lors de la guérison) sont aussi impliqués dans le contrôle des cellules sénescentes lors de la régénération ¹¹¹ et que leur perte dans ce modèle mène à une perte de la capacité de régénération et cause même la fibrose ¹¹².

On distingue deux types de macrophages dont le profil d'expression est grandement différent. Suite à une blessure, on reconnaît la première vague de macrophages par une

expression plus élevée de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*) et d'interleukine 6 (IL-6) qui est associée au rôle pro-inflammatoire de la deuxième vague. Cette dernière présente une expression plus importante de TGF- β et joue un rôle de réparation et remodelage des tissus ^{113,114}. Il n'est pas impossible que ces profils soient différents dans le cadre du processus de régénération, ce qui pourrait expliquer le remodelage parfait que l'on observe chez des organismes qui régénèrent comme l'axolotl. Qui plus est, certains avancent que la production de cytokines provenant des macrophages serait insuffisante pour provoquer seule la fibrose ¹¹⁵. Cela implique qu'il existe d'autres types cellulaires produisant ces cytokines qui pourraient être responsables de la fibrose observée chez les mammifères mais pas chez l'axolotl.

1.3.2 Effets négatifs de la signalisation TGF- β lors de la guérison

1.3.2.1 Cicatrisation

Il est connu que l'activation de la voie des TGF- β mène à l'expression de collagènes. Une mauvaise réorganisation de ces fibres de collagène cause la cicatrisation. Par exemple, la surexpression de TGF- β mène à une accumulation de collagène dans les poumons des rats causant une fibrose accrue comparativement au contrôle ⁹⁰. On peut aussi induire l'expression de collagène et de α -SMA (*alpha Smooth Muscle Actin*) en injectant du diméthylnitrosamine dans les rats. Cette molécule est connue pour augmenter l'expression des collagènes de type I, de type III et de type IV ce qui cause une fibrose hépatique dans le rat suite à une injection intrapéritonéale ¹¹⁶. On note que l'expression de TGF- β 1 et de p-Smad3 est aussi augmentée, ce qui corrèle avec la fibrose accrue observée dans ces tissus de rats injectés ¹¹⁷. Finalement, deux conditions humaines bien connues sont aussi causées par une expression mal contrôlée de la signalisation des TGF- β lors de la guérison des plaies. Premièrement, la cicatrisation hypertrophique est liée à une mauvaise régulation de TGF- β 1. Il s'agit d'une cicatrisation excessive qui se résorbe lentement (en plusieurs mois) suite à une blessure de la peau. Elle ne s'étend pas aux tissus non-blessés. La deuxième, les chéloïdes, est liée à une mauvaise régulation de la signalisation TGF- β 1/Smad3. Ce type de cicatrice n'est pas limité aux tissus

blessés et progresse lentement telle une tumeur bénigne. Contrairement à la cicatrisation hypertrophique, les chéloïdes ne se résorbent pas (voir ¹¹⁸⁻¹²⁰).

On peut réduire la fibrose en inhibant cette voie de signalisation avec un inhibiteur pharmacologique ^{90,121}. Par exemple, l'utilisation de l'inhibiteur du récepteur SB-431542 réduit l'expression de p-Smad3 et la présence de fibrose dans les reins des rats injectés avec du diméthylnitrosamine ¹¹⁷. Similairement, on peut réduire l'expression du collagène de type I et de type III dans les cellules de vessie porcine en traitant avec l'inhibiteur SB-431542 ¹²². D'autre part, une réduction partielle de l'expression du récepteur TGFBR1 par ARN interférant ou une réduction de la phosphorylation de Smad3 par une dose peu élevée d'inhibiteur spécifique semblent aussi mener à une expression diminuée de collagène de type I et de type III et de plusieurs autres marqueurs de fibrose dans le modèle de blessures d'oreille de lapins ¹²³.

Dans le cadre de la régénération de la patte chez le triton, l'expression du collagène de type I et de type III ne commence qu'après 8 jours, moment où le blastème est déjà formé ¹²⁴. Pour l'axolotl, l'expression des collagènes de type I et de type II est très localisée et peu importante, même 30 jours post-amputation. Comparativement à ce que l'on observe dans le blastème de l'axolotl, le blastème du membre accessoire du xénope exprime fortement ces deux collagènes et ce seulement dix jours post-amputation ¹²⁵. Il semble donc que la présence excessive de collagène et la régénération ne soient pas compatibles.

Il existe trois isoformes de TGF- β chez les mammifères qui semblent avoir des rôles distincts lors de la guérison des plaies ¹²⁶. Dans les processus de guérison, le ratio entre les isoformes TGF- β 3 et TGF- β 1 est le plus souvent mentionné. La guérison sans cicatrice observée chez le fœtus est associée à un taux plus élevé de TGF- β 3 comparativement au ratio observé lors de la guérison avec cicatrice (exemple de la guérison du derme humain) ². La guérison avec peu de cicatrices observées dans la gencive du Duroc est aussi associée à un taux plus élevé de TGF- β 3 comparativement à celui observé lors de la guérison de la peau avec cicatrisation ²⁸. De manière similaire, l'action de TGF- β 3 prévient l'expression de collagène de type I et la fibrose associée dans les fibroblastes de chéloïdes humains ¹²⁷. Bien que l'identité entre ces protéines ne soient pas grande (nos alignements montrent que l'identité entre la pré-pro-protéine de TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3 humain est d'environ 60%, mais de plus de 70% pour le peptide actif), les cystéines importantes pour la formation de complexe de latence (LAP) et pour la

dimérisation de TGF- β sont conservées. Pour sa part, l'isoforme TGF- β 2 est peu régulé lors de la guérison des plaies et ne semble pas être un acteur majeur dans ce processus¹²⁶. Cela est donc potentiellement dû à une plus faible affinité de TGF- β 2 pour son récepteur TGFBR2 que celle des deux autres isoformes (voir¹²⁸, page 397).

Lors de la régénération d'un membre chez l'axolotl, l'isoforme TGF- β 1 est régulé positivement lors de la phase de préparation (ARN et protéine)⁵⁶. L'expression de l'isoforme TGF- β 2 n'est pas augmentée, alors que l'expression de l'isoforme TGF- β 3 est faible et n'est pas régulé au niveau de l'ARN. Cela renforce l'idée que TGF- β 1 pourrait être la molécule responsable de la formation du blastème lors de la phase de préparation chez l'axolotl puisqu'une inhibition de cette voie de signalisation par le SB-431542 (inhibe la capacité du récepteur TGFBR1 de phosphoryler Smad2 et Smad3) empêche la formation du blastème. Tout porte à croire que la régulation de l'isoforme TGF- β 1 est cruciale pour une guérison sans cicatrice.

Cette voie de signalisation est aussi impliquée dans la différenciation/transformation de fibroblaste en myofibroblaste. Les myofibroblastes sont des cellules qui présentent des fibres de stress intracellulaires et des fibrilles extracellulaires de fibronectine. Ces fibres et fibrilles s'attachent à des sites d'adhésions focales au sein des myofibroblastes. Ces sites coordonnent la contraction des fibres de stress intracellulaires et des fibrilles extracellulaires suite à la blessure⁵. Ils sont d'ailleurs importants lors de la guérison cardiaque et leur présence diminue avec l'âge dans les modèles murins de guérison du cœur¹²⁹. Malgré l'origine incertaine de ces cellules, il semble s'agir d'une transition temporaire des fibroblastes de différentes origines sous l'effet de la signalisation TGF- β suite à une blessure¹³⁰⁻¹³⁴. On associe souvent l'expression du gène α -SMA aux myofibroblastes. Cette expression est sous le contrôle de la signalisation TGF- β , plus spécifiquement la voie TGF- β /Smad3¹³⁵. Par exemple, dans le rein, l'expression de α -SMA est contrôlé par une cascade impliquant p-Smad3, p-ERK1/2, NAD(P)H et d'autres gènes liés à la production de ROS¹³⁶. En effet, en bloquant spécifiquement la phosphorylation de Smad3, les fibroblastes retrouvent leur état original¹²¹. Ce type cellulaire est aussi associé à l'expression de collagène qui mène à la formation de cicatrices. Dans certaines pathologies, ces cellules ne sont pas éliminées et continuent à remodeler la matrice extracellulaire (par exemple la cicatrisation hypertrophique)⁵. Cependant, cette transition cellulaire n'est pas observée lors de

la guérison des plaies ou lors de la régénération chez l'axolotl (absence de α -SMA), malgré une activation rapide de TGF- β . Cette information est corrélée à celle d'une absence de fibrose lors de la guérison des plaies chez l'axolotl ¹³⁷. Une étude récente montre une expression de α -SMA lors de la régénération dans un modèle de déplétion du système immunitaire ¹¹². Dans ce cas précis, les animaux perdent leur capacité de régénération et produisent du tissu cicatriciel, ce qui corrèle bien avec l'idée que les myofibroblastes soient associés à la fibrose.

1.4 Différences entre les Smads de la voie canonique

Bien que quelques études récentes aient montré les différences existantes entre Smad2 et Smad3, la distinction entre ces deux protéines est souvent omise. Cependant, il existe des différences fondamentales dans la nature de ces protéines qui peuvent leur conférer des rôles différents lors de la régénération (voir Figure 5). On distingue Smad2 de Smad3 par un insert d'une trentaine d'acides aminés dans son domaine MH1 (*Mad Homology 1*), ce qui empêche la liaison directe de Smad2 avec l'ADN ^{12,138,139}. Smad2 participe donc à la transcription via d'autres facteurs de transcription comme le co-Smad4 ¹⁴⁰. Il existe aussi un épissage alternatif de Smad2 ne contenant pas l'exon3 (région comprenant le domaine TID et GAG qui empêche Smad2 de se lier directement à l'ADN, voir figure 3). Cet isoforme long a des fonctions différentes lors du développement, similaire aux fonctions associées à de Smad3 ^{141,142}. Les domaines TID et GAG de Smad2 l'empêche aussi de s'associer à d'autres protéines lorsqu'il n'est pas phosphorylé. Comparativement, Smad3 est connu pour s'associer avec une multitude de protéines, même s'il n'est pas phosphorylé ¹⁴³. D'autre part, les partenaires d'interaction participant à la transcription ne sont pas les mêmes. En effet, certains sont capables de se lier spécifiquement à Smad2, à Smad3 ou encore à Smad4 ce qui complexifie d'avantage les réponses possibles suite à la stimulation de cette voie de signalisation (voir ¹²⁸, page 293). Il est aussi évident que les gènes cibles de ces deux Smads ne sont pas les mêmes. Dans le Tableau 1, je présente une liste des gènes régulés par l'un et/ou l'autre des Smads. Ces observations ont été recueillies de plusieurs types cellulaires tant par des techniques de réduction/d'augmentation d'expression géniques ciblées que par des expériences de précipitation de la chromatine.

Tableau I. Gènes cibles de Smad2 et de Smad3

Gène	Cible de Smad2	Cible de Smad3	Fonction	Référence
Adhésion cellulaire et mobilité des cellules				
CEACAM5, CEACAM6		Oui	Adhérence cellulaire	144
Cyr61		Oui	Adhésion des cellules endothéliales	145
DST	Oui		Jonction cellulaire	10
E-cadhérine		Oui	Adhérence des cellules épithéliales	122
MYLK	Oui		Kinase qui stabilise la myosine	10
Net1	Oui		Échange GDP pour GTP, active Rho	146
Zyxin		Oui	Adhérence cellulaire	147
Facteurs de croissance				
CTGF	Oui	Oui	Cytokine, chondrocyte	122,148-150
MCP-1		Oui	Cytokine, inflammation	151
Il-11		Oui	Cytokine, inflammation	149
TGF- β 1		Oui	Cytokine, inflammation	18,152,153
VEGF	Bloqué par Smad2	Oui	Cytokine, angiogenèse	149
Protéases et inhibiteurs de protéase				
CST6		Oui	Inhibiteur de protéases	10
MMP2	Oui		Protéase	122,154,155
MMP9	Oui	Oui	Protéase	10,122,156,157
MMP12		Oui	Protéase	156
PAI-1 (Serpine1)	Peut-être	Oui	Inhibe la Fibrinolyse	10,18,149,158-163
TIMP-1		Oui	Inhibiteur de protéases	156,164
Protéines de la matrice extracellulaire				
Col1A1, Col5A2, Col6A1, Col6A3		Oui	Protéine de la matrice extracellulaire	164
Col1A2		Oui	Protéine de la matrice extracellulaire	165
Col3A1		Oui	Protéine de la matrice extracellulaire	156,164
Fibronectine		Oui	Protéine de la matrice extracellulaire	161
Prolifération, différenciation et cycle cellulaire				
c-fos (AP-1)		Oui	Facteur de transcription, prolifération	18
c-myc		Oui	Facteur de transcription, prolifération	166
Fox2A		Oui	Facteur de transcription, différenciation	159
Id1		Oui	Inhibiteur de la différenciation	10,167
p15 et p21	Oui	Oui	Inhibiteur du cycle cellulaire	10,18,164,168-170
Smad7		Oui	Inhibiteur de la signalisation TGF- β	18,159,162,164,171,172
SnoN	Oui		Inhibiteur de la signalisation TGF- β	173

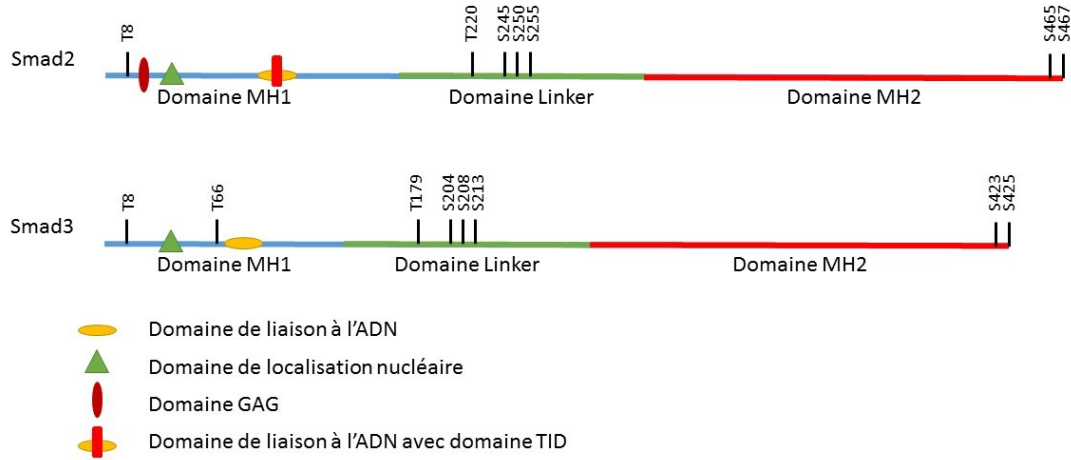


Figure 5. Figure comparative entre Smad2 et Smad3

Figure présentant les sites de phosphorylation importants pour Smad2 et Smad3, ainsi que leurs différents domaines. Smad2 contient deux domaines exclusifs, le domaine GAG et le domaine TID (empêche la liaison directe avec l'ADN). La tyrosine66 de Smad3 peut être phosphorylée, ce qui mène à sa dégradation éventuelle. Smad2 n'a pas de site de phosphorylation équivalent.

1.4.1 Smad2

Les souris K.O. n'étant pas viables, les expériences visant à comprendre le rôle de Smad2 sont effectuées en utilisant des K.O. conditionnels. Dans les cellules épithéliales de foie et dans les cellules cancéreuses pancréatiques, Smad2 joue un rôle pour bloquer le cycle cellulaire. Il est aussi associé à la migration de ces cellules et l'ablation de Smad2 mène à une diminution de la capacité de migration des cellules épithéliales du foie, des cellules cancéreuses pancréatiques^{174,175} et des cellules épithéliales de cristallins humains¹⁷⁶. L'ablation de Smad2 spécifiquement dans les kératinocytes de souris promeut la progression du cancer de la peau. En effet, dans ce type cellulaire, Smad2 joue un rôle d'inhibiteur des EMT¹⁷⁷. D'autre part, la surexpression de Smad2 dans les kératinocytes de la peau de souris affecte la limite la vitesse de migration et ralentit le processus de guérison, sans affecter la prolifération de ces cellules¹⁷⁸. La surexpression de Smad2 dans les kératinocytes des gencives de souris ralentit aussi la fermeture de la plaie et augmente la cicatrisation¹⁷⁹. Une phosphorylation trop importante de Smad2 peut mener à la dégradation de cette protéine ou à la mort des cellules surexprimant Smad2, ce qui peut expliquer les résultats observés¹⁸⁰. Dans un contexte de cancer du sein, Smad2 joue un rôle pro-prolifératif¹⁴⁹. Il est donc clair que la signalisation TGF- β /Smad2 est dépendante du type cellulaire. Elle semble contrôler la capacité de migration de certains types de cellules épithéliales et la capacité de prolifération des cellules mésenchymateuses.

Peu de gènes sont connus comme cible de Smad2 à l'exception du gène Skil (protéine SnoN). Ce dernier est connu pour sa capacité d'auto-inhibition et d'inhibition de la signalisation de TGF- β ^{150,181,182}. Il est aussi détecté dans nombre de cancers et est lié à la prolifération cellulaire. De plus, SnoN est induit rapidement par TGF- β dans les hépatocytes de souris, arrêtant l'action de la voie de signalisation et limitant ainsi la capacité de prolifération des cellules du foie¹⁸³. Ce régulateur est possiblement important pour arrêter la prolifération des cellules du blastème et permettre au redéveloppement d'opérer lors de régénération chez l'axolotl, mais peu de données sont actuellement disponibles concernant ce gène lors de la régénération.

Ce cas est particulièrement intéressant, puisque la stabilité de cette protéine semble être positivement régulée par les complexes comprenant Smad2-Smad4 et négativement régulée les complexes comprenant Smad3-Smad4^{173,184}. Aussi, en présence de TGF- β et de Smad3

nucléaire, SnoN est rapidement dégradée par le protéasome. Cette dégradation est moins rapide lorsque SnoN s'associe à Smad2, mais l'association de SnoN au complexe Smad2-Smad4 empêche l'activation de leurs gènes cibles^{173,185,186}. Cette dégradation est dépendante du complexe APC. SnoN lie Smad3 et Smad2 dans leur domaine linker et ce complexe recrute le APC via son domaine MH2. Cette association est aussi dépendante de la liaison avec Smad4¹⁸⁷, ce qui indique que ce sont les complexes actifs transcriptionnellement qui sont inhibés par SnoN et dégradés par le protéasome. De plus, deux séquences distinctes dans le promoteur de Skil ayant des affinités différentes pour chacun des Smads pourraient expliquer un contrôle opposé dans l'expression de ce gène. Smad3 réduit l'expression de SnoN, alors que Smad2 promeut son expression.¹⁸⁸

D'autre part, Smad2 est connu comme régulateur de l'expression de certaines MMPs, comme MMP2^{122,154,155} et MMP9. Dans le cas de MMP9, on ne peut pas exclure que Smad3 puisse aussi réguler son expression. Toutefois, l'expression de MMP9 dans les poumons de souris K.O. pour Smad3 est augmentée suite à une stimulation avec TGF- β 1¹⁵⁶. De plus, l'expression de MMP9 est aussi partiellement contrôlée par la voie non canonique de p38¹⁸⁹. Il n'est cependant pas exclu que le contrôle de l'expression de MMP9 par la voie canonique des TGF- β s'opère par Smad2.

1.4.2 Smad3

Plusieurs souris K.O. ont été créées pour les différents Smads. Les K.O. pour Smad2 et Smad4 ne sont pas viables, mais le K.O. pour Smad3 est viable^{38,174,190} et présente un phénotype de guérison très intéressant. Ces souris sont relativement normales, mais 1) la réponse à TGF- β 1 est amplifiée dans les fibroblastes, ce qui semble être contre-intuitif¹⁵⁴ 2) la stimulation des cellules de poumons avec TGF- β 1 ne provoque pas de fibrose comme dans les contrôles¹⁵⁶ 3) la guérison de ces animaux s'effectue avec une fibrose diminuée et une réépithéliation plus rapide que les souris contrôles^{38,191} 4) on observe une réponse immunitaire diminuée^{38,191}. De plus, ce modèle est plus apte à recevoir des greffes de peaux fœtales ne les rejetant pas aussi rapidement, ce qui permet un développement de follicules pileux tout en limitant la fibrose comparativement aux greffes effectuées sur des animaux contrôles¹⁹². Ces caractéristiques de

guérison rappellent le processus observé lors de la phase de préparation de la régénération chez l'axolotl puisque 1) la fermeture de la plaie est rapide et ne laisse pas de cicatrice ¹⁹³ 2) la réponse immunitaire est faible, tant au niveau des neutrophiles que des macrophages ^{106,107,194}. Il est plausible que Smad3 est un rôle à jouer pour la maturation du système immunitaire.

Il semble aussi que l'apoptose soit contrôlée par Smad3 ¹⁹⁵. En effet, les cellules hépatiques de souris K.O. pour Smad3 montrent moins de mort cellulaire et moins d'activité de la Caspase3 ^{174,196}. Dans le cas d'hépatocytes de souris, Smad3 bloque la transcription de BCL-2 ce qui amène une augmentation de l'apoptose, prévenant ainsi le développement de carcinomes hépatiques. Une perte de fonction pour Smad3 promeut le développement de ces carcinomes ¹⁹⁷. Dans les cellules épithéliales intestinales, la voie TGF- β /Smad3 induit l'apoptose via l'action des caspase3 et 9 ¹⁹⁸. C'est aussi le cas dans les cellules épithéliales des poumons où la surexpression de Smad3, mais aussi de Smad2 (moins efficace), mène à l'apoptose des cellules ¹⁹⁹. Dans le cadre du processus de régénération de la patte d'axolotl ou de triton, peu d'apoptose est détectée. Seules quelques cellules sont apoptotiques à 24h post-amputation ^{200,201}.

L'expression de Smad3 est intimement liée à la cicatrisation ²⁰². Le modèle de fibrose progressive, comme celui proposé pour la fibrose dans les poumons des rats, commençant là où TGF- β 1 est exprimé et s'étendant progressivement dans tout le tissu ²⁰³, peut s'expliquer par le fait que Smad3 est impliqué dans la boucle d'auto-induction de TGF- β 1. En effet, le promoteur de ce gène contient une séquence SBE (*Smad binding element*) où Smad3 vient se lier ^{152,153} et permet son expression. L'activation de Smad3 permet aussi l'expression de gènes cibles de la matrice extracellulaire. On peut donc concevoir que cette boucle d'auto-induction de TGF- β 1 garde Smad3 actif et promeut l'expression de gènes menant à la cicatrisation.

1.4.3 Smad7

Smad7 est le I-Smad de la voie canonique de TGF- β . Son rôle lors du processus de régénération pourrait aussi être d'empêcher la fibrose puisqu'il bloque la signalisation de TGF- β 1 s'opérant via Smad2 et Smad3. L'expression de ce gène est contrôlée par Smad3 (voir tableau 1). Des expériences de gains de fonction et de perte de fonction ont montré que Smad7 peut

avoir des propriétés anti-fibrose. Chez la souris, une mutation de Smad7 (délétion de l'exon I) entraîne une augmentation de la fibrose du foie suite à une exposition au CCL4²⁰⁴. D'un autre côté, la surexpression de Smad7 semble diminuer l'inflammation et la fibrose de la cavité péritonéale dans un modèle de dialyse péritonéale chez le rat^{205,206}. Il semble donc que Smad7 joue un rôle dans le contrôle de la fibrose. Outre le rôle connu de Smad7 comme inhibiteur de la signalisation des TGF- β , on lui reconnaît aussi un rôle dans la myogénèse²⁰⁷. Il est donc plausible que la présence de Smad7 soit requise dans la phase de redéveloppement pour stimuler la myogénèse.

1.4.4 Mécanismes permettant des fonctions différentielles pour Smad2 et Smad3

La voie canonique TGF- β est l'une des voies les plus étudiée. L'utilisation du mot clé « tgf-beta » dans Pubmed donne plus de 76 000 résultats. Pourtant, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes qui permettent aux protéines Smad2 et Smad3 d'effectuer séparément leur fonction respective dans la cellule. Certaines études ont montré que l'expression de ces protéines était différente au sein d'un tissu sans s'attarder à leur activation²⁰⁸. Certaines montrent une activation différente des deux protéines dans des essais en culture cellulaire suite à une stimulation avec TGF- β ²⁰⁹ ou avec Notch¹⁴⁶. D'autres mentionnent que ces deux protéines ont des gènes cibles différents^{10,18,149,163,176,210} (voir aussi Tableau 1). Finalement, certaines montrent que les protéines interagissant avec Smad2 ne sont pas les mêmes que celles qui interagissent avec Smad3^{138,211}. Un exemple lors du développement est que l'expression de Smad2 est essentielle au développement des souris et coopère avec Smad3 pour former correctement le mésoderme et l'axe antéro-postérieur¹⁵. On retrouve aussi une hypothèse intéressante qui propose que la signalisation TGF β soit dépendante de Smad3 dans les fibroblastes, alors que Smad2 et la voie des ERK ne seraient que des modulateurs d'expression pour ces gènes²¹². Cela ne nous informe toutefois pas sur le mécanisme responsable de ces actions différentielles.

1.4.3.1 Mécanismes de transport et d'activation différentielle à la membrane plasmique

Pour expliquer l'activation différentielle, quelques mécanismes ont été étudiés. Au niveau du cytosquelette, on retrouve des protéines différentes capables de lier spécifiquement un des Smads (voir Figure 6). Ainsi, Km23-1 lie Smad2 alors Km23-2 lie Smad3^{213,214}. Km23-1 est directement lié à l'activation de la GTPase RhoA et à la migration cellulaire²¹⁵, ce qui corrèle avec le rôle que joue Smad2 dans la migration cellulaire. D'autre part, l'action de GTPase peut aussi mener à l'activation préférentielle d'un des deux Smads. Par exemple, la GTPase Rac1 permet la phosphorylation de Smad2 dans les cellules de cancer pancréatique. La compétition avec un dominant négatif de cette protéine mène à une diminution de la phosphorylation de Smad2 et à une augmentation de la phosphorylation de Smad3¹⁷⁵. D'autre part, la protéine TLP (TRAP-1-like-protein) est capable de lier le récepteur du type II des TGF- β et Smad4. Cette association promeut l'activité de Smad2 et inhibe celle de Smad3 sans affecter le niveau de phosphorylation des Smads, comme démontré par des expériences de surexpression de TLP en présence d'un rapporteur luciférase spécifique à Smad2 ou à Smad3²¹⁶.

1.4.3.2 Interactions différentes des Smads dans le cytoplasme

On peut aussi imaginer que certaines protéines soient capables de séquestrer Smad3 (voir Figure 6). La protéine Stat3 pourrait jouer ce rôle. Dans les cellules HaCaT (Kératinocytes humains immortalisés), il a été montré qu'un mutant de Stat3 toujours actif est capable d'interagir avec Smad3 via son domaine MH2. Cette interaction empêche Smad3 de se lier avec Smad4. L'expression de ces gènes cibles p15 et p21 sont aussi diminués dans les cellules HEK où l'on surexprime un mutant toujours actif de Stat3, Smad3 n'est pas enrichie sur les promoteurs p15 et PAI-1 (cibles de Smad3, voir table 1). Ce mutant de Stat3 n'affecte toutefois pas l'interaction entre Smad2 et Smad4, régulant ainsi spécifiquement la voie TGF- β /Smad3²¹⁷. Il ne faut pas négliger la possibilité que l'activation différentielle soit contrôlée par des modifications post-traductionnelles. Outre que la phosphorylation des sérines terminales du domaine MH2, il existe aussi une multitude d'autres sérines et thréonines phosphorylées, ainsi que des phosphatases capables de déphosphoryler ces sites²¹⁸⁻²²². Ces modifications post traductionnelles sont tissus spécifiques²²³. Par exemple, la phosphorylation de Smad2 par ERK1 stabilise la protéine, ce qui permet une activité transcriptionnelle maximale de Smad2²²⁴.

D'autre part, la phosphorylation de Smad3 dans son domaine linker (domaine de liaison entre le domaine MH1 et le domaine MH2) par ERK1 diminue son activité dans les cellules épithéliales de poumons ²²⁵. Il semble aussi que l'activité de p38 soit nécessaire pour que la voie canonique de TGF- β phosphoryle Smad2 dans les chondrocytes humains ⁹⁴. Il pourrait aussi s'agir d'une dégradation d'une des deux protéines. Par exemple, la phosphorylation de la T66 de Smad3 par GSK3- β mène à son ubiquitination, ce qui entraîne sa dégradation subséquente dans les cellules HaCaT, HepG2 (Cellules cancéreuses hépatiques humaines) et MEFs de souris ²²⁶. Suite à la phosphorylation en c-terminal du motif SSXS (voir figure 2), GSK3 phosphoryle la S204 et les CDK2 et CDK4 phosphorylent la T179 et la S208, ce qui réduit l'activité de Smad3 dans les cellules Mv1Lu (Cellules épithéliales de poumon de vison) ²²⁷. La phosphorylation de la T179 mène à de multiples mono-ubiquitination de Smad3 par Smurf2 (*Smad-Specific E3 Ubiquitin Protein Ligase 2*), ce qui empêche Smad3 de former des complexes transcriptionnellement actifs. Smurf2 ne semble pas réguler Smad2 de la même façon ²²⁸, favorisant ainsi l'action de Smad2. De plus, l'acétylation de la K19 de l'isoforme de Smad2 sans exon3 et de Smad3 par p300 promeut l'activité de transcription de ces protéines. Cependant, l'acétylation de la protéine complète Smad2 n'a pas d'effet sur son activité transcriptionnelle ²²⁹. L'activité de ERK5 augmente l'acétylation de Smad3, ce qui cause une fibrose accrue dans les cellules A549 et les cellules HEK293 ²³⁰.

1.4.3.3 Mécanismes d'import différentiel au noyau des Smads

De plus, il pourrait aussi s'agir de différences dans le mécanisme d'import au noyau (voir Figure 6). Par exemple, la protéine Smad2 contient deux domaines que Smad3 n'a pas, le domaine GAG et le domaine TID, qui empêche sa liaison avec l'ADN tel que mentionné précédemment. Le domaine TID serait aussi responsable de la localisation cytoplasmique avant sa phosphorylation. La localisation de Smad3 est plutôt nucléaire ce qui mènerait à sa séquestration et une activation des gènes cibles de Smad2. Cette différence de localisation est particulièrement importante pendant le développement ²³¹. La différence existe peut-être aussi au niveau des pores nucléaires. En effet, la protéine Sorting nexin 9 (SNX9) se lie spécifiquement à p-Smad3 et facilite l'import de cette protéine phosphorylée au noyau via l'Importine 8 ¹⁶². Ces processus n'ont pas été étudiés dans le cadre de la régénération.

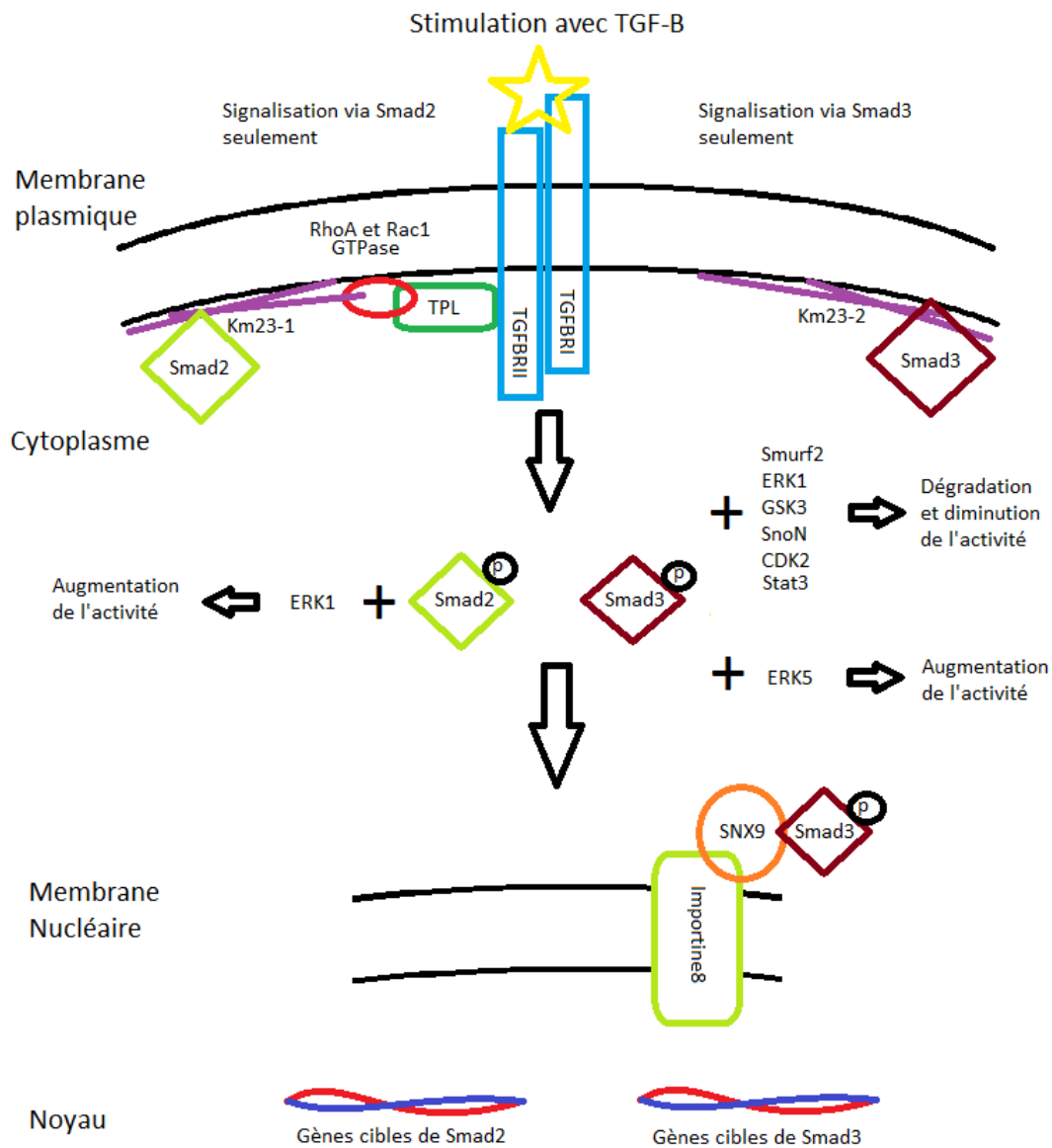


Figure 6. Résumé des mécanismes pouvant expliquer une régulation différentielle de Smad2 et Smad3

Figure résumant les différents acteurs protéiques pouvant jouer un rôle dans la régulation différentielle des Smads. Les mécanismes présentés montrent spécifiquement les différences rapportées dans la littérature entre Smad2 et Smad3. Les mécanismes communs ne sont pas inclus dans cette figure.

1.5 Voies non canoniques des TGF-beta

Outre la voie canonique des TGF- β transmettant leurs signaux via les Smads, il existe aussi des voies non canoniques de signalisation^{232,233} (voir Figure 7). L'activation de plusieurs MAPK par TGF- β est rapportée dans la littérature. Par exemple, la voie non canonique passant par p38 utilise les récepteurs TGFBR1 et TGFBR2 qui se lient à TRAP (*TRAF and TNF receptor-associated protein*). TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*) et TAK1 (*TGF-beta-Activated Kinase 1*) sont ensuite impliqués et TAK1 transmet ultimement le signal à p38 en le phosphorylant²³⁴⁻²³⁶. Contrairement à la voie canonique, c'est Smad6 qui joue le rôle d'inhibiteur de cette voie de signalisation non canonique²³⁵.

Plusieurs études ont aussi mis en lumière le rôle de la voie non canonique via p38 pour la fermeture des plaies²³⁷⁻²³⁹. Tout d'abord, l'expression de TGF- β 1 ou TGF- β 3 permet l'expression de MMP13 dans la guérison de plaies fœtales humaines, mais pas dans la guérison des plaies néonatales²³⁸. De façon similaire, TGF- β 1 est capable d'activer l'expression de MMP13 via p38 dans les fibroblastes des gencives, dans les ostéoblastes, dans les kératinocytes, mais pas dans les fibroblastes du derme^{189,237,240}. La guérison des plaies buccales et la guérison des plaies des fœtus sont des exemples de guérison presque parfaite et la présence accrue de MMP13 en est possiblement un bon indicateur. Autre fait intéressant, dans les kératinocytes, il a aussi été montré que l'activation de p38 par TGF- β 1 mène à l'activation d'ATF2 (*Activating Transcription Factor 2*), puis à l'expression de ATF3 (*Activating Transcription Factor 3*) spécifiquement dans les kératinocytes qui s'appêtent à migrer²³⁹. Les rôles connus de l'activation de ces gènes sont de favoriser la migration des cellules²³⁹ et d'inhiber ID1, un gène responsable de garder les cellules dans un état dédifférencié²⁴¹. En somme, la voie non canonique de TGF- β /p38 pourrait être responsable de la migration des cellules épithéliales, particulièrement dans les cas où la signalisation canonique est bloquée. D'autre part, la signalisation des TGF- β joue aussi dans l'angiogenèse. VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est un gène associé à ce processus. L'inhibition de Smad3, PKC, ERK1/2 ou de p38 à l'aide d'inhibiteur pharmacologique suite à une stimulation de cellules de tubules rénales mène à une diminution importante de VEGF. En comparaison, l'induction de ce gène par l'hypoxie est dépendante de PKC et partiellement de p38²⁴².

La voie de TGF- β

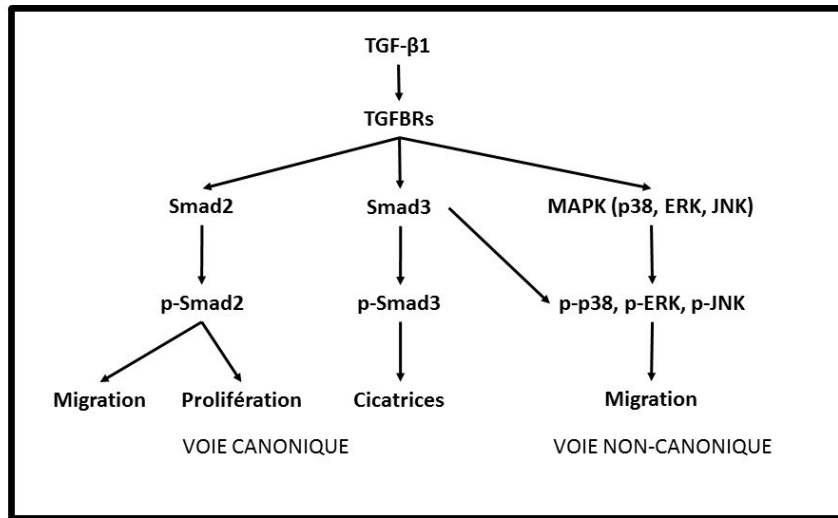


Figure 7. Représentation simple de la signalisation TGF- β

Cette figure présente une représentation simple de la signalisation de TGF- β . La voie canonique passe par une phosphorylation des protéines Smad2 et Smad3 via le récepteur dimérisé de TGF- β . Dans le cas des voies non-canoniques, le récepteur s'associe à des complexes et à des kinases supplémentaires qui activent des voies comme celle de p38, JNK ou ERK. Smad3 coopère souvent à la signalisation non canonique en s'associant avec ces kinases, et particulièrement avec p38.

1.6 Objectifs et hypothèses

Dans cette thèse, je présente les résultats de mes expériences relatives à la signalisation des TGF- β durant le processus de régénération épimorphique. L'axolotl est un modèle vertébré qui répond à une blessure par une expression de gènes similaires à ceux observés chez l'humain. La cytokine TGF- β est un acteur important qui contrôle autant la capacité de régénération que la qualité de guérison. L'accumulation de collagène chez les mammifères serait due partiellement à Smad3, qui est activé par le récepteur des TGF- β . Une absence de Smad3 (souris KO) dans la signalisation lors de la guérison entraîne une diminution de la fibrose observée. L'axolotl, lui, ne forme pas de cicatrices lors de sa guérison contrairement à d'autres modèles vertébrés. TGF- β 1 active aussi Smad2, qui lui semble être responsable de la migration et de la prolifération cellulaire. Malheureusement, les souris KO pour Smad2 ne sont pas viables, empêchant de recueillir des données spécifiques à cette protéine.

Chez l'axolotl, il est donc possible que Smad3 soit inhibé lors de la régénération, ce qui pourrait expliquer l'absence de cicatrice. D'autre part, l'activation de la signalisation des TGF- β est essentielle pour la formation du blastème. L'activation de Smad2 est donc possiblement essentielle à la formation du blastème.

L'objectif principal de mon projet a donc été de définir le rôle des Smads dans le processus de régénération épimorphique. En premier lieu, j'ai déterminé la variation temporelle et spatiale de l'expression des différents Smads, tant au niveau des protéines que de l'ARN. Par la suite, j'ai évalué l'effet de l'inhibiteur du récepteur de type I des TGF- β sur les gènes cibles responsables du remodelage de la matrice extracellulaire. Finalement, j'ai effectué une étude par gain/perte de fonctions spécifique des Smads permettant une meilleure caractérisation de leur rôle lors de la régénération. J'ai aussi exploré le rôle de ces protéines lors de la guérison des plaies chez l'axolotl.

Ces deux protéines montrent une activation différentielle lors de ces processus et seule l'activation de Smad2 semble essentielle à la formation du blastème qui mène à la régénération. Bien que certains aient remarqué que Smad2 et Smad3 jouent un rôle différent dans les processus cellulaires, cela n'a pas été confirmé dans des modèles *in vivo*. Avec le second article, je montre que ces protéines sont régulées différemment. Je n'ai malheureusement pas été en

mesure de diminuer l'expression spécifique de Smad2, mais nos expériences pour Smad3 incluent une approche de diminution et de surexpression. Considérant l'importance de la signalisation des TGF- β lors de la guérison et de la régénération, je crois que les résultats présentés sont particulièrement intéressants et nous rappellent l'importance que chaque protéine, nonobstant sa ressemblance avec une autre, peut avoir au sein d'un processus.

2- Chapitre 1 -Article 1

Titre : Axolotl as a model to study scarless wound healing in vertebrates: Role of TGF- β signaling pathway.

Titre court: Axolotl: a model to study skin regeneration.

Auteurs : Jean-François Denis, Mathieu Lévesque, Simon D. Tran, Aldo-Joseph Camarda, et Stéphane Roy

Journal: Advance in Wound Care (New Rochelle). 2013 Jun;2(5):250-260.

Publication finale disponible : Mary Ann Liebert, Inc., publishers

[http://dx.doi.org/\[10.1089/wound.2012.0371\]](http://dx.doi.org/[10.1089/wound.2012.0371])".

2.1 Mise en contexte

La recherche au sein de laboratoire Roy traite d'une problématique bien précise : la régénération épimorphique. Cette forme de régénération est un idéal qui permettrait à une multitude de problèmes médicaux d'être réglés. Il suffit de penser aux grands brûlés qui perdent l'usage d'un organe de protection très important ; la peau. Plusieurs groupes tentent de comprendre le processus de guérison des plaies afin d'éventuellement améliorer les soins disponibles. À cette fin, plusieurs modèles différents sont utilisés en recherche. En ce qui a trait à la régénération, il s'agit d'un processus qui n'est pas observé chez tous les animaux. Pour en comprendre les fondements, il faut donc sélectionner un modèle animal qui est capable de régénérer parfaitement. La première publication expose donc les forces et les faiblesses de divers modèles de recherche en ce qui a trait à la guérison des plaies et positionne l'axolotl comme le modèle vertébré le mieux adapté pour étudier la guérison des plaies dans un contexte de régénération parfaite. Les données présentées montrent que, suite à une blessure, plusieurs gènes liés à la guérison des plaies chez l'humain sont aussi activés chez l'axolotl dont TGF- β . La publication montre aussi que la guérison des épithéliums buccaux humains s'opère avec peu de cicatrices, même chez des patients plus âgés, ce qui nous indique que la régulation des gènes lors de la guérison des plaies est finement régulée et dépendante de l'environnement dans lequel elle s'opère. Cette observation nous indique aussi qu'il est possible de guérir avec peu de cicatrisation.

2.2 Contributions des auteurs

Ces auteurs ont conçu les expériences : Mathieu Lévesque, Aldo-Joseph Camarda, et Stéphane Roy

Ces auteurs ont effectué les expériences : Mathieu Lévesque et Aldo-Joseph Camarda

Ces auteurs ont analysé les données : Jean-François Denis et Stéphane Roy

Ces auteurs ont fourni du matériel et des réactifs : Aldo-Joseph Camarda, et Stéphane Roy

Ces auteurs ont écrit l'article : Jean-François Denis et Stéphane Roy

2.3 Texte de l'article - Axolotl as a model to study scarless wound healing in vertebrates: Role of TGF- β signaling pathway.

2.3.1 Scope

This critical review looks at the advantages and disadvantages of different experimental animal models used to study wound healing and skin repair. Humans and mammals, in general, heal their skin wounds by scarring when the dermis is damaged. Clinically speaking it would be much better to regenerate damaged skin as oppose to scarring. Scar tissue has lower tensile strength and is less flexible. We present the axolotl (Mexican salamander) as a model organism to study scarless wound healing in vertebrates. These animals, which are urodele amphibians, are the only vertebrates that can regenerate/heal their tissues perfectly throughout their lives. This is important as these animals offer a unique opportunity to identify the mechanisms and signals that allow animals to heal perfectly.

2.3.2 Translational Relevance

A better understanding of how different vertebrates heal their wounds is essential to identify the pathways that are: 1) responsible for scarring; and 2) responsible for regeneration. The use of experimental animal models allows the identification of molecular signals and cellular events that lead to scar tissue formation in some animals and tissue regeneration in others. The evolutionary conservation of gene function across species makes it possible to transfer the knowledge gained from regenerating to non-regenerating animals.

2.3.3 Clinical Relevance

Presently there are no treatments that lead to scarless skin wound healing. If we are to, one day, improve the clinical outcome for patients, we have to understand the biology behind tissue repair and regeneration. Although it cannot be said when exactly the results of basic research will provide the information/knowledge to regenerate patient skin, it is nonetheless

essential to keep on doing research to identify the genes and signaling pathways that could be harnessed for therapeutic applications in the future.

2.3.4 Introduction

Although skin is one of our largest organ and our single most important protective layer against bacterial infection, it is often viewed and considered in terms of aesthetics. It goes without saying that the skin is responsible in large part for our looks, but it is also important for thermoregulation through perspiration. Since the skin represents our protective layer against the outside world, it comes as no surprise that it is the first and most frequent organ to be damaged or injured during our lifespan. Damages incurred are from minor scrapes to deep wounds, or in some situations large sections being destroyed. It is therefore, by its nature, the organ that would benefit most from being able to regenerate itself. Most people would wish to be able to regenerate their skin because of its aesthetic role. Very few people cherish having a large visible scar on their skin, as opposed to scars on internal organs for which most people are happy to recover the functional aspect. Good examples are by-pass surgery or bone implants (e.g. hip replacement). However, being able to regenerate damaged skin is more than simply aesthetics. Scar tissue has lower tensile strength, may lack pigmentation as well as skin appendages such as sebaceous glands, is less flexible, and sensation is often missing altogether from the damaged skin². In addition, with the increasing aging population in the western world, more cases of skin diseases are diagnosed and more surgeries are performed for various ailments. The number of surgeries worldwide are in the hundreds of millions each year and will likely remain this high for many years to come. A large part of today's emerging older population comprises the baby boomers that are highly active and conscious of their appearance. This is in part driving the global sales figure for cosmetics which were around \$253 billion in 2006 with growth projections of over 4% per year for the foreseeable future (www.gcimagazine.com/marketstrends/regions/world/2941511.html). Most cosmetics are for skin care which highlights the importance of healthy-looking skin for many people worldwide. The industry is working hard to provide an array of products to help keep our skin looking healthy (or younger and less wrinkly). However, there are no products yet available that can

eliminate scars or stimulate our skin to regenerate (although more and more companies are working on developing products for this purpose). This is important notably for patients with injuries such as third degree burns on large parts of their bodies, or following surgeries for ailments such as skin cancer. Therefore, there is an important clinical need to find ways to reduce scarring and to stimulate skin regeneration.

2.3.5 Experimental Models:

There is significant effort by scientists worldwide to understand why human skin heals by scarring. For obvious ethical reasons, research cannot be performed directly on humans for solving the basic mechanisms on how wound healing leads to the aberrant collagen deposits observed in scars, at the biochemical and cellular levels^{2,243,244}. Therefore, we turn our attention to the various experimental models that can help answer fundamental questions on how wound healing proceeds. Answering the aforementioned question is rather complicated by the fact that different types of injuries heal differently. For instance, a deep stab wound does not heal in quite the same way a superficial scrape does. There are also excisional and non-excisional wounds. For example, the incision site for an operation is non-excisional while removing a mole or a melanoma requires taking a biopsy which results in an excisional type of wound. The cellular dynamics required to heal an incisional wound does not require cells at the edge to migrate over the surface in order to close the wound, as opposed to an excisional wound where cells have to migrate in order to start the healing process. Many studies on wound healing are looking at injuries resulting from a physical trauma (cut, scrape or biopsy). However, some wounds can be the result of chemical exposure or extreme stress such as heat in burn victims. Second degree burns, although painful, heal rather well as opposed to third degree burns that leave the patients with dysfunctional skin which consists of a scar devoid of the glands necessary for thermoregulation (sweat glands and sebaceous glands)².

In order to increase our understanding of the cellular and molecular events that regulate wound healing, scientists have turned to various models. The *in vitro* approach of developing skin cultures and substitutes has seen much progress in the last 20 years^{245,246}. There are many interesting prospects to using artificial systems to study skin biology, however due to space

constraint and to maintain the focus on animal models, we will refer the readers to reviews on that subject^{246,247}. Generally when one is thinking of wound healing, the focus is on human welfare and since we are mammals we often consider that the best animal models should also be mammals. There is indeed a certain phylogenetic logic to this thinking process (see figure 1) and it is without anyone's surprise that a large proportion of the research being done today using animals is on small mammals (i.e. rodent models). Based on the Canadian Council for Animal Care (CCAC, www.ccac.ca), mice and rats represent nearly 40% of all the animals used in research (biomedical, agricultural and academic research in Canada). The only other group of animals that comes close are fishes; probably due to the ever increasing use of the zebrafish which is bred in large numbers for genetic screens. When browsing the 2010 statistics of the CCAC, one realizes quickly that small animals are highly prized for research while large animals (bigger than a pig or sheep) represent less than 2.5% of the total animals used. Obviously, the high cost of housing and feeding animals precludes the vast majority of research labs from being able to perform research on large animals.

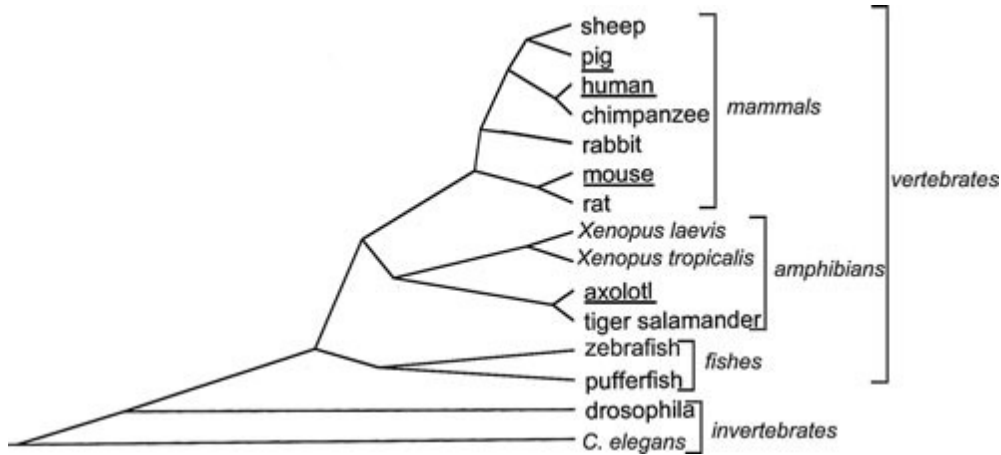


Figure 8. Figure 1: Rooted phylogenetic tree depicting evolutionary relationships between various organisms.

The invertebrates (*Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*) and vertebrates (all other animals in this tree) are separated. Notice that vertebrates are further subdivided in different classes: fish, amphibians, and mammalians. The animals discussed in the article are underlined, and it is apparent that pigs are closest to humans, followed by mouse and then axolotls. This tree represents a partial phylogenetic analysis and is intended as an aid to help visualize the evolutionary relationship of these animals. This tree was generated with software Lasergene Meg-Align from DNASTAR using the p53 sequences from each organism in the tree.

2.3.5.1 Mouse Model:

Mice represent the animal model that is most frequently encountered in laboratories for biomedical research. They are presently the only vertebrate model in which we can delete any genes, knock-in specific mutations, perform tissue specific deletions and control when the deletions will occur. The mouse genome has been fully sequenced 10 years ago ^{248,249} and thousands of antibodies that cross react with its proteins are commercially available, making it one of the animal models for which there is the largest tool set available to perform experiments. There are multiple mutant mouse models that have been used to study the role of genes during wound healing and there is even a model that has been presented as an actual mammalian model that can regenerate its tissues, the MRL/MPJ mouse ²⁵⁰. These mice have the ability to heal as it seems, the punch holes made on their ears for identification, in every respect perfectly ²⁵⁰. This new mouse strain obviously generated quite a lot of excitement. Unfortunately when their ability to heal skin wounds was tested, it became apparent that wound healing in these mice resulted in scarring just like wild type littermates ²⁵¹.

So far, no mouse models have been developed that can heal skin wounds perfectly. However, a recent study has identified a close cousin of the lab mouse, called the spiny mouse (*Acomys kempfi* and *A. percivali*), as being able to heal large wounds without the appearance of scars which indicates that some mammals are capable of what seems to be skin regeneration as adults ⁵². This report is the first to show such extensive wound healing capacities in a mammal and raises the hope that regeneration is not completely lost in this class. That same report also looked at the ability of these spiny mice to regenerate ear holes which they were able to do very well, albeit not with 100% efficiency since the muscle covering the cartilage was not regenerated ⁵². A high contraction rate of the wounds was observed in spiny mice with a 65% reduction in the wound area within 24 hours ⁵². Unfortunately, the report did not test the ability of these animals to heal their skin following a second wounding event and it did not look at whether the panniculus carnosus, which is essential for wound contraction in loose skin animals, was regenerated at the wound sites ⁵².

As in any animal model, the mouse has its limitations when comparing its skin wound healing ability. Differences in the skin biology between mice and humans preclude the mouse from being the perfect model to mimic wound healing in humans (despite the incredible tool set

available for this model). One of the problems encountered when comparing wound healing between mice and humans is the fact that mice (and spiny mice) are loose skin animals and humans are tight skin ^{244,252}. Loose skin animals heal mainly by wound contraction with the panniculus carnosus which is absent in humans. Tight skin animals on the other hand heal mostly by re-epithelialization over the accumulated granulation tissue. This granulation tissue arises following an inflammation phase that will see various cytokines being activated, which will recruit macrophages and neutrophils in the wound bed ²⁴³. Many technical approaches were developed using ring stents, flaps, pressure and mechanical load models to bring the mouse loose skin model as close as possible to the human tight skin to circumvent the problems arising from loose skin and to improve its use as an experimental model system for wound healing studies²⁵³.

2.3.5.2 Pig Model:

In an attempt to find an alternate solution to the problems encountered with loose skin animals, researchers introduced the pig model. The Yorkshire pig was the first to be introduced because of the high resemblance of its skin with that of humans. Pigs are tight skin animals that heal their skin wounds by scarring. The organisation of pig skin is almost identical to that of humans ⁴⁰. There is also the red Duroc pig that mimics hypertrophic scarring in humans ²⁵⁴. The main advantages of the pig models as compared to the mice are: 1- they are tight skin as mentioned above; 2- they heal by re-epithelialization over the accumulated granulation tissue following an inflammation phase; and 3- their larger size allows multiple wounds to be administered on a single animal allowing experimenters to test different types of wounds or dressings. Since the pig is phylogenetically close to humans (figure 1) most of the antibodies that have been raised against human proteins cross-react with the pigs. In addition, the pig represents an interesting model in terms of pharmacokinetics studies and drug testing ^{255,256}. There are of course some disadvantages of using pigs when compared to mice. The first being the cost of the animals, and second the fact that we cannot perform any genetic manipulations.

2.3.5.3 Animal Models for scarless wound healing:

So far we have described animal models that aim to mimic or reproduce as close as possible the wound healing process observed in humans, scar and all. These models are

important and essential to understand what leads to scar formation. However these models may not provide direct insight into how to achieve a scarless wound healing, which would represent a tremendous benefit to patients. Once again, researchers turn to animal models to gain insight and understanding on how scarless wound healing and/or skin regeneration can be achieved. Nature has succeeded almost always in providing models to resolve most questions for which scientists seek answers and scarless wound healing/regeneration is no exception. Research done on mammalian fetal wound healing has shown that fetuses from some species (scarless wound healing is not a universal trait of all mammalian fetuses) can regenerate their skin if the damages occurred during the first trimester of gestation ^{257,258}. This is exciting as it indicates that some mammals, other than the spiny mouse, can regenerate their skin even though the timeline corresponds to when embryonic development is not completed and may be the result of developmental homeostasis. Another caveat is the fact that accessing embryos to perform these injuries is not trivial. The mouse uterus is very small and fragile so accessing the fetuses is a challenge. The sheep, which is often used for fetal wound healing studies, is of a reasonable size for accessing the fetuses, but the cost can be in many cases prohibitive. Interestingly, mammalian embryos which can regenerate skin wounds do so without much inflammation (immune cell infiltration and cytokine production) and seem to deposit and turnover extracellular matrix components more rapidly than adult wounds ²⁵⁸.

2.3.5.4 Axolotl as a Model for scarless wound healing:

The availability of an animal model capable of scarless wound healing or skin regeneration at an adult stage could allow scientists to identify the cellular and molecular mechanisms regulating organogenesis in a fully developed and mature setting. Such animals do indeed exist in nature. For example, many invertebrates can regenerate whole body segments if cut in half (planarians and echinoderms). There is also a group of vertebrates which can regenerate whole limbs, tail, internal organs and heal skin wounds perfectly without the appearance of any scar tissue. These animals are the urodele amphibians (i.e. salamanders). The most widely used urodeles are the axolotl (also known as the Mexican salamander) and the newt. These animals can regenerate all of their appendages perfectly following amputation (figure 2) ^{259,260}. Genomic studies have consistently shown that developmentally important genes are strongly conserved across vast evolutionary distances. Much of what we know of vertebrate

development and molecular genetics has been derived from studies on the *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. Therefore, it is not unreasonable to expect that the same genes involved in the regeneration of amphibian tissues are conserved in humans, though their activity may be either suppressed or neutralized by inhibitory factors in humans or enhanced in amphibians. Thus, based on the knowledge that genes and their functions are highly conserved between species, using the axolotl, aimed at uncovering the mechanisms leading to perfect tissue regeneration, is justified. Interestingly, salamanders are tight skinned like humans and are long lived (over 10 years in captivity) which provides the possibility of following the impact of a treatment on the health of the animal over many years, if desired. These animals have been used extensively for epimorphic regeneration studies as they represent the only vertebrates capable of regenerating highly complex structures (e.g. a complete limb including the bones, nerves, muscle and skin) following amputation. Other vertebrates such as the zebrafish are also used for regeneration studies as they can regenerate the extremities of their fin rays quite well and they are amenable to genetic screening (zebrafish are also used extensively for developmental genetics studies also because of the ability to perform genetic screens, see <http://zfin.org/> for more details). However, teleost fish, such as the zebrafish, are not capable of regenerating their fins if amputated proximal to the basal articulations of the rays²⁶¹ and no report has ever been published on their ability to heal skin wounds as adults. Axolotls are not highly amenable for genetic screening but there are more and more tools now available to perform research of a mechanistic nature in these animals. Transgenic axolotls have been generated with constitutive⁶³ and inducible promoters²⁶² and specific microarrays are available for assessing the expression of thousands of genes²⁶³. In addition, since axolotls are normally aquatic salamanders, one can use the ever growing number of commercially available signaling pathway agonists and antagonists simply by adding them to the water to test the importance or role of various proteins on development and regeneration^{264,265}.

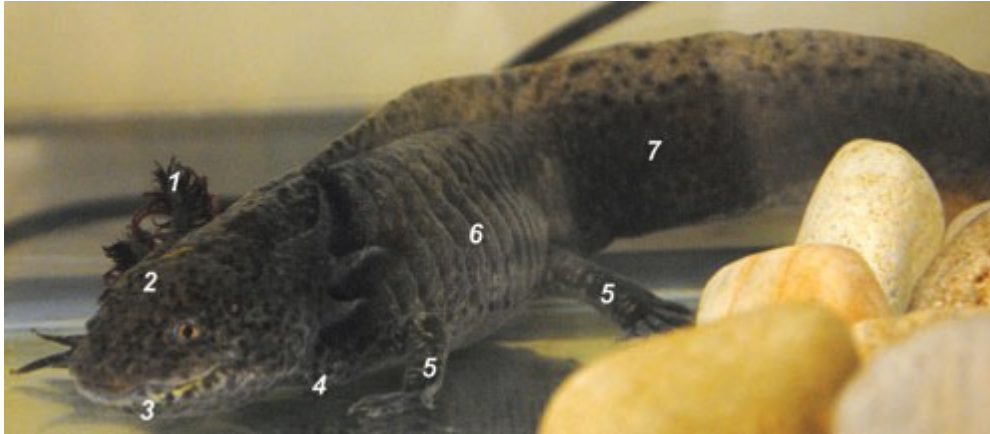


Figure 9. Figure 2: Axolotl can regenerate after injury or amputation throughout the animal's life

Mature wild-type axolotl ~5 years of age (25-cm total length). External gills (#1) can be noticed, as this species of salamander remains aquatic for its entire life. The different numbers depict structures that can regenerate after injury or amputation throughout the animal's life: 1, gills; 2, parts of the brain can regenerate; 3, jaws; 4, apex of the heart; 5, limbs, both fore- and hindlimbs, can regenerate when amputated distally or proximally; 6, the skin and some internal organs such as parts of the intestine and pancreas; 7, the tail and the spinal cord, whether transected, crushed, or even if a segment is removed. Color images available online at www.liebertpub.com/wound

As the theme of the current issue of the journal is centered on wound healing and Transforming Growth Factor β (TGF- β) action, the remainder of the present review will focus on wound healing and skin regeneration in the axolotls with an emphasis on what is known about the role of TGF- β in this organism. For those interested more about limb regeneration, we suggest the following review articles ^{259,266,267}. As mentioned previously, humans are tight skinned animals and finding a model organism that is also tight skinned presents some advantages when considering mechanisms of cell migration during wound healing and wound closure. We were the first group to publish an article that examined how skin wound healing in axolotls proceeds ¹³⁷. This study confirmed that axolotls do indeed heal full thickness excisional skin wounds in a scarless manner. Re-epithelialisation was very rapid with keratinocytes covering a 1.5 mm in diameter wound in 8 hours, although this layer was not attached to the underlying muscles ¹³⁷. Incisional wounds were assessed but since axolotls are so efficient at healing and regeneration, it was almost impossible to survey the healing process for such a type of wound ¹³⁷. A time course study of 90 days was performed to assess whether skin regeneration in axolotls was perfect with all the components of the skin, including the basal lamina, were reconstituted to their original state. The epidermal layer of the skin was returned to normal in less than 45 days, except for the basal lamina which was not fully reconstituted yet ¹³⁷. By 90 days post-wounding, it was not possible to distinguish between injured and intact skin.

TGF- β 1 has been implicated in wound healing in mammals ⁴¹ and we also demonstrated that it was expressed during the initial phases of limb regeneration in the axolotl at the time when epidermal cells migrate to cover the stump wound in the first 24 hours ²⁶⁴. In a previous review article, we highlighted the differences and similarities between the different phases of limb regeneration (limb regeneration can be divided in two main phases: a preparation phase and a redevelopment phase) and limb development ²⁵⁹. We also took our analysis a step further and compared it to the initial phases of wound healing and noted that many events observed during the early phase of limb regeneration following amputation, like the formation of a blood clot, wound epithelium formation and extracellular matrix remodelling, are similar to events occurring in skin wound healing in mammals ²⁵⁹. Normal wound healing in mammals is marked by a rapid recruitment of neutrophils at the wound site ²⁶⁸. Axolotls and newts, however display a somewhat reduced immune response and almost no inflammation following amputation ¹⁰⁷.

This is similar to the immune response observed in mammalian fetal wound healing which also heals perfectly^{257,258}. This prompted us to look at the presence of neutrophils at various time points following wounding. There were almost no neutrophils or very little considering the size of the wound¹³⁷. This was in line with the Ziegels' observations that very few macrophages were present at 6 hours post-wounding¹⁹⁴. Macrophages are normally recruited to the wound site after neutrophils. Interestingly, we observed that in the axolotl, epidermal cells start to migrate over the open wound as early as 1 hour post-wounding with almost no neutrophils in the area¹³⁷ which contrasts with observations in mammals where neutrophils are recruited to the wound site immediately following injury and are present for a period of time before epidermal cells start to migrate over the wound. These experiments raised the question whether axolotls are capable of forming scar tissue at all. To answer this question, we took advantage of the fibrogenic potential of bleomycin and injected it subcutaneously to induce fibrosis in axolotls. We were able to demonstrate that indeed axolotls can produce scar tissue, although this scar tissue was devoid of collagen and consisted mostly of fibronectin¹³⁷. In order to obtain a better understanding of the initial molecular events that unfold during skin wound healing in axolotls versus mammalian models, the expression of 4 genes known to be expressed early in wound healing was determined. TGF- β 1, Krox-24, Msx-1 and Hsp-70 were selected because they had been shown to be activated early in normal wound healing in mammals^{86,269-271}. Figure 3 shows the expression of the aforementioned genes at early time points post-wounding in the axolotl skin. The pattern of gene expression observed in the axolotl skin was similar to that reported in the mammalian skin, with a somewhat faster time course. The expression of TGF- β 1 was in the wound itself, as expected, and peaked around 6 hours post-wounding. The expression of Krox-24 started around the edge of the wound very early (as early as 2 hours post-wounding), again very similar to what has been reported in mice wounds, then its expression became restricted to the wound site by 6 hours post-wounding, and finally was almost undetectable by 24 hours. Msx-1 had a similar pattern of expression to TGF- β 1 with a peak at 6 hours in the wound site and still some expression by 24 hours. Finally, Hsp-70 expression was similar to Krox-24 at the 2 hour time point and then was more like TGF- β 1 and Msx-1 by 24 hours. One of the roles of TGF- β 1 in scarring is associated with its ability to induce the expression of alpha-smooth muscle actin (α -sma) in fibroblasts, facilitating their differentiation into myofibroblasts²⁷². Myofibroblasts are thought to be the cells responsible for the production

of collagen bundles in mammalian wounds, leading to scarring. Since TGF- β 1 was expressed in axolotl wound healing, we also examined the expression of α -sma at various time points in excisional wounds in the axolotl, but found it to be absent¹³⁷. This was later confirmed by the group of Maden at the University of Florida in Gainesville who also studied the ability of axolotls to heal their wounds and found no evidence of α -sma expression⁵⁵. They also determined that collagen type III was expressed early during wound healing and that type I collagen appeared later at the end of the healing process⁵⁵ which is similar to the collagen expression pattern observed during fetal wound healing²⁵⁸. As mentioned earlier, we demonstrated in a previous study that TGF- β signaling is essential for limb regeneration to proceed normally in axolotls²⁶⁴. We also demonstrated in that study that the TGF- β signaling machinery (e.g. receptors type I and type II) was functional and that axolotl cells responded to TGF- β 1 by upregulating the expression of Smad3 responsive genes (e.g. plasminogen activator inhibitor-I)²⁶⁴. In fact, multiple studies have shown that TGF- β signaling is required for tissue regeneration in various animal models: *Xenopus laevis*, zebrafish and even invertebrates *Antedon mediterranea*^{42,83,273}. The other TGF- β isoforms were either not regulated (TGF- β 2, S Roy unpublished data) or not detectable (TGF- β 3 was undetectable by polymerase chain reaction amplification or western blotting with various antibodies against this isoform, S Roy unpublished data) in axolotl regenerating tissues.

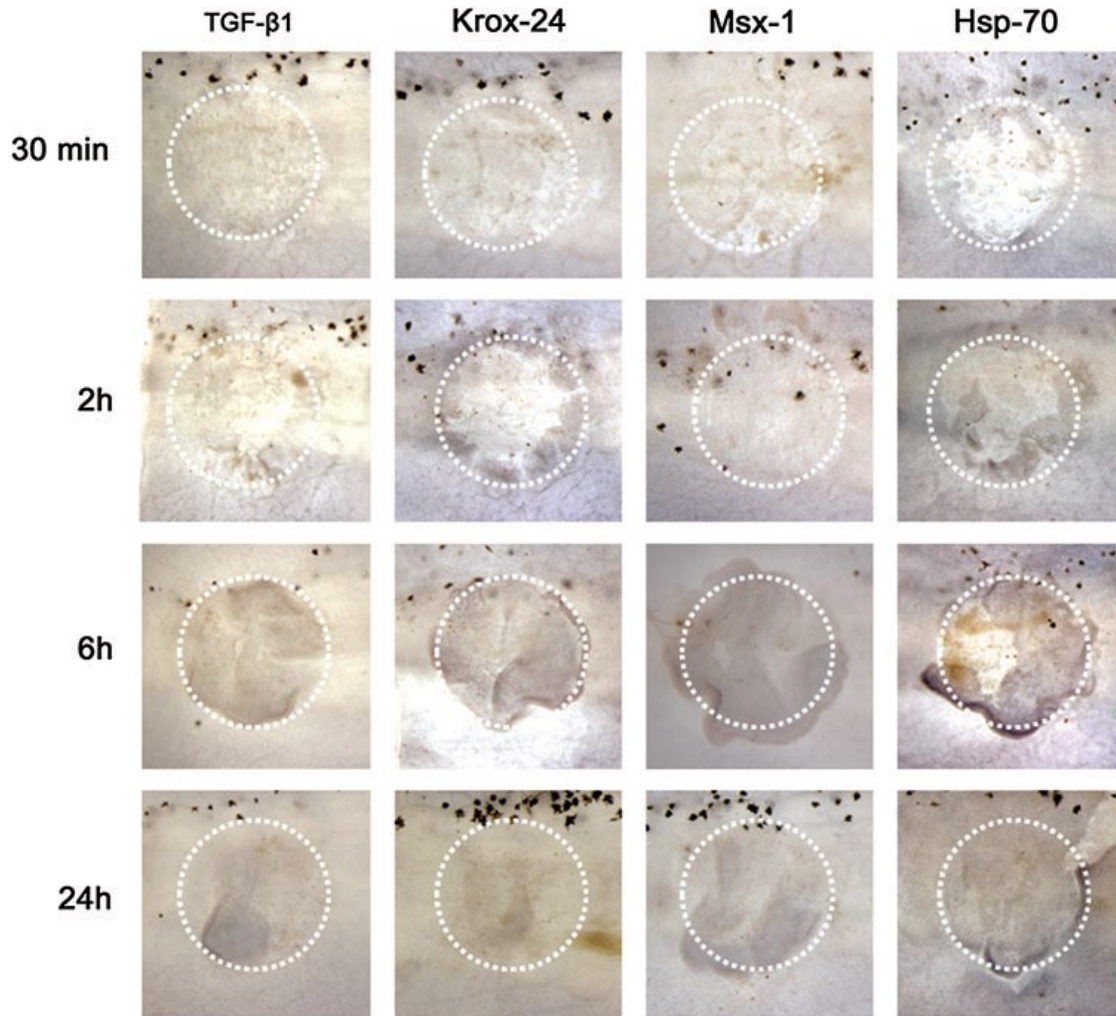


Figure 10. Figure 2: Whole-mount in situ hybridization of wound healing genes

Whole-mount in situ hybridization on axolotl full-thickness excisional skin wounds was performed to look at the expression of four different genes known to be expressed early in mammalian wounds. An early time course for the expression of TGF- β 1, Krox-24, Msx-1, and Hsp-70 shows the expression of the messenger RNA (view is from the above the wounds). Dotted circles indicate the area of skin that was removed for the wounds with the dorsal side on top for each panel. The expression of each gene is shown at 30 min, 2, 6, and 24 h postwounding (the expression appears in dark around the circle). The wounds were done on the side of the tail at the midlevel with a 1.5-mm punch to excise a full-thickness piece of skin. Technical details for whole-mount in situ hybridization can be found in Monaghan et al. (2009). Color images available online at www.liebertpub.com/wound

The fact that axolotls are normally neotenic (i.e. they remain aquatic and do not metamorphose into a land dwelling salamander unless exposed to thyroxin) has often raised the question of whether or not their ability to regenerate was due to their unique nature. The ability of axolotls to regenerate limbs independently of their metamorphic state has been demonstrated over 3 decades ago ²⁷⁴. These experiments also demonstrate that regeneration is not dependent on an aquatic environment as once metamorphosis is complete axolotls are terrestrial and they still regenerate ^{274,275}. More recently, Maden's group, in their skin wound healing study, specifically addressed this point by inducing metamorphosis of adult axolotls and assessing skin regeneration/scar free healing in paedomorphic versus metamorphic animals ⁵⁵. Their findings clearly demonstrate that metamorphosis does not affect wound healing in axolotls and therefore supports the argument that axolotl regeneration is not a neotenic dependent process unlike limb and tail regeneration in anurans (i.e. frogs) which occurs only prior to metamorphosis ²⁷⁶. Some anurans, however, can still regenerate their skin after metamorphosis which may indicate that limb regeneration is somehow affected more by metamorphosis than scarless wound healing ²⁷⁷. Finally, Maden's group also showed that the immune response following full thickness skin excision is not changed significantly in paedomorphic versus metamorphic animals and remains relatively modest compared to what is observed in mammals.

There is no doubt the axolotl itself, as an animal model, is interesting because of its extraordinary regenerative capacities. In addition, a recent study by Menger and colleagues suggest that this regenerative capacity may partly be due to the axolotl genes themselves. They examined whether the epidermal lipoxygenase, a gene important for wound healing in mammals, of axolotl could influence wound closure in mammalian cells ²⁷⁸. They compared the ability of axolotl versus human lipoxygenase to influence wound closure using scratch assays with different mammalian cell lines. They found that the axolotl lipoxygenase was much more efficient than human lipoxygenase in promoting wound closure in these *in vitro* assays ²⁷⁸. This finding may not be generalized for all axolotl genes as we have shown in a previous study that the axolotl p53 protein had no activity at 37° C in human cells ²⁶⁵. However, it remains interesting that some axolotl genes known to be important for normal wound healing are more efficient in their actions than their mammalian counterparts. Understanding what makes these

axolotl genes perform better could provide insights for developing drugs or therapies to improve wound healing.

Scarless wound healing and/or skin regeneration in axolotl shares many striking points of resemblance with the only adult mammalian tissue capable of nearly perfect scarless wound healing: the oral mucosa. The oral mucosa, like limb regeneration and scarless wound repair in axolotls, displays a limited immune response with few neutrophils invading the wound site ²⁷⁹. It is interesting that wound healing occurs with a mild inflammatory response in an environment rich in bacteria such as the oral cavity. Again, TGF- β signaling is important during mammalian oral wound healing ²⁸ as in limb regeneration in axolotls ²⁶⁴. Although human oral wounds do not completely regenerate or heal perfectly, their level and quality of healing observed after extensive surgery is quite amazing considering the tissue damage resulting from these surgeries (see figure 4).

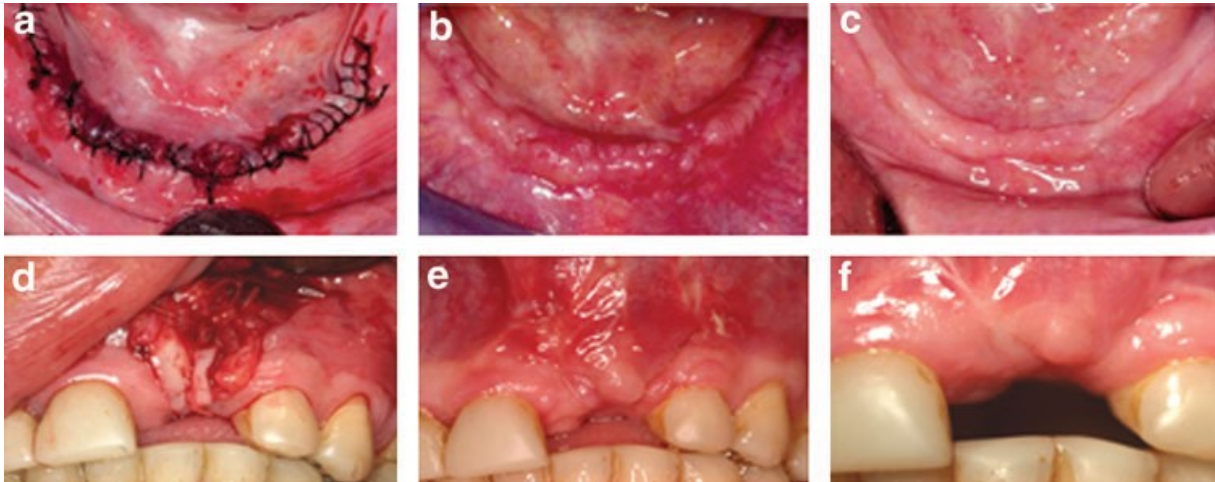


Figure 11. Figure 4: Wound healing after oral surgery in human

(a) Lower jaw of a 62-year-old male patient at the day of oral surgery. Silk sutures (black) were placed to close the large incisional wound created to the oral and gingival tissues for the removal of four teeth, insertion of two dental implants, and placement of bone grafts. The same surgical area is shown at **(b)** 2 weeks and **(c)** 4 months postoperatively. No scar tissue was clinically observed. **(d)** Insertion of a free keratinoconjunctival graft tissue (to augment the lack of keratinized tissue at future implant site). The same surgical area is shown at **(e)** 2 weeks and **(f)** 3 months postoperatively. The amount of postoperative scarring is low, considering the extent of the surgical procedure compared to a similar type of skin-grafting surgery. Color images available online at www.liebertpub.com/wound

2.3.6 Conclusion

The axolotl, with its regenerative capacity, offers a unique model to analyse the potential interactions between signaling pathways modulating the regenerative process in vertebrates. The complexity of the regenerative process (wound healing, dedifferentiation, proliferation, extracellular matrix remodelling and pattern formation) is such that it likely results from the convergence of multiple pathways leading towards tissue replacement. In addition, an attenuated immune response seems to correlate with scarless wound healing in mammals and amphibians^{107,257,258} and could be essential for regeneration. A better understanding of the process and hierarchal cascade of gene expression controlling cellular activity following amputation or injury in axolotls will yield important knowledge that may lead to the identification of genes or proteins that represent good targets for therapeutic intervention to improve tissue repair in mammals.

2.3.7 Take home message

Basic Science:

Various animal models are needed to help us understand the difference between scarring and regeneration.

Each model has advantages and disadvantages (tight and loose skin; genetic manipulations or lack of).

Evolutionary conservation of gene function allows us to study animals from divergent phylogenetic ancestry and transfer what is learnt from one group to another.

TGF- β signaling is involved in both scarring and regeneration which highlights the complexity of biological systems and their signaling pathways.

The axolotl, even though it is a urodele amphibian, offers many advantages to identify the signals involved in tissue regeneration.

Relevance to clinical science:

Oral wound healing in humans is in many ways similar to regeneration in axolotls: low inflammation and minimal scarring.

Identification of genes or pathways responsible for regeneration in vertebrates such as axolotls will provide targets for the development of therapeutic applications.

2.3.8 Acknowledgments

We would like to thank the members of the Roy laboratory for insightful discussions on the subject covered in this review. We would like to specifically acknowledge to contribution of Dr Andrea Hsu for providing some of the clinical photographs presented in figure 4. We apologize to all the scientists whose work we did not cite. Unfortunately due to the limited scope of this review article and space limitations we were not able to refer to all the work that has been done on this subject. This work is supported by grants from the Canadian Institute of Health Research, the National Science and Engineering Research Council of Canada and the Network for Oral and Bone Health research from the Fonds de Recherche du Québec-Santé to SDT and SR.

2.3.9 Author disclosure and ghostwriting

All the authors have participated in the writing of this paper and declare no conflicts of interest. There was no ghostwriting involved in this paper.

2.3.10 Mises à jour

Depuis la publication de cet article, certaines avancées scientifiques nous ont permis de mieux comprendre la guérison parfaite dans certains modèles.

Les avancées techniques pour le modèle du poisson zèbre le rende très versatile. Il est maintenant possible de faire une délétion génétique ou une surexpression de manière tissue

spécifique dans le poisson zèbre ²⁸⁰. La souris demeure cependant le seul modèle de mammifère où toutes ces techniques sont disponibles.

Les nageoires de plusieurs poissons téléostéens (dont le poisson zèbre et les carpes) sont capables de régénérer. Ces poissons peuvent aussi régénérer suite à une amputation de la queue mais cette régénération est imparfaite puisque la marge arrière de la queue n'est pas définie ⁴⁶.

La guérison de la peau chez le poisson zèbre a été spécifiquement étudiée par le groupe de Hammerschmidt. La guérison est parfaite et régulée par les TGF- β , les Rho kinase et les JNK kinases ^{48,49}.

Une étude récente montre que les axolotls post-métamorphiques ne régénèrent pas parfaitement et régénèrent plus lentement comparativement aux axolotls néoténiques ²⁸¹. Young et al. ^{274,282} avaient déjà publié des observations similaires concernant un ralentissement mais ils n'ont pas observé de problème de régénération chez les axolotls post-métamorphiques. En ce qui a trait à la guérison de la peau, elle est parfaite dans les deux cas mais plus lente pour les axolotls post-métamorphiques ⁵⁵.

3. Chapitre 2 – Article 2

Titre : Activation of Smad2 but not Smad3 is required to mediate TGF- β signaling during axolotl limb regeneration

Auteurs : Jean-François Denis, Fadi Sader, Samuel Gatién, Éric Villiard, Anie Philip et Stéphane Roy

Reproduit avec permission

Journal : Development. 2016 Oct 1;143(19):3481-3490.

Publication finale disponible : <http://www.biologists.com/development>

<http://dev.biologists.org/content/143/19/3481> doi: 10.1242/dev.131466

3.1 Mise en contexte

Chez l'humain, la guérison n'est jamais parfaite, mais elle s'opère mieux dans certaines circonstances. Nous avons déjà montré que la guérison des épithéliums buccaux s'opère avec peu de cicatrisation, même chez des patients âgés. Nous avons aussi montré que la signalisation des TGF- β est intimement liée à la guérison de plaies chez l'humain et chez les autres vertébrés, comme l'axolotl. Il semble toutefois que cette voie de signalisation soit responsable de processus aux antipodes ; la cicatrisation associée à une perte de fonction de l'organe visé et la guérison parfaite qui mène à une restauration de l'organe et de sa fonction. La voie canonique comprend des acteurs intracellulaires qui pourraient être responsables de cette diversité de réponse. En effet, les deux protéines activées par le récepteur des TGF- β de type I (ALK5), Smad2 et Smad3, sont connus pour différents rôles. Smad3 est associé à la cicatrisation (expression de collagènes et de α -SMA) alors que Smad2 est associée à la prolifération, à la migration, et à l'état de différenciation des cellules. L'axolotl est capable de guérir parfaitement et de régénérer des organes perdus sans cicatrisation en permettant la formation d'une structure nommée blastème (amas de cellules dédifférenciées). La seconde publication montre, pour la première fois dans un modèle *in vivo* en régénération, un rôle différent pour Smad2 et Smad3. L'activation de Smad2 est essentielle pour le processus alors que l'activation de Smad3 n'est pas nécessaire et est même réduite. Ceci pourrait expliquer, en partie, pourquoi ces animaux ne cicatrisent pas.

3.2 Contribution des auteurs

Ces auteurs ont conçu les expériences : Jean-François Denis et Stéphane Roy

Ces auteurs ont effectué les expériences : Jean-François Denis (80 %), Fadi Sader, Samuel Gatién et Éric Villiard

Ces auteurs ont analysé les données : Jean-François Denis et Stéphane Roy

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

Ces auteurs ont écrit l'article : Jean-François Denis, Fadi Sader, et Stéphane Roy

3.3 Texte de l'article - Activation of Smad2 but not Smad3 is required to mediate TGF- β signaling during axolotl limb regeneration

3.3.1 Abstract

Axolotls are unique among vertebrates in their ability to regenerate tissues, such as limbs, tail and skin. The axolotl limb is the most studied regenerating structure. The process is well characterized morphologically; however, it is not well understood at the molecular level. We demonstrate that TGF- β 1 is highly upregulated during regeneration and that TGF- β signaling is necessary for the regenerative process. We show that the basement membrane is not prematurely formed in animals treated with the TGF- β antagonist SB-431542. More importantly, Smad2 and Smad3 are differentially regulated post-translationally during the preparation phase of limb regeneration. Using specific antagonists for Smad2 and Smad3 we demonstrate that Smad2 is responsible for the action of TGF- β during regeneration, whereas Smad3 is not required. Smad2 target genes (Mmp2 and Mmp9) are inhibited in SB-431542-treated limbs, whereas non-canonical TGF- β targets (e.g. Mmp13) are unaffected. This is the first study to show that Smad2 and Smad3 are differentially regulated during regeneration and places Smad2 at the heart of TGF- β signaling supporting the regenerative process.

3.3.2 Introduction

The capacity to regenerate complex tissues and organs as adults is a process exhibited by few vertebrates. In fact, urodeles (e.g. axolotls and newts) are the only tetrapods that can regenerate multiple tissues throughout their life. The urodele limb represents an ideal structure for understanding the signals modulating the process of epimorphic regeneration in vertebrates. The stages of limb regeneration are well characterized^{68,283} and animals tolerate the surgery extremely well. Limb regeneration represents a highly orchestrated series of cellular and molecular events that control cellular migration and proliferation, as well as the initial wound

healing phase. The process is often subdivided into two general phases: (1) a preparation phase immediately following amputation, comprising wound epithelium formation, cellular dedifferentiation, migration and proliferation giving rise to the blastema; and (2) a redevelopment phase, which is generally considered to initiate around the late bud stage of blastemal formation and corresponds to when regeneration becomes nerve independent, cellular redifferentiation starts in parallel with pattern formation and cells stop proliferating^{67,68,75}. The preparation phase of limb regeneration shares similarities with mammalian wound healing during the first 48-72 h post-amputation/wounding^{29,78}. Both are characterized by the migration of epidermal cells to cover the wound, the upregulation of extracellular matrix (ECM) remodeling proteins, the appearance of some inflammatory markers and the activation of dermal fibroblasts to migrate under the wound epithelium Yang and Bryant^{99,100,112,284}. To understand how axolotls can regenerate lost body parts, it is important to determine which specific molecular pathways of the normal wound healing response observed in non-regenerating models are present in this regenerating organism. It is also important to determine the regulation and function of the different components of such pathways in a situation of complete regeneration. A previous study demonstrated that the level of Tgf- β 1 mRNA was upregulated early following amputation (already upregulated at 6 h) and that expression remained high until early bud stage, when it returned to normal²⁶⁴. In that same study, SB-431542, which is a chemical antagonist of TGF- β receptor type I (T β R-I)²⁸⁵, was used to specifically inhibit TGF- β signaling. This demonstrated, for the first time, that TGF- β signaling is necessary for the cellular proliferation that gives rise to the blastema and limb regeneration. TGF- β signaling is important during development, wound healing, bone fracture healing and in compensatory liver hyperplasia following partial hepatectomy^{80,286-288}. Interestingly, TGF- β 1 has also been shown to regulate matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of MMPs (TIMPs)²⁸⁹⁻²⁹¹ and fibronectin in several species, including axolotls^{264,292}. The Smad transcription factors represent the major intracellular mediators of TGF- β superfamily signaling. There are eight Smads in mammals (Smad1-8) responsible for transmitting the TGF- β superfamily response from the cell surface receptors to the nucleus²⁹³⁻²⁹⁶. Smads are divided into three types: receptor Smads (R-Smads), which are phosphorylated by T β R-I; co-Smad (Smad4), which heterodimerizes with R-Smads to induce transcription; and inhibitory Smads (I-Smads), which block the phosphorylation of R-Smads. TGF- β s and BMPs utilize different subsets of cell surface receptors as well as different

Smads to transmit their signals. The TGF- β isoforms 1-3 signal via R-Smads 2 and 3 and are negatively controlled by I-Smad7. Canonical TGF- β signaling involves the phosphorylation of two serines in the Cterminus of both Smad2 and Smad3 by T β R-I^{8,297}. BMPs signal via R-Smads 1, 5 and 8 and are negatively controlled by I-Smad6. Smad4 is the co-Smad for all the R-Smads and is used for TGF- β and BMPs. There are also noncanonical TGF- β signaling pathways that are mediated via the mitogen-activated protein kinases, such as p38 and Jun-k, and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt^{233,236}. Limb regeneration shares many similarities with limb development, including the interaction of epithelial and mesenchymal cells²⁹⁸. This interaction requires the absence of a basement membrane between these two cell types, at least during the initial stages of regeneration. During limb regeneration, Neufeld and co-workers showed that the basement membrane was not re-established early during the regenerative process, allowing interactions between epithelial and mesenchymal cells^{299,300}. The idea that blocking TGF- β signaling leads to the premature establishment of the basal membrane, thereby preventing the wound epithelium from being permissive, is the first thing that we assessed in the present study. Also, in order to determine how TGF- β controls limb regeneration, a better understanding of the intracellular components of the pathway is needed. Various Smad knockout (KO) mice have been generated: Smad2 and Smad4 KO mice were lethal, whereas the Smad3 KO was viable^{100,190,301-305}. The phenotype of Smad3 KO mice was interesting in multiple ways: (1) mice were viable and relatively normal³⁰⁶; (2) the TGF- β response was somewhat amplified in fibroblasts, which is contrary to what one would expect for an R-Smad KO¹⁵⁴; (3) they displayed improved wound healing capacities for various types of injury, which were marked by an increased rate of re-epithelialization and significantly reduced scarring^{38,307,308}; and (4) they had less inflammation following skin wounding^{38,100,309} (Ashcroft et al., 1999; Yang et al., 1999b; Ashcroft and Roberts, 2000). All of these changes observed in the Smad3 KO mice, as compared with their wild-type littermates, actually display a striking resemblance to the early phases of regeneration in axolotls⁷⁸. This also highlights the fact that Smad2 and Smad3 play different roles in mediating TGF- β signaling. Smad3 is associated with scarring and the inhibition of proliferation, whereas Smad2 is associated with cellular migration and proliferation¹³⁸. These functions are not simultaneously compatible with the regenerative process. Scarring is absent during limb regeneration, while proliferation and cellular migration are necessary during the preparation phase^{67,264}. The present study focuses on the role of Smad2 and Smad3, as the

mediators of the canonical TGF- β signaling pathway, during the early phase of limb regeneration in axolotl. Newly available reagents made it possible to determine whether Smad2 and Smad3 are activated during limb regeneration and to what extent their individual roles are important in this process.

3.3.3 Results

3.3.3.1 The basement membrane is not prematurely restored by TGF- β inhibition

It was previously shown that cellular proliferation is blocked by the TGF- β antagonist SB-431542²⁶⁴. The same study also showed that 7 days of treatment is enough to prevent regeneration, even when treatment is then stopped. However, wound closure was not noticeably affected. Hence, we wondered whether the basement membrane was restored prematurely in treated animals, thereby inhibiting signaling between the apical epithelial cap (AEC) and the underlying mesenchymal cells. This could explain, in part, the loss in cellular proliferation of mesenchymal cells observed when TGF- β signaling is blocked. In order to assess restoration of the basement membrane, we took advantage of Picrosirius Red staining, which is specific for collagens³¹⁰⁻³¹². Collagens in the basement membrane were not detectable at the amputated extremity 6 days post-amputation in control or treated limbs (Fig. 1B,E). To confirm the lack of a basement membrane under the AEC, the expression of Col IV protein, a specific marker of basement membrane³¹³, was assessed. As shown in Fig. 1C,C', F,F', Col IV is not present under the AEC site 6 days post-amputation in either controls or SB-431542-treated animals. Other time points (as shown in Fig. S1) demonstrated that, even as late as medium bud or palette stage, the basement membrane is not reformed prematurely in SB-431542 treated animals. Therefore, the lack of proliferation observed in SB-431542-treated limbs is not due to the premature formation of basement membrane.

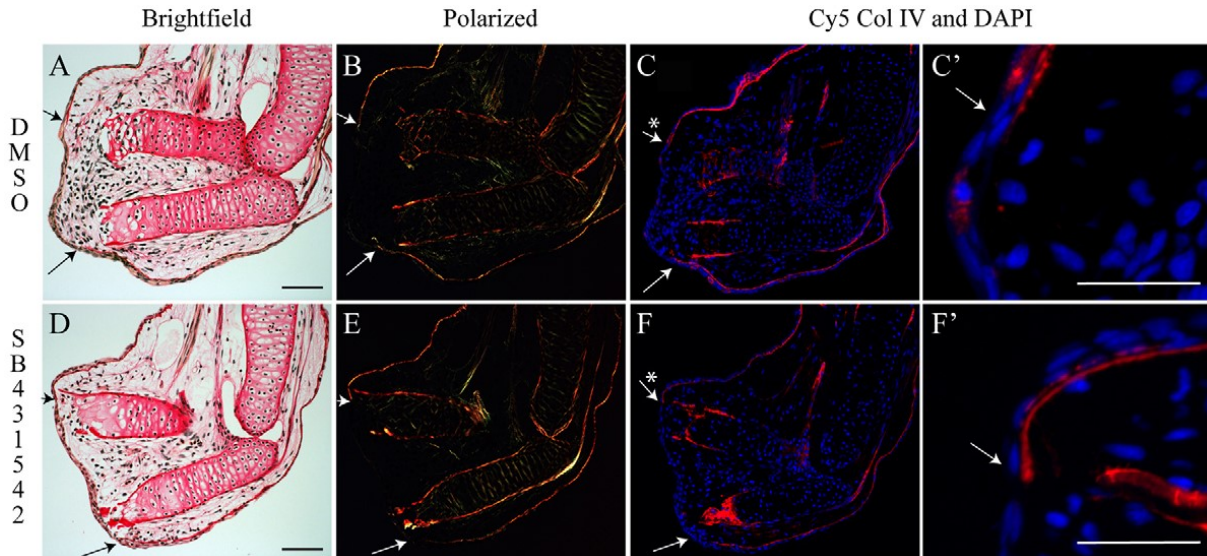


Figure 12. Figure 1: The basement membrane does not prematurely reform when TGF- β signaling is blocked in regenerating axolotl limbs.

(A-C') Control animal, DMSO treated for 6 days post-amputation. (A,B) Picrosirius Red staining showing normal blastema formation in brightfield view (A) and polarized light (B); collagen fibers light up red/orange/green. The basement membrane is not restored. (C,C') Col IV (basement membrane protein) expression (red) confirms that the basement membrane is not restored (no Col IV is present in the regenerating portion, asterisk). DAPI (blue), showing cell nuclei. C' is a magnification from C. (D-F') Animal treated with 25 μ M SB-431542 for 6 days post-amputation. (D,E) Picrosirius Red staining showing no blastema formation (no cells have accumulated under the wound epidermis) in treated limb in brightfield view (D) and polarized light (E). The basement membrane is not restored. (F,F') Col IV expression confirms that the basement membrane is not restored 6 days post-amputation under SB-431542 treatment (no Col IV is present in the regenerating portion, asterisk). F' is a magnification from F. Composite images are shown. Arrows indicate the base of the blastema corresponding to the amputation site. $n=5$ for Picrosirius Red staining; $n=3$ for Col IV immunofluorescence. Scale bars: 200 μ m in A,D; 90 μ m in C',F'.

3.3.3.2 Cloning of Smad2, Smad3 and Smad7

Since TGF- β signaling is essential for regeneration and blastema formation, regulation of the intracellular components of the canonical pathway was assessed. Canonical signaling occurs through the C-terminal phosphorylation of serine residues of Smad2 and Smad3. Full-length cDNAs were cloned for Smad2 and Smad3 (GenBank accessions KT383019 and KT383020), as well as a partial clone for Smad7 (see the supplementary Materials and Methods). Of particular interest was the C-terminal portion of Smad2 and Smad3 that contains the SSVS motif, which is phosphorylated twice for activation⁹. The sequence identity of axolotl proteins compared with human is 99% (464/467 amino acids) for Smad2 and 93% (402/432 amino acids) for Smad3, showing that these proteins are highly conserved (Figs S2 and S3) over a vast phylogenetic distance from urodeles to humans, spanning 370 million years³¹⁴.

3.3.3.3 Involvement of Smads and TGF- β signaling in normal regeneration

RT-PCR and western blotting (Smad2 and Smad3) analyses were performed to assess the expression of Smads and the phosphorylation of the Smad C-terminal SSVS motif during regeneration. Commercially available antibodies were used for all proteins except for phosphorylated axolotl Smad3 (p-Smad3), which was not recognized by most commercial antibodies. The Biorbyt S425 p-Smad3 antibody (orb222846) did cross react with the axolotl protein but only recognizes one phosphorylation site. An in-house mouse polyclonal antibody was raised against a 12 amino acid phospho-peptide identical in sequence to the last 12 amino acids of the axolotl p-Smad3 protein. No antibodies were found that cross-reacted against the axolotl Smad7 protein. The results show that Smad2, Smad3 and Smad7 do not differ significantly at the mRNA level during the preparation phase of limb regeneration (Fig. 2A). Expression of Smad2, Smad3 and Smad7 mRNA did, however, show an upregulation during the redevelopment phase. The timing of this upregulation correlates with an accumulation of cells in the regenerative process⁶⁷. Tgf- β 2, Activin and Smad4 mRNA levels were not upregulated (data not shown). Since RT-PCR measures mRNA levels, findings may correlate with total protein levels but are not informative regarding potential post-translational modifications. Indeed, Smad2 and Smad3 are known targets for post-translational modifications (e.g. S-phosphorylation at the C-terminus) and these could play a role in blastema formation.

Western blot experiments looking at total and phosphorylated Smad proteins were conducted. Results show maximal expression of active TGF- β 1 (12.5 kDa fragment) between 6 h and 48 h (Fig. 2B). Protein expression matches the mRNA expression of Tgf- β 1 described previously (Levesque et al., 2007). Total Smad2 protein levels were reduced during the preparation phase but elevated during redevelopment, which correlates with the RT-PCR results (Fig. 2C). Phosphorylation of Smad2 was detected between 6 h and 48 h, which correspond to the time when mesenchymal cells migrate and begin to proliferate to give rise to the blastema. This also correlates with maximal expression of active TGF- β 1 (Fig. 2C). Total Smad3 protein levels were also reduced during the preparation phase but elevated during redevelopment, correlating with the RT-PCR results (Fig. 2D). Phosphorylation of Smad3 was detected from 3 h to 24 h post-amputation (Fig. 2E-G). Phosphorylation of Smad3 occurs before phosphorylation of Smad2, while the wound is closing. Interestingly, detection of p-Smad3 required a very sensitive reagent, SignalFire Elite ECL Reagent (Cell Signaling), which is six to seven times more sensitive than the ECL reagent Lumi-LightPlus (Roche) used to detect p-Smad2 (data not shown). p-Smad3 was undetectable, or very difficult to detect, with the reagent used to detect p-Smad2 (Fig. 2C,E). Consequently, the level of p-Smad3 is likely to be minimal compared with p-Smad2 during regeneration. These differences were unlikely to be due to the antibodies used, as our mouse polyclonal and the Biorbyt commercial antibody yielded identical results. These data suggest a differential activation of Smad proteins during regeneration.

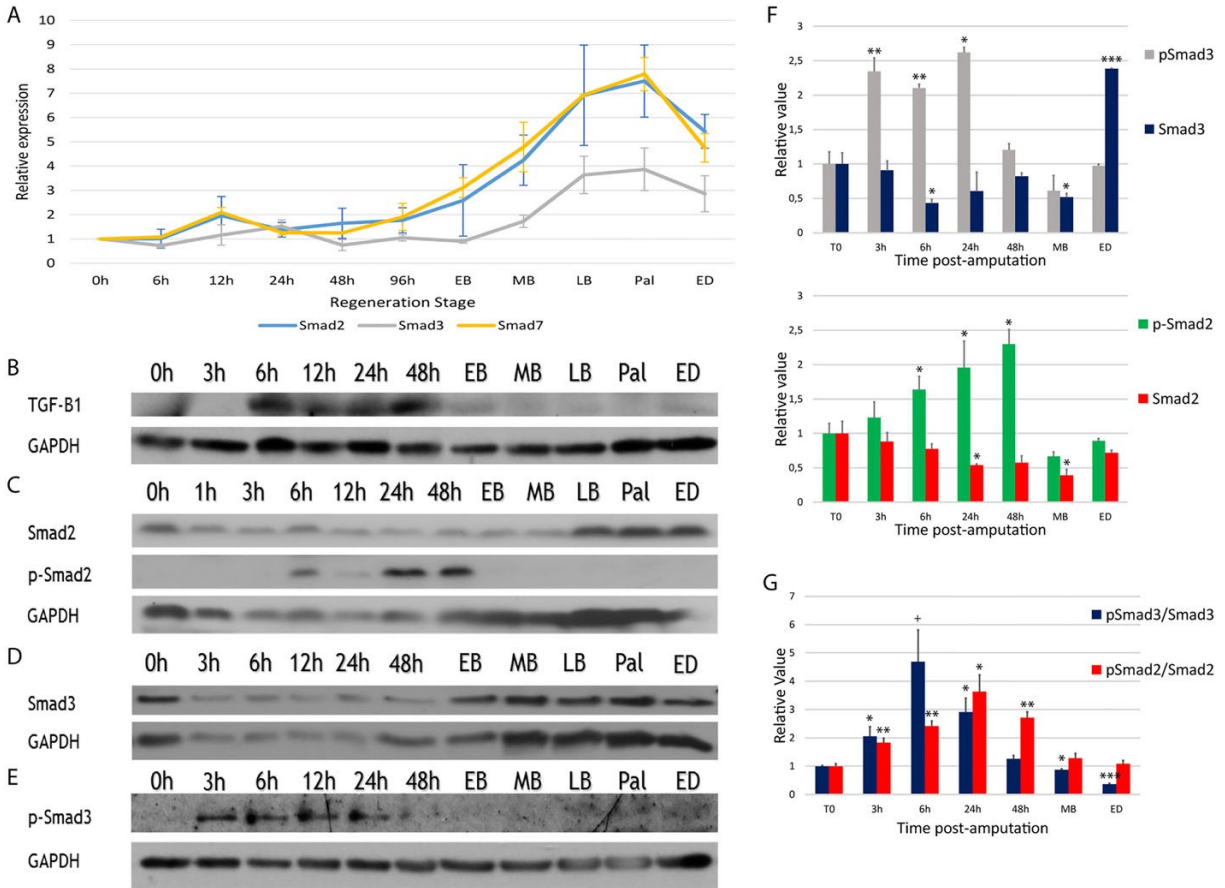


Figure 13. Figure 2: Expression of Smads during normal limb regeneration.

(A) Expression of Smad2, Smad3 and Smad7 RNA relative to Gapdh, as assessed by RTPCR. Smads are not regulated at the RNA level during the preparation phase (0 h-96 h post-amputation). Expression increases for all three Smads during the redevelopment phase (EB-ED). Data show mean±s.e.m., n=3. (C-E) Western blots. (B) Expression of TGF-β1 (12.5 kDa, active form). Maximal expression is detected during the preparation phase between 6 h and 48 h. (C) Smad2 and p-Smad2 (active form). Activation is maximal between 6 h and 48 h. (D) Expression of total Smad3 protein. Levels of Smad3 are lower during the preparation phase than the redevelopment phase. (E) p-Smad3 is detected early (3 h postamputation), earlier than observed for p-Smad2. (F) Quantification of Smad proteins (densitometric analysis from B-E) during regeneration. (G) Ratio of p-Smad over total Smad. Maximal activation of Smad3 occurs before maximal activation of Smad2. Welch's t-test was performed to compare t=0 h with each time point: ***P<0.005, **P<0.01, *P<0.05, +P<0.08. Mean±s.e.m. (normalized using GAPDH, n=4). EB, early bud; MB, medium bud; LB, late bud; Pal, palette; ED, early differentiation

3.3.3.4 Inhibition of Smad2 but not Smad3 phosphorylation prevents regeneration

Activation of Smad proteins is likely to be essential for regeneration, as treatment with SB-431542 prevents blastema formation and blocks regeneration²⁶⁴. SB-431542 is an inhibitor of TGF- β signaling that acts at the receptor level, thus preventing phosphorylation of its targets (Smad2 and Smad3). Our results indeed show a strong inhibition ($\geq 85\%$) of Smad2 phosphorylation at 24 h post-amputation in animals treated with 25 μM SB-431542 (Fig. 3B,D). Phosphorylation of Smad3 at 3 h post-amputation is also inhibited ($\geq 53\%$) when animals are treated with 25 μM SB-431542 (Fig. 3A,C). Hence, we took advantage of a second inhibitor, SIS3, which is specific to Smad3 phosphorylation. Animals were treated with 4 μM , 3 μM and 2 μM SIS3 for 35 days. Results show that inhibiting Smad3 phosphorylation does not prevent regeneration. All animals treated with 4 μM SIS3 died before the end of treatment; however, they all showed a perfectly normal blastema, as in the size-matched controls (data not shown). Half of the animals treated with 3 μM SIS3 died after 20 days of treatment, but again showed blastemas similar to those of control animals at the time of death. Animals that survived the 35-day treatment regenerated their limbs to near perfection, with only a few carpal elements missing in some of the limbs (three of four limbs analyzed were missing one or two carpal elements) (Fig. 3G,J). No delays in limb regeneration were observed in animals treated with 2 μM SIS3 (100% survival rate; five out of eight limbs analyzed showed one or two missing carpal elements) (Fig. 3F,I). Nevertheless, p-Smad3 was diminished by more than 46% with SIS3 treatment, as assessed by western blot analysis (Fig. 3C). Smad2 phosphorylation was unaffected by SIS3 treatment, whereas it was greatly inhibited following SB-431542 treatment (Fig. 3D). In addition, a third inhibitor of Smad3, Naringenin, was tested to see whether it would have the same effects as SIS3. We selected the highest dose that did not affect the health and growth of animals when treated daily for 35 days (data not shown). When treated with 35 μM Naringenin, animals regenerated perfectly. p-Smad3, measured 6 h postamputation, was reduced by 51%, whereas p-Smad2 levels were not reduced by Naringenin treatment (data not shown).

In order to clarify further the role of Smad3 in the regenerative process, we performed electroporation of wild-type and a phosphomimetic axolotl Smad3 *in vivo*. We did not observe any scarring or any effect on the regeneration process (data not shown). However, the GFP

tracer rapidly disappeared when axolotl Smad3 was co-electroporated. We performed TUNEL assays and observed increased numbers of apoptotic cells (Figs S4 and S5), which would explain the disappearance of the tracer and the lack of a phenotype, since cells overexpressing Smad3 are eliminated via apoptosis. Since limb regeneration is a complex process involving multiple cell types, we performed immunofluorescence analyses to visualize the cells that exhibit p-Smad2 and p-Smad3 during regeneration. p-Smad2 can be observed in epithelial cells and in mesenchymal cells underneath the wound epithelium in control limbs (Fig. 4B,B' ; see Fig. S6 for additional time points). In SB-431542-treated limbs, p-Smad2 is very limited (Fig. 4D,D' ,E, Fig. S6). Phosphorylation of Smad3 occurs mostly in epithelial cells and is enriched in the wound epithelium (Fig. 5B,B' ; see Fig. S7 for additional time point). In SIS3-treated limbs, most cells are negative for p-Smad3 owing to a decrease in p-Smad3-positive cells of over 85% (Fig. 5D,D' ,E, Fig. S7). The immunofluorescence results for p-Smad2 and p-Smad3 corresponded exactly to those obtained by western blot analysis, in that no immunofluorescence signal was detected at medium bud or palette stage for either protein with or without SB-431542 treatment (see Fig. S8). All observations thus far indicate that p-Smad2 is crucial for blastema formation, whereas p-Smad3 is less important and its inhibition does not affect regeneration. This further suggests differential roles of Smad proteins during regeneration.

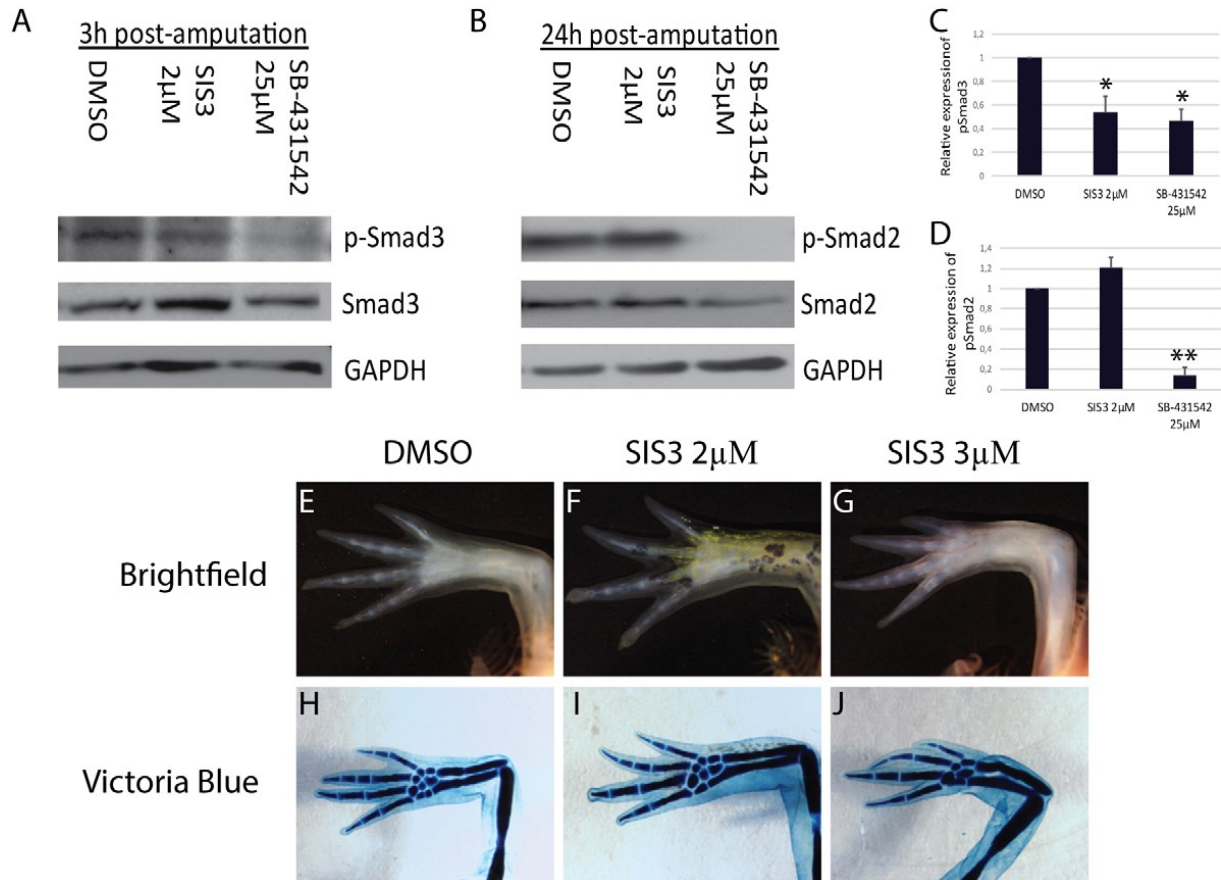


Figure 14. Figure 3: Inhibition of Smad3 phosphorylation has minimal effect on limb regeneration.

(A,B)Western blot. Animals were treated with 25 µM SB-431542, 2 µM SIS3, or DMSO as control. (A) Proteins were harvested 3 h post-amputation. Blot shows that p-Smad3 is reduced in SB-431542 and in SIS3 treatment conditions. (B) Proteins were harvested 24 h post-amputation. Smad2 phosphorylation is blocked at 24 h post-amputation by SB-431542 treatment only. (C) Quantification (from A) shows significant differences between DMSO and inhibitors (SIS3 and SB-431542) for p-Smad3 levels. (D) Quantification (from B) shows a significant difference between DMSO and SB-431542 but not SIS3 for p-Smad2 levels. (E-J) Ongoing SIS3 treatments with (E,H) DMSO control, (F,I) 2 µM SIS3 or (G,J) 3 µM SIS3 for 35 days. No differences can be observed in brightfield (E-G) and only minor differences can be discerned after Victoria Blue staining in SIS3-treated limbs (missing carpal or phalange in some limbs) (J). Welch's t-test was performed to compare protein phosphorylation under different conditions at 3 h and 24 h: **P<0.01, *P<0.05. Mean±s.e.m. (normalized using GAPDH, n=3).

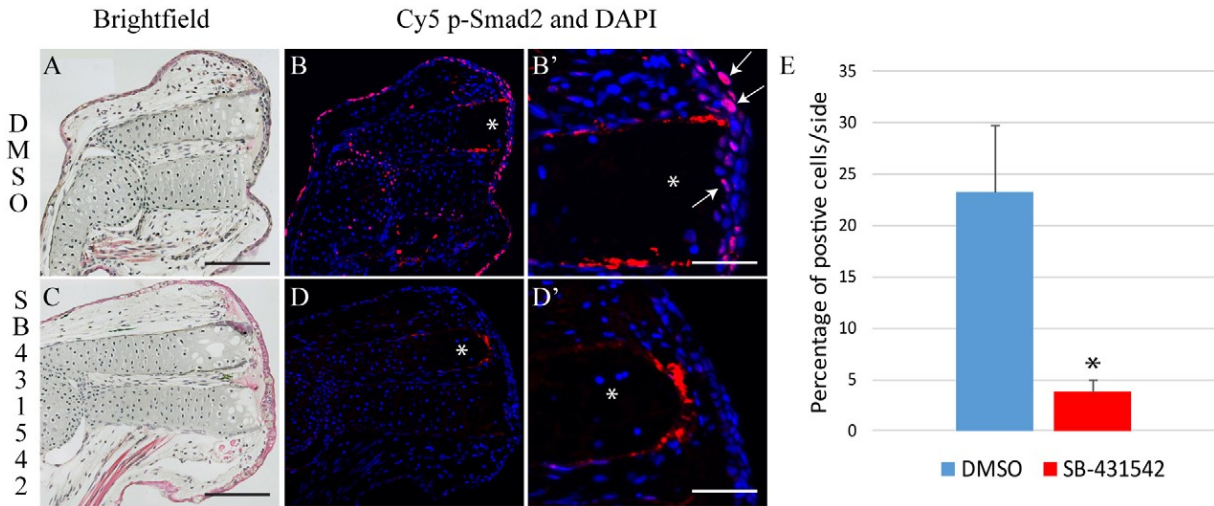


Figure 15. Figure 4: SB-431542 prevents phosphorylation of Smad2 in regenerating limbs.

(A-B') Control animal treated for 24 h post-amputation with DMSO. (A) Hematoxylin and Eosin staining, brightfield image. (B) Nuclei staining (DAPI, blue) overlaid with immunofluorescence of p-Smad2 (red) shows Smad2 phosphorylation in most cells of the wound epithelium and in some underlying mesenchymal cells. (B') Magnified view from B in the region of the asterisk. Phosphorylated proteins are often seen in the nucleus (pink, examples indicated with arrows). (C-D') Animal treated for 24 h post-amputation with 25 μ M SB-431542. (C) Hematoxylin and Eosin staining, brightfield image. (D) Overlay of DAPI and p-Smad2 immunofluorescence shows very few p-Smad2-positive cells when treated with SB-431542. (D') Magnified view from D in the region of the asterisk. Composite images are shown in A-D. (E) Quantification (%) of cells positive for nuclear p-Smad2. Error bars indicate s.e.m. Welch's t-test was performed to compare protein phosphorylation levels: * $P < 0.05$ (n=5). Scale bars: 200 μ m in A,C; 50 μ m in B', D'.

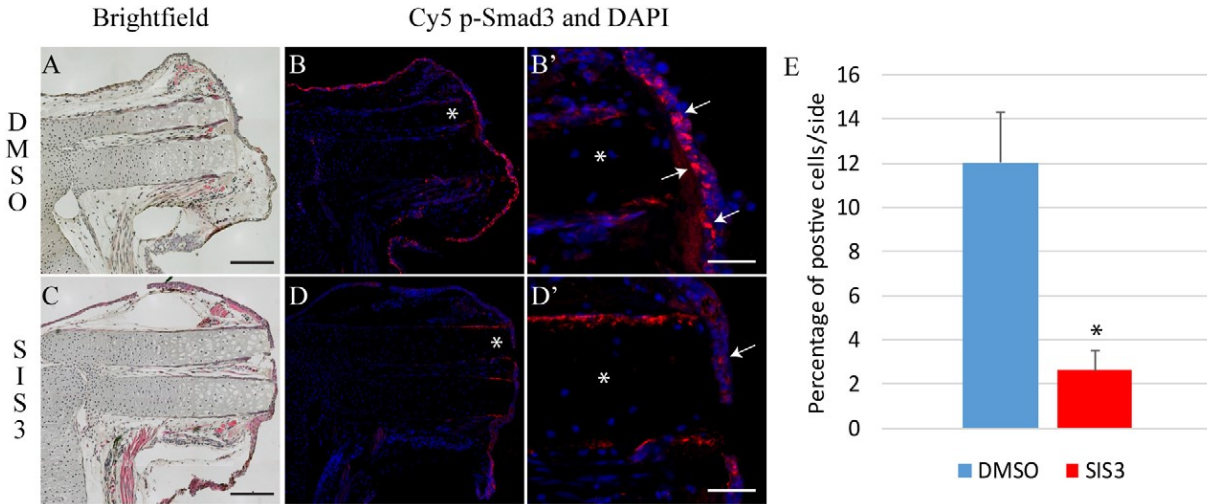


Figure 16. Figure 5: SIS3 treatment reduces p-Smad3 in regenerating limbs.

(A-B') Control animal treated for 6 h post-amputation with DMSO. (A) Hematoxylin and Eosin staining, brightfield image. (B) Overlay of nuclei staining (DAPI, blue) and p-Smad3 immunofluorescence (red) shows Smad3 phosphorylation in cells of the wound epithelium. (B') Magnified view from B in the region of the asterisk, showing that p-Smad3 is often seen in the nucleus (pink, examples indicated by arrows). (C-D') Animal treated for 6 h post-amputation with 5 μ M SIS3. (C) Hematoxylin and Eosin staining, brightfield image. (D) Overlay of nuclei staining (DAPI, blue) and p-Smad3 immunofluorescence (red) shows reduced Smad3 phosphorylation. (D') Magnified view (in the region of the asterisk in D) showing that p-Smad3 signal is not localized in the nucleus (arrow). Composite images are shown in A-D. (E) Quantification (%) of cells positive for nuclear p-Smad3. Error bars indicate s.e.m. Welch's t-test was performed to compare protein phosphorylation levels: * $P < 0.05$ ($n=3$). Scale bars: 300 μ m in A,C; 60 μ m in B', D'.

3.3.3.5 TGF- β target MMPs are affected by SB-431542, whereas nontarget MMPs are not

TGF- β controls a variety of targets, including genes responsible for matrix remodeling. In wound healing, matrix remodeling is an important mechanism in promoting cell migration and cell proliferation. Cell migration has not been assessed in SB-431542 treated limbs, but cellular proliferation is greatly reduced. In addition, in limbs treated with SB-431542 we do not see any cell accumulation under the wound epithelium that could result from either a lack of migration and/or proliferation (Fig. 1D). Therefore, we performed RT-PCR experiments to assess the effects of SB-431542 treatment on the expression of TGF- β 1 target MMPs and compare them with other MMPs that are known not to be targets of TGF- β 1. Mmp2 and Mmp9 are known targets of TGF- β . Their expression is augmented in cancer models¹⁵⁷ and during regeneration^{99,100}. When treated with SB-431542, the expression of these two MMPs is diminished (Fig. 6A,B). This could in part explain the lack of cellular migration and proliferation observed in SB-431542 treated limbs. The expression of other MMPs (Mmp13 and Mmp14) that are not TGF- β 1 targets was not affected by this treatment, at least not to the same extent (Fig. 6). Mmp14 was reduced slightly after 5 days of SB-431542 treatment, which is likely to be the result of indirect effects of TGF- β 1 inhibition via p38 and Erk, since this MMP is not a canonical target of TGF- β ^{315,316}.

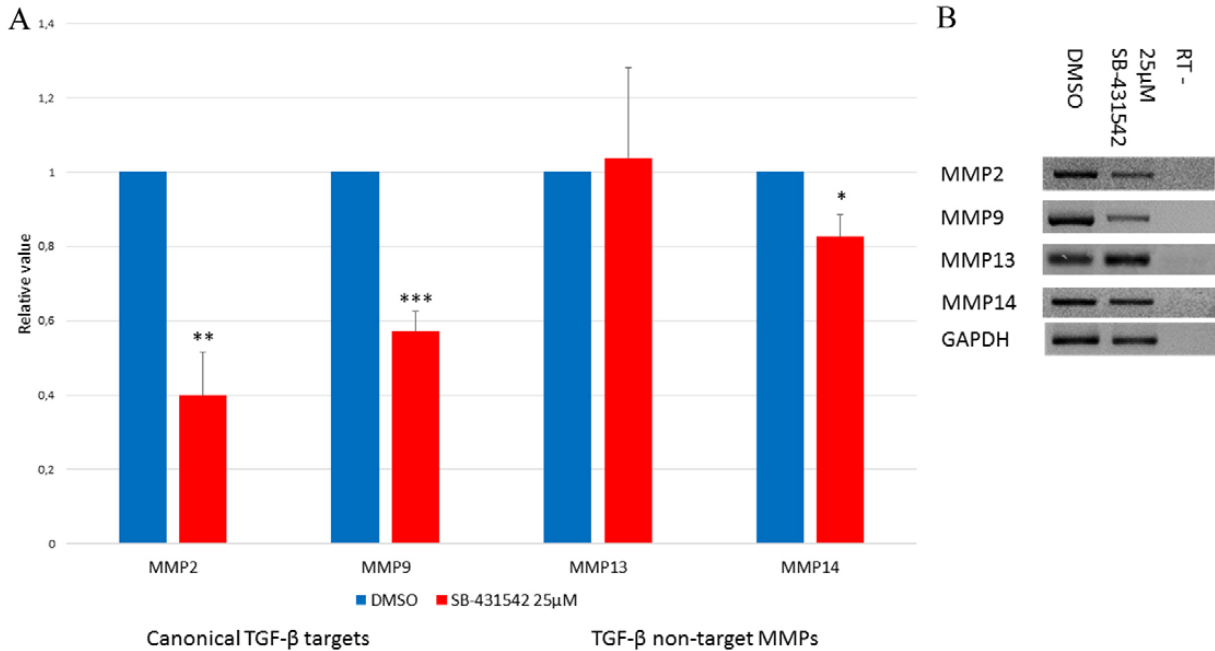


Figure 17. Figure 6: SB-431542 treatment reduces expression of canonical TGF-β target MMPs.

Animals were treated for 5 days post-amputation. (A) RT-PCR results. Animals were treated with DMSO (blue) or 25 µM SB-431542 (red). TGF-β target genes (Mmp2 and Mmp9) are affected by SB-431542 treatment, whereas non-targets (Mmp13) are not affected or not very much (Mmp14). Welch's t-test was performed to compare control and treated limbs: ***P<0.005, ** P<0.01, *P<0.05 (n=5). Mean±s.e.m. (normalized using Gapdh). (B) Agarose gel showing expression of MMP genes and Gapdh after a 5-day treatment with DMSO or SB-431542. RT-, RT-PCR control without reverse transcriptase.

3.3.4 Discussion

Inhibition of TGF- β signaling with SB-431542 does not prevent wound closure but does prevent blastema formation (Fig. 1) ²⁶⁴. One possible explanation is that SB-431542 treatment affects signaling between the AEC and underlying mesenchymal cells. The AEC is a permissive epithelium ^{70,73,317} that is essential for the regeneration process ⁶⁷. In mature limbs the basement membrane, which is constituted mainly of collagens, separates epithelial from mesenchymal cells, limiting their interactions. Following amputation, this structure is absent from the amputation plane and is not restored completely until the very end of the regeneration process ^{299,300}. Premature restoration of this structure could limit signaling between the AEC and mesenchymal cells, hence preventing blastema formation. Using collagen-specific histological staining (Picrosirius Red) and Col IV immunofluorescence we show that the basement membrane is not restored prematurely upon SB- 431542 treatment. Although TGF- β 1 activity is essential for blastema formation, inhibiting its signaling does not cause premature restoration of the basement membrane.

Canonical TGF- β signaling occurs via Smad2 and Smad3, which are phosphorylated by TGF- β type I receptor (ALK5). Recent studies have revealed functional differences between Smad2 and Smad3 ^{138,154,175}. Smad2 has a 30 amino acid insert in the MH1 domain that prevents direct DNA binding ¹³⁸, whereas Smad3 binds to target sequences in the promoter of genes such as Smad7 ¹⁷². Despite its indirect DNA binding, Smad2 is associated with cellular migration and proliferation, while Smad3 is known to control the production of matrix components such as collagens, the main ECM components implicated in fibrosis/scarring ¹³⁸. The axolotl Smad2 and Smad3 proteins exhibit very high identity with their human homologs, indicating that domains of interaction and functions are conserved.

The expression of Smad2, Smad3 and Smad7 mRNA was determined for all stages of regeneration. Expression of all three genes is biphasic (Fig. 2), showing low expression during the preparation phase and an increase during the redevelopment phase. These upregulation patterns during the redevelopment phase correlate with an accumulation of cells in the regenerative process ⁶⁷.

Expression of TGF- β 1 is maximal between 6 h and 48 h, correlating with when mesenchymal cells start to migrate under the AEC, the initial step leading to blastema formation. Normally, the presence of active TGF- β 1 leads to phosphorylation of Smad proteins. Our results show that p-Smad2 is maximal between 6 h and 48 h, which correlates perfectly with the presence of active TGF- β 1. Smad2 phosphorylation has been described in other regenerating organisms, such as *Xenopus*⁸⁵ and gecko⁸⁴. In both cases, p-Smad2 is associated with the wound epithelium. Similarly, our results show that p-Smad2 is located mostly in the wound epithelium. Ho and Whitman (2008) reported that p-Smad2 colocalizes with active TGF- β 5 [the *Xenopus* homolog of mammalian TGF β 1³¹⁸], with maximal phosphorylation at 24 h post-wounding. When TGF- β signaling is impaired with SB-431542, the wound epithelium fails to form in *Xenopus* and regeneration does not occur⁸⁵. In axolotl limb regeneration, a wound epithelium is formed following SB-431542 treatment but cellular proliferation and blastema formation are abrogated (Fig. 1)²⁶⁴. These disparities are likely to be due to the very different doses of SB-431542 used: 25 μ M in our study versus 100 μ M in the Ho and Whitman study. We determined the optimum dose of SB-431542 for use in axolotl, such that regeneration is inhibited without preventing normal growth or affecting the health of the animal²⁶⁴. If axolotls are treated with 100 μ M SB-431542 they do not survive more than 48 h (data not shown) and we deemed it toxic. It is possible that *Xenopus* tadpoles can withstand higher doses than axolotls, and if axolotls could survive at such high concentrations of SB-431542 it might well prevent wound closure as well. Gilbert et al. (2013) reported that p-Smad2 is seen throughout tail regeneration in gecko, specifically in the blastema. The authors propose that activation of Smad2 is Activin rather than TGF- β 1 related. Our PCR results indicate that Activins and Tgf- β 2 are not upregulated during axolotl limb regeneration (data not shown). Therefore, the Smad2 phosphorylation observed in regenerating axolotl limbs is more likely to be due to TGF- β 1 activity, and the differences observed between *Xenopus*, geckos and axolotls are likely to be species-specific characteristics.

Smad3 activation is associated with scarring in mammals. This function for Smad3 is supported by the phenotype of Smad3 KO mice^{38,202}. p-Smad3 has also been described in zebrafish heart regeneration. Activation of Smad3 via Activin/TGF- β in zebrafish heart leads to the formation of a transient scar that is later resolved to achieve regeneration⁴⁷. Treatment with

SB-431542 prevents phosphorylation of Smad3 and hence the heart regeneration process in zebrafish is inhibited. However, Chablais and Jazwinska (2012) did not look at p-Smad2 and they did not test Smad3-specific inhibitors, such as SIS3, to confirm that inhibition of heart regeneration was due solely to the loss of p-Smad3. In axolotl limb regeneration, scar formation is never observed^{29,137,264}. We observe low levels of p-Smad3 very early post-amputation (Figs 2 and 5). In addition, specifically inhibiting Smad3 phosphorylation using SIS3 or Naringenin does not affect regeneration. Finally, overexpression of Smad3 does not impair limb regeneration nor does it cause scarring. This is largely due to the fact that these overexpressing cells are eliminated via apoptosis (Figs S4 and S5). p-Smad3 is likely to have limited activity in axolotl limb regeneration (it is detected at very low levels and there is no effect when inhibited) during the preparation phase. Our study did look at the levels of p-Smad2 in animals treated with SIS3 and Naringenin. The results showed clearly that these inhibitors had no effect on p-Smad2 levels, although they significantly inhibited Smad3 phosphorylation.

None of the aforementioned studies compared the expression and activation of Smad2 and Smad3^{47,84,85}. Multiple studies have shown that these two proteins have different functions^{149,154,175}. Our results show that in regenerating axolotl limbs there is a differential activation of Smad2 and Smad3. Smad3 is active very early and at low levels compared with p-Smad2. Specific inhibitors of Smad3 phosphorylation, SIS3 (50% inhibition as assessed by western blot and over 80% by immunofluorescence) and Naringenin, significantly reduce the level of p-Smad3 but have no effect on regeneration. Overexpression of Smad3 does not affect regeneration either. p-Smad2 is correlated to the active form of TGF- β 1 and is clearly inhibited by treatment with SB-431542. Smad2 inhibition is strongly correlated with a lack of cellular proliferation and the absence of blastema formation. Also, Smad7, a known Smad3 target gene, does not show any increase in expression at the time points when p-Smad3 is detected, supporting the idea that Smad3 activation is not very strong/important during the early phase of limb regeneration.

TGF- β 1 is known to regulate MMPs⁹², which are essential during wound healing for matrix remodeling and proper cell migration. In normal axolotl wound healing and limb regeneration, the expression of MMP2 and MMP9 has been described^{55,99,100}. MMPs are also essential for regeneration, since the broad spectrum inhibitor of MMPs, GM6001, prevents

blastema formation and regeneration¹⁰². We show that following treatment with the TGF- β inhibitor SB-431542, MMP2 and MMP9 are significantly diminished. Interestingly, it was reported that MMP2 is most likely regulated by Smad2^{154,155}. Other MMPs, such as MMP13 and MMP14, are not known to be regulated by the TGF- β canonical signaling pathway^{189,209,319} and are unaffected (MMP13) or only slightly affected (MMP14) by SB-431542 treatment. Consequently, inhibition of Smad2 activation correlates with the diminished expression of target MMPs. These matrix proteases might be essential in providing the proper environment for mesenchymal cells to migrate, similar to what has been described in cancer invasion¹⁵⁷. Other MMPs, such as MMP13 and MMP14, might be employed in other processes such as wound closure or to prevent the basal lamina from reforming by preventing the deposition of Col IV, which is degraded by MMP13^{320,321}, independently of the TGF- β canonical pathway.

This study is the first to examine the activation of the TGF- β canonical signaling mediators Smad2 and Smad3 in the context of epimorphic regeneration. It is also the first study to demonstrate that Smad2 and Smad3 are differentially regulated during regeneration and that Smad2 activation is essential for axolotl limb regeneration. The level of p-Smad3 is low compared with that of p-Smad2, indicating that limb regeneration is controlled by a differential activation of Smad proteins. Specific inhibition or overexpression of Smad3 does not affect the regeneration process in axolotl. Treatment with SB-431542 greatly inhibits the phosphorylation of Smad2 and, consequently, inhibits regeneration. Treatment with Smad3-specific inhibitors has no effect on regeneration, even though they achieved the same level of inhibition as SB-431542. These results suggest that inhibition of the canonical TGF- β pathway blocks regeneration by preventing the activation of Smad2.

3.3.6 Materials and methods

3.3.6.1 Animal maintenance and treatments

Axolotls (*Ambystoma mexicanum*) were purchased from the *Ambystoma* Genetic Stock Center (Lexington, KY, USA) and maintained as described²⁶⁴. SB-431542 and SIS3 were purchased from Sigma-Aldrich. 10 mM stock solutions were prepared in DMSO (Sigma-

Aldrich). After amputation, 4 cm animals were kept in 5 ml and 6 cm animals were kept in 10 ml 20% Holtfreter's solution containing 25 μ M SB-431542. SIS3 treatments were at 2, 3 or 5 μ M. Control animals were treated with DMSO (same volumes as for SB-431542 and SIS3 compounds). Solutions were changed daily. Animal care and experiments were performed in accordance with Université de Montréal Animal Care Committee guidelines.

3.3.6.2 Production of antibody against axolotl p-Smad3

A peptide corresponding to the phosphorylated C-terminus of axolotl Smad3 (CGMGTPSLRCSpSVpS) was synthesized (Biomatik) with the phospho-serine residues corresponding to positions 423 and 425. Peptide was diluted in sterile PBS at 10 mg/ml. KLH (ThermoFisher Scientific, 77606) was diluted in sterile water at 10 mg/ml for conjugation with the peptide. Peptide and KLH solutions were mixed and incubated 2 h at room temperature then stored at -20°C until use. Prior to injection, peptide-KLH solution was diluted (400 μ g/ml peptide) in sterile PBS. Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich) was added to a final peptide concentration of 200 μ g/ml. Five 25-day-old BALB/c mice were injected subcutaneously on the back with this mixture. Booster shots were administered at 14 days and 28 days. Serum was collected prior to first injection (pre-serum) and after 10 weeks. Serum was collected in a microtainer (BD, 365956) and separated following the manufacturer's protocol. Western blot analyses were performed to assess the presence of antibodies against axolotl p-Smad3 in the serum.

3.3.6.3 RT-PCR

RNA extraction and RT-PCR were performed as described²⁶⁴; primers are listed in Table S1. For each non-treated regeneration stage, two animals of 6 cm (four blastemas) were pooled per preparation for a total of six animals (n=3 independent replicates). To measure the effect of SB-431542 on TGF- β 1 target genes, animals were treated with 25 μ M SB-431542 or DMSO for 5 days following amputation, two animals of 6 cm (four blastemas) were pooled per preparation for a total of eight animals (n=4 independent replicates). For quantification, densitometric analysis was performed using the AlphaEaseFC (Fluor-Chem 8900) program. Gene expression was normalized using Gapdh, which has been demonstrated to be the most

appropriate standard during limb regeneration in urodeles ³²². Relative values are represented compared with t=0 h.

3.3.6.4 Western blotting

For each non-treated regeneration stage, two animals of 6 cm (four blastemas) were used per preparation for a total of eight animals (n=4 independent replicates). To measure the effects of SB-431542 and SIS3 on phosphorylation of Smad2 and Smad3, animals were treated for 3 h or for 24 h following amputation with 25 μ M SB-431542, 2 μ M SIS3 or DMSO as a control for the carrier of the drugs. Proteins were extracted by sonication in Laemmli buffer containing 50 mM NaF. Proteins were quantified using EZQ Reagent (Invitrogen, R33200) following the manufacturer's protocol. 30 μ g protein was loaded per lane on 10% SDS-PAGE gels. Proteins were transferred electrophoretically onto Immobilon PVDF membranes (Millipore, IPVH00010). Antibodies and blotting conditions are described in Table S2. For quantification, densitometric analysis was performed using Adobe Photoshop CS4. Protein expression was normalized using GAPDH and relative values compared with t=0 h (i.e. unamputated control) are presented.

3.3.6.5 Picrosirius Red staining

Following treatments with SB-431542 or DMSO, animals were fixed overnight in 4% paraformaldehyde in 0.7 \times PBS at 4°C. The following day, tissues were rinsed thoroughly with 0.7 \times PBS and embedded in paraffin. To assess the presence of the basement membrane, 10 μ m sections were rehydrated then stained with Weigert's Hematoxylin for 10 min, rinsed with running tap water and then stained with Picrosirius Red (ThermoFisher Scientific, B21693) for 1 h. Slides were dehydrated and mounted using Permount (Fisher Scientific). Polarized light was used to visualize collagen fibers. Slides were visualized with an Axiophot 506747 microscope (Zeiss).

3.3.6.6 Victoria Blue cartilage staining

Following treatments with SIS3 or DMSO, limbs were stained using Victoria Blue (Sigma-Aldrich, V-0753) to verify cartilage formation as previously described ¹. Limbs were fixed in alcoholic Bouin's solution for 24 h, then rinsed several times with 70% ethanol. Limbs

were rinsed multiple times with 3.5% NH₄OH for 24 h and then treated with acid alcohol (70% ethanol with 0.4% HCl) for 2 h. Specimens were stained with 1% Victoria Blue for 2 h and then rinsed with 70% ethanol. Limbs were gradually dehydrated to 100% ethanol, then cleared and stored in methyl salicylate.

3.3.6.7 Apoptosis

Apoptosis was assessed by Acridine Orange/ethidium bromide staining or by TUNEL assay following injection/electroporation (see Table S3) as described in the supplementary Materials and Methods.

3.3.6.8 Immunofluorescence enhanced with tyramide

Sections of treated limbs were rehydrated as previously described²⁶⁴. Epitope retrieval was performed (1% SDS for 5 min at room temperature for p-Smad3; and citric acid for 20 min at 95°C for Col IV). Slides were blocked using 2% BSA in TBS-T (Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature for p-Smad2 and p-Smad3 or with Power Block 1× (Hk085.5K, BioGenex) for 15 min at room temperature for Col IV. Primary antibodies anti-p-Smad2 (3101, Cell Signaling; 1/400) and anti-p-Smad3 (homemade mouse antibody; 1/500) were diluted in blocking solution and anti-Col IV (ab6586, Abcam; 1/500) in PBS and incubated overnight at 4°C. Anti-rabbit-HRP and anti-mouse-HRP (170-6515 and 170-6516, Bio-Rad; 1/400) secondary antibodies were diluted in blocking solution for p-Smads or PBS for Col IV and incubated at room temperature for 45 min. Tyramide (Biotium, 92175) was diluted in TBS with 0.0015% H₂O₂ to 11.6 μM then incubated at room temperature for 8 min. All slides were mounted with ProLong Gold antifade reagent containing DAPI (Invitrogen, 36931). Slides were visualized with a Zeiss Axio Imager M2 optical microscope. The software used was Zeiss Zen 2 Pro Blue Edition with a Tile Module. All images were verified using the range indicator of the software to ensure that they were not saturated. The images were saved as tif files and then imported into Photoshop CS4 to adjust the rotation and to crop to be mounted into a multipanel figure using Adobe Illustrator CS4.

3.3.6.9 Statistical analysis

Cell counts were performed using ImageJ. Statistical analyses were achieved using Welch's t-test, which corrects biases due to an unequal number of samples and/or variances between the different groups (Scherrer, 2007). Values are presented as mean±s.e.m.

3.3.7 Acknowledgements

Special thanks to Dr Ken Finnon for help with antibodies; Dr Mathieu Lévesque for help with western blots and detection of TGF- β 1; the laboratory of Dr Antonio Nanci for help with their microscopes; and Dr Elly Tanaka and Dr Prayag Murawala of the Center for Regenerative Therapies in Dresden for constructive input.

3.3.8 Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

3.3.9 Author contributions

J.-F.D. performed 80% of the experiments and helped design, analyze and interpret the data and co-wrote the manuscript. F.S. helped with some of the animal treatments, protein preparation and RT-PCR experiments and helped with the writing of the manuscript. S.G. cloned Smad2 and Smad3. E.V. helped with protein and RNA preparation, TUNEL assay and animal husbandry. A.P. helped interpret some of the results and her lab provided antibodies for some of the western blots. S.R. designed and supervised the project, helped analyze and interpret the data and co-wrote the manuscript.

3.3.10 Funding

This research is supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research [MOP: 111013] to S.R. J.-F.D. is supported by a PhD scholarship award from the Réseau de Recherche en Santé Buccodentaire et Osseuse (RSBO).

3.3.11 Data availability

cDNA sequences for axolotl Smad2 and Smad3 are available at GenBank under accessions KT383019 and KT383020.

3.3.12 Supplementary information

Supplementary information available online at
<http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.131466.supplemental>

3.3.13 Supplementary Materials and Methods:

3.3.13.1 Cloning of Axolotl Smad2, Smad3 and Smad7

Partial axolotl Smad2, Smad3 and Smad7 cDNA were obtained from axolotl larvae total RNA by RT-PCR. The cDNAs were amplified with primers (see sup. table1) designed from human cDNA sequences. The full length Smad2, Smad3 and partial Smad7 cDNA were subsequently obtained by screening an axolotl cDNA library (Stratagene, CA, USA), following the manufacturer's instructions and using the RT-PCR fragments as probes radioactively labeled with $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Perkin Elmer, MA, USA).

3.3.13.2 Acridine Orange / Ethidium bromide staining for apoptosis

AL-1 cells were electroporated (approx. 150k cells) with expression vectors (GFP with β -gal, axolotl Smad3 or axolotl Smad3 Δ D, see sup. table 3) and plated in a 12 well plate. Cells were harvested 48h post-electroporation and stained with Acridine Orange / Ethidium bromide as described in Ribble et al, 2005 and Kasibhatla et al, 2006^{323,324}.

3.3.13.3 TUNEL assay

Following injection and electroporation of plasmids (details for in situ electroporation can be found in Guimond et al 2010)³²⁵, 10 μm sections of paraffin embedded limbs were rehydrated then treated with Proteinase K 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Invitrogen, Ref#25530-015) for 20min at RT. Positive control were treated with DNase 1 1U/50 μL (Invitrogen, ref#18068-015) for 10min at RT. Sections were then rinsed in TBS then TdT buffer 1X (Invitrogen, ref#16314-015) and treated with recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) 3,75U/ μL (Invitrogen, ref#10533-065), Digoxigenin-11-dUTP 2 μM (Roche, ref#11093088910) in TdT buffer 1X for 1h at 37°C. Slides were rinsed in TBS then blocking was performed at RT for 15min with 2%

sheep serum in TBS. Slides were incubated with a primary Antibody against digoxigenin 1/1500 (Roche, ref#113333062910) at 4°C overnight. Slides were rinsed (4X 15min) with PBST then incubated with a secondary antibody coupled to Alexa fluor 594 (anti-mouse 1/250) (Invitrogen, ref#A11020) in blocking solution for 2h at RT in the dark. Slides were rinsed (4X15min) with PBST and mounted with ProLong® Gold antifade reagent containing DAPI (Invitrogen, ref#36931). Slides were visualized with a Zeiss Axio Imager M2 Optical Microscope (Zeiss, Munich, Germany).

Tableau I. Supplementary Table 1: List of primers

Gene Name		Primer sequence 5' to 3'
Smad3 probe primers	3RSmd3-11 (forward)	AATCAGGGTTTCGAAGCCGT
	5RSmd3-5 (reverse)	CTGATTTACAGATTGGGACAA
Axolotl Smad2 (used for probe)	aSmd2F59	ATTCAGAACCAGCGTTTTGG
	aSmd2R598	ATTGCAGAGGTCCATTCAGG
Axolotl Smad3	Smad3_axo_F515	GGAGCTCTGCGAGTATGCCT
	Smad3_axo_R997	CTCTCCCACTCGTTGATTAAGC
Axolotl Smad7 (used for probe)	aSmd7F95	GCCTTCCTCCACTGAAACTG
	aSmd7R445	GTGGCCGACTTGATGAAAAT
Axolotl MMP2	aMMP2F100	TCAGAAGGCTCTCCCTGTGT
	aMMP2R779	GCTGCATCCACATGTTTCAC
Axolotl MMP9	F485_MMP9axo	AAGGGGGCTTGCAGGATAA
	R1091_MMP9axo	AGCACAGAAGTGTGGGCTCT
Axolotl MMP13	F2381_MMP13axo	AAAACGACGCTCCAAAACAC
	R2565_MMP13axo	AAGGCACACTCTCAGCCAAA
Axolotl MMP14	F2795_MMP14axo	TGGATAACTGAATGTGCGGA
	R3046_MMP14axo	GACGCTGACACTCAACCTCA
Axolotl GAPDH	aGAPDHF709	AGCTCAATGGGAAACTCACTGGC
	aGAPDHR966	TCACAAAGTGATCGTTGAGGGCA

Tableau II. Supplementary Table 2: Antibodies and blotting conditions

Antibody	Manufacturer	Ref #	Dilution	Conditions	Blocking	ECL
Smad2	Cell Signaling	5339	1/500	O.N. 4°C	5% milk in PBST, 6h 4°C	GE*
p-Smad2	Cell Signaling	3108	1/500	O.N. 4°C	5% chicken serum, 0,75% BSA in TBST, 1h30 RT	LL+**
Smad3	Zymed	51-1500	1/500	O.N. 4°C	5% milk in PBST, 6h 4°C	GE*
p-Smad3	<i>See materials and methods</i>	N/A	1/2500	O.N. 4°C	5% chicken serum, 0,75% BSA in TBST, 1h30 RT	SFE***
TGF-β1	Santa Cruz	Sc-146	1/500	O.N. 4°C	5% chicken serum, 0,75% BSA in TBST, 1h30 RT	GE*
GAPDH	Sigma	G8795	1/1000	1h RT	5% chicken serum in PBST, 1h RT	GE*

*Western blotting detection reagents, GE Healthcare, ref#RPN2109, Buckinghamshire, UK

**Lumi-Light^{Plus} Western Blotting Substrate, Roche, ref#12015196001

***SignalFireTM Elite ECL Reagent, Cell Signaling, ref#12757

Tableau III.Supplementary Table 3: Plasmids used in injection/electroporation experiment

Gene expressed by plasmid with CMV promoter	Backbone	Quantity used (μg)
GFP	Max GFP	0.5
β -gal	pSport1	1
axolotl Smad3 (wild type)	pSport1	1
Axolotl Smad3 S Δ D (Serine 423-425 mutated to glutamic acids)	pSport1	1

3.3.14 Supplementary figures

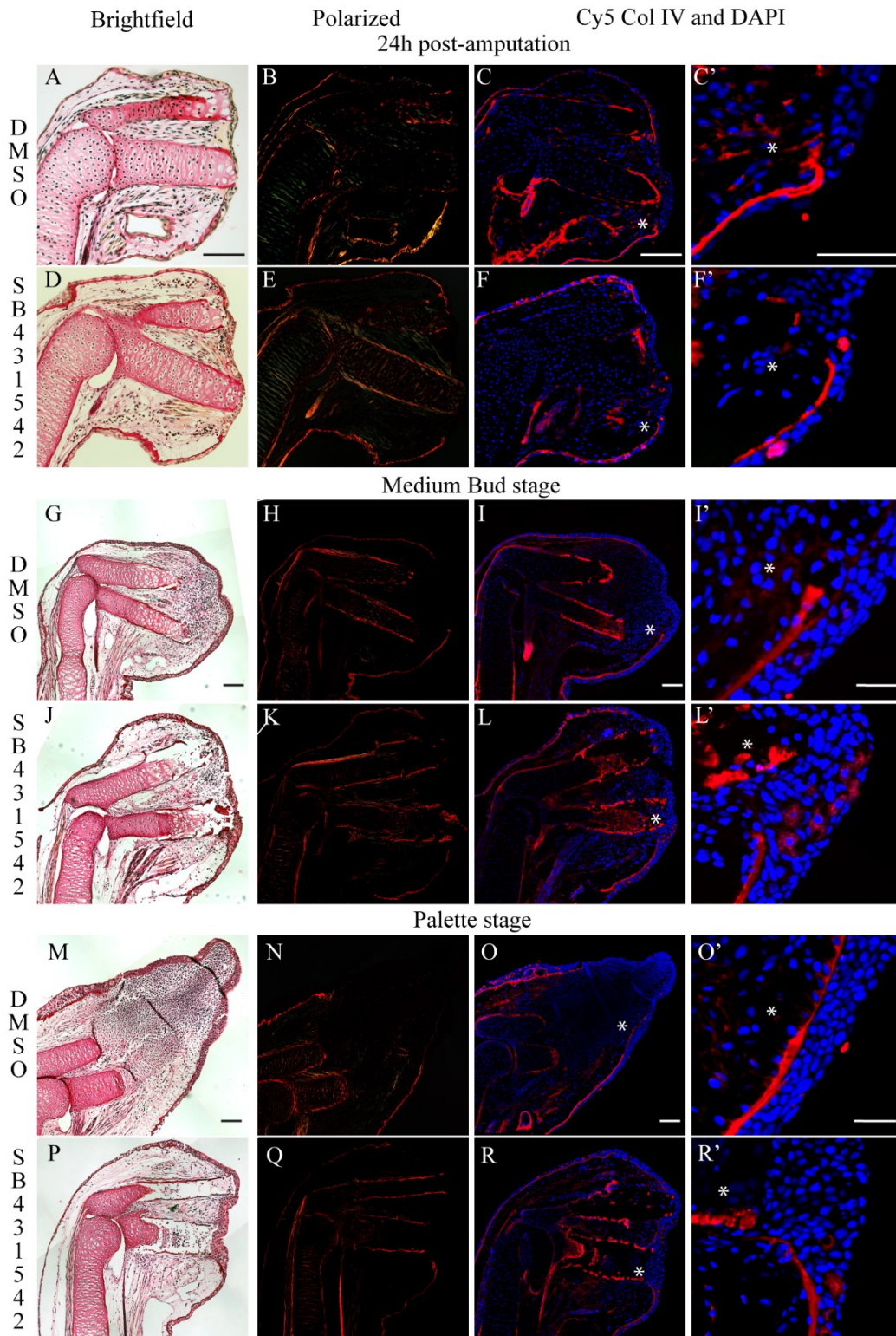


Figure 18. Supplementary Figure 1: SB-431542 does not affect basement membrane reformation in regenerating limbs

(A-C, G-I, M-O) Animals treated with DMSO (A,G,M) Brightfield view of limb indicates that a blastema is forming normally. Polarized light show some collagen deposition in Palette stage (N) in basement membrane region but not at 24h (B) or MB stage (H). Col IV expression (red) shows some collagen deposition in Palette stage (O,O') in basement membrane region but not at 24h (C, C') or MB stage (I,I'). (D-F, J-L, P-R) Animals treated with 25 μ M SB-431542 (D,J,P) Brightfield view of limb indicates that no blastema is forming. Polarized light show some collagen deposition in Palette stage (Q) in basement membrane region but not at 24h (E) or MB stage (K). Col IV expression (red) shows some collagen deposition in Palette stage (R,R') in basement membrane region but not at 24h (F, F') or MB stage (L,L'). Results show that basement membrane is not restored prematurely in limbs treated with SB-431542. Scale bar 200 μ M (A,C,G,I,M,O) and 60 μ M (C',I',O'). Composite images are shown and stars indicate areas of magnification.

K19/K20 K39
 1 MSSILPFTPPVVKRLLGW **K****K**SA**G**GSSGGAGGGGEQNGQEE **K**WCEKAV Smad2 Human
 1 MSSILPFTPPVVKRLLGW **K****K**SA**S**GSSGGAGGGGEQNGQEE **K**WCEKAV Smad2 Axolotl

46 KSLVKKLKKTG **R**LDELEKAITTQNCNTKCVTIPSTCSEIWGLSTP Smad2 Human
 46 KSLVKKLKKTG **Q**LDELEKAITTQNCNTKCVTIPSTCSEIWGLSTP Smad2 Axolotl

91 NTIDQWDTTGLYSFSEQTRSLDGRLQVSHRKGLPHVIYCRLWRWP Smad2 Human
 91 NTIDQWDTTGLYSFSEQTRSLDGRLQVSHRKGLPHVIYCRLWRWP Smad2 Axolotl

136 DLHSHHELKAIENCEYAFNLKKDEVCVNPYHYQRVETPVLPPVLV Smad2 Human
 136 DLHSHHELKAIENCEYAFNLKKDEVCVNPYHYQRVETPVLPPVLV Smad2 Axolotl

181 PRHTEILTELPPLDDYTHSIPENTNFPAGIEPQSNIYIPETPPPGY Smad2 Human
 181 PRHTEILTELPPLDDYTHSIPENTNFPAGIEPQSNIYIPETPPPGY Smad2 Axolotl

T220 S245/S250/S255
 226 IEDGE **T**SDQQLNQSMDTG **S**PAEL **S****P****T**TL **S**PNHSLDLQPVTYSE Smad2 Human
 226 IEDGE **T**SDQQLNQSMDTG **S**PAEL **S****P****S**TL **S**PNHSLDLQPVTYSE Smad2 Axolotl

271 PAFWCSIAYYELNQRVGETFHASQPSTLVDGFTDPSNSERFCLGL Smad2 Human
 271 PAFWCSIAYYELNQRVGETFHASQPSTLVDGFTDPSNSERFCLGL Smad2 Axolotl

316 LSNVNRNATVEMTRRHIGRGVRLYYIGGEVFAECLSDSAIFVQSP Smad2 Human
 316 LSNVNRNATVEMTRRHIGRGVRLYYIGGEVFAECLSDSAIFVQSP Smad2 Axolotl

361 NCNQRYGWHPATVCKIPPGCNLKFNNQEFAALLAQSVNQGFEAV Smad2 Human
 361 NCNQRYGWHPATVCKIPPGCNLKFNNQEFAALLAQSVNQGFEAV Smad2 Axolotl

406 YQLTRMCTIRMSFVKGWGAEYRRQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLD Smad2 Human
 406 YQLTRMCTIRMSFVKGWGAEYRRQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLD Smad2 Axolotl

S465/S267
 451 KVLTMGSPSVRCS **S****M****S** Smad2 Human
 451 KVLTMGSPSVRCS **S****M****S** Smad2 Axolotl

Figure 19. Supplementary Figure 2 : Protein alignment of Smad2

Protein sequences for human and axolotl Smad2 were aligned using DNASTAR MegAlign. Sequences are greatly conserved between species. The axolotl Smad2 sequence has 99% identity with the human Smad2. MH1 domain is underlined in green. MH2 domain is underlined in blue. Linker domain is located between MHI and MH2 domain, with no underlining. Important post-translational modification sites are indicated on top of the aligned sequences and highlighted in green. Differences in aa are highlighted in yellow with red writing. All post-translational modification sites are conserved between both species.

1 MS **S**ILPFTPPIVKRLLGWKKG **EQN - - - -** GQEEKW **C**EKAVKSLV Smad3 Human
1 MS **S**ILPFTPPIVKRLLGWKKG **GGGDQGGPG** GQEEKW **S**EKAVKSLV Smad3 Axolotl

40 KKLKK **T**GQL **D**ELE **K**AIT **T**Q **NVN**TKCITIPRSLDGRLQVSHRKGLP Smad3 Human
45 KKLKK **S**GQL **E**ELE **R**AIT **S**Q **SPG**TKCITIPRSLDGRLQVSHRKGLP Smad3 Axolotl

85 HVIYCRLWRWPDHSHHELRA **M**ELCE **F**AFNMKKDEVCVNPYHYQR Smad3 Human
90 HVIYCRLWRWPDHSHHELRA **V**ELCE **Y**AFNMKKDEVCVNPYHYQR Smad3 Axolotl

130 VETPVLPPVLVPRHTEIPAEFPPLDDYSHSIPENTNFPAGIEPQS Smad3 Human
135 VETPVLPPVLVPRHTEIPAEFPPLDDYSHSIPENTNFPAGIEPQS Smad3 Axolotl

T179 S204/S208/S213
175 N **I**PE **T**PPPGYLSEGETSDH **Q**MNHSMD **A**G **S**PN **L**SPN **P**MS **P**A **H**NN Smad3 Human
180 N **Y**PE **T**PPPGYLSEGETSDH **L**MNHSMD **S**G **S**PN **V**SPN **S**MS **P**I **P**NN Smad3 Axolotl

219 LDLQPVTYCEPAFWCSISYYELNQRVGETFHASQPSMTVDGFTDP Smad3 Human
225 LDLQPVTYCEPAFWCSISYYELNQRVGETFHASQPSMTVDGFTDP Smad3 Axolotl

264 SNSERFCLGLLSNVNRNAAVELTRRHIGRGVRLYYIGGEVFAECL Smad3 Human
270 SNSERFCLGLLSNVNRNAAVELTRRHIGRGVRLYYIGGEVFAECL Smad3 Axolotl

K333
309 SDSAIFVQSPNCNQRYGWHPATVC **K**IPPGCNLKIFNNQEFAALL **A** Smad3 Human
315 SDSAIFVQSPNCNQRYGWHPATVC **K**IPPGCNLKIFNNQEFAALL **S** Smad3 Axolotl

K378
354 QSVNQGFEAVYQLTRMCTIRMSFV **K**GWGAEYRRQTVTSTPCWIEL Smad3 Human
360 QSVNQGFEAVYQLTRMCTIRMSFV **K**GWGAEYRRQTVTSTPCWIEL Smad3 Axolotl

S423/S425
399 HLNGLPLQWLDKVLTMG **S**PS **I**RCS **S**V **S** Smad3 Human
405 HLNGLPLQWLDKVLTMG **T**PS **I**RCS **S**V **S** Smad3 Axolotl

Figure 20. Supplementary Figure 3: Protein alignment of Smad3

Protein sequences for human and axolotl Smad3 were aligned using DNASTAR MegAlign. Sequences are greatly conserved between species. The axolotl Smad3 sequence has 93% identity with the human Smad3. MH1 domain is underlined in green. MH2 domain is underlined in blue. Linker domain is located between MHI and MH2 domain, with no underlining. Important post-translational modification sites are indicated on top of the aligned sequences and highlighted in green. Differences in aa are highlighted in yellow with red writing. All post-translational modification sites are conserved between both species.

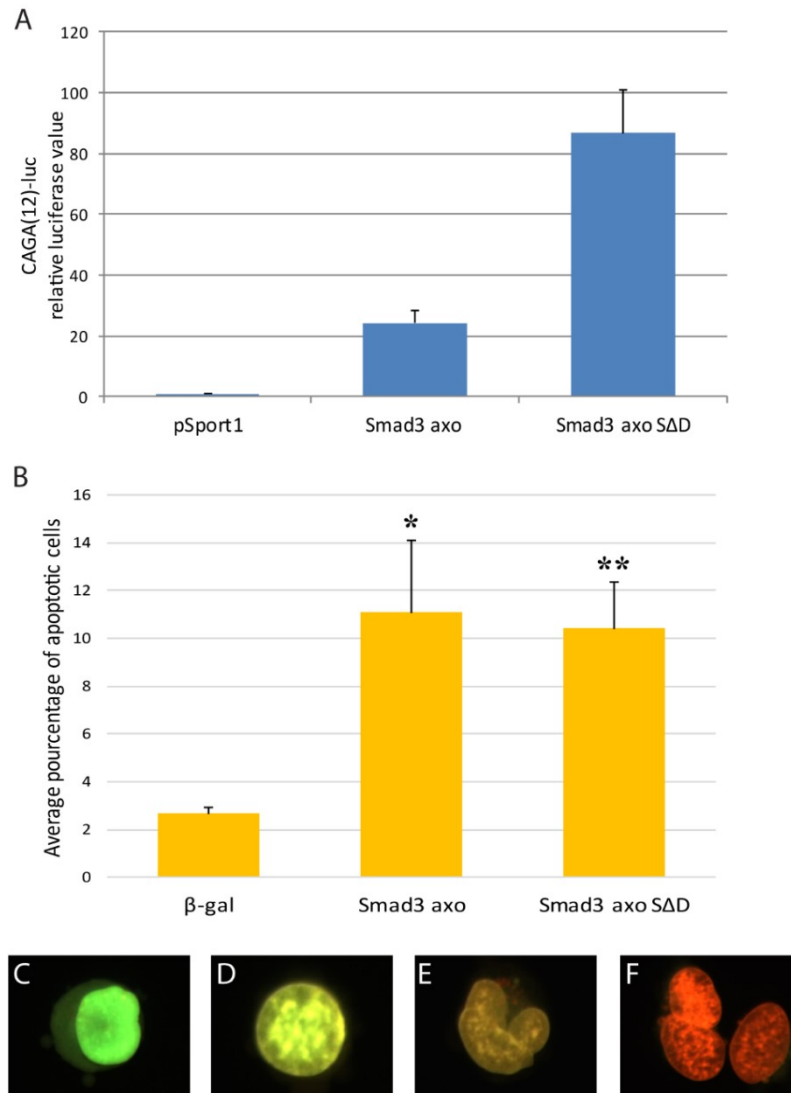


Figure 21. Supplementary Figure 4: Overexpression of axolotl Smad3 leads to increased apoptosis in AL-1 cell line

(A) Luciferase assay showing that axolotl Smad3 (Smad3 axo) and axolotl Smad3 SΔD (Smad3 axo SΔD, a phosphomimetic Smad3) overexpression have more activity on the CAGA promoter driving luciferase in AL-1 cells than control vector (pSport1) (n=12). Data is presented as mean relative luciferase value \pm SEM. (B) Acridine Orange/Ethidium Bromide double staining cell count for apoptosis; (C) viable cell (not counted), (D) early apoptosis (counted as apoptotic), (E) late apoptosis (counted as apoptotic) and (F) necrotic cells (not counted). Data is presented as mean percentage \pm SEM. Student's t-test were performed to compare means. There is significantly more apoptosis in axolotl Smad3 and axolotl Smad3 SΔD compared to β -gal (**p < 0.01, * p < 0.05, n=3).

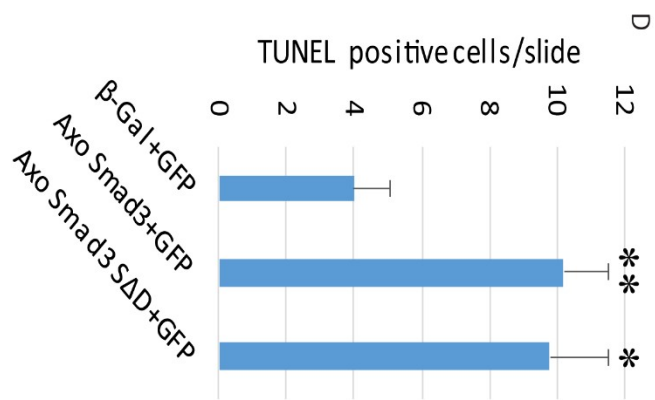
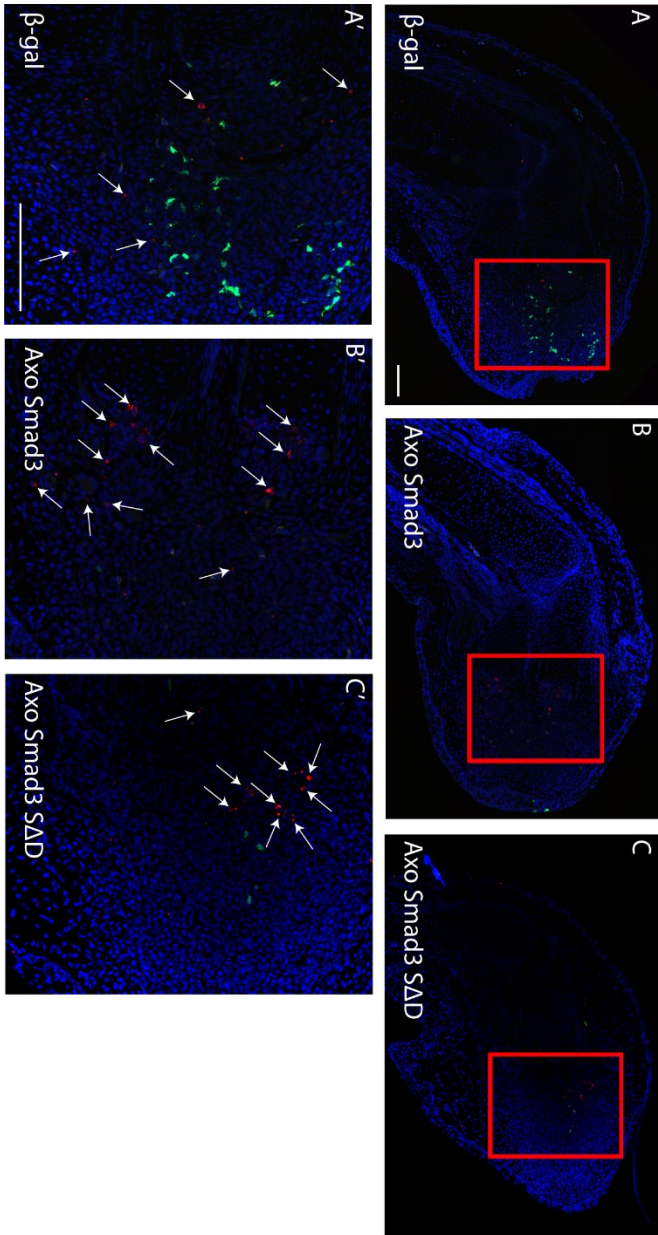


Figure 22. Supplementary Figure 5: Overexpression of axolotl Smad3 in vivo leads to apoptosis

(A-A') Co-injection and electroporation of β -gal and GFP. Multiple fluorescent cells can be seen. Only a few cells are positive for apoptosis (TUNEL, 4 days post-transfection). (B-B') Co-injection and electroporation of axolotl Smad3 and GFP. GFP positive cells are almost absent from slide. Multiple cells near the injection site are positive for apoptosis (TUNEL, 4 days post-transfection). (C-C') Co-injection and electroporation of axolotl Smad3 Δ D and GFP. Similar results to what is observed for axolotl Smad3 presented in B and B', GFP positive cells are almost absent from slide. Multiple cells near the injection site are positive for apoptosis (TUNEL, 4 days post-transfection). Regions in red square are magnified (A', B', C'). TUNEL positive cells (red) are pointed with arrows. Composite images are shown and scale bars represent 200 μ m. (D) TUNEL positive cells were counted for each condition (n=5 different animals). Data is presented as number of positive cells \pm SEM. There are less apoptotic cells in β -gal and GFP co-injected blastemas compared to axolotl Smad3 and GFP or axolotl Smad3 Δ D and GFP co-injected blastemas. Welch's t-test was performed to compare apoptosis between different treatments; observed difference are statistically significant. ** p < 0.01, * p < 0.05.

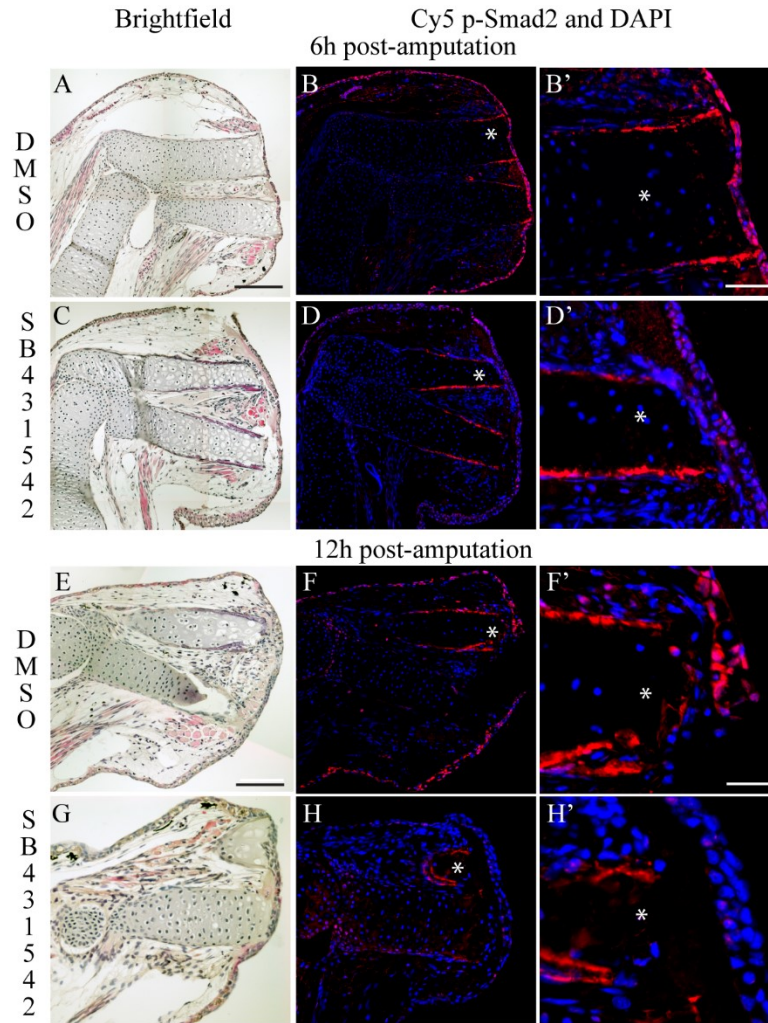


Figure 23. Supplementary Figure 6: SB-431542 prevents phosphorylation of p-Smad2 in regenerating limbs

Control animal treated with DMSO for 6h (A-B) or 12h (E-F). (A,E) Hematoxylin and Eosin staining shown in brightfield microscopy. Scale bar is 200 μ m. (B,F) Nuclei staining with DAPI (blue) overlaid with immunofluorescence of p-Smad2 (red) shows phosphorylation in most epithelial cells of the wound epithelium and some in the underlying mesenchymal cells. (B',F') Magnified view (Scale bar 50 μ m, composite images are shown and stars indicate area of magnification). Phosphorylated proteins are often in the nucleus. Animal treated with 25 μ M SB-431542 for 6h (C-D) or 12h (G-H). (C,G) Hematoxylin and Eosin staining shown in brightfield microscopy. (D-D', H-H') Overlay of DAPI and immunofluorescence of p-Smad2 shows very limited positive cells for phosphorylated Smad2 protein. Composite images are shown and stars indicate area of magnification.

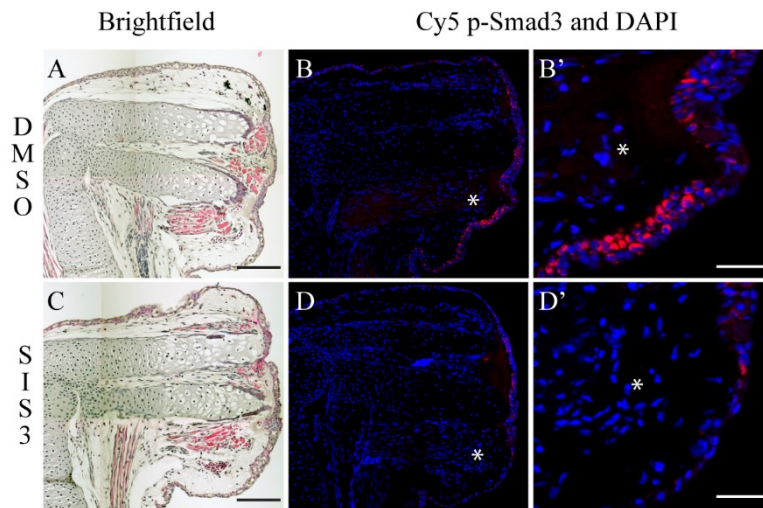


Figure 24. Supplementary Figure 7: SIS3 treatment reduces phosphorylation of p-Smad3

(A-B) Control animal treated for 3h with DMSO. (A) Hematoxylin and Eosin staining shown in brightfield microscopy. Scale bar is 300 μ m. (B) Overlay of nuclei staining with DAPI (blue) and immunofluorescence of p-Smad3 (red) shows phosphorylation in epithelial cells of the wound epithelium, especially near the plane of amputation. (B') Magnified view (scale bar is 60 μ m, composite images are shown and stars indicate area of magnification) shows that phosphorylated proteins are often in the nucleus (pink). (C-D) Animal treated for 3h with 5 μ M SIS3. (C) Hematoxylin and Eosin staining shown in brightfield microscopy. Scale bar is 300 μ m. (D-D') Overlay of nuclei staining with DAPI (blue) and immunofluorescence of p-Smad3 (red) shows reduced number of positive cells for phosphorylated Smad3 protein and (D') p-Smad3 signal is not localized in nucleus. Scale bar is 60 μ m. Composite images are shown and stars indicate area of magnification.

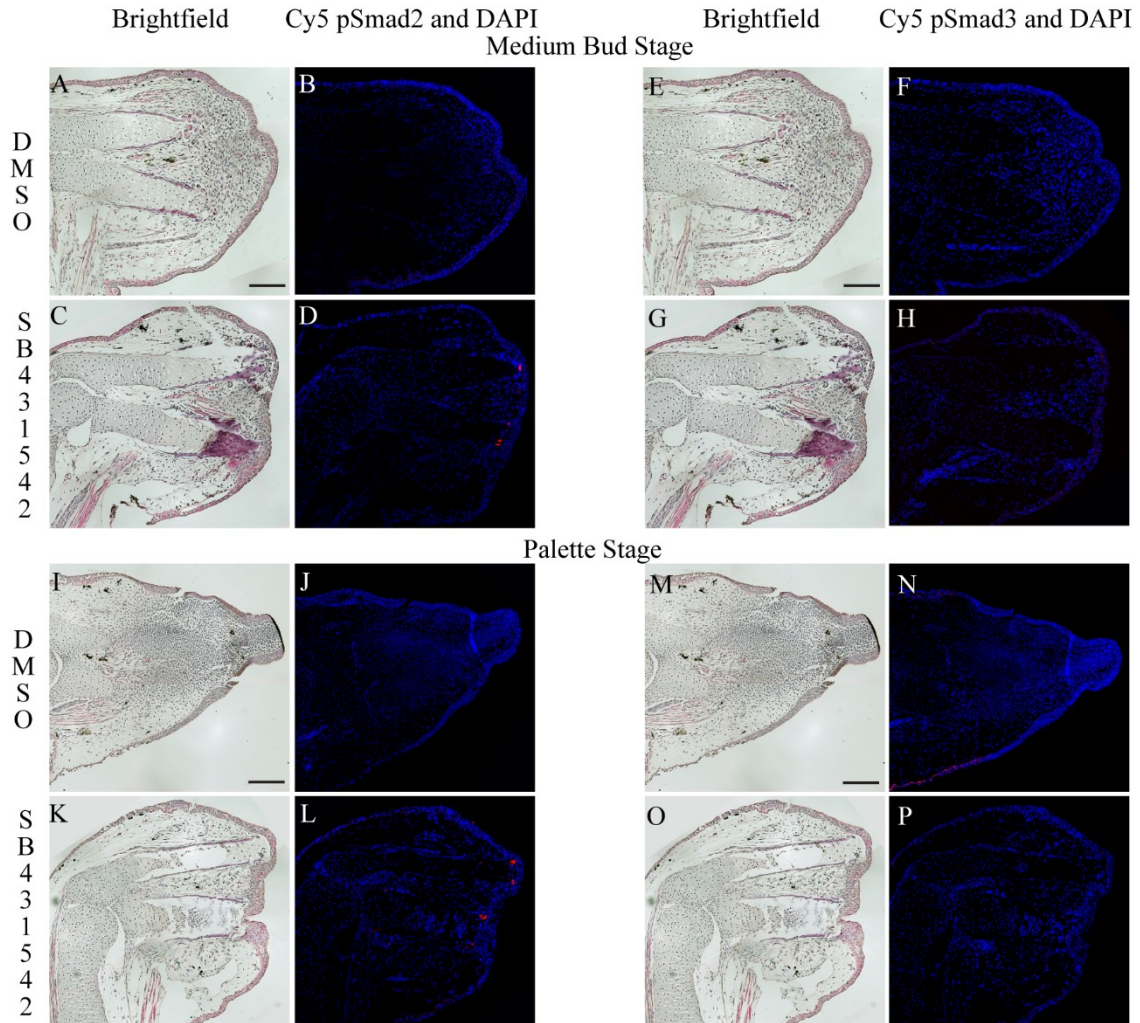


Figure 25. Supplementary Figure 8: p-Smad2 and p-Smad3 are not detected at Medium Bud and Palette stages

Control animal treated with DMSO until MB (A-B, E-F) or Pal (I-J,M-N). (A,E,I,M) Hematoxylin and Eosin staining shown in brightfield microscopy. Composite images are shown and scale bars are 200µm. (B,F,J,N) Nuclei staining with DAPI (blue) overlaid with immunofluorescence of p-Smad2 (B,J) or p-Smad3 (F,N) shows no phosphorylation. Animal treated with 25µM SB-431542 until MB (C-D, K-L) or Pal (G-H, O-P). (C,G,K,O) Hematoxylin and Eosin staining shown in brightfield microscopy. (D,H,L,P) Overlay of DAPI and immunofluorescence shows no positive cells for phosphorylated proteins.

4.Chapitre 3 – Expériences supplémentaires

4.1 Présentation

Nous avons montré l'importance de la régulation différentielle de Smad2 et de Smad3 lors du processus de régénération. Toutefois, notre approche consiste principalement à utiliser des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques. Malheureusement, il n'existe pas d'inhibiteur spécifique disponible pour la phosphorylation de Smad2. D'autre part, ces inhibiteurs doivent être utilisés dans un contexte où la santé de l'animal n'est pas affectée et l'inhibition de Smad3 ne semblait pas être complète. Nous avons donc fait plusieurs expériences pour confirmer les différences entre Smad2 et Smad3. Les expériences présentées dans ce chapitre montrent que l'activation différentielle des Smads est aussi observée dans d'autres modèles, telle que dans la lignée cellulaire AL-1 et lors de la guérison des plaies chez l'axolotl. Plusieurs tentatives d'inhibition spécifique de Smad2 ont été tentées, mais aucune n'a permis de réduire spécifiquement la phosphorylation de Smad2.

4.2 Matériel et Méthodes

4.2.1 Protocole pour préparation de protéines (phospho-Smads) dans les AL-1

Ce protocole a été utilisé pour vérifier la capacité de phosphorylation de Smad2 et de Smad3 avec l'ajout de sérum ou de TGF- β 1 recombinant sur les AL-1 (Axolotl Limb -1). Cette lignée cellulaire est composée de fibroblastes de pattes d'axolotl. C'est, à l'heure actuelle, la seule lignée cellulaire disponible pour ce modèle. Il ne faut pas laisser les cellules devenir trop confluentes. La confluence idéale est entre 70 % et 90 % (les plaques devraient être près du 70 % si l'attachement est bon).

Dans des plaques de 6 puits, il faut placer environ 200 000 cellules AL-1 en présence de milieu complet (environ 1ml, voir pour recette ³²⁶). Le lendemain, vérifier si les cellules ont bien adhéré. Il faut changer le milieu si nécessaire (si le volume a trop diminué ou si le pH a changé). Attendre 48 heures avant d'utiliser les plaques. Ensuite, enlever le milieu et rincer deux fois avec du PBS 0,7X pour bien enlever tout le milieu complet. Remettre un milieu sans facteur de croissance (L15 seulement). Attendre 48 heures avant de commencer l'expérience et vérifier les cellules pour s'assurer qu'elles ne manquent pas de milieu.

Pour récolter les cellules, retirer le milieu et rincer une fois avec du PBS 0,7X. Ajouter du milieu complet pour un temps x, puis le retirer. Ajouter 1ml de PBS 0,7X et gratter les cellules pour les récolter. Placer le mélange dans un tube de 1,5ml et centrifuger à Vmax (16000g) pendant une seconde pour culoter les cellules. Retirer ensuite le PBS 0,7X du tube, puis ajouter 50 μ l de la solution de lyse (Leamml + DTT 200mM + NaF 50mM). Il faut soniquer (Sonic Dismembrator, Model 100, Fisher Scientific, réglé à puissance 1, en continu) sur glace pendant un maximum de 10 secondes. Répéter au besoin (rare). Il ne reste qu'à quantifier les protéines. Normalement, les valeurs varient entre 1,5 et 2,5 μ g/ μ l.

4.2.2 LNA et antisens

Les LNA (ou Lock Nucleic Acid) sont des ADN simple brin contenant une modification aux nucléotides pour les rendre plus stables³²⁷. Ils sont utilisés pour réduire spécifiquement l'expression des gènes *in vivo*^{328,329}. Nous avons fait produire deux LNA contre Smad2 dans des régions non conservées avec Smad3 par Exiqon (MA, É.-U.). Les séquences sont axoantiSmad2LNA1 : « AGGAATGGAGTGAGTA » et axoantiSmad3LNA3 « ATGTGGTAACCCTTTG ». Nous avons aussi produit des antisens longs (450pb et 900pb) contre Smad2. Pour ce faire, nous avons amplifié la séquence désirée par PCR à partir d'ADN plasmidique contenant la séquence de Smad2 complète. Les fragments ont été purifiés sur gel, puis insérés dans un vecteur d'expression sous le contrôle de promoteur CAG. Le clonage a été fait avec la technologie Gateway (Thermo Fisher, É.-U.), en suivant les recommandations du manufacturier. La BP clonase (cat# 11789013), la LR clonase (cat# 11791019) et le vecteur donneur (pDONRtm221, cat# 12536017) ont été obtenus chez Thermo Fisher. Les plasmides receveurs sont pEZY3 (AddGene, Cambridge, MA, É.-U.) et E17pBMH (construction du laboratoire). L'orientation a été vérifiée par digestion et la séquence par séquençage. Les LNA et les antisens ont été électroporés dans les cellules AL-1 en suivant le protocole établi préalablement par le laboratoire³²⁶. Les cellules ont été récoltées 48h post-transfection pour préparer des ARN ou des protéines.

4.2.3 Blessure par excision de peau d'axolotl

Les blessures par excision ont été effectuées tel que décrit précédemment (voir¹³⁷). Les blessures sont effectuées sur le dos de l'animal (9cm de longueur) à deux endroits et sur la queue à deux endroits (voir Figure 26) avec un emporte-pièce pour biopsie de 2mm (Miltex, York, États-Unis, Ref #33-31). Pour positionner les blessures, une mesure est effectuée à partir du milieu des pattes postérieures (voir Figure 26, ligne pointillée). Au moment voulu, les échantillons ont été récoltés avec un emporte-pièce pour biopsie de 6mm (Miltex, York, États-Unis, Ref #33-36). Les sites Q1 et D1 ont été utilisés pour des préparations d'ARN et de protéines (échantillon coupé en deux). Les sites Q2 et D2 ont été fixés avec 4% paraformaldéhyde et enrobés dans la paraffine (voir³³⁰).

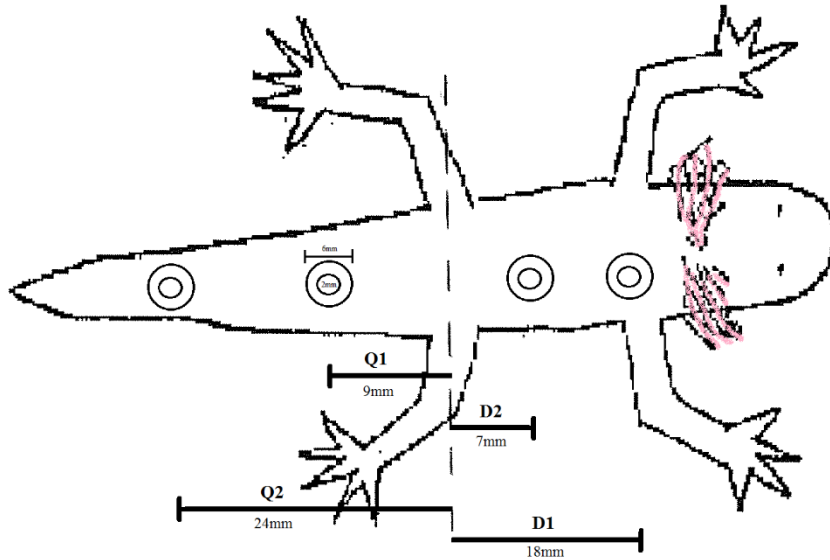


Figure 26. Schéma des blessures par excision

Les blessures par excisions sont effectuées avec des emporte-pièces à biopsie propres, en appuyant légèrement sur la peau tout en tournant. L'épithélium et le derme sont retirés en prenant soin de ne pas endommager le muscle sous-jacent. Les mesures sont effectuées à partir du centre des pattes postérieures pour tous les animaux assurant ainsi une reproductibilité expérimentale.

4.3 Résultats

4.3.1 Phosphorylation différentielle des Smads dans d'autres modèles

La culture cellulaire est un outil permettant de tester des voies de signalisation dans un contexte de travail plus simple qu'un modèle *in vivo*. Nous avons utilisé la lignée cellulaire d'axolotl (AL-1), une lignée composée de fibroblastes de patte d'axolotl. TGF- β et ses récepteurs ayant déjà été décrits précédemment par Lévesque et ses collègues ²⁶⁴, nous avons testé la présence et l'activation des acteurs intracellulaires.

Nous avons utilisé une approche de privation/stimulation avec sérum pour déterminer si l'activation des Smads s'opère dans les AL-1. La privation de sérum réduit considérablement la quantité de cytokines disponibles dont TGF- β . L'ajout subséquent de sérum permet d'activer ces différentes voies de signalisation et d'analyser la dynamique d'activation dans le temps. Cela nous permet de comparer des situations où les Smads sont non-phosphorylés (pas de sérum) versus où ils sont phosphorylés (en présence de sérum). Suite à une stimulation avec le sérum, la phosphorylation de Smad2 est rapide et maintenue (Figure 27a, c). Il est aussi possible de bloquer cette phosphorylation à l'aide du SB-431542, comme nous l'avons montré *in vivo* (voir Chapitre 2). Cette expérience confirme que dans ces fibroblastes, l'activation de Smad2 est possible et qu'elle s'effectue via le récepteur ALK5.

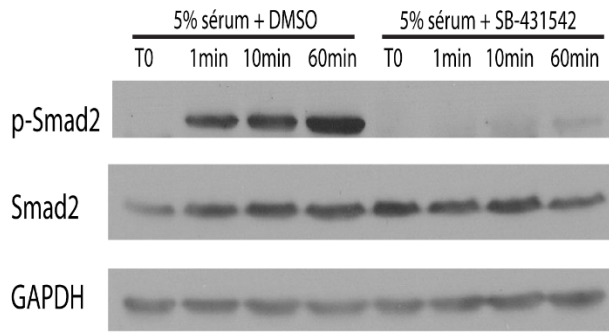
Nous avons ensuite conduit une expérience visant à montrer que TGF- β 1 peut activer Smad2. Suite à la privation de sérum, nous avons stimulé les cellules avec du TGF- β 1 recombinant. Cette stimulation induit une forte phosphorylation de Smad2 (Figure 27b) et confirme le rôle de cette cytokine dans l'activation de Smad2 dans les AL-1.

Nous avons, par la suite, déterminé si l'activation de Smad2 et de Smad3 dans les AL-1 était similaire. Dans la littérature, l'activation de ces protéines est souvent présentée comme simultanée. Comme l'indique le résultat présenté (figure 27c), les deux protéines Smads sont activées dans les AL-1 suite à une stimulation avec le sérum. Toutefois, la phosphorylation de Smad2 est stable dans le temps (30sec à 90min), alors que la phosphorylation de Smad3 est détectable en deux vagues (30sec-5min et 45min-90min). Ces résultats nous indiquent que la

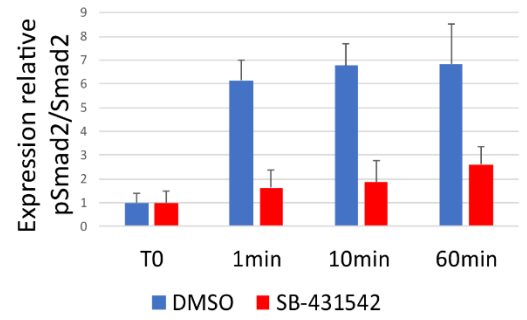
régulation de ces deux protéines dans les fibroblastes d'axolotl est différente, comme ce qui est observé lors de la régénération (voir chapitre 2).

Afin de mieux définir le rôle de la signalisation TGF- β canonique lors de la guérison, nous avons effectué des blessures par excision sur des queues d'axolotl. L'expression de TGF- β est détectable dans l'épiderme à partir de 1h et jusqu'à 24h suite à ce genre de blessure ¹³⁷. Nous avons donc effectué de l'immunofluorescence amplifiée avec de la tyramide pour détecter les acteurs intracellulaires de la voie canonique lors de ce processus. Il est possible de détecter la phosphorylation de Smad3 très rapidement (figure 28, c-c'), alors que la phosphorylation de Smad2 n'est détectable que 3h après la blessure (figure 28, e-e'). Les cellules en migration sont majoritairement positives pour les deux p-Smads (figure 28, e-f') et cette activation est maintenue jusqu'à 24h (figure 28, h-i'). Cela correspond à la détection de TGF- β 1 rapportée préalablement. Ceci est une autre évidence de l'activation différentielle des Smads.

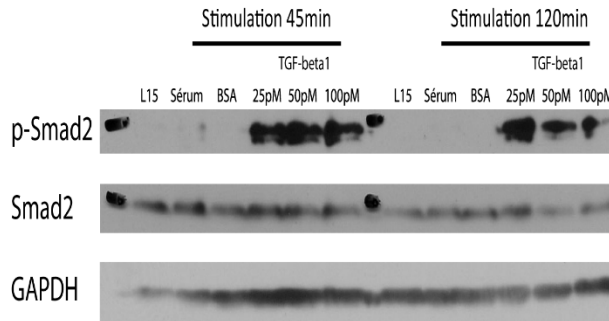
a)



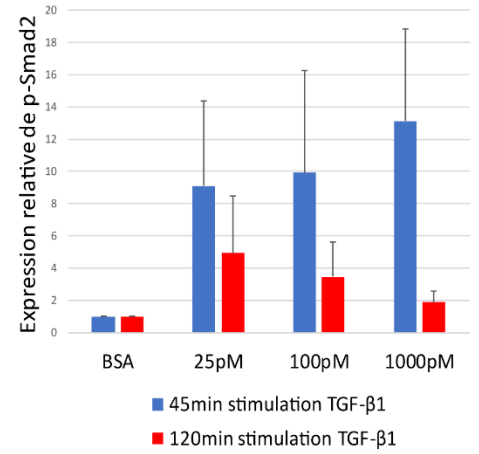
b)



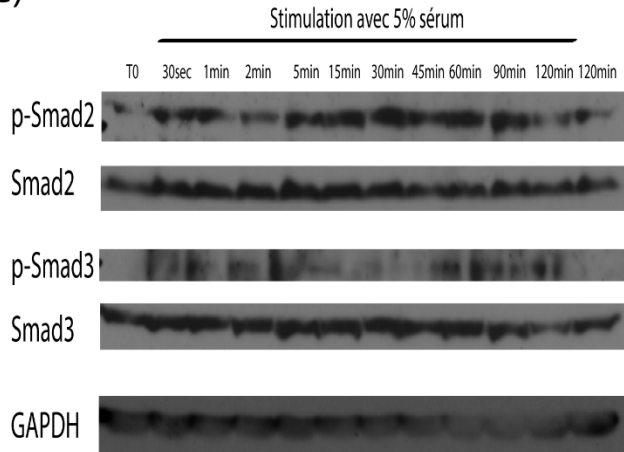
c)



d)



e)



f)

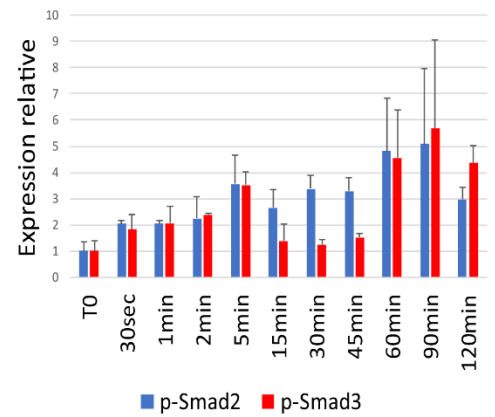


Figure 27. Activation des Smads dans les cellules AL-1

Expériences effectuées dans la lignée cellulaire AL-1. Immunobuvardage de type Western. a) Privation de sérum sur une période de 48h, puis stimulation avec 5 % de sérum. Traitement avec 25 μ M de SB-431542 ou avec véhicule contrôle DMSO 1h avant la stimulation. Le traitement avec le SB-431542 diminue grandement la phosphorylation observée pour Smad2 (n=4). b) La quantification montre que le SB-431542 diminue la phosphorylation. Normalisation avec Smad2 total c) Privation de sérum sur une période de 48h, puis stimulation avec TGF- β 1 recombinant. Une forte phosphorylation de Smad2 est observable à 45min (n=3) et 2h (n=2) post-stimulation avec des concentrations de 25pM, 50pM et 100pM de TGF- β 1 recombinant. d) La quantification montre que le TGF- β active Smad2 plus fortement à 45min post-stimulation. Normalisation avec GAPDH e) Privation de sérum sur une période de 48h, puis stimulation avec 5 % de sérum. La phosphorylation de Smad2 est maintenue de 30sec à 90min. La phosphorylation de Smad3 est en deux vagues ; la première est de 30sec à 5min et la seconde de 45min à 90min. L'activation de ces deux protéines est différente dans le temps (n=2). f) La quantification montre que la phosphorylation de Smad3 diminue grandement entre 15min et 45min ce qui n'est pas observé pour Smad2. Normalisation avec GAPDH.

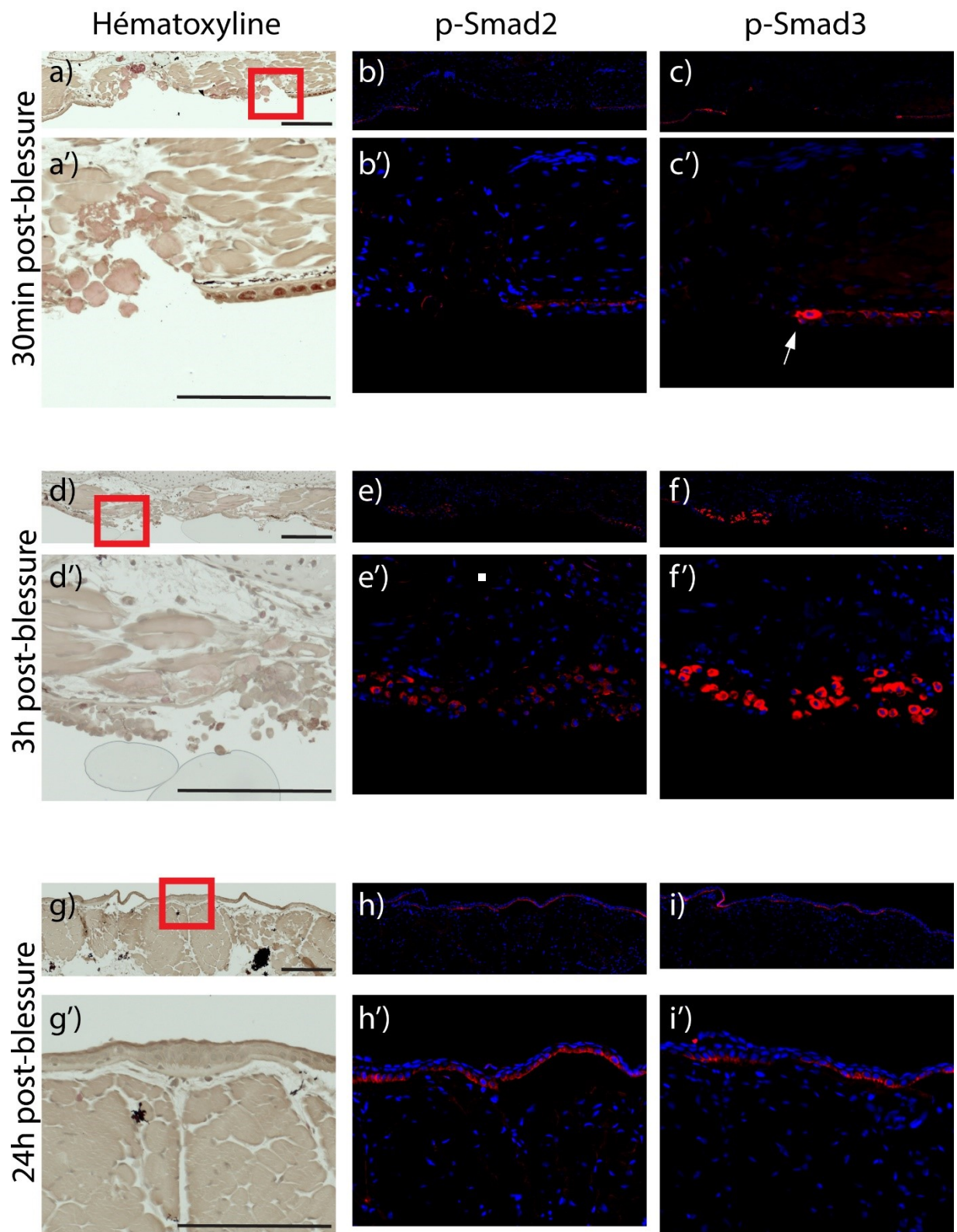


Figure 28. Activation des Smads suite à une blessure par excision

Expériences effectuées sur des queues d'axolotl. Immunofluorescence avec amplification à la tyramide. a-c) 30min après la blessure par excision. On voit que les cellules ne semblent pas avoir commencé à migrer (a-a'). Pas de signal pour p-Smad2 (b-b'), mais un signal fort pour p-Smad3 est détecté (c-c'), particulièrement en bordure de la blessure (pointé avec une flèche blanche en c'). d-f') 3h après la blessure par excision. On voit que plusieurs cellules migrent (d-d'). Ces cellules sont positives pour p-Smad2 (e-e') et fortement positives pour p-Smad3 (f-f'). g-i') 24h après la blessure par excision. On voit que la plaie est fermée, mais que l'épithélium ne semble pas attaché au muscle sous-jacent (g-g'). Plusieurs des cellules épithéliales sont encore positives pour p-Smad2 (h-h') et pour p-Smad3 (i-i'), mais l'intensité du signal pour p-Smad3 est grandement diminuée. Coupes successives. Images composites. Le carré rouge représente l'endroit où le zoom a été effectué. Barre d'étalonnage = 500µm

4.3.2 Diminution de l'expression de Smad2 par LNA, long antisens et compétiteur non-phosphorylable

Tel que présenté dans le chapitre 2, les inhibiteurs pharmacologiques ne permettent pas d'affecter spécifiquement la phosphorylation de Smad2. Grâce aux expériences précédentes, nous avons montré que le modèle en culture cellulaire AL-1 présente plusieurs ressemblances avec le modèle *in vivo*. Nous avons donc tiré avantage de ce modèle pour tester différentes techniques de diminution d'expression génique. Puisque plusieurs essais ont déjà été effectués au laboratoire avec des shRNA ou des ribozymes sans succès, nous avons, en conséquence, testé d'autres approches.

Nous avons tout d'abord utilisé une approche d'interférence par LNA (Lock Nucleic Acid). Ces molécules ont été conçues pour interagir spécifiquement avec Smad2 en ciblant des régions non conservées entre Smad2 et Smad3 au niveau de l'ARN. Nous avons électroporé deux LNA différents dans des AL-1 afin d'évaluer leur capacité à réduire l'ARNm de Smad2. Une de ces deux molécules, le LNA antiS2 1 (axoSmad2LNA1), semblait plus efficace. Nous avons donc testé l'efficacité de réduction de protéine pour Smad2 et Smad3 dans les AL-1. Pour ce faire, nous avons électroporé des quantités variables de LNA dans ces cellules (Figure 29a) et avons observé que cette molécule était capable de réduire la quantité de protéine avec une électroporation de 0.5µg (33 % de diminution) ou de 5µg (33 % de diminution) de LNA (Figure 29b). Cependant, lorsqu'une diminution de Smad2 est observée, une diminution concomitante de Smad3 l'est aussi (49 % de diminution avec 0.5µg de LNA). Il semble donc que cette technique ne peut pas spécifiquement diminuer la quantité de protéine pour Smad2.

Nous avons ensuite testé de long antisens en électroporant les plasmides dans les cellules AL-1. Les antisens sont dans des vecteurs d'expression et sont sous le contrôle du promoteur CAG (promoteur de la beta-actine du poulet avec l'amplificateur du cytomégalovirus (CMV) et un adaptateur provenant de la séquence de la bêta-globine du lapin). Deux constructions différentes ont été utilisées. La première est un antisens qui cible principalement la région du « linker » de Smad2 (le domaine le moins conservé entre les deux Smads), ainsi que le domaine TID qui n'est pas présent dans la séquence de Smad3. La seconde est une séquence plus courte dans le domaine MH2 qui montre aussi une moins grande identité entre les séquences (voir

Figure 29f pour schéma). Cette approche a déjà été utilisée chez l'axolotl avec succès par le groupe de Dube³³¹ ainsi qu'au laboratoire pour diminuer l'activité de p53 (données non publiées). Nous avons testé différentes quantités de plasmides (Figure 29c) et avons observé que l'antisens ciblant le « linker » était moins efficace pour diminuer la quantité de protéine totale de Smad2 comparativement à l'antisens plus court dirigé contre une séquence dans le domaine MH2. Nous avons aussi observé que la quantité de plasmides est un facteur important et que la quantité optimale dans ces expériences semblait être de 1µg (Figure 29d, diminution de 61 % pour l'antisens court). Cependant, l'électroporation de ces antisens semble aussi affecter la quantité de protéine totale pour Smad3 (Figure 29e, diminution de 38 % pour l'antisens court). Il semblerait donc que ces designs d'antisens ne sont pas en mesure de cibler spécifiquement l'expression de Smad2.

Finalement, nous avons effectué une expérience d'inhibition par introduction d'un compétiteur. Une construction exprimant un Smad2 modifié où les sérines 465/467 ont été mutées en alanine (non phosphorylable) a été utilisée. Suite à une privation de sérum, nous avons stimulé les cellules avec 5 % de sérum. L'analyse de la phosphorylation de Smad2 par immunobuvardage nous indique que la surexpression du compétiteur n'a pas d'effet sur la phosphorylation de Smad2 (Figure 29g).

L'utilisation de ces diverses techniques ne nous a pas permis de réduire de manière spécifique l'activation de Smad2 dans les cellules AL-1. La technique qui a connu le plus de succès semble être celle des longs antisens. Récemment, une étude a montré qu'il est possible d'utiliser une technique d'interférence à l'ARN pour réduire la présence d'un gène dans un système *in vivo*³³². L'utilisation de la technologie CRISPR-Cas9 pourrait être une autre alternative. Elle a déjà été utilisée dans notre modèle^{62,333}. Malheureusement, les expériences menées dans notre laboratoire n'ont pas permis de cibler une majorité de cellules dans les embryons de la F0, rendant difficile l'utilisation de cette technique. Il pourrait être avantageux, dans notre contexte, de mettre au point ce genre de technique, tout en contrôlant les effets de cette interférence sur les autres protéines Smad.

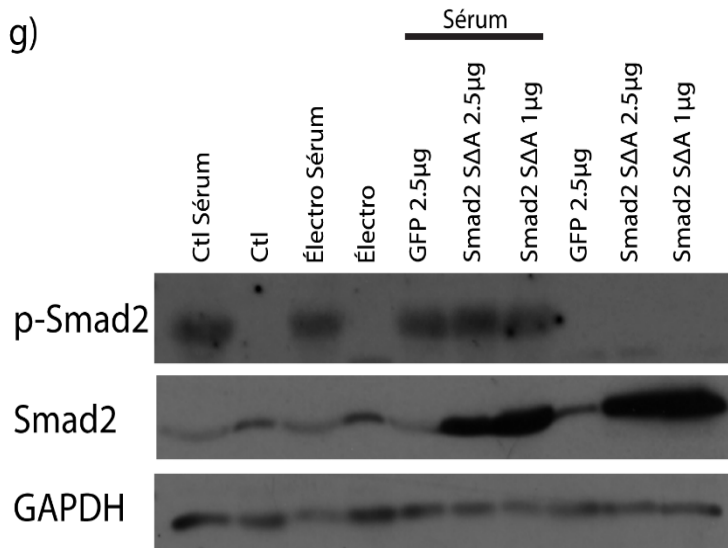
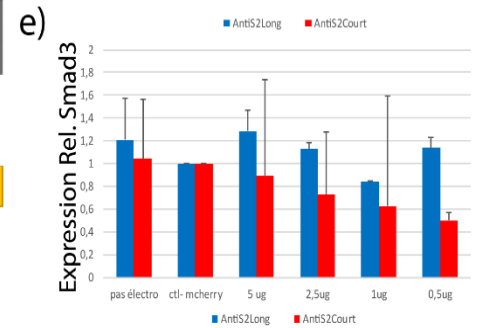
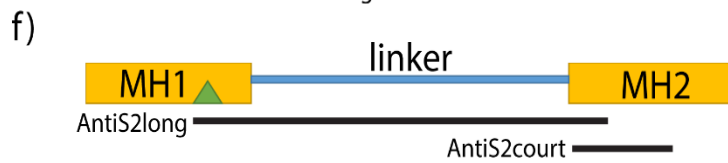
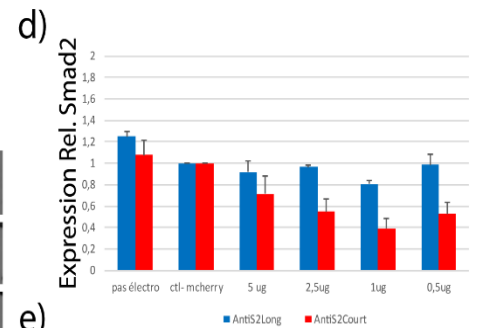
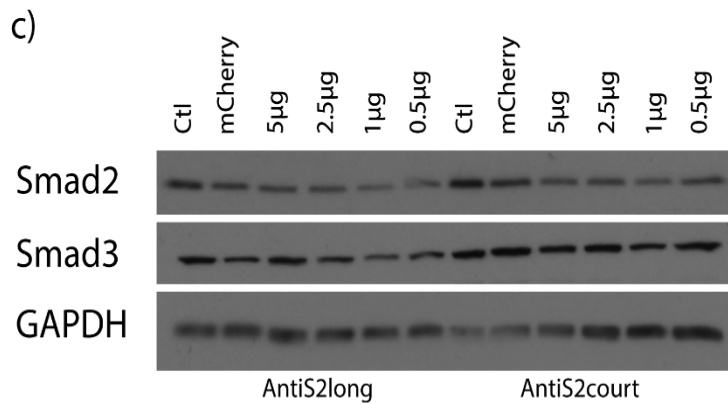
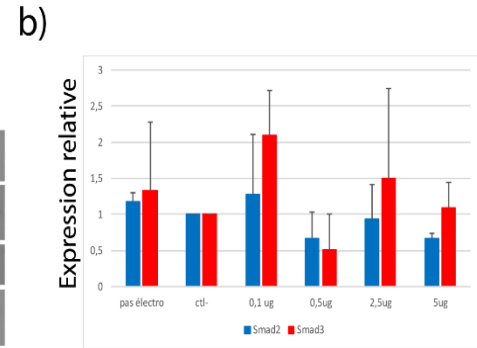
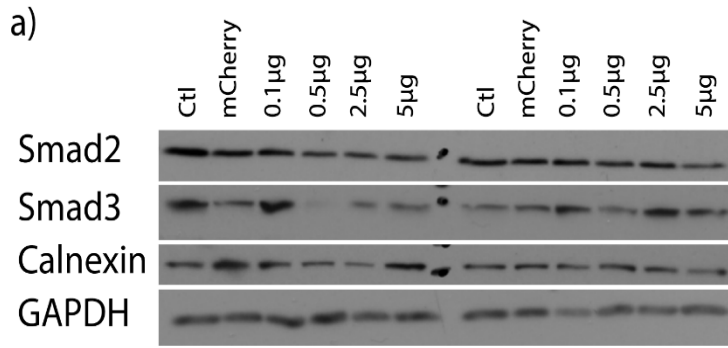


Figure 29. Inhibition de Smad2 dans les AL-1

Expériences visant à diminuer l'expression de la protéine Smad2 dans les cellules AL-1. Cellules non électroporées (Ctl) et cellules transfectées avec un traceur fluorescent seulement (mCherry) a) Électroporation du LNA antiS2 1 dans les AL-1. Différentes quantités de LNA utilisées, 2n d'immunobuvardage de type western présentés. Nous avons utilisé deux gènes de ménage différents soit la Calnexin et le GAPDH b) Quantification des expériences (n=3). Diminution de la protéine totale Smad2 avec l'électroporation de 0,5µg et 5µg. Une diminution de la protéine totale Smad3 est aussi observée pour 0,5µg de LNA. c) Électroporation des plasmides antiS2long et antiS2court 1 dans les AL-1. Différentes quantités de plasmide utilisées, immunobuvardage de type western. Quantification des expériences (n=3). d) Diminution de la protéine totale Smad2 avec l'électroporation de l'antisens antiS2court avec 0,5µg à. e) Une diminution de la protéine totale Smad3 est aussi observée pour les mêmes quantités de plasmides. f) localisation des antisens sur la séquence de Smad2. Les domaines MH1, « linker » et MH2 sont représentés ainsi que le domaine TID (triangle vert) qui empêche la liaison directe avec l'ADN. g) Électroporation des plasmides Smad2 S465/S467 mutées en A465/A467 dans les AL-1. Différentes quantités de plasmides utilisées, immunobuvardage de type western (n=3). Suite à l'électroporation, privation de sérum sur une période de 48h, puis stimulation avec 5 % de sérum. Aucune différence n'est observée au niveau de la phosphorylation de Smad2. La protéine totale Smad2 montre qu'il y a bel et bien surexpression.

5. Discussion

L'axolotl est capable de régénérer parfaitement la plupart de ses organes et tissus. Ce processus peut être divisé en deux étapes, une phase de préparation et une phase de redéveloppement. La phase de préparation est essentiellement la phase où la guérison de la plaie s'opère et cela est suivi par une phase de dédifférenciation et de prolifération des cellules du mésenchyme qui mène à la formation d'un blastème. Contrairement au processus de guérison des mammifères, le dépôt de matrice extracellulaire lors de ce processus ne mène pas à la formation de cicatrices. On constate toutefois que ce sont les mêmes gènes qui sont impliqués chez l'axolotl que ceux liés à la guérison avec fibrose chez les mammifères. Dans le second chapitre, nous avons montré que l'axolotl est un excellent modèle pour l'étude de la guérison des plaies et pour l'étude de la régénération. Plusieurs gènes liés à la guérison des plaies sont exprimés suite à une blessure. On retrouve, notamment, l'activation de TGF- β 1 comme montrée par les résultats d'hybridation *in situ* et d'immunobuvardage. Les expériences d'immunobuvardage de type Northern, ainsi que d'hybridation *in situ* ont aussi montré que TGF- β 1 est régulé au niveau de l'ARNm⁵⁶ lors de la régénération. Nous avons donc vérifié la régulation de ce gène au niveau de la protéine. Les résultats indiquent que la protéine active est aussi régulée, par augmentation, dans la phase de préparation. L'activation de TGF- β 1 est donc corrélée avec la formation du blastème.

Puisque l'inhibition de la voie des TGF- β avec l'inhibiteur SB-431542 n'empêche pas la fermeture de la plaie, mais empêche la formation du blastème⁵⁶, nous avons émis l'hypothèse que le traitement pouvait interférer avec la signalisation de l'AEC. L'AEC est essentielle au processus de régénération^{67,70,73,317}. En temps normal, la membrane basale, constituée majoritairement de collagènes et de protéines de la matrice extracellulaire, délimite les cellules de l'épithélium et les cellules du mésenchyme et régule les signaux entre ces types cellulaires. Lors de l'amputation, cette structure est enlevée et n'est pas complètement restaurée avant la fin du processus^{299,300}. Ce délai permet une signalisation directe entre l'AEC et les cellules du mésenchyme sous-jacentes, menant à la formation du blastème. Il est important de mentionner que la signalisation canonique de TGF- β 1 joue un rôle différent dépendamment du type cellulaire impliqué. Aussi, en règle générale, la prolifération des cellules épithéliales est inhibée

par cette voie de signalisation. Cependant, la migration de l'épithélium de guérison pourrait être liée à cette voie de signalisation. Une perte de perméabilité pourrait donc être due à la restauration prématurée d'une structure imperméable, comme la membrane basale, bloquant la signalisation entre les cellules épithéliales et les cellules du mésenchyme. Nous avons donc vérifié l'état de la membrane basale suite à des traitements avec le SB-431542 avec la coloration histologique PicroSirius Red, ainsi qu'avec le marquage spécifique de la lame basale pour le Collagène de type IV. La membrane basale n'est pas restaurée prématurément suite au traitement. Les résultats montrent aussi que cette structure n'est pas restaurée après un traitement jusqu'au stade de Palette. Cela confirme que la formation du blastème est intimement liée à la régulation de TGF- β 1 et que le blocage du processus ne semble pas être lié à une perte de perméabilité de la coiffe épithéliale apicale.

Les Smads de la voie canonique des TGF- β ont été clonés au laboratoire et des vecteurs d'expression contenant Smad2, Smad3 et Smad7 d'axolotl sous le contrôle du promoteur CMV ont été produits. D'autre part, des vecteurs d'expressions constitutivement actifs (phosphomimétiques, S465/S567 mutées en D465/D467) et constitutivement inactifs (S465/S567 mutées en A465/A467) ont aussi été produits pour Smad2 et Smad3. Nous avons également testé une multitude d'anticorps disponibles commercialement et produit notre propre anticorps spécifique pour p-Smad3 S423/S425 d'axolotl. Nous avons d'abord montré que la phosphorylation de Smad2 et de Smad3 est possible chez l'axolotl par une approche de culture cellulaire. La lignée AL-1 a été utilisée à cette fin. Les cellules ont été privées de sérum pendant 48h, puis ont été stimulées avec du sérum pour différents temps. L'essai a montré que la phosphorylation de Smad2 est rapide et maintenue, la phosphorylation étant détectable après une stimulation aussi courte qu'une minute. Cette phosphorylation est aussi présente lorsque les cellules privées de sérum sont mises en contact avec du TGF- β recombinant. La phosphorylation de Smad3 est aussi détectable après un ajout de sérum, mais n'est pas aussi stable dans le temps que Smad2. Afin de montrer que le SB-431542 bloque l'activation de la voie canonique de TGF- β 1 en empêchant la phosphorylation des Smads, un essai en privation de sérum a été effectué en présence ou non de l'inhibiteur. Les résultats indiquent qu'une concentration de 25 μ M de SB-431542 est suffisante pour bloquer presque entièrement la phosphorylation de Smad2 en culture cellulaire dans la lignée Al-1. Il semble que les récepteurs soient fonctionnels et capables de

transmettre les signaux extracellulaires en phosphorylant Smad2. Il s'agit d'une première démonstration que tous les éléments de la voie canonique de TGF- β sont présents dans les cellules d'axolotl et qu'ils semblent être régulés de façon similaire à ce qui est observé dans d'autres modèles.

Suite aux essais en culture cellulaire, nous avons décrit la régulation des différents Smads lors du processus de régénération. Dans une condition sans traitement, l'expression de Smad2, Smad3, Smad4 et Smad7 ne semblent pas être régulés lors de la phase de préparation. Les résultats de RT-PCR montrent que la quantité d'ARNm redevient plus élevée au cours de la phase de redéveloppement pour Smad2, Smad3 et Smad7. Outre le rôle connu de Smad7 comme inhibiteur de la signalisation des TGF- β , on lui reconnaît aussi un rôle dans la myogenèse²⁰⁷. Il est donc plausible que la présence de Smad7 soit requise dans la phase de redéveloppement pour la myogenèse. En ce qui a trait à Smad2, la protéine est phosphorylée très tôt, au cours des 48 premières heures post-amputation, ce qui correspond à la phase de migration cellulaire et au début de la prolifération cellulaire. D'autre part, la quantité de protéine totale pour Smad3 diminue lors de la phase de préparation et augmente lors de la phase de redéveloppement. Autre que son rôle pour la régulation des composantes de la matrice extracellulaire, qui lie cette protéine à la fibrose chez les mammifères, elle est aussi responsable de réguler l'expression de Smad7^{153,171}. Il est intéressant de constater que la faible expression de Smad7 concorde avec l'activation de Smad2 par phosphorylation, ce qui supporte l'hypothèse que la formation du blastème soit contrôlée par TGF- β 1 via la phosphorylation de Smad2.

Nous avons observé une activation différentielle des protéines Smad de la voie canonique lors du processus de régénération. L'activation de Smad3 est très rapide (3-6h) et faible comparativement à l'activation de Smad2 qui est observable plus tard dans le processus (6h-48h) et corrèle avec l'activation de TGF- β 1. Nous avons donc voulu tester les fonctions spécifiques de Smad2 et de Smad3. Nous avons tenté de mesurer l'activité *in vivo* de Smad3 par essai luciférase (comme proposé par Yun et al., voir Annexe 1), mais n'avons pas été en mesure d'observer une activation de notre rapporteur. Nous avons ensuite tiré profit de plusieurs inhibiteurs pharmacologiques. Des traitements 24h pa ont été effectués avec l'inhibiteur SB-431542. Le résultat de l'immunobuvardage montre qu'il y a, en effet, une forte diminution de

la phosphorylation de la protéine Smad2 dans les animaux traités. La phosphorylation de Smad3 est aussi réduite de 50 % à 3h pa. Les quantités de protéine totale pour Smad2 et Smad3 ne semblent pas être affectées par le traitement. Nous avons utilisé deux inhibiteurs spécifiques de Smad3, le SIS3 et la Naringénine. Dans les deux cas, la phosphorylation de Smad3 est diminuée de 50 % et la régénération n'est pas affectée outre mesure. La phosphorylation de Smad2 ne semble pas affectée. Nous avons tenté de bloquer spécifiquement Smad2, sans succès. Nous avons toutefois surexprimé Smad3. Dans ce cas, les cellules affectées semblent être éliminées par apoptose. Il s'agit ici de la première démonstration d'une régulation différentielle des Smads lors du processus de régénération. Plusieurs autres études ont observé une activation de cette voie de signalisation et ont montré son importance, mais aucune n'a montré que le rôle de ces deux protéines est différent lors du processus de régénération.

Nous avons aussi utilisé un modèle de guérison parfaite en effectuant des blessures par excision sur des queues d'axolotl. L'accumulation de TGF- β au site d'excision est évidente en immunohistochimie ¹³⁷ et ses acteurs intracellulaires sont rapidement phosphorylés (voir Chapitre 2, figure 13). Lorsque la plaie est fermée, la phosphorylation de Smad3 diminue, alors que celle de Smad2 semble demeurer au même niveau. De plus, il semble que la plupart des cellules positives pour des phospho-Smads sont des kératinocytes qui ferment la plaie. Le rôle de TGF- β dans le contrôle des transitions épithéliales mésenchymateuses est de mieux en mieux décrit et il est plausible que TGF- β contrôle ces transitions chez l'axolotl. Toutefois, compte tenu du fait que l'inhibition de la voie canonique n'empêche pas la fermeture de la plaie lors de la régénération de la patte, tout porte à croire que certaines voies non-canoniques participent à ce processus. Malheureusement, les données récoltées jusqu'à présent ne semblent pas nous indiquer clairement quelles voies participent au processus.

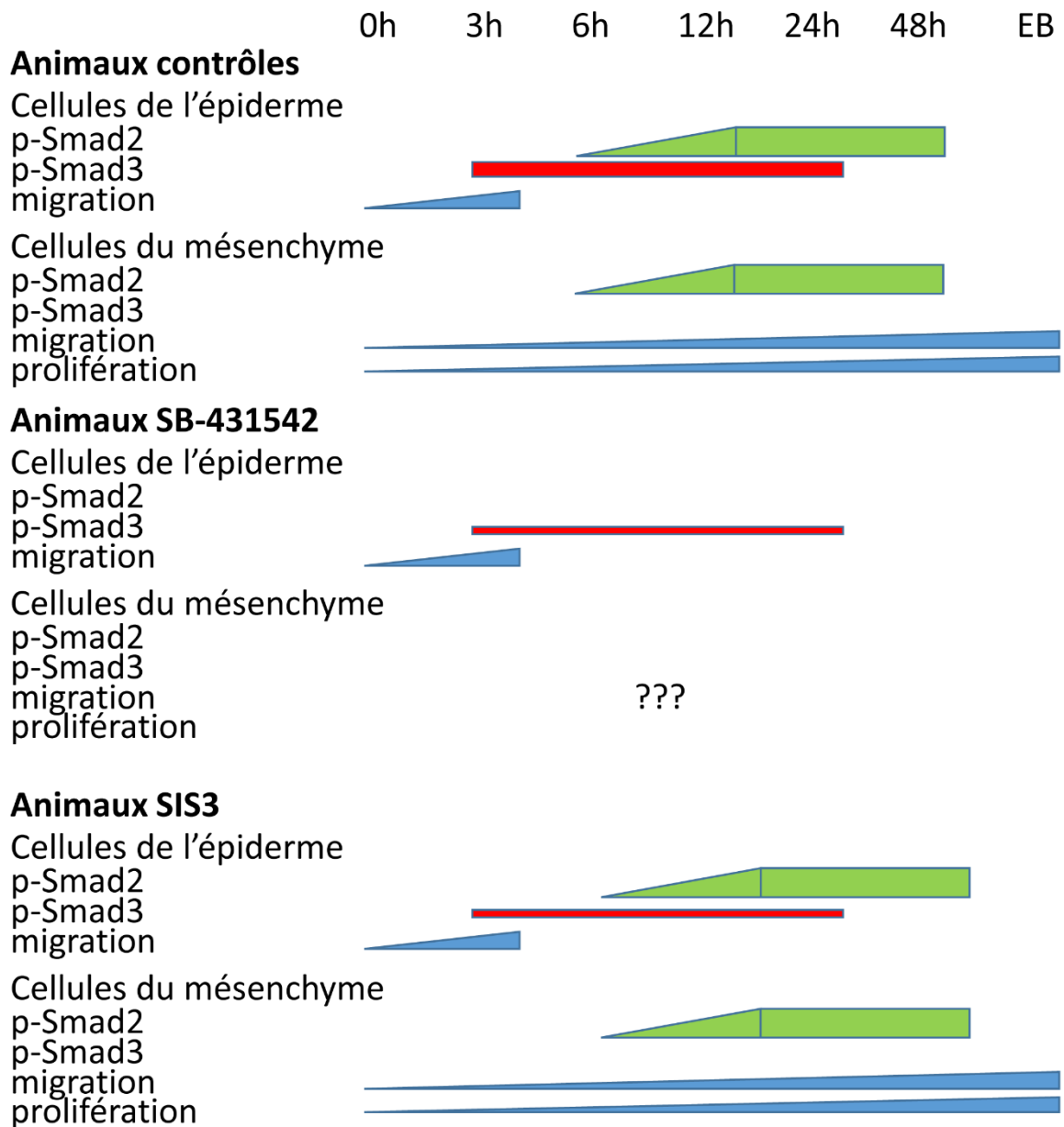


Figure 30. Résumé de la phosphorylation des Smads lors de la phase de préparation

Résumé présentant schématiquement le niveau dans le temps de phosphorylation des Smads dans deux types cellulaires différents lors du processus de régénération de la patte. Cette figure présente aussi l'effet de l'inhibiteur de la voie de TGF- β sur la phosphorylation. En résumé, Smad2 est activé entre 6h et 48h dans les cellules épithéliales et les cellules du mésenchyme. Un traitement avec le SB-431542, mais pas avec le SIS3 prévient cette phosphorylation et est associé à une perte de prolifération des cellules du mésenchyme. La migration n'a pas été directement testée, mais semble réduite dans le cas d'un traitement avec le SB-431542. Smad3 est activé rapidement (entre 3h et 24h) dans les cellules épithéliales. Un traitement avec le SB-431542 ou avec le SIS3 réduit cette phosphorylation sans toutefois avoir un effet sur la fermeture de la plaie.

D'autre part, l'expression de plusieurs gènes de la famille des MMPs a été mesurée suite à des traitements avec l'inhibiteur de TGF- β 1. Plusieurs MMPs sont des cibles connues de la signalisation des TGF- β . Par exemple, Smad2 joue un rôle dans la régulation de MMP2 et MMP9¹⁵⁴. Les résultats obtenus montrent que l'expression de MMP2 et MMP9 est diminuée dans les pattes traitées avec le SB-431542 comparativement aux contrôles. Plusieurs autres études ont montré l'importance des MMPs lors de la régénération^{99,100,102}. La régulation des cibles canoniques de TGF- β , MMP2 (via Smad2) et MMP9 (via Smad2 et Smad3), est potentiellement un élément important pour le remodelage de la matrice permettant la migration subséquente de cellules vers le blastème. La diminution d'expression de ces deux importants MMPs pourrait expliquer, en partie, l'absence de blastème dans les pattes amputées des animaux traités.

Il semble aussi clair que la signalisation canonique des TGF- β s'effectue, en temps normal, via les deux effecteurs, Smad2 et Smad3. En dérégulant l'équilibre entre ces effecteurs, on peut causer, par exemple, une fibrose accrue¹⁵⁵. Il n'est donc pas impossible que la signalisation des TGF- β favorise un des effecteurs lors de la régénération, Smad2, ce qui prévient la formation de cicatrices. La diminution de la protéine totale Smad3 et une faible activation de cette protéine lors de la phase de préparation sont donc probablement essentielles au phénotype de guérison sans fibrose. Nous n'observons pas la présence de myofibroblastes lors du processus de régénération qui sont aussi intimement liés à la signalisation des TGF- β /p-Smad3. La présence de myofibroblastes est détectable seulement suite à une déplétion du système immunitaire et cause aussi l'apparition de tissu cicatriciel¹¹², ce qui corrèle avec notre observation que l'activation de Smad3 est minime lors du processus de régénération.

Deux questions pertinentes pourront être explorées dans le futur. La première est la question d'activation de TGF- β uniquement lors de la phase de préparation lors du processus de régénération. On sait que cette voie est active jusqu'à EB. Selon nos observations, le gène cible de Smad2, SnoN, pourrait jouer un rôle important. Ce gène est intimement lié à l'auto-inhibition de la signalisation des TGF- β . L'expression de SnoN a déjà été décrite lors du processus de régénération au laboratoire. Le maximum d'expression est observé entre 24h et 48h post-amputation. Son expression est aussi réduite lorsque les animaux sont traités avec du SB-431542. La diminution de la protéine totale de Smad3 lors de la phase de préparation est un

autre indice. SnoN est aussi connue pour sa capacité à lier Smad3 et à le mener au protéasome, ce qui concorde avec le peu de p-Smad3 que nous détectons au début du processus de régénération. Il est plausible que l'activation de Smad3 lors de la régénération mène rapidement à sa propre dégradation. SnoN et d'autres partenaires d'interaction (voir figure 6) pourraient promouvoir cette dégradation. Considérant le rôle connu de SnoN dans la littérature, il est plausible que cette protéine soit, en partie, responsable de la transition entre l'activité de la voie des TGF- β liée à la formation du blastème et à une seconde phase de signalisation qui exclut TGF- β lors du redéveloppement. Une perte de cette protéine pourrait maintenir la signalisation TGF- β plus longtemps. Cette diminution pourrait aussi promouvoir une activité plus importante de Smad3, amenant la production de tissus cicatriciels. Il est crucial de comprendre ces phénomènes puisqu'ils contrôlent possiblement le processus de guérison sans cicatrice.

Un second élément intéressant est la boucle d'auto-activation de TGF- β 1. Puisque le promoteur de ce gène contient un SBE, il est possible que l'activité des Smads régule aussi son expression. Dans la littérature, il semble exister un consensus autour du fait que cette boucle s'opère via p-Smad3. Cette observation est intimement liée avec l'expression excessive de protéines de la matrice extracellulaire, dont le collagène de type I, qui mène à la fibrose. Or, l'activation de Smad3 au cours de la régénération est relativement minimale comparativement à celle de Smad2. De plus, la surexpression de Smad3 semble mener à l'apoptose des cellules ciblées, l'empêchant potentiellement d'effectuer ses actions profibrotiques. Malgré tout, l'ARNm de TGF- β 1 augmente lors de la phase de préparation²⁶⁴. Il est possible que l'expression de TGF- β 1 soit régulée par Smad2 dans le contexte de la régénération. Une évaluation plus précise de cette régulation pourrait être faite en travaillant avec les inhibiteurs déjà utilisés au laboratoire (SB-431542 et SIS3) et permettra de mieux comprendre pourquoi l'axolotl ne produit pas de cicatrices bien qu'il exprime TGF- β 1 lors de sa phase de préparation.

La seconde question concerne la régulation différentielle des Smads. J'ai relevé plusieurs éléments dans la littérature, mais il n'y a pas un mécanisme clair qui sort du lot. La régulation de la phosphorylation par des GTPase comme Rac1 est très intéressante et facile à tester puisqu'il existe un inhibiteur de cette protéine. En effet, l'inhibition de Rac1 semble mener à une diminution de la phosphorylation de Smad2 et à une diminution de la migration cellulaire. Il serait intéressant de tester l'inhibiteur de Rac1 puisqu'aucune méthode actuelle ne m'a permis

de diminuer spécifiquement l'activation de Smad2 *in vivo*. Cet outil pourrait permettre de mieux définir le rôle de Smad2 lors de la fermeture de la plaie chez l'axolotl et lors de la formation du blastème. Une perte d'activation spécifique de Smad2 devrait empêcher la formation du blastème. Une autre possibilité intéressante est le modèle de séquestration de Smad3 par Stat3. Stat3 est déjà connu pour son rôle dans la régénération du cœur chez le poisson zèbre ³³⁴. Il existe deux phosphorylations bien connues pour Stat3 qu'il serait intéressant d'étudier. La première est une phosphorylation de la tyrosine 705 qui est associée à un état actif de la protéine et à un état de cellules dédifférenciées ³³⁵. Nos résultats préliminaires montrent que cette tyrosine est phosphorylée lors de la phase de préparation, ce qui correspond au moment où les cellules sont dédifférenciées. La seconde phosphorylation est située sur la sérine 727. Cette phosphorylation promouvoit la déphosphorylation de la tyrosine 705 ³³⁶. Dans ce cas, les cellules souches de souris ont tendance à se différenciées ³³⁵. Nos résultats préliminaires montrent que cette phosphorylation est présente seulement lors de la phase de redéveloppement. Lorsque Stat3 est activé, il est en mesure d'interagir avec p-Smad3, bloquant ainsi la signalisation des TGF- β ³³⁷. Des inhibiteurs sont disponibles pour inhiber spécifiquement chacune des deux phosphorylations de Stat3. Une perte de la phosphorylation de la tyrosine 705 pourrait amener une augmentation de l'activité de Smad3 et à une accumulation de tissus cicatriciels.

6. Conclusion

L'axolotl est un modèle vertébré possédant une peau similaire à celle de l'humain. La signalisation lors du processus de guérison chez l'axolotl est similaire à celle observée lors de la guérison humaine, puisque ce sont les mêmes gènes qui sont impliqués. Les plus grandes différences se situent au niveau du moment où ces gènes s'expriment et sur la durée de leur expression. Cette régulation fine est essentielle à une guérison parfaite. La guérison humaine n'est pas parfaite et s'accompagne de fibrose. Pour améliorer ce processus, il faudra comprendre comment la guérison s'opère chez l'humain, mais aussi comment elle s'opère dans un contexte de guérison parfait. L'axolotl représente donc un modèle de choix pour comprendre ce processus, mais aussi pour comprendre la régénération épimorphique qui permet de remplacer

des organes et des tissus perdus. Ces processus complexes sont intimement liés à la signalisation de TGF- β et nous montrons clairement que Smad2 et Smad3 jouent un rôle différent dans la régénération. Smad2 est essentiel au processus et permet la formation du blastème, structure contenant les cellules dédifférenciées menant à la régénération parfaite. Smad3 ne semble pas être essentiel au processus, puisque sa phosphorylation est limitée. Toutefois, cela concorde avec l'absence de cicatrisation observée lors du processus de régénération.

On peut espérer que l'amélioration de nos connaissances sur la signalisation de la voie canonique de TGF- β chez l'axolotl mène à de meilleurs traitements cliniques. Il semble que l'activité excessive de Smad3 dans un contexte de guérison humaine mène à des problèmes comme la cicatrisation, la propagation des chéloïdes ou l'apparition de cicatrices hypertrophiées. Enfin, il faut intégrer ces nouvelles connaissances au sein d'un réseau complexe de signalisation. Un processus complexe s'opère rarement par une seule voie. Les systèmes biologiques montrent souvent des redondances qui permettent au système de survivre dans le cas de mutations ou autres problèmes. Il faudra donc combiner nos connaissances de plusieurs voies de signalisation pour comprendre ce processus bien défini.

Bibliographie

- 1 Hutchison, C., Pilote, M. & Roy, S. The axolotl limb: a model for bone development, regeneration and fracture healing. *Bone* **40**, 45-56, doi:10.1016/j.bone.2006.07.005 (2007).
- 2 Martin, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81 (1997).
- 3 Diegelmann, R. F. & Evans, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience* **9**, 283-289 (2004).
- 4 Valluru, M., Staton, C. A., Reed, M. W. & Brown, N. J. Transforming Growth Factor-beta and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing. *Front Physiol* **2**, 89, doi:10.3389/fphys.2011.00089 (2011).
- 5 Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 349-363, doi:10.1038/nrm809 (2002).
- 6 Shi, M. *et al.* Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* **474**, 343-349, doi:nature10152 [pii] 10.1038/nature10152 (2011).
- 7 Worthington, J. J., Klementowicz, J. E. & Travis, M. A. TGF[beta]: a sleeping giant awoken by integrins. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 47-54 (2010).
- 8 Nakao, A. *et al.* TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* **16**, 5353-5362, doi:10.1093/emboj/16.17.5353 (1997).
- 9 Massagué, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes & development* **19**, 2783-2810, doi:10.1101/gad.1350705 (2005).
- 10 Koinuma, D. *et al.* Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol* **29**, 172-186, doi:10.1128/MCB.01038-08 (2009).
- 11 Conidi, A. *et al.* Four amino acids within a tandem QxVx repeat in a predicted extended alpha-helix of the Smad-binding domain of Sip1 are necessary for binding to activated Smad proteins. *PLoS One* **8**, e76733, doi:10.1371/journal.pone.0076733 (2013).

- 12 Verrecchia, F. & Mauviel, A. Control of connective tissue gene expression by TGF beta: role of Smad proteins in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* **4**, 143-149 (2002).
- 13 Nagarajan, R. P. & Chen, Y. Structural basis for the functional difference between Smad2 and Smad3 in FAST-2 (forkhead activin signal transducer-2)-mediated transcription. *Biochem J* **350 Pt 1**, 253-259 (2000).
- 14 Yeo, C.-Y., Chen, X. & Whitman, M. The Role of FAST-1 and Smads in Transcriptional Regulation by Activin during Early *Xenopus* Embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 26584-26590, doi:10.1074/jbc.274.37.26584 (1999).
- 15 Dunn, N. R., Vincent, S. p. D., Oxburgh, L., Robertson, E. J. & Bikoff, E. K. Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo. *Development* **131**, 1717-1728, doi:10.1242/dev.01072 (2004).
- 16 Koinuma, D. *et al.* ChIP-chip analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in TGF- β signaling. *Mol. Cell. Biol.*, MCB.01038-01008, doi:10.1128/mcb.01038-08 (2008).
- 17 Moustakas, A. & Heldin, C. H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714, doi:136/22/3699 [pii] 10.1242/dev.030338 (2009).
- 18 Piek, E., Heldin, C. H. & Ten Dijke, P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* **13**, 2105-2124 (1999).
- 19 Carlson, M. E. *et al.* Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Mol Med* **1**, 381-391, doi:10.1002/emmm.200900045 (2009).
- 20 Carlson, M. E. *et al.* Relative roles of TGF-beta1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. *Aging Cell* **8**, 676-689, doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00517.x (2009).
- 21 Delaney, K., Kasprzycka, P., Ciemerych, M. A. & Zimowska, M. The role of TGF-beta1 during skeletal muscle regeneration. *Cell Biol Int*, doi:10.1002/cbin.10725 (2016).
- 22 Degen, K. E. & Gourdie, R. G. Embryonic wound healing: A primer for engineering novel therapies for tissue repair. *Birth Defects Res C Embryo Today* **96**, 258-270, doi:10.1002/bdrc.21019 (2012).

- 23 Walraven, M., Gouverneur, M., Middelkoop, E., Beelen, R. H. & Ulrich, M. M. Altered TGF-beta signaling in fetal fibroblasts: What is known about the underlying mechanisms? *Wound Repair Regen* **22**, 3-13, doi:10.1111/wrr.12098 (2014).
- 24 Larson, B. J., Longaker, M. T. & Lorenz, H. P. Scarless Fetal Wound Healing: A Basic Science Review. *Plastic and Reconstructive Surgery* **126**, 1172-1180 doi:10.1097/PRS.1170b1013e3181eae1781 (2010).
- 25 Buchanan, E. P., Longaker, M. T. & Lorenz, H. P. Fetal skin wound healing. *Adv Clin Chem* **48**, 137-161 (2009).
- 26 Armatas, A. A. *et al.* The differential proliferative response of fetal and adult human skin fibroblasts to TGF-beta is retained when cultured in the presence of fibronectin or collagen. *Biochim Biophys Acta*, doi:10.1016/j.bbagen.2014.04.004 (2014).
- 27 Wong, J. W. *et al.* Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: evidence from the red Duroc pig model and humans. *Wound Repair Regen* **17**, 717-729, doi:WRR531 [pii] 10.1111/j.1524-475X.2009.00531.x (2009).
- 28 Eslami, A. *et al.* Expression of integrin alphavbeta6 and TGF-beta in scarless vs scar-forming wound healing. *J Histochem Cytochem* **57**, 543-557, doi:jhc.2009.952572 [pii] 10.1369/jhc.2009.952572 (2009).
- 29 Denis, J. F., Levesque, M., Tran, S. D., Camarda, A. J. & Roy, S. Axolotl as a Model to Study Scarless Wound Healing in Vertebrates: Role of the Transforming Growth Factor Beta Signaling Pathway. *Advances in wound care* **2**, 250-260, doi:10.1089/wound.2012.0371 (2013).
- 30 Quan, T., Shao, Y., He, T., Voorhees, J. J. & Fisher, G. J. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) mediates collagen loss in chronologically aged human skin. *J Invest Dermatol* **130**, 415-424, doi:10.1038/jid.2009.224 (2010).
- 31 Illingworth, C. M. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *Journal of Paediatric Surgery* **9**, 853-858 (1974).
- 32 Muneoka, K., Allan, C. H., Yang, X., Lee, J. & Han, M. Mammalian regeneration and regenerative medicine. *Birth Defects Res C Embryo Today* **84**, 265-280, doi:10.1002/bdrc.20137 (2008).

- 33 Han, M., Yang, X., Farrington, J. E. & Muneoka, K. Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development* **130**, 5123-5132, doi:10.1242/dev.00710 (2003).
- 34 Yu, L., Han, M., Yan, M., Lee, J. & Muneoka, K. BMP2 induces segment-specific skeletal regeneration from digit and limb amputations by establishing a new endochondral ossification center. *Dev Biol* **372**, 263-273, doi:10.1016/j.ydbio.2012.09.021 (2012).
- 35 Gottrup, F., Agren, M. S. & Karlsmark, T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen* **8**, 83-96, doi:wrr083 [pii] (2000).
- 36 Fernando, W. A. *et al.* Wound healing and blastema formation in regenerating digit tips of adult mice. *Developmental Biology* **350**, 301-310 (2011).
- 37 Mu, X., Bellayr, I., Pan, H., Choi, Y. & Li, Y. Regeneration of Soft Tissues Is Promoted by MMP1 Treatment after Digit Amputation in Mice. *PLoS One* **8**, e59105, doi:10.1371/journal.pone.0059105 PONE-D-12-36238 [pii] (2013).
- 38 Ashcroft, G. S. *et al.* Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol* **1**, 260-266, doi:10.1038/12971 (1999).
- 39 Liu, J. *et al.* Regenerative phenotype in mice with a point mutation in transforming growth factor b type I receptor (TGFBRI). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi:10.1073/pnas.1111056108 (2010).
- 40 Sullivan, T. P., Eaglstein, W. H., Davis, S. C. & Mertz, P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen* **9**, 66-76, doi:wrr066 [pii] (2001).
- 41 Levine, J. H., Moses, H. L., Gold, L. I. & Nanney, L. B. Spatial and temporal patterns of immunoreactive transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 during excisional wound repair. *Am J Pathol* **143**, 368-380 (1993).
- 42 Jazwinska, A., Badakov, R. & Keating, M. T. Activin-betaA signaling is required for zebrafish fin regeneration. *Curr Biol* **17**, 1390-1395, doi:S0960-9822(07)01697-1 [pii] 10.1016/j.cub.2007.07.019 (2007).
- 43 Chablais, F. & Jazwinska, A. IGF signaling between blastema and wound epidermis is required for fin regeneration. *Development* **137**, 871-879, doi:137/6/871 [pii]

- 10.1242/dev.043885 (2010).
- 44 Govindan, J. & Iovine, M. K. Dynamic remodeling of the extra cellular matrix during zebrafish fin regeneration. *Gene expression patterns : GEP*, doi:10.1016/j.gep.2015.06.001 (2015).
- 45 Hasegawa, T., Nakajima, T., Ishida, T., Kudo, A. & Kawakami, A. A diffusible signal derived from hematopoietic cells supports the survival and proliferation of regenerative cells during zebrafish fin fold regeneration. *Dev Biol*, doi:10.1016/j.ydbio.2014.12.015 (2014).
- 46 Shao, J., Qian, X., Zhang, C. & Xu, Z. Fin regeneration from tail segment with musculature, endoskeleton, and scales. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution* **312**, 762-769, doi:10.1002/jez.b.21295 (2009).
- 47 Chablais, F. & Jazwinska, A. The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on TGFbeta signaling. *Development* **139**, 1921-1930, doi:dev.078543 [pii] 10.1242/dev.078543 (2012).
- 48 Richardson, R. *et al.* Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research. *J Invest Dermatol* **133**, 1655-1665, doi:10.1038/jid.2013.16 (2013).
- 49 Richardson, R. *et al.* Re-epithelialization of cutaneous wounds in adult zebrafish combines mechanisms of wound closure in embryonic and adult mammals. *Development* **143**, 2077-2088, doi:10.1242/dev.130492 (2016).
- 50 Saera-Vila, A. *et al.* Myocyte Dedifferentiation Drives Extraocular Muscle Regeneration in Adult Zebrafish. *Investigative ophthalmology & visual science* **56**, 4977-4993, doi:10.1167/iovs.14-16103 (2015).
- 51 Saera-Vila, A., Kish, P. E. & Kahana, A. Fgf regulates dedifferentiation during skeletal muscle regeneration in adult zebrafish. *Cell Signal* **28**, 1196-1204, doi:10.1016/j.cellsig.2016.06.001 (2016).
- 52 Seifert, A. W. *et al.* Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature* **489**, 561-565, doi:nature11499 [pii] 10.1038/nature11499 (2012).
- 53 Gawriluk, T. R. *et al.* Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals. *Nat Commun* **7**, 11164, doi:10.1038/ncomms11164 (2016).

- 54 Brant, J. O., Yoon, J. H., Polvadore, T., Barbazuk, W. B. & Maden, M. Cellular events during scar-free skin regeneration in the spiny mouse, *Acomys*. *Wound Repair Regen* **24**, 75-88, doi:10.1111/wrr.12385 (2016).
- 55 Seifert, A. W., Monaghan, J. R., Voss, S. R. & Maden, M. Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PLoS One* **7**, e32875, doi:10.1371/journal.pone.0032875 PONE-D-11-18138 [pii] (2012).
- 56 Lévesque, M. *et al.* Transforming Growth Factor: β Signaling Is Essential for Limb Regeneration in Axolotls. *PLoS ONE* **2**, e1227 (2007).
- 57 Keinath, M. C. *et al.* Initial characterization of the large genome of the salamander *Ambystoma mexicanum* using shotgun and laser capture chromosome sequencing. *Scientific reports* **5**, 16413, doi:10.1038/srep16413 (2015).
- 58 Whited, J. L., Lehoczky, J. A. & Tabin, C. J. Inducible genetic system for the axolotl. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13662-13667, doi:1211816109 [pii] 10.1073/pnas.1211816109 (2012).
- 59 Whited, J. L. *et al.* Pseudotyped retroviruses for infecting axolotl in vivo and in vitro. *Development*, doi:dev.087734 [pii] 10.1242/dev.087734 (2013).
- 60 Khattak, S. *et al.* Foamy virus for efficient gene transfer in regeneration studies. *BMC Dev Biol* **13**, 17, doi:1471-213X-13-17 [pii] 10.1186/1471-213X-13-17 (2013).
- 61 Khattak, S. *et al.* Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination. *Nature protocols* **9**, 529-540, doi:10.1038/nprot.2014.040 (2014).
- 62 Flowers, G. P., Timberlake, A. T., McLean, K. C., Monaghan, J. R. & Crews, C. M. Highly efficient targeted mutagenesis in axolotl using Cas9 RNA-guided nuclease. *Development* **141**, 2165-2171, doi:10.1242/dev.105072 (2014).
- 63 Sobkow, L., Epperlein, H. H., Herklotz, S., Straube, W. L. & Tanaka, E. M. A germline GFP transgenic axolotl and its use to track cell fate: Dual origin of the fin mesenchyme during development and the fate of blood cells during regeneration. *Dev Biol* **290**, 386-397 (2006).
- 64 Khattak, S. *et al.* Germline Transgenic Methods for Tracking Cells and Testing Gene Function during Regeneration in the Axolotl. *Stem cell reports* **1**, 90-103, doi:10.1016/j.stemcr.2013.03.002 (2013).

- 65 Currie, J. D. *et al.* Live Imaging of Axolotl Digit Regeneration Reveals Spatiotemporal Choreography of Diverse Connective Tissue Progenitor Pools. *Dev Cell* **39**, 411-423, doi:10.1016/j.devcel.2016.10.013 (2016).
- 66 Roy, S. & Gardiner, D. M. Cyclopamine induces digit loss in regenerating axolotl limbs. *J Exp Zool* **293**, 186-190, doi:10.1002/jez.10110 (2002).
- 67 Wallace, H. *Vertebrate limb regeneration*. (Wiley, 1981).
- 68 Tank, P. W., Carlson, B. M. & Connelly, T. G. A Staging System for Forelimb Regeneration in the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Journal of Morphology* **150**, 117-128 (1976).
- 69 Shimokawa, T., Yasutaka, S., Kominami, R. & Shinohara, H. Wound epithelium function in axolotl limb regeneration. *Okajimas Folia Anat Jpn* **89**, 75-81, doi:DN/JST.JSTAGE/ofaj/89.75 [pii] (2012).
- 70 Christensen, R. N. & Tassava, R. A. Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Developmental Dynamics* **217**, 216-224, doi:10.1002/(sici)1097-0177(200002)217:2<216::aid-dvdy8>3.0.co;2-8 (2000).
- 71 Satoh, A., Bryant, S. V. & Gardiner, D. M. Nerve signaling regulates basal keratinocyte proliferation in the blastema apical epithelial cap in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Dev Biol* **366**, 374-381, doi:S0012-1606(12)00193-5 [pii] 10.1016/j.ydbio.2012.03.022 (2012).
- 72 Muneoka, K., Fox, W. F. & Bryant, S. V. Cellular contribution from dermis and cartilage to the regenerating limb blastema in axolotls. *Dev Biol* **116**, 256-260 (1986).
- 73 Mullen, L. M., Bryant, S. V., Torok, M. A., Blumberg, B. & Gardiner, D. M. Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development* **122**, 3487-3497 (1996).
- 74 Grim, M. & Carlson, B. M. The formation of muscles in regenerating limbs of the newt after denervation of the blastema. *Journal of embryology and experimental morphology* **54**, 99-111 (1979).
- 75 Gardiner, D. M., Carlson, M. R. J. & Roy, S. Towards a functional analysis of limb regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **10**, 385-393 (1999).

- 76 Gardiner, D. M., Blumberg, B., Komine, Y. & Bryant, S. V. Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs. *Development* **121**, 1731-1741 (1995).
- 77 Carlson, M. R. J., Komine, Y., Bryant, S. V. & Gardiner, D. M. Expression of Hoxb13 and Hoxc10 in Developing and Regenerating Axolotl Limbs and Tails. *Developmental Biology* **229**, 396-406 (2001).
- 78 Roy, S. & Lévesque, M. Limb Regeneration in Axolotl: Is It Superhealing? *TheScientificWorldJOURNAL* **6**, 12-25 (2006).
- 79 Han, A. *et al.* The anti-motility signaling mechanism of TGFbeta3 that controls cell traffic during skin wound healing. *Biol Open* **1**, 1169-1177, doi:10.1242/bio.20122246 BIO20122246 [pii] (2012).
- 80 Braun, L. *et al.* Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1539-1543 (1988).
- 81 Zhong, Z. *et al.* Inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling improves regeneration of small-for-size rat liver grafts. *Liver Transpl* **16**, 181-190, doi:10.1002/lt.21966 (2010).
- 82 Thenappan, A. *et al.* Role of transforming growth factor beta signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver. *Hepatology* **51**, 1373-1382, doi:10.1002/hep.23449 (2010).
- 83 Patruno, M. *et al.* Expression of transforming growth factor beta-like molecules in normal and regenerating arms of the crinoid *Antedon mediterranea*: immunocytochemical and biochemical evidence. *Proc Biol Sci* **269**, 1741-1747, doi:10.1098/rspb.2002.2010 (2002).
- 84 Gilbert, R. W., Vickaryous, M. K. & Vitoria-Petit, A. M. Characterization of TGFbeta signaling during tail regeneration in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*). *Dev Dyn*, doi:10.1002/dvdy.23977 (2013).
- 85 Ho, D. M. & Whitman, M. TGF-[beta] signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Developmental Biology* **315**, 203-216 (2008).
- 86 Kane, C. J., Hebda, P. A., Mansbridge, J. N. & Hanawalt, P. C. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during

- cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* **148**, 157-173, doi:10.1002/jcp.1041480119 (1991).
- 87 O'Kane, S. & Ferguson, M. W. Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 63-78, doi:S1357272596001203 [pii] (1997).
- 88 Mohan, R. *et al.* Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 2065-2072 (2002).
- 89 Gaspar, N. J. *et al.* Inhibition of transforming growth factor beta signaling reduces pancreatic adenocarcinoma growth and invasiveness. *Mol Pharmacol* **72**, 152-161, doi:10.1124/mol.106.029025 (2007).
- 90 Bonniaud, P. *et al.* Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 889-898, doi:10.1164/rccm.200405-612OC (2005).
- 91 Xie, J. *et al.* TGF-beta1 induces the different expressions of lysyl oxidases and matrix metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after mechanical injury. *J Biomech*, doi:S0021-9290(12)00749-X [pii] 10.1016/j.jbiomech.2012.12.019 (2013).
- 92 Kahari, V. M. & Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol* **6**, 199-213 (1997).
- 93 Ramos, C. *et al.* FGF-1 reverts epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 through MAPK/ERK kinase pathway. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **299**, L222-231, doi:10.1152/ajplung.00070.2010 (2010).
- 94 Qureshi, H. Y., Ricci, G. & Zafarullah, M. Smad signaling pathway is a pivotal component of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 regulation by transforming growth factor beta in human chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 1605-1612, doi:S0167-4889(08)00139-0 [pii] 10.1016/j.bbamcr.2008.04.005 (2008).
- 95 Nace, J. D. & Tassava, R. A. Examination of fibronectin distribution and its sources in the regenerating newt limb by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Developmental Dynamics* **202**, 153-164, doi:10.1002/aja.1002020207 (1995).

- 96 Mitten, E. K., Jing, D. & Suzuki, Y. Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for wound closure and healing during larval leg regeneration in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem Mol Biol* **42**, 854-864, doi:S0965-1748(12)00110-5 [pii] 10.1016/j.ibmb.2012.08.001 (2012).
- 97 Gawronska-Kozak, B. Scarless skin wound healing in FOXP1 deficient (nude) mice is associated with distinctive matrix metalloproteinase expression. *Matrix Biol* **30**, 290-300, doi:S0945-053X(11)00046-1 [pii] 10.1016/j.matbio.2011.04.004 (2011).
- 98 Kato, T. *et al.* Unique expression patterns of matrix metalloproteinases in regenerating newt limbs. *Dev Dyn* **226**, 366-376, doi:10.1002/dvdy.10247 (2003).
- 99 Yang, E. V. & Bryant, S. V. Developmental regulation of a matrix metalloproteinase during regeneration of axolotl appendages. *Dev Biol* **166**, 696-703, doi:S0012160684713480 [pii] (1994).
- 100 Yang, E. V., Gardiner, D. M., Carlson, M. R., Nugas, C. A. & Bryant, S. V. Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Dev Dyn* **216**, 2-9, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199909)216:1<2::AID-DVDY2>3.0.CO;2-P [pii] 10.1002/(SICI)1097-0177(199909)216:1<2::AID-DVDY2>3.0.CO;2-P (1999).
- 101 Park, I. S. & Kim, W. S. Modulation of gelatinase activity correlates with the dedifferentiation profile of regenerating salamander limbs. *Molecules and cells* **9**, 119-126 (1999).
- 102 Vinarsky, V., Atkinson, D. L., Stevenson, T. J., Keating, M. T. & Odelberg, S. J. Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. *Dev Biol* **279**, 86-98, doi:S0012-1606(04)00853-X [pii] 10.1016/j.ydbio.2004.12.003 (2005).
- 103 Bai, S. *et al.* Matrix metalloproteinase expression and function during fin regeneration in zebrafish: analysis of MT1-MMP, MMP2 and TIMP2. *Matrix Biol* **24**, 247-260, doi:10.1016/j.matbio.2005.03.007 (2005).
- 104 Santosh, N. *et al.* Matrix metalloproteinase expression during blastema formation in regeneration-competent versus regeneration-deficient amphibian limbs. *Dev Dyn* **240**, 1127-1141, doi:10.1002/dvdy.22503 (2011).

- 105 Leung, S. Y. *et al.* Effect of transforming growth factor-beta receptor I kinase inhibitor
2,4-disubstituted pteridine (SD-208) in chronic allergic airway inflammation and
remodeling. *J Pharmacol Exp Ther* **319**, 586-594, doi:10.1124/jpet.106.109314 (2006).
- 106 Mescher, A. L. & Neff, A. W. Limb regeneration in amphibians: immunological
considerations. *ScientificWorldJournal* **6 Suppl 1**, 1-11, doi:10.1100/tsw.2006.323
(2006).
- 107 Mescher, A. L. & Neff, A. W. Regenerative capacity and the developing immune
system. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **93**, 39-66 (2005).
- 108 Martin, P. *et al.* Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent
on inflammatory cells. *Curr Biol* **13**, 1122-1128, doi:S0960982203003968 [pii] (2003).
- 109 King, M. W., Neff, A. W. & Mescher, A. L. The developing *Xenopus* limb as a model
for studies on the balance between inflammation and regeneration. *Anat Rec (Hoboken)*
295, 1552-1561, doi:10.1002/ar.22443 (2012).
- 110 Godwin, J. W. & Rosenthal, N. Scar-free wound healing and regeneration in amphibians:
Immunological influences on regenerative success. *Differentiation* **87**, 66-75,
doi:10.1016/j.diff.2014.02.002 (2014).
- 111 Yun, M. H., Davaapil, H. & Brockes, J. P. Recurrent turnover of senescent cells during
regeneration of a complex structure. *Elife* **4**, doi:10.7554/eLife.05505 (2015).
- 112 Godwin, J. W., Pinto, A. R. & Rosenthal, N. A. Macrophages are required for adult
salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:1300290110 [pii]
10.1073/pnas.1300290110 (2013).
- 113 Daley, J. M., Brancato, S. K., Thomay, A. A., Reichner, J. S. & Albina, J. E. The
phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* **87**, 59-67 (2010).
- 114 Rigamonti, E., Zordan, P., Sciorati, C., Rovere-Querini, P. & Brunelli, S. Macrophage
Plasticity in Skeletal Muscle Repair. *BioMed research international* **2014**, 560629,
doi:10.1155/2014/560629 (2014).
- 115 Nacu, N. *et al.* Macrophages produce TGF-beta-induced (beta-ig-h3) following
ingestion of apoptotic cells and regulate MMP14 levels and collagen turnover in
fibroblasts. *Journal of immunology* **180**, 5036-5044 (2008).

- 116 Ala-Kokko, L., Pihlajaniemi, T., Myers, J. C., Kivirikko, K. I. & Savolainen, E. R. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rat. *Biochem J* **244**, 75-79 (1987).
- 117 Tao, Y. Y., Wang, Q. L., Shen, L., Fu, W. W. & Liu, C. H. Salvianolic acid B inhibits hepatic stellate cell activation through transforming growth factor beta-1 signal transduction pathway in vivo and in vitro. *Experimental biology and medicine* **238**, 1284-1296, doi:10.1177/1535370213498979 (2013).
- 118 Finnson, K. W., McLean, S., Di Guglielmo, G. M. & Philip, A. Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Advances in wound care* **2**, 195-214, doi:10.1089/wound.2013.0429 (2013).
- 119 Campaner, A. B. *et al.* Upregulation of TGF-beta1 expression may be necessary but is not sufficient for excessive scarring. *J Invest Dermatol* **126**, 1168-1176, doi:5700200 [pii] 10.1038/sj.jid.5700200 (2006).
- 120 Shi, H. X. *et al.* The anti-scar effects of basic fibroblast growth factor on the wound repair in vitro and in vivo. *PLoS One* **8**, e59966, doi:10.1371/journal.pone.0059966 (2013).
- 121 Jinnin, M., Ihn, H. & Tamaki, K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol* **69**, 597-607, doi:10.1124/mol.105.017483 (2006).
- 122 Islam, S. S. *et al.* TGF-beta1 induces EMT reprogramming of porcine bladder urothelial cells into collagen producing fibroblasts-like cells in a Smad2/Smad3-dependent manner. *Journal of cell communication and signaling*, doi:10.1007/s12079-013-0216-4 (2013).
- 123 Wang, Y. W. *et al.* siRNA-Targeting Transforming Growth Factor-beta Type I Receptor Reduces Wound Scarring and Extracellular Matrix Deposition of Scar Tissue. *J Invest Dermatol*, doi:10.1038/jid.2014.84 (2014).
- 124 Asahina, K., Obara, M. & Yoshizato, K. Expression of genes of type I and type II collagen in the formation and development of the blastema of regenerating newt limb. *Dev Dyn* **216**, 59-71, doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199909)216:1<59::AID-DVDY8>3.0.CO;2-B (1999).

- 125 Satoh, A., Hirata, A. & Makanae, A. Collagen reconstitution is inversely correlated with induction of limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Zoolog Sci* **29**, 191-197, doi:10.2108/zsj.29.191 (2012).
- 126 Frank, S., Madlener, M. & Werner, S. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* **271**, 10188-10193 (1996).
- 127 Wu, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells suppress fibroblast proliferation and reduce skin fibrosis through a TGF-beta3-dependent activation. *Int J Low Extrem Wounds* **14**, 50-62, doi:10.1177/1534734614568373 (2015).
- 128 Derynck, R. & Miyazono, K. *The TGF-beta Family*. Vol. 50 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008).
- 129 Cieslik, K. A., Trial, J. & Entman, M. L. Defective myofibroblast formation from mesenchymal stem cells in the aging murine heart rescue by activation of the AMPK pathway. *Am J Pathol* **179**, 1792-1806, doi:10.1016/j.ajpath.2011.06.022 (2011).
- 130 Wight, T. N. & Potter-Perigo, S. The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G950-955, doi:ajpgi.00132.2011 [pii] 10.1152/ajpgi.00132.2011 (2011).
- 131 Desmouliere, A., Chaponnier, C. & Gabbiani, G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* **13**, 7-12, doi:WRR130102 [pii] 10.1111/j.1067-1927.2005.130102.x (2005).
- 132 Hinz, B. *et al.* Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* **180**, 1340-1355, doi:S0002-9440(12)00098-3 [pii] 10.1016/j.ajpath.2012.02.004 (2012).
- 133 Li, B. & Wang, J. H. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement. *J Tissue Viability* **20**, 108-120, doi:S0965-206X(09)00056-4 [pii] 10.1016/j.jtv.2009.11.004 (2011).
- 134 Micallef, L. *et al.* The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **5**, 5 (2012).
- 135 Hu, B., Wu, Z. & Phan, S. H. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **29**, 397-404, doi:10.1165/rcmb.2003-0063OC (2003).

- 136 Bondi, C. D. *et al.* NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol* **21**, 93-102, doi:10.1681/ASN.2009020146 (2010).
- 137 Levesque, M., Villiard, E. & Roy, S. Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* (2010).
- 138 Brown, K. A., Pietenpol, J. A. & Moses, H. L. A tale of two proteins: Differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF- β signaling. *Journal of Cellular Biochemistry* **101**, 9-33, doi:10.1002/jcb.21255 (2007).
- 139 Dennler, S., Huet, S. & Gauthier, J. M. A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene* **18**, 1643-1648, doi:10.1038/sj.onc.1202729 (1999).
- 140 Funaba, M. & Mathews, L. S. Identification and characterization of constitutively active Smad2 mutants: evaluation of formation of Smad complex and subcellular distribution. *Mol Endocrinol* **14**, 1583-1591 (2000).
- 141 Yagi, K. *et al.* Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem* **274**, 703-709 (1999).
- 142 Ueberham, U. *et al.* Smad2 isoforms are differentially expressed during mouse brain development and aging. *Int J Dev Neurosci* **27**, 501-510, doi:S0736-5748(09)00042-2 [pii] 10.1016/j.ijdevneu.2009.04.001 (2009).
- 143 Jayaraman, L. & Massague, J. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem* **275**, 40710-40717, doi:10.1074/jbc.M005799200 (2000).
- 144 Han, S. U. *et al.* CEACAM5 and CEACAM6 are major target genes for Smad3-mediated TGF-beta signaling. *Oncogene* **27**, 675-683, doi:10.1038/sj.onc.1210686 (2008).
- 145 Bartholin, L., Wessner, L. L., Chirgwin, J. M. & Guise, T. A. The human Cyr61 gene is a transcriptional target of transforming growth factor beta in cancer cells. *Cancer Lett* **246**, 230-236, doi:10.1016/j.canlet.2006.02.019 (2007).
- 146 Fu, Y. *et al.* Differential regulation of transforming growth factor beta signaling pathways by Notch in human endothelial cells. *J Biol Chem* **284**, 19452-19462, doi:M109.011833 [pii] 10.1074/jbc.M109.011833 (2009).

- 147 Mise, N. *et al.* Zyxin Is a Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta)/Smad3 Target Gene That Regulates Lung Cancer Cell Motility via Integrin alpha 5 beta 1. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31393-31405, doi:DOI 10.1074/jbc.M112.357624 (2012).
- 148 Gressner, O. A. *et al.* Connective tissue growth factor is a Smad2 regulated amplifier of transforming growth factor beta actions in hepatocytes--but without modulating bone morphogenetic protein 7 signaling. *Hepatology* **49**, 2021-2030, doi:10.1002/hep.22850 (2009).
- 149 Petersen, M. *et al.* Smad2 and Smad3 have opposing roles in breast cancer bone metastasis by differentially affecting tumor angiogenesis. *Oncogene* **29**, 1351-1361 (2009).
- 150 Holmes, A. *et al.* CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* **276**, 10594-10601, doi:10.1074/jbc.M010149200 (2001).
- 151 Ma, J., Wang, Q., Fei, T., Han, J. D. & Chen, Y. G. MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* **109**, 987-994, doi:10.1182/blood-2006-07-036400 (2007).
- 152 Cutroneo, K. R. Evidence for TGF- β 1 and bleomycin intracellular signaling through autocrine regulation of Smad 3 binding to the proximal promoter of the Smad 7 gene. *Journal of Cellular Biochemistry* **97**, 933-939, doi:10.1002/jcb.20594 (2006).
- 153 Cutroneo, K. R. & Phan, S. H. TGF-beta1-induced Smad 3 binding to the Smad 7 gene: knockout of Smad 7 gene transcription by sense phosphorothioate oligos, autoregulation, and effect on TGF-beta1 secretion: bleomycin acts through TGF-beta1. *Journal of Cellular Biochemistry* **89**, 474-483 (2003).
- 154 Piek, E. *et al.* Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in Smad2- and Smad3-deficient fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 19945-19953, doi:10.1074/jbc.M102382200 M102382200 [pii] (2001).
- 155 Meng, X. M. *et al.* Smad2 Protects against TGF-b/Smad3-Mediated Renal Fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology* **21**, 1477-1487, doi:10.1681/asn.2009121244 (2010).
- 156 Bonniaud, P. *et al.* Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis. *Journal of immunology* **173**, 2099-2108 (2004).

- 157 Wiercinska, E. *et al.* The TGF-beta/Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast cancer research and treatment* **128**, 657-666, doi:10.1007/s10549-010-1147-x (2011).
- 158 Dennler, S. *et al.* Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* **17**, 3091-3100, doi:10.1093/emboj/17.11.3091 (1998).
- 159 Zhang, Y. *et al.* High throughput determination of TGFbeta1/SMAD3 targets in A549 lung epithelial cells. *PLoS One* **6**, e20319, doi:10.1371/journal.pone.0020319 (2011).
- 160 Samarakoon, R. & Higgins, P. J. Integration of non-SMAD and SMAD signaling in TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression in vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* **100**, 976-983, doi:08120976 [pii] (2008).
- 161 Liu, X. *et al.* Smad3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF-beta1 in cultured rat hepatic stellate cells. *Pharmaceutical research* **23**, 82-89, doi:10.1007/s11095-005-9043-5 (2006).
- 162 Wilkes, M. C. *et al.* Sorting nexin 9 differentiates ligand-activated Smad3 from Smad2 for nuclear import and transforming growth factor beta signaling. *Mol Biol Cell* **26**, 3879-3891, doi:10.1091/mbc.E15-07-0545 (2015).
- 163 Yu, J. *et al.* Identification of the gene transcription and apoptosis mediated by TGF-beta-Smad2/3-Smad4 signaling. *J Cell Physiol* **215**, 422-433, doi:10.1002/jcp.21325 (2008).
- 164 Verrecchia, F., Chu, M. L. & Mauviel, A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* **276**, 17058-17062, doi:10.1074/jbc.M100754200 (2001).
- 165 Chen, S. J., Yuan, W., Lo, S., Trojanowska, M. & Varga, J. Interaction of smad3 with a proximal smad-binding element of the human alpha2(I) procollagen gene promoter required for transcriptional activation by TGF-beta. *J Cell Physiol* **183**, 381-392, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200006)183:3<381::AID-JCP11>3.0.CO;2-O [pii] 10.1002/(SICI)1097-4652(200006)183:3<381::AID-JCP11>3.0.CO;2-O (2000).
- 166 Frederick, J. P., Liberati, N. T., Waddell, D. S., Shi, Y. & Wang, X. F. Transforming growth factor beta-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct

- binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Mol Cell Biol* **24**, 2546-2559 (2004).
- 167 Liang, Y. Y., Brunnicardi, F. C. & Lin, X. Smad3 mediates immediate early induction of Id1 by TGF-beta. *Cell Res* **19**, 140-148, doi:cr2008321 [pii] 10.1038/cr.2008.321 (2009).
- 168 Feng, X. H., Lin, X. & Derynck, R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *EMBO J* **19**, 5178-5193, doi:10.1093/emboj/19.19.5178 (2000).
- 169 Pardali, K. *et al.* Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **275**, 29244-29256, doi:10.1074/jbc.M909467199 M909467199 [pii] (2000).
- 170 Feng, X. H., Liang, Y. Y., Liang, M., Zhai, W. & Lin, X. Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol Cell* **9**, 133-143 (2002).
- 171 Pogoda, H. M. & Meyer, D. Zebrafish Smad7 is regulated by Smad3 and BMP signals. *Dev Dyn* **224**, 334-349, doi:10.1002/dvdy.10113 (2002).
- 172 Denissova, N. G., Pouponnot, C., Long, J., He, D. & Liu, F. Transforming growth factor B-inducible independent binding of SMAD to the Smad7 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 6397-6402, doi:10.1073/pnas.090099297 (2000).
- 173 Stroschein, S. L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. & Luo, K. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **286**, 771-774, doi:7926 [pii] (1999).
- 174 Ju, W. *et al.* Deletion of Smad2 in mouse liver reveals novel functions in hepatocyte growth and differentiation. *Mol Cell Biol* **26**, 654-667, doi:10.1128/MCB.26.2.654-667.2006 (2006).
- 175 Ungefroren, H. *et al.* Differential roles of Smad2 and Smad3 in the regulation of TGF-beta1-mediated growth inhibition and cell migration in pancreatic ductal adenocarcinoma cells: control by Rac1. *Mol Cancer* **10**, 67, doi:1476-4598-10-67 [pii] 10.1186/1476-4598-10-67 (2011).

- 176 Jun, L., Xin, T. & Xia, C. Comparative effects of TGF-beta 2/Smad2 and TGF-beta 2/Smad3 signaling pathways on proliferation, migration, and extracellular matrix production in a human lens cell line. *Experimental eye research* **92**, 173-179 (2011).
- 177 Hoot, K. E. *et al.* Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression. *J Clin Invest* **118**, 2722-2732, doi:10.1172/JCI33713 (2008).
- 178 Hosokawa, R., Urata, M. M., Ito, Y., Bringas, P., Jr. & Chai, Y. Functional significance of Smad2 in regulating basal keratinocyte migration during wound healing. *J Invest Dermatol* **125**, 1302-1309, doi:JID23963 [pii] 10.1111/j.0022-202X.2005.23963.x (2005).
- 179 Tomikawa, K. *et al.* Smad2 decelerates re-epithelialization during gingival wound healing. *J Dent Res* **91**, 764-770, doi:0022034512451449 [pii] 10.1177/0022034512451449 (2012).
- 180 Fujita, T. *et al.* Smad2 is involved in the apoptosis of murine gingival junctional epithelium associated with inhibition of Bcl-2. *Arch Oral Biol* **57**, 1567-1573, doi:S0003-9969(12)00289-0 [pii] 10.1016/j.archoralbio.2012.08.011 (2012).
- 181 Tecalco-Cruz, A. C. *et al.* Transforming growth factor-beta/SMAD Target gene SKIL is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4. *J Biol Chem* **287**, 26764-26776, doi:M112.386599 [pii] 10.1074/jbc.M112.386599 (2012).
- 182 Zhang, F. *et al.* Ski-related novel protein N (SnoN), a Negative Controller of Transforming Growth Factor- β Signaling, Is a Prognostic Marker in Estrogen Receptor-positive Breast Carcinomas. *Cancer Research* **63**, 5005-5010 (2003).
- 183 Macias-Silva, M., Li, W., Leu, J. I., Crissey, M. A. S. & Taub, R. Up-regulated Transcriptional Repressors SnoN and Ski Bind Smad Proteins to Antagonize Transforming Growth Factor- β Signals during Liver Regeneration. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 28483-28490, doi:10.1074/jbc.M202403200 (2002).
- 184 Sengupta, S., Jana, S., Biswas, S., Mandal, P. K. & Bhattacharyya, A. Cooperative involvement of NFAT and SnoN mediates transforming growth factor-beta (TGF-beta)

- induced EMT in metastatic breast cancer (MDA-MB 231) cells. *Clin Exp Metastasis* **30**, 1019-1031, doi:10.1007/s10585-013-9600-y (2013).
- 185 Luo, K. Ski and SnoN: negative regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 65-70, doi:10.1016/j.gde.2003.11.003 S0959437X03001692 [pii] (2004).
- 186 Tsuneyoshi, N. *et al.* The SMAD2/3 corepressor SNON maintains pluripotency through selective repression of mesendodermal genes in human ES cells. *Genes Dev* **26**, 2471-2476, doi:26/22/2471 [pii] 10.1101/gad.201772.112 (2012).
- 187 Stroschein, S. L., Bonni, S., Wrana, J. L. & Luo, K. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* **15**, 2822-2836, doi:10.1101/gad.912901 (2001).
- 188 Zhu, Q., Pearson-White, S. & Luo, K. Requirement for the SnoN oncoprotein in transforming growth factor beta-induced oncogenic transformation of fibroblast cells. *Mol Cell Biol* **25**, 10731-10744, doi:25/24/10731 [pii] 10.1128/MCB.25.24.10731-10744.2005 (2005).
- 189 Johansson, N. *et al.* Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci* **113 Pt 2**, 227-235 (2000).
- 190 Datto, M. B. *et al.* Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**, 2495-2504 (1999).
- 191 Jinno, K., Takahashi, T., Tsuchida, K., Tanaka, E. & Moriyama, K. Acceleration of palatal wound healing in Smad3-deficient mice. *J Dent Res* **88**, 757-761, doi:0022034509341798 [pii] 10.1177/0022034509341798 (2009).
- 192 Liu, K. *et al.* Knocking out Smad3 favors allogeneic mouse fetal skin development in adult wounds. *Wound Repair Regen* **22**, 265-271, doi:10.1111/wrr.12143 (2014).
- 193 Lévesque, M., Villiard, É. & Roy, S. Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **314B**, 684-697, doi:10.1002/jez.b.21371 (2010).
- 194 Ziegels, J. [The melanocytes of the Axolotl. Their modifications during skin regeneration]. *Arch Biol* **82**, 407-428 (1971).
- 195 Conery, A. R. *et al.* Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-[beta]-induced apoptosis. *Nat Cell Biol* **6**, 366-372 (2004).

- 196 Kremer, M. *et al.* Pivotal role of Smad3 in a mouse model of T cell-mediated hepatitis. *Hepatology* **47**, 113-126, doi:10.1002/hep.21956 (2008).
- 197 Yang, Y.-A., Zhang, G.-M., Feigenbaum, L. & Zhang, Y. E. Smad3 reduces susceptibility to hepatocarcinoma by sensitizing hepatocytes to apoptosis through downregulation of Bcl-2. *Cancer Cell* **9**, 445-457 (2006).
- 198 Cao, Y. *et al.* Identification of apoptotic genes mediating TGF-beta/Smad3-induced cell death in intestinal epithelial cells using a genomic approach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G28-38, doi:10.1152/ajpgi.00437.2005 (2007).
- 199 Yanagisawa, K. *et al.* Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF-beta in human normal lung epithelial cells. *Oncogene* **17**, 1743-1747 (1998).
- 200 Vlaskalin, T., Wong, C. J. & Tsilfidis, C. Growth and apoptosis during larval forelimb development and adult forelimb regeneration in the newt (*Notophthalmus viridescens*). *Development genes and evolution* **214**, 423-431, doi:10.1007/s00427-004-0417-1 (2004).
- 201 Mescher, A. L., White, G. W. & Brokaw, J. J. Apoptosis in regenerating and denervated, nonregenerating urodele forelimbs. *Wound Repair Regen* **8**, 110-116 (2000).
- 202 Flanders, K. C. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *International Journal of Experimental Pathology* **85**, 47-64, doi:10.1111/j.0959-9673.2004.00377.x (2004).
- 203 Gauldie, J., Bonniaud, P., Sime, P., Ask, K. & Kolb, M. TGF-b, Smad3 and the process of progressive fibrosis *Biochemical Society Transactions* **35**, 661-664 (2007).
- 204 Hamzavi, J. *et al.* Disruption of the Smad7 gene enhances CCI4-dependent liver damage and fibrogenesis in mice. *J Cell Mol Med* **12**, 2130-2144, doi:JCMM262 [pii] 10.1111/j.1582-4934.2008.00262.x (2008).
- 205 Nie, J. *et al.* Effects of Smad7 overexpression on peritoneal inflammation in a rat peritoneal dialysis model. *Perit Dial Int* **27**, 580-588, doi:27/5/580 [pii] (2007).
- 206 Nie, J. *et al.* Smad7 gene transfer inhibits peritoneal fibrosis. *Kidney Int* **72**, 1336-1344, doi:5002533 [pii] 10.1038/sj.ki.5002533 (2007).
- 207 Miyake, T., Alli, N. S. & McDermott, J. C. Nuclear function of Smad7 promotes myogenesis. *Mol Cell Biol* **30**, 722-735, doi:MCB.01005-09 [pii] 10.1128/MCB.01005-09 (2010).

- 208 Xu, J., Beyer, A. R., Walker, W. H. & McGee, E. A. Developmental and stage-specific expression of Smad2 and Smad3 in rat testis. *J Androl* **24**, 192-200 (2003).
- 209 Leivonen, S. K. *et al.* Activation of Smad signaling enhances collagenase-3 (MMP-13) expression and invasion of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene* **25**, 2588-2600, doi:10.1038/sj.onc.1209291 (2006).
- 210 Susarla, B. T. S. *et al.* Smad proteins differentially regulate transforming growth factor-beta-mediated induction of chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurochem* **119**, 868-878 (2011).
- 211 Brown, K. A. *et al.* Identification of novel Smad2 and Smad3 associated proteins in response to TGF- β 1. *Journal of Cellular Biochemistry* **105**, 596-611, doi:10.1002/jcb.21860 (2008).
- 212 Yang, Y. C. *et al.* Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10269-10274, doi:10.1073/pnas.1834070100 (2003).
- 213 Jin, Q., Gao, G. & Mulder, K. M. Requirement of a dynein light chain in TGFbeta/Smad3 signaling. *J Cell Physiol* **221**, 707-715, doi:10.1002/jcp.21910 (2009).
- 214 Jin, Q., Ding, W. & Mulder, K. M. Requirement for the dynein light chain km23-1 in a Smad2-dependent transforming growth factor-beta signaling pathway. *J Biol Chem* **282**, 19122-19132, doi:10.1074/jbc.M609915200 (2007).
- 215 Jin, Q. *et al.* Role of km23-1 in RhoA/actin-based cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* **428**, 333-338, doi:10.1016/j.bbrc.2012.10.047 (2012).
- 216 Felici, A. *et al.* TLP, a novel modulator of TGF-beta signaling, has opposite effects on Smad2- and Smad3-dependent signaling. *EMBO J* **22**, 4465-4477, doi:10.1093/emboj/cdg428 (2003).
- 217 Wang, G. *et al.* STAT3 selectively interacts with Smad3 to antagonize TGF-beta signalling. *Oncogene* **35**, 4422, doi:10.1038/onc.2016.145 (2016).
- 218 Sapkota, G. *et al.* Dephosphorylation of the Linker Regions of Smad1 and Smad2/3 by Small C-terminal Domain Phosphatases Has Distinct Outcomes for Bone Morphogenetic Protein and Transforming Growth Factor- β Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 40412-40419, doi:10.1074/jbc.M610172200 (2006).

- 219 Wrighton, K. H. *et al.* Small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate the regulatory linker regions of Smad2 and Smad3 to enhance transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **281**, 38365-38375, doi:M607246200 [pii] 10.1074/jbc.M607246200 (2006).
- 220 Ross, S. & Hill, C. S. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 383-408, doi:S1357-2725(07)00316-0 [pii] 10.1016/j.biocel.2007.09.006 (2008).
- 221 Itoh, S. & ten Dijke, P. Negative regulation of TGF-[beta] receptor/Smad signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 176-184 (2007).
- 222 Matsuzaki, K. Smad phosphoisoform signaling specificity: the right place at the right time. *Carcinogenesis*, doi:10.1093/carcin/bgr172 (2011).
- 223 Browne, J. A., Liu, X., Schnaper, H. W. & Hayashida, T. Serine-204 in the linker region of Smad3 mediates the collagen-I response to TGF-beta in a cell phenotype-specific manner. *Exp Cell Res*, doi:10.1016/j.yexcr.2013.07.013 (2013).
- 224 Funaba, M., Zimmerman, C. M. & Mathews, L. S. Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* **277**, 41361-41368, doi:10.1074/jbc.M204597200 M204597200 [pii] (2002).
- 225 Matsuura, I., Wang, G. N., He, D. M. & Liu, F. Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry* **44**, 12546-12553 (2005).
- 226 Guo, X. *et al.* Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF-signaling. *Genes Dev* **22**, 106-120, doi:22/1/106 [pii] 10.1101/gad.1590908 (2008).
- 227 Wang, G., Matsuura, I., He, D. & Liu, F. Transforming Growth Factor-b-inducible Phosphorylation of Smad3. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 9663-9673, doi:10.1074/jbc.M809281200 (2009).
- 228 Tang, L. Y. *et al.* Ablation of Smurf2 reveals an inhibition in TGF-beta signalling through multiple mono-ubiquitination of Smad3. *EMBO J* **30**, 4777-4789, doi:emboj2011393 [pii] 10.1038/emboj.2011.393 (2011).
- 229 Simonsson, M., Kanduri, M., Gronroos, E., Heldin, C. H. & Ericsson, J. The DNA binding activities of Smad2 and Smad3 are regulated by coactivator-mediated acetylation. *J Biol Chem* **281**, 39870-39880, doi:10.1074/jbc.M607868200 (2006).

- 230 Kim, S., Lim, J. H. & Woo, C. H. ERK5 inhibition ameliorates pulmonary fibrosis via regulating Smad3 acetylation. *Am J Pathol* **183**, 1758-1768, doi:10.1016/j.ajpath.2013.08.014 (2013).
- 231 Liu, L. *et al.* Smad2 and Smad3 have differential sensitivity in relaying TGFbeta signaling and inversely regulate early lineage specification. *Scientific reports* **6**, 21602, doi:10.1038/srep21602 (2016).
- 232 Guo, X. & Wang, X.-F. Signaling cross-talk between TGF-[beta]/BMP and other pathways. *Cell Res* **19**, 71-88 (2009).
- 233 Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-[beta] signaling. *Cell Res* **19**, 128-139 (2009).
- 234 Varady, G., Sarkadi, B. & Fatyol, K. TTRAP Is a Novel Component of the Non-Canonical TRAF6-TAK1 TGF-beta Signaling Pathway. *Plos One* **6** (2011).
- 235 Jung, S. M. *et al.* Smad6 inhibits non-canonical TGF-beta 1 signalling by recruiting the deubiquitinase A20 to TRAF6. *Nature Communications* **4** (2013).
- 236 Mu, Y., Gudey, S. K. & Landstrom, M. Non-Smad signaling pathways. *Cell and tissue research* **347**, 11-20, doi:10.1007/s00441-011-1201-y (2012).
- 237 Ravanti, L. *et al.* Transforming growth factor-beta induces collagenase-3 expression by human gingival fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 37292-37300 (1999).
- 238 Ravanti, L. *et al.* Expression of human collagenase-3 (MMP-13) by fetal skin fibroblasts is induced by transforming growth factor beta via p38 mitogen-activated protein kinase. *FASEB J* **15**, 1098-1100 (2001).
- 239 Harper, E. G., Alvares, S. M. & Carter, W. G. Wounding activates p38 map kinase and activation transcription factor 3 in leading keratinocytes. *J Cell Sci* **118**, 3471-3485, doi:118/15/3471 [pii] 10.1242/jcs.02475 (2005).
- 240 Selvamurugan, N., Kwok, S., Alliston, T., Reiss, M. & Partridge, N. C. Transforming growth factor-beta 1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2. *J Biol Chem* **279**, 19327-19334, doi:10.1074/jbc.M314048200 (2004).

- 241 Kang, Y., Chen, C. R. & Massague, J. A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* **11**, 915-926, doi:S1097276503001096 [pii] (2003).
- 242 Nakagawa, T. *et al.* Differential regulation of VEGF by TGF-beta and hypoxia in rat proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F658-664, doi:10.1152/ajprenal.00040.2004 (2004).
- 243 Singer, A. J. & Clark, R. A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* **341**, 738-746, doi:10.1056/NEJM199909023411006 (1999).
- 244 Greenhalgh, D. G. Models of wound healing. *J Burn Care Rehabil* **26**, 293-305, doi:00004630-200507000-00001 [pii] (2005).
- 245 Dubertret, L. Reconstruction of the human skin equivalent in vitro: a new tool for skin biology. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society* **3**, 144-148 (1990).
- 246 Grinnell, F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* **13**, 264-269 (2003).
- 247 Poumay, Y. & Coquette, A. Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Archives of dermatological research* **298**, 361-369, doi:10.1007/s00403-006-0709-6 (2007).
- 248 Mouse Genome Sequencing, C. *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562, doi:10.1038/nature01262 (2002).
- 249 Okazaki, Y. *et al.* Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* **420**, 563-573, doi:10.1038/nature01266 (2002).
- 250 McBrearty, B. A., Clark, L. D., Zhang, X. M., Blankenhorn, E. P. & Heber-Katz, E. Genetic analysis of a mammalian wound-healing trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 11792-11797 (1998).
- 251 Colwell, A. S., Krummel, T. M., Kong, W., Longaker, M. T. & Lorenz, H. P. Skin wounds in the MRL/MPJ mouse heal with scar. *Wound Repair Regen* **14**, 81-90 (2006).
- 252 Lindblad, W. J. Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **19**, 1087-1096, doi:10.1163/156856208784909390 (2008).

- 253 Wong, V. W., Sorkin, M., Glotzbach, J. P., Longaker, M. T. & Gurtner, G. C. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 969618, doi:10.1155/2011/969618 (2011).
- 254 Zhu, K. Q. *et al.* The female, red Duroc pig as an animal model of hypertrophic scarring and the potential role of the cones of skin. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries* **29**, 649-664 (2003).
- 255 Bode, G. *et al.* The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **62**, 196-220, doi:10.1016/j.vascn.2010.05.009 (2010).
- 256 Kvetina, J., Svoboda, Z., Nobilis, M., Pastera, J. & Anzenbacher, P. Experimental Goettingen minipig and beagle dog as two species used in bioequivalence studies for clinical pharmacology (5-aminosalicylic acid and atenolol as model drugs). *General physiology and biophysics* **18 Spec No**, 80-85 (1999).
- 257 Longaker, M. T. & Adzick, N. S. The biology of fetal wound healing: a review. *Plast Reconstr Surg* **87**, 788-798 (1991).
- 258 Adzick, N. S. & Lorenz, H. P. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Annals of surgery* **220**, 10-18 (1994).
- 259 Roy, S. & Lévesque, M. Limb Regeneration in Axolotl: Is It Superhealing? *TSW Development & Embryology* **1**, 12-25 (2006).
- 260 Wallace, H. *Vertebrate Limb Regeneration*. (John Wiley and Sons, 1981).
- 261 Goss, R. J. *Principles of Regeneration*. (Academic Press, 1969).
- 262 Whited, J. L., Lehoczky, J. A. & Tabin, C. J. Inducible genetic system for the axolotl. *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:10.1073/pnas.1211816109 (2012).
- 263 Monaghan, J. R. *et al.* Microarray and cDNA sequence analysis of transcription during nerve-dependent limb regeneration. *BMC Biol* **7**, 1 (2009).
- 264 Levesque, M. *et al.* Transforming growth factor: Beta signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PLoS ONE* **2**, e1227 (2007).
- 265 Villiard, E. *et al.* Urodele p53 tolerates amino acid changes found in p53 variants linked to human cancer. *BMC Evol Biol* **7**, 180, doi:1471-2148-7-180 [pii] 10.1186/1471-2148-7-180 (2007).

- 266 Brockes, J. P. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* **276**, 81-87 (1997).
- 267 Tanaka, E. M. & Reddien, P. W. The cellular basis for animal regeneration. *Developmental cell* **21**, 172-185, doi:10.1016/j.devcel.2011.06.016 (2011).
- 268 Dovi, J. V., Szpaderska, A. M. & DiPietro, L. A. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thrombosis and haemostasis* **92**, 275-280, doi:10.1267/THRO04080275 (2004).
- 269 Grose, R., Harris, B. S., Cooper, L., Topilko, P. & Martin, P. Immediate early genes *krox-24* and *krox-20* are rapidly up-regulated after wounding in the embryonic and adult mouse. *Dev Dyn* **223**, 371-378, doi:10.1002/dvdy.10064 (2002).
- 270 Laplante, A. F. *et al.* Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **46**, 1291-1301 (1998).
- 271 Stelnicki, E. J. *et al.* The human homeobox genes *MSX-1*, *MSX-2*, and *MOX-1* are differentially expressed in the dermis and epidermis in fetal and adult skin. *Differentiation; research in biological diversity* **62**, 33-41, doi:10.1046/j.1432-0436.1997.6210033.x (1997).
- 272 Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **122**, 103-111 (1993).
- 273 Ho, D. M. & Whitman, M. TGF-beta signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Dev Biol* **315**, 203-216 (2008).
- 274 Young, H. E., Bailey, C. F. & Dalley, B. K. Gross morphological analysis of limb regeneration in postmetamorphic adult *Ambystoma*. *Anat Rec* **206**, 295-306, doi:10.1002/ar.1092060308 (1983).
- 275 Armstrong, J. B. & Malacinski, G. M. *Developmental biology of the axolotl*. (Oxford University Press, 1989).
- 276 Dent, J. N. Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J. Morph.* **110**, 61-77 (1962).

- 277 Yokoyama, H. *et al.* Prx-1 expression in *Xenopus laevis* scarless skin-wound healing and its resemblance to epimorphic regeneration. *J Invest Dermatol* **131**, 2477-2485, doi:10.1038/jid.2011.223 (2011).
- 278 Menger, B. *et al.* AmbLOXe--an epidermal lipoxygenase of the Mexican axolotl in the context of amphibian regeneration and its impact on human wound closure in vitro. *Annals of surgery* **253**, 410-418, doi:10.1097/SLA.0b013e318207f39c (2011).
- 279 Szpaderska, A. M., Zuckerman, J. D. & DiPietro, L. A. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dent Res* **82**, 621-626, doi:10.1177/154405910308200810 (2003).
- 280 Garcia, G. R., Noyes, P. D. & Tanguay, R. L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacol Ther* **161**, 11-21, doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.009 (2016).
- 281 Monaghan, J. R. *et al.* Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration (Oxf)* **1**, 2-14, doi:10.1002/reg2.8 (2014).
- 282 Young, H. E., Bailey, C. F., Markwald, R. R. & Dalley, B. K. Histological analysis of limb regeneration in postmetamorphic adult *Ambystoma*. *Anat Rec* **212**, 183-194, doi:10.1002/ar.1092120213 (1985).
- 283 Iten, L. E. & Bryant, S. V. Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, rate, and stages. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* **173**, 263-282, doi:10.1007/bf00575834 (1973).
- 284 Han, M. *et al.* Limb regeneration in higher vertebrates: developing a roadmap. *Anat Rec B New Anat* **287**, 14-24, doi:10.1002/ar.b.20082 (2005).
- 285 Inman, G. J. *et al.* SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor-B Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular Pharmacology* **62**, 65-74, doi:10.1124/mol.62.1.65 (2002).
- 286 Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* **200**, 500-503, doi:10.1002/path.1427 (2003).
- 287 Zentella, A. & Massague, J. Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5176-5180 (1992).

- 288 Massague, J. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 169-178, doi:10.1038/35043051 (2000).
- 289 Overall, C. M., Wrana, J. L. & Sodek, J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem* **266**, 14064-14071 (1991).
- 290 Sehgal, I. & Thompson, T. C. Novel regulation of type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9 and -2) activities by transforming growth factor-beta1 in human prostate cancer cell lines. *Mol Biol Cell* **10**, 407-416 (1999).
- 291 Blavier, L. *et al.* TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell* **12**, 1457-1466 (2001).
- 292 Zhao, Y. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I and type II receptors are both required for TGF-beta-mediated extracellular matrix production in lung fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol* **150**, 91-97 (1999).
- 293 Attisano, L. & Wrana, J. L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* **296**, 1646-1647, doi:10.1126/science.1071809 296/5573/1646 [pii] (2002).
- 294 Massague, J. & Chen, Y. G. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* **14**, 627-644 (2000).
- 295 Wrana, J. L. & Attisano, L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 5-13 (2000).
- 296 Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-584, doi:10.1038/nature02006 (2003).
- 297 Zhang, Y., Feng, X., We, R. & Derynck, R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* **383**, 168-172, doi:10.1038/383168a0 (1996).
- 298 Neufeld, D. A. & Aulhouse, A. L. Association of mesenchyme with attenuated basement membranes during morphogenetic stages of newt limb regeneration. *Am J Anat* **176**, 411-421, doi:10.1002/aja.1001760404 (1986).
- 299 Neufeld, D. A. & Day, F. A. Perspective: a suggested role for basement membrane structures during newt limb regeneration. *Anat Rec* **246**, 155-161, doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199610)246:2<155::AID-AR1>3.0.CO;2-0 [pii]

- 10.1002/(SICI)1097-0185(199610)246:2<155::AID-AR1>3.0.CO;2-0 (1996).
- 300 Neufeld, D. A., Day, F. A. & Settles, H. E. Stabilizing role of the basement membrane and dermal fibers during newt limb regeneration. *Anat Rec* **245**, 122-127, doi:10.1002/(SICI)1097-0185(199605)245:1<122::AID-AR17>3.0.CO;2-R [pii] 10.1002/(SICI)1097-0185(199605)245:1<122::AID-AR17>3.0.CO;2-R (1996).
- 301 Nomura, M. & Li, E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* **393**, 786-790, doi:10.1038/31693 (1998).
- 302 Sirard, C. *et al.* The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes Dev* **12**, 107-119 (1998).
- 303 Waldrip, W. R., Bikoff, E. K., Hoodless, P. A., Wrana, J. L. & Robertson, E. J. Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo. *Cell* **92**, 797-808 (1998).
- 304 Weinstein, M. *et al.* Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9378-9383 (1998).
- 305 Zhu, Y., Richardson, J. A., Parada, L. F. & Graff, J. M. Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell* **94**, 703-714 (1998).
- 306 Datto, M. & Wang, X. F. The Smads: transcriptional regulation and mouse models. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 37-48 (2000).
- 307 Flanders, K. C. *et al.* Interference with transforming growth factor-beta/ Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin. *Am J Pathol* **163**, 2247-2257 (2003).
- 308 Falanga, V. *et al.* Full-thickness wounding of the mouse tail as a model for delayed wound healing: accelerated wound closure in Smad3 knock-out mice. *Wound Repair Regen* **12**, 320-326, doi:10.1111/j.1067-1927.2004.012316.x (2004).
- 309 Ashcroft, G. S. & Roberts, A. B. Loss of Smad3 modulates wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 125-131 (2000).
- 310 Junqueira, L. C., Bignolas, G. & Brentani, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* **11**, 447-455 (1979).

- 311 Junqueira, L. C., Cossermelli, W. & Brentani, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* **41**, 267-274 (1978).
- 312 Kiraly, K. *et al.* Specimen preparation and quantification of collagen birefringence in unstained sections of articular cartilage using image analysis and polarizing light microscopy. *Histochem J* **29**, 317-327 (1997).
- 313 Poschl, E. *et al.* Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* **131**, 1619-1628, doi:10.1242/dev.01037 (2004).
- 314 Smith, J. J. & Voss, S. R. Gene order data from a model amphibian (*Ambystoma*): new perspectives on vertebrate genome structure and evolution. *BMC genomics* **7**, 219, doi:10.1186/1471-2164-7-219 (2006).
- 315 Kuo, Y. C. *et al.* Transforming growth factor-beta induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Int J Cancer* **124**, 2568-2576, doi:10.1002/ijc.24263 (2009).
- 316 Gomes, L. R., Terra, L. F., Wailemann, R. A., Labriola, L. & Sogayar, M. C. TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC cancer* **12**, 26, doi:10.1186/1471-2407-12-26 (2012).
- 317 Han, M.-J., An, J.-Y. & Kim, W.-S. Expression patterns of Fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl. *Developmental Dynamics* **220**, 40-48, doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999::aid-dvdy1085>3.0.co;2-8 (2001).
- 318 Burt, D. W. & Law, A. S. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res* **5**, 99-118 (1994).
- 319 Takahashi, M., Tsunoda, T., Seiki, M., Nakamura, Y. & Furukawa, Y. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* **21**, 5861-5867, doi:10.1038/sj.onc.1205755 (2002).
- 320 Knauper, V. *et al.* The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem* **272**, 7608-7616 (1997).

- 321 Ravanti, L., Heino, J., Lopez-Otin, C. & Kahari, V. M. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 2446-2455 (1999).
- 322 Vascotto, S. G., Beug, S., Liversage, R. A. & Tsilfidis, C. Nvbeta-actin and NvGAPDH as normalization factors for gene expression analysis in limb regenerates and cultured blastema cells of the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *The International journal of developmental biology* **49**, 833-842, doi:10.1387/ijdb.052069sv (2005).
- 323 Kasibhatla, S. *et al.* Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis. *CSH Protoc* **2006**, doi:10.1101/pdb.prot4493 (2006).
- 324 Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A. & Shellman, Y. G. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* **5**, 12, doi:10.1186/1472-6750-5-12 (2005).
- 325 Guimond, J. C. *et al.* BMP-2 functions independently of SHH signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs. *BMC Dev Biol* **10**, 15 (2010).
- 326 Denis, J. F., Sader, F., Ferretti, P. & Roy, S. Culture and transfection of axolotl cells. *Methods in molecular biology* **1290**, 187-196, doi:10.1007/978-1-4939-2495-0_15 (2015).
- 327 Wahlestedt, C. *et al.* Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5633-5638, doi:97/10/5633 [pii] (2000).
- 328 Elmen, J. *et al.* LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* **452**, 896-899, doi:nature06783 [pii] 10.1038/nature06783 (2008).
- 329 Gupta, N. *et al.* A locked nucleic acid antisense oligonucleotide (LNA) silences PCSK9 and enhances LDLR expression in vitro and in vivo. *PLoS One* **5**, e10682, doi:10.1371/journal.pone.0010682 (2010).
- 330 Denis, J. F. *et al.* Activation of Smad2 but not Smad3 is required to mediate TGF-beta signaling during axolotl limb regeneration. *Development* **143**, 3481-3490, doi:10.1242/dev.131466 (2016).
- 331 Zajdel, R. W., Denz, C. R., Narshi, A., Dube, S. & Dube, D. K. Anti-sense-mediated inhibition of expression of the novel striated tropomyosin isoform TPM1kappa disrupts myofibril organization in embryonic axolotl hearts. *J Cell Biochem* **95**, 840-848, doi:10.1002/jcb.20456 (2005).

- 332 Satoh, A., Makanae, A., Nishimoto, Y. & Mitogawa, K. FGF and BMP derived from dorsal root ganglia regulate blastema induction in limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Dev Biol* **417**, 114-125, doi:10.1016/j.ydbio.2016.07.005 (2016).
- 333 Fei, J. F. *et al.* CRISPR-mediated genomic deletion of Sox2 in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration. *Stem cell reports* **3**, 444-459, doi:10.1016/j.stemcr.2014.06.018 (2014).
- 334 Fang, Y. *et al.* Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 13416-13421, doi:10.1073/pnas.1309810110 (2013).
- 335 Huang, G., Yan, H., Ye, S., Tong, C. & Ying, Q. L. STAT3 phosphorylation at tyrosine 705 and serine 727 differentially regulates mouse ESC fates. *Stem Cells* **32**, 1149-1160, doi:10.1002/stem.1609 (2014).
- 336 Wakahara, R. *et al.* Phospho-Ser727 of STAT3 regulates STAT3 activity by enhancing dephosphorylation of phospho-Tyr705 largely through TC45. *Genes Cells* **17**, 132-145, doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01575.x (2012).
- 337 Wang, G. *et al.* STAT3 selectively interacts with Smad3 to antagonize TGF-beta. *Oncogene* **35**, 4388-4398, doi:10.1038/onc.2015.446 (2016).
- 338 Lou, C. *et al.* Naringenin decreases invasiveness and metastasis by inhibiting TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *PLoS One* **7**, e50956, doi:10.1371/journal.pone.0050956 (2012).
- 339 Li, J. H. *et al.* Blockade of Endothelial-Mesenchymal Transition by a Smad3 Inhibitor Delays the Early Development of Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. *Diabetes* **59**, 2612-2624, doi:Doi 10.2337/Db09-1631 (2010).
- 340 Stuelten, C. H., Kamaraju, A. K., Wakefield, L. M. & Roberts, A. B. Lentiviral reporter constructs for fluorescence tracking of the temporospatial pattern of Smad3 signaling. *Biotechniques* **43**, 289-290, 292, 294 (2007).
- 341 Yun, M. H., Gates, P. B. & Brockes, J. P. Regulation of p53 is critical for vertebrate limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:10.1073/pnas.1310519110 (2013).

Annexe 1

Expériences supplémentaires : Moduler l'activité de Smad3

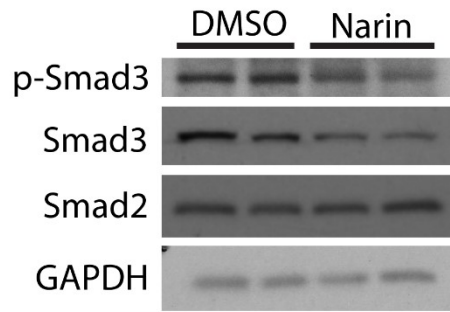
Les expériences menées jusqu'ici ne nous ont pas permis de réduire l'activation de Smad3 par plus de 50 %. Nous avons aussi testé un autre inhibiteur spécifique de Smad3, la Naringénine. Cet inhibiteur est connu pour réduire l'expression de Smad3, ainsi que la phosphorylation de Smad3^{161,338}. Nous avons traité les animaux 6h et avons vérifié le niveau de phosphorylation de Smad3, ainsi que l'expression de la protéine totale. Bien que nous observions une diminution d'expression pour p-Smad3 (Chapitre 2, Figure 16a, b), cette diminution est similaire à celle observée suite à un traitement avec le SIS3. D'autre part, la diminution de la protéine totale Smad3 causée par le traitement avec la Naringénine ne semble pas non plus affecter le processus, du moins au niveau phénotypique (Figure 16e, f). Nous avons aussi vérifié l'effet de cet inhibiteur sur la phosphorylation de Smad2 et avons observé que cette dernière n'était pas réduite par l'inhibiteur à 24h (Figure 16c, d). Cet inhibiteur est spécifique à Smad3, mais ne cause pas de défauts lors de la régénération. Ceci supporte que Smad3 ne soit pas essentiel particulièrement lors de la formation du blastème.

Afin de diminuer davantage la phosphorylation de Smad3, nous avons aussi tenté de combiner la Naringénine avec le SIS3. Le SIS3 est connu pour réduire la phosphorylation de Smad3 indépendamment de l'activation par TGF- β ; cette molécule peut aussi réduire la phosphorylation de Smad3 stimulée par les AGE³³⁹. Puisque leur action n'est pas la même, nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation simultanée des deux inhibiteurs pourrait diminuer davantage cette phosphorylation. Les expériences que nous avons effectuées ont montré que la diminution maximale était d'environ 50 %. Puisque ces inhibiteurs ont des effets systémiques qui peuvent être nocifs, nous avons acheminé l'inhibiteur pharmacologique SIS3 à l'aide d'un micro-injecteur directement au site de l'amputation en utilisant une dose plus élevée pour réduire davantage la phosphorylation de Smad3. Des animaux de 5cm ont été injectés 24h avant l'amputation et directement avant l'amputation 1 μ l de 25 μ M de SIS3 ou 50 μ M de SIS3. Dans les deux cas, l'inhibition de la phosphorylation n'est pas supérieure à celle observée en

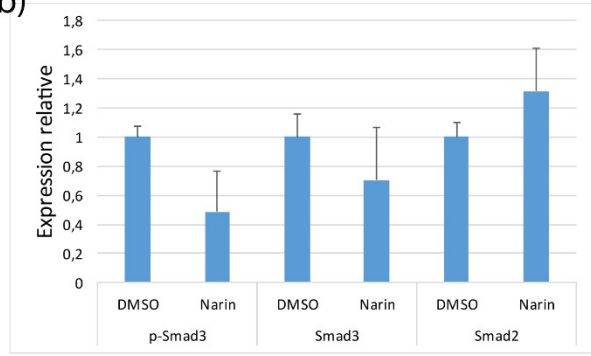
immergeant l'animal dans un milieu contenant 5µM de l'inhibiteur (figure 31a, b). Cette approche ne permet donc pas de réduire davantage l'activation de Smad3 *in vivo*.

D'autre part, nous avons tenté de mesurer l'activité de Smad3 *in vivo* à l'aide d'un rapporteur luciférase, CAGA₁₂lux, spécifique à Smad3³⁴⁰. Comme nous l'avons montré dans la figure supplémentaire 4 du chapitre 2, ce rapporteur fonctionne bien dans les cellules d'axolotl. Il a aussi été montré qu'une approche de mesure avec un rapporteur luciférase est possible *in vivo*. Une approche similaire a été utilisée pour mesurer l'activité de p53 dans la patte en régénération de l'axolotl³⁴¹. Malheureusement, nous n'avons pas mesuré d'activation de notre rapporteur luciférase, mais nous avons mesuré de l'activité pour le rapport b-globine rénilla luciférase (figure 31c). Ceci confirme encore une fois que l'activité de Smad3 est minime lors du processus de régénération.

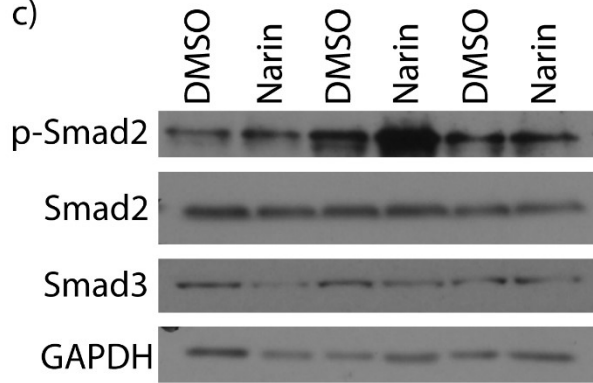
a)



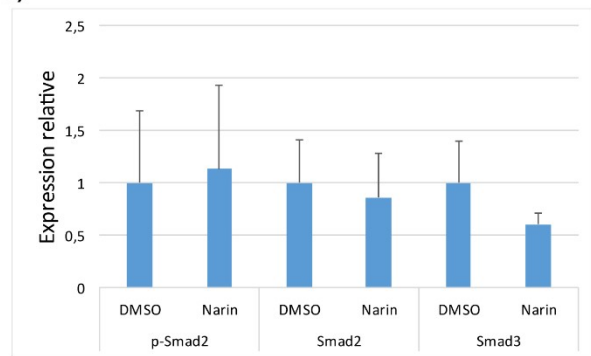
b)



c)



d)

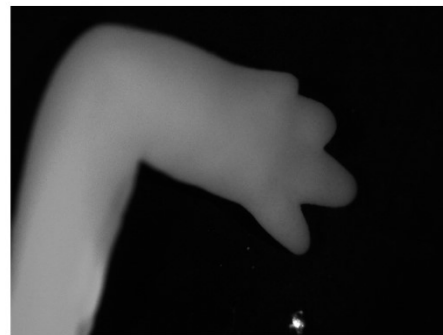


e)



DMSO 21jours

f)



Narin 35µM 21jours

Figure 31. Les traitements avec la Naringénine réduisent l'expression de Smad3, mais n'affectent pas la régénération

Expériences visant à montrer que la Naringénine affecte spécifiquement l'expression de Smad3 *in vivo*. a) Traitement de 6h avec 35µM de Naringénine. 2n présentés en immunobuvardage de type Western. b) Quantification des expériences (n=4). L'expression de la protéine totale pour Smad3 et la phosphorylation de Smad3 sont réduites. c) Traitement de 24h avec 35µM de Naringénine. 3n présentés en immunobuvardage de type Western. b) Quantification des expériences (n=3). La phosphorylation de Smad2 n'est pas réduite par cet inhibiteur, mais l'expression de la protéine totale Smad3 est réduite. e-f) Exemple de pattes suite à un traitement. Il n'y a pas de différence marquée entre le contrôle DMSO (e) et la patte de l'animal traité avec 35µM de Naringénine (f) après 21 jours de traitements consécutifs.

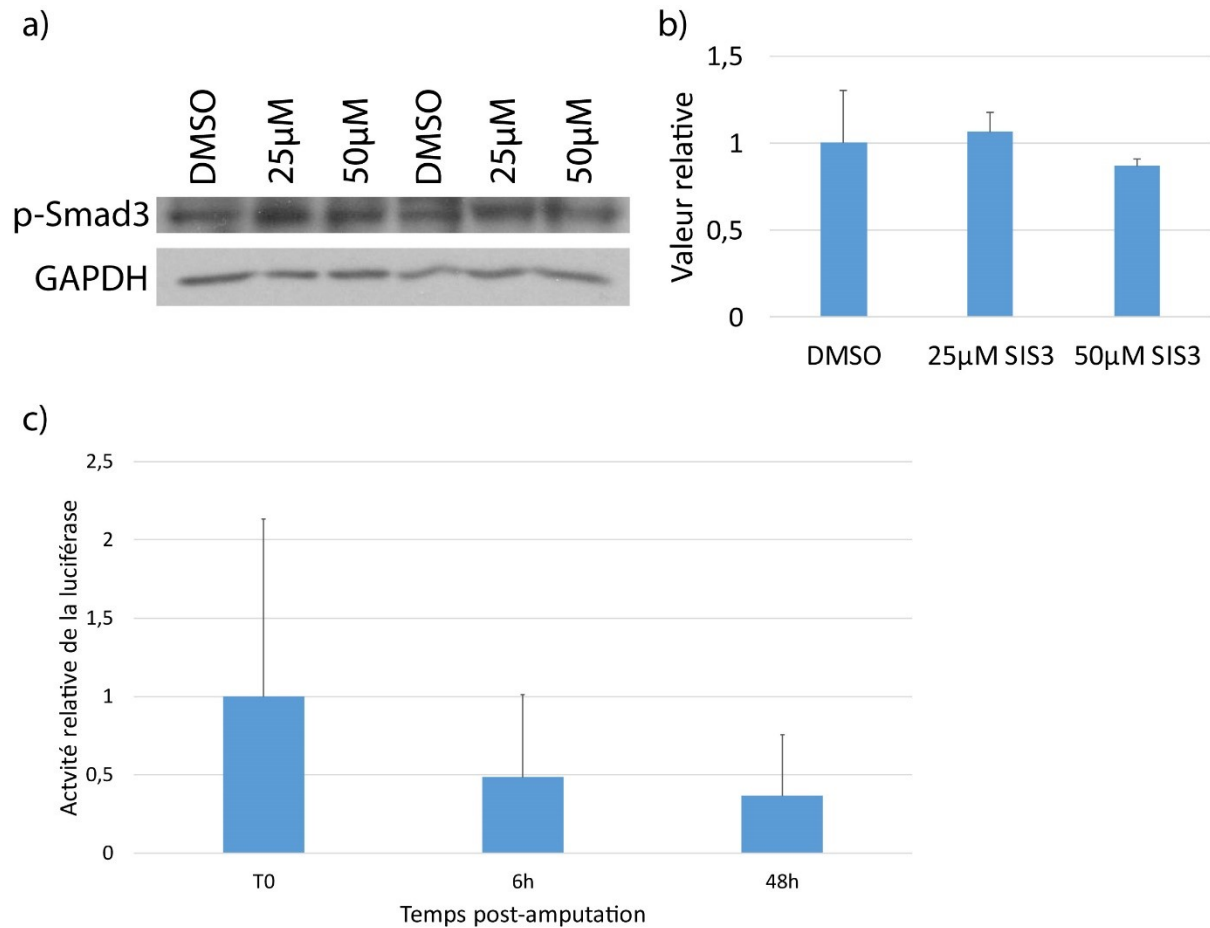


Figure 32. Injection *in vivo* de SIS3 et du rapporteur luciférase CAGA₁₂lux

a-b) Injection *in vivo* de SIS3. Des animaux ont été injectés 24h avant l'amputation et 1h avant l'amputation (1µl de solution PBS 0.7X et FastGreen 0,01 % avec 1 % de DMSO pour les contrôles et 25µM de SIS3 ou 50µM de SIS3 pour les animaux traités). n=2. a) Immunobuvardage de type Western. Les résultats montrent que l'injection n'est pas efficace pour diminuer la phosphorylation de Smad3. 2n sont présentés. b) Quantification des expériences présentées en (a). c) Activité relative de la luciférase *in vivo*. Injection et électroporation des rapporteurs 24h pré-amputation. Aucune activité n'est mesurée 6h ou 48h post-amputation. n=3.

Annexe 2

Expériences supplémentaires : Voie non canonique de p38

Étant donné que l'inhibition de la voie canonique de TGF- β n'empêche pas la fermeture de la plaie, nous avons identifié une seconde voie pouvant potentiellement être responsable de la fermeture de la plaie en absence de la signalisation canonique de TGF- β .

Nous avons mesuré l'expression du gène ATF3, connu pour son rôle dans la fermeture des plaies. Ce gène est régulé par une voie non canonique de TGF- β et implique une interaction entre p38 et Smad3²³⁹. Ce gène est exprimé fortement à 6h pa (Figure 33a) et son expression diminue par la suite. Suite à un traitement avec 25 μ M de SB-431542, l'expression d'ATF3 n'est pas affectée et la plaie ferme de manière normale. Il est plausible que la fermeture de la plaie soit contrôlée, en partie, par cette voie non canonique de TGF- β . Nous avons donc testé un inhibiteur de p38, le SB-203580. À une concentration de 50 μ M, l'inhibiteur est capable de réduire de manière dose dépendante la phosphorylation de p38 (figure 33b). Cependant, aucun effet n'est observable lors de la fermeture de la plaie ou même au niveau du processus de régénération (Figure 33). Il est possible que les voies canoniques et non-canoniques participent ensemble à la fermeture de la plaie. Une tentative de blocage simultané de ces deux voies pourrait être tentée afin de mieux comprendre ce processus.

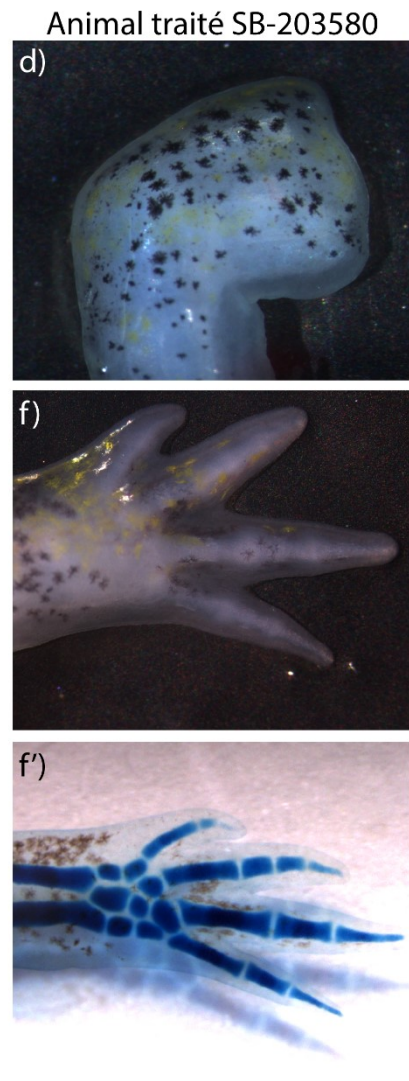
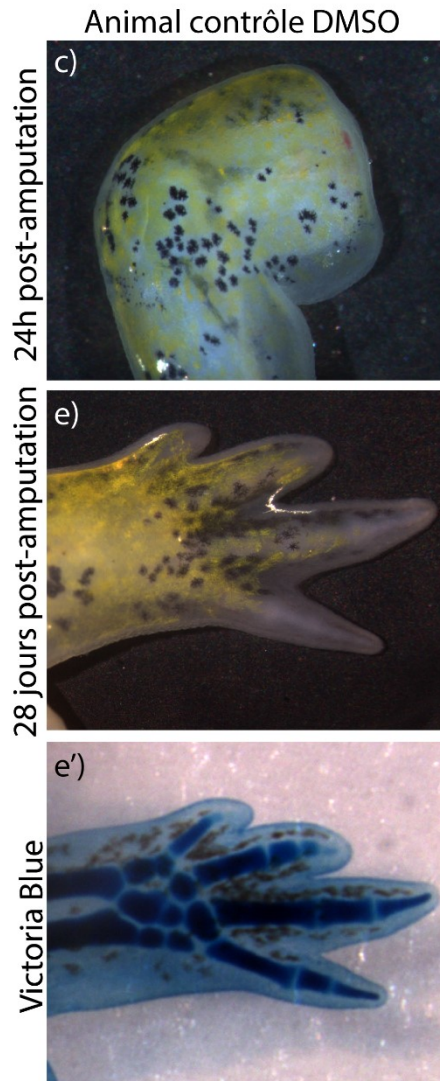
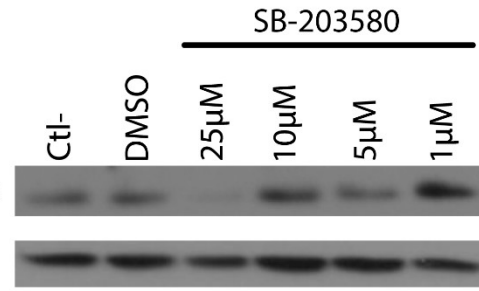
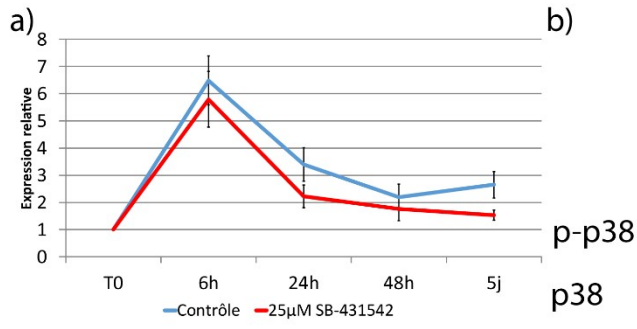


Figure 33. Rôle de la voie non canonique p38 lors de la fermeture de la plaie

a) PCR semi-quantitative sur gel. L'expression de ATF3 est augmentée rapidement (6h post-amputation) et rediminue rapidement. Le traitement avec le SB-431542 n'affecte pas son expression. n=4. b) Immunobuvardage de type Western. Traitement d'embryons entiers avec l'inhibiteur de p38 SB-203580. La phosphorylation de p38 est affectée de manière dose dépendante. n=2. c-f') Traitement avec le SB-203580 d'animaux amputés. On voit que la plaie est fermée après 24h dans l'animal contrôle (c) et dans l'animal traité (d). L'inhibiteur ne semble pas affecter la régénération (f) comparativement au contrôle (e) après 28 jours de traitement. Le cartilage se forme normalement dans l'animal contrôle (e') et dans l'animal traité (f') comme l'on observe avec la coloration Victoria blue du cartilage. n=3