

Université de Montréal

**Étude de l'implication des voies non-canoniques de TGF- β
durant la régénération de la patte chez l'axolotl**

par Fadi Sader

Département de biochimie et médecine moléculaire
Faculté de Médecine

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

Avril, 2019

© Fadi Sader, 2019

Résumé

La force de la recherche fondamentale réside dans le transfert des découvertes à de réels problèmes humains, qu'ils soient médicaux, sociaux ou pratiques. Généralement, cette recherche débute par la compréhension de ce problème. L'humain a une capacité de guérison qu'on peut définir comme rapide, mais qui réside plus dans le rafistolage que dans la qualité de la guérison. Si la blessure en question est le moins grave, généralement, le corps humain est capable de guérir afin de maintenir l'organisme en vie, toutefois la fonction n'est pas toujours rétablie. Par exemple, dans le cas d'une amputation à un membre, la guérison va se faire par une cicatrice et former un moignon, rendant la partie amputée non fonctionnelle. Le laboratoire du Dr Roy étudie la régénération et la guérison sans cicatrice chez un modèle qui le fait de manière phénoménale, l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Comprendre la signalisation qui permet à cet animal de régénérer parfaitement est une étape importante pour nous permettre de transférer ces découvertes à des traitements chez l'humain.

Notre modèle de régulation des voies de signalisation dans le processus de régénération met la cytokine TGF- β au cœur de notre recherche. Cette protéine est responsable de la formation du blastème, en permettant la migration et la prolifération suite à une amputation. Notre recherche a permis de montrer que lors de la première phase de la régénération, TGF- β active SMAD2 et SMAD3, mais que le processus de guérison passe par SMAD2 puisque le niveau de SMAD3 est très faible. De plus, en bloquant uniquement SMAD3, la régénération s'opère normalement. L'importance de TGF- β pour la formation du blastème est solidement démontrée. Par contre, son rôle pour la fermeture de plaie n'a pas encore été déterminé.

La fonction de TGF- β est associée à une multitude de processus dont celui des transitions épithéliales mésenchymateuses (EMT). Ce processus est caractérisé par des changements phénotypiques de cellules épithéliales leur permettant de migrer. Les EMTs s'opèrent lors du développement, de la progression du cancer et durant la guérison. Nous avons donc tenté de comprendre comment les EMTs pouvaient jouer un rôle dans la régénération de la patte et comment TGF- β pouvait influencer la chose.

Durant mon doctorat, nous avons déterminé que les EMTs étaient associées à la fermeture de la plaie, une étape indispensable à la régénération. De plus, leur régulation serait dépendante en partie de TGF- β . La fermeture de la plaie serait dépendante de la voie TGF- β /SMAD (connue comme la voie canonique) et de la voie TGF- β /p38/JNK (une des voies non-canoniques). Nous avons aussi montré que les voies p38 et JNK sont importantes pour la progression du blastème, et ce de manière indépendante de TGF- β .

Les résultats obtenus durant cette thèse nous permettent de mieux comprendre le processus de régénération parfaite.

Mots-clés : Axolotl, régénération, signalisation, TGF- β , MAPK

Abstract

The strength of basic research lies in the ability to translate discoveries to real human problems, whether they are medical, social or practical. Generally, research begins with a problem that needs to be solved. Humans have a healing capacity that can be defined as rapid, but resides more in repairing promptly than in quality healing. If the injury in question is not life threatening, usually the human body is able to heal in order to keep the organism alive, but the function is not always restored. For example, in the case of an amputation the healing will be done by scar formation, and will form a stump rendering the amputated part non-functional. Our lab studies regeneration and scar-free healing in a model that does it phenomenally well, the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Understanding the signaling that allows this animal to regenerate perfectly may allow us to transfer these discoveries to treatments for humans.

Our signaling regulatory model of the regeneration process puts the cytokine TGF- β at the heart of our research. This protein is responsible for blastema formation, by allowing migration and proliferation following the amputation. Our research has shown that during the first phase of regeneration, TGF- β activates SMAD2 and SMAD3, and that the healing process mainly goes through SMAD2, since the level of SMAD3 is very low. Also, by only blocking SMAD3, regeneration proceeds normally. The importance of TGF- β for the formation of the blastema is now very well demonstrated, however, its role in wound closure has not yet been determined.

The function of TGF- β is associated with a multitude of processes including epithelial to mesenchymal transitions (EMT). This process is characterized by phenotypic changes of epithelial cells allowing them to migrate. EMTs occur during development, cancer progression and during wound healing. We therefore tried to understand how EMTs could play a role in the regeneration of the limb and how TGF- β could influence it.

During my Ph.D., we determined that EMTs were associated with wound closure, an essential step to regeneration. In addition, their regulation is dependent in part on TGF- β . Wound closure is dependent of the TGF- β /SMAD pathway (known as the canonical pathway) and the

TGF- β /p38/JNK pathway (one of the non-canonical pathways). Additionally, we showed that p38 and JNK are essential for blastema progression, and in this case, independently of TGF- β .

The results obtained during this thesis provide a better understanding of what signaling pathway allows perfect regeneration in axolotl.

Keywords: Axolotl, regeneration, signaling, TGF- β , MAPK

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
1-Introduction.....	1
1.1 Modèles de régénération.....	1
1.1.1 Les Invertébrés.....	2
1.1.2 Mammifères.....	2
1.1.3 Lézard (gecko).....	3
1.1.4 Têtard de xénope.....	3
1.1.5 Poisson-zèbre.....	4
1.1.6 Salamandres.....	5
1.2 Régénération de la patte chez la salamandre.....	7
1.2.1 Vue d'ensemble.....	7
1.2.2 Phase de préparation.....	10
1.2.3 Phase de redéveloppement.....	14
1.3 Guérison de la peau chez les mammifères vs axolotl (sans cicatrice).....	15
1.4 Signalisation clé, la voie des TGF- β	19
1.4.1. Mécanisme de la voie canonique SMAD.....	19
1.4.2 La voie canonique SMAD durant la guérison.....	19
1.4.3 Mécanisme de la voie non-canonique TAK1.....	20
1.4.4 La voie non-canonique TAK1 durant la guérison.....	21
1.5 La signalisation dans le contexte de la régénération.....	24
1.5.1 Générale (p53, Wnt, ERK).....	24

1.5.2	Signalisation des TGF- β	25
1.5.3	Signalisation de p38 et JNK (MAPK)	27
1.6	Transitions épithéliaux mésenchymateuses (EMT)	29
1.6.1	Concept général	29
1.6.2	Les trois types de EMT	31
1.6.3	Voies de signalisation impliquées dans les EMT	34
1.6.4	EMT dans la régénération ?	36
1.7	Objectifs et hypothèses	37
2-	Chapitre 1 - Article 1	38
2.1	Mise en contexte	39
2.2.	Contribution des auteurs	40
2.3	Texte de l'article - Epithelial to mesenchymal transition is mediated by both TGF- β canonical and non-canonical signaling during axolotl limb regeneration	41
2.3.1	Abstract	41
2.3.2	Introduction	41
2.3.3	Results	45
2.3.4	Discussion	62
2.3.5	Material and Methods	65
2.3.6	Acknowledgements:	69
2.3.7	Competing interests:	69
2.3.8	Author contributions:	69
2.3.9	Funding	69
2.3.10	Additional Information	69
2.3.11	Supplementary information	73
3 –	Chapitre 2 - Article 2	78
3.2.	Contribution des auteurs	79
3.2	Mise en contexte	80
3.3	Texte de l'article - JNK and p38 are involved in blastema progression independently of TGF- β during axolotl limb regeneration	81
3.3.1	Abstract	81

3.3.2 Introduction.....	81
3.3.3 Results.....	83
3.3.4 Discussion.....	92
3.3.5 Material and methods.....	94
3.3.6 Acknowledgements.....	95
3.3.7 Competing interests.....	96
3.3.8 Author contributions.....	96
4 – Discussion.....	97
4.1 Réépithélialisation chez les animaux capables de régénération.....	97
4.2 EMT dans la migration des kératinocytes et le développement de la patte.....	98
4.3 Voies de signalisation nécessaires à la fermeture de la plaie.....	99
4.3.1 Autres voies non canoniques de TGF- β	100
4.3.2 Signalisation autre que TGF- β	100
4.4 Initiation vs vitesse de fermeture.....	102
4.5 JNK et p38 : fonction pour les deux ou compensation.....	103
4.6 Dépendance de TGF- β limitée à la phase de préparation.....	104
4.7 Modèle pour la régénération.....	105
5 - Conclusion.....	108
Bibliographie.....	i
Annexe 1 - Effet des doses élevées de SB-431542 sur la fermeture de la plaie.....	xv
Présentation.....	xv
Résultats.....	xvi
Les doses élevées de SB-431542 ont un certain effet inhibiteur sur l'expression des marqueurs EMT.....	xvi
Effet de hautes doses de SB-431542 sur la fermeture de la plaie.....	xviii
Annexe 2 – Article de Revue – Tissue regeneration in dentistry : Can salamander provide insight	xxi

Liste des tableaux

Tableau I.	Table 1. Details of the inhibitors used	71
Tableau II.	Table 2. List and sequence of the RT-qPCR primers	72
Tableau III.	Table 3. Sequence of primers used for probe synthesis	72

Liste des figures

Figure 1.	Photos d'animaux capables d'un certain niveau de régénération.	6
Figure 2.	Représentation graphique des différents stades de régénération suite à une amputation distale (au niveau de l'avant-bras), suivant la nomenclature de Tank en 1974.	9
Figure 3.	Représentation graphique de la fermeture de la plaie par migration des kératinocytes suite à l'amputation.	12
Figure 4.	Comparaison entre la guérison des plaies cutanée chez l'axolotl vs la guérison chez les mammifères suite à une blessure de 4mm.	18
Figure 5.	Schéma simplifié de la signalisation TGF- β /SMAD et TGF- β /p38/JNK.	23
Figure 6.	Représentation graphique simplifiée du processus de transitions épithéliaux mésenchymateuses.	30
Figure 7.	Figure 1. RT-qPCR on EMT markers during axolotl limb regeneration.	46
Figure 8.	Figure 2. <i>In situ</i> hybridization using tyramide signal amplification showing the expression of EMT markers during regeneration.	49
Figure 9.	Figure 3. JNK and p38 activation during axolotl limb regeneration.	51
Figure 10.	Figure 4. SB-431542, SB-203580 and SP-600125 treatments show no effect on wound closure.	55
Figure 11.	Figure 5. Effect of combinations of SB-431542, SB-230580 and SP-600125 on wound closure.	58
Figure 12.	Figure 6. Effect of 5Z-7-Oxozeanol on protein phosphorylation and wound closure.	61
Figure 13.	Supplementary Figure 1 <i>In situ</i> hybridization using tyramide showing the expression of Snail, Vimentin and N-Cadherin during regeneration.	73
Figure 14.	Supplementary Figure 2 <i>In situ</i> hybridization using tyramide showing the expression of E-Cadherin during regeneration.	74
Figure 15.	Supplementary Figure 3 Time course of normal wound closure following limb amputation in axolotls.	75
Figure 16.	Supplementary Figure 4 RT-qPCR for EMT markers on axolotl limb for animal treated with different combinations of SB-431542, SB-203580 and SP-600125.	76

Figure 17. Supplementary Figure 5 RT-qPCR for EMT markers on axolotl limb for animal treated with combination of SZ-7-Oxozeanol and SB-431542. 77

Figure 18. Expression of p-38 and p-JNK and effect of their inhibition on regeneration.. 84

Figure 19. Effect of inhibition of p38/JNK and TAK1 on regeneration. 86

Figure 20. Effect on blastema proliferation and apoptosis of the combination of SB-203580/SP600125 and 5Z-7-Oxozeanol..... 89

Figure 21. Effect of treatments on various gene expression. 91

Figure 22. Représentation de la signalisation des TGF- β s durant la régénération..... 107

Figure 23. Q-RT-PCR mesurant l'expression de marqueurs EMT dans des pattes d'axolotl 1h post-amputation..... xvii

Figure 24. Effet d'un traitement de 50 μ M et 100 μ M de SB-431542 sur la fermeture de la plaie suite à l'amputation de la patte d'axolotl. xix

Liste des abréviations

AEC: Cap apical épithélial

AER: Crête apicale ectodermique

AL-1: Axolotl limb-1

ARN: Acide ribonucléique

ARN: ARN interférent

ARNsh: ARN “single hairpin”

BMP: Bone morphogenic protein

CDFA-1: Core binding factor-1

COX: Cyclooxygénase

CTGF: Connective tissue growth factor

DKK: Dikkopf

DPA ou JPA: Days post-amputation ou jours post-amputation

EB: « Early Bud » ou bourgeon primaire

ECM : Matrice extracellulaire

ED: « Eary differentiation » stade de différenciation

EMT: Epithelial to mesenchymal transition

FACS: Fluorescence-activated cell sorter

FGF: Fibroblast growth factor

IL: Interleukin

IPSC: Induced pluripotent stem cells

JNK: c-Jun N-terminal kinase

KO: Knock-out

LB: « Late Bud » ou bourgeon tardif

MAPK: Mitogen activated protein kinases

MB: « Medium Bud » ou bourgeon moyen

MMP: Matrice metalloproteinase

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinases

PRXX1: Paired related homeobox 1

PTHRP: Parathyroid hormon related protein

ROS: Espèces reactive oxygénées

SHH: Sonic hedgehog

TAK1: TGF- β activated kinase

TGF- β : Transforming growth factor beta

TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase

TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

TRAF6: TNF receptor associated protein-8

T β RI : Récepteur TGF- β de type 1

T β RII : Récepteur TGF- β de type 2

α -SMA: alpha smooth muscle actin

Je dédie cette thèse à ma famille...merci pour tout

“If you can't fly then run, if you can't run then walk, if you can't walk then crawl, but by all means keep moving.” - Martin Luther King Jr.

“Look beyond what you see.” – Rafiki

“When we die, our bodies become the grass, and the antelope eat the grass. And so, we are all connected in the great Circle of Life” – Mufasa

“To live life, you need problems. If you get what you want the minute you want it, then what's the point of living?” — Jake the Dog

“Sometimes life is scary and dark. That is why we must find the light.” – BMO

Remerciements

Mon entrée dans le laboratoire de Stéphane était une de ces situations où j'étais à la bonne place au bon moment. Je me cherchais un laboratoire pour faire une maîtrise et Stéphane se cherchait un étudiant. C'est un peu par chance que le sujet de recherche, m'ai intéressé dès la première seconde.

Je pense que l'amour que j'ai eu pour ce sujet provient de toi Stéphane. Tu transmets ta passion aux autres et c'est pour cette raison que j'ai passé de si bonnes années au laboratoire. Je tiens à te remercier pour chaque petite chose que tu as faite pour moi. Des conversations qui pouvaient parler de pêches ou de politiques, ta porte toujours ouverte, les discussions scientifiques toujours constructives et surtout ta bonne humeur même dans les moments plus difficiles. C'est grâce à tout ça qu'aujourd'hui que je suis capable de rédiger ma thèse.

C'était très important pour moi de choisir un laboratoire avec un environnement léger et pas toujours trop sérieux, et heureusement je suis tombé sur le bon labo. Eric, J-F, Etienne et André je pense que vous êtes rapidement passé de collègues à amis. Que ce soit les soirées Diablo ou Magic, et bien sûr les arguments sur le hockey, vous avez certainement marqué ces dernières années. Je tiens à te remercier particulièrement J-F. Je souhaite à n'importe qui commence dans un laboratoire d'avoir un mentor comme tu as été pour moi. Je pense sincèrement que dans chacun des résultats que j'ai obtenus, même après ton départ, il y a un peu de toi.

Merci à toutes les autres personnes qui sont passées au labo. Chacun d'entre vous a laissé une petite marque à sa manière, Faranak, Hamza, Étienne2, Claudio et Jacob. Aux membres présents, c'est-à-dire Nasim, merci de m'avoir permis de finalement être un membre Sénior du labo.

Merci à mon comité de thèse, et tous les laboratoires qui nous ont aidés, particulièrement celui de Gerardo Ferbeyre et Antonio Nanci.

Si compléter un Doctorat c'est difficile, d'avoir de bons amis autour de sois, ça rend la tâche infiniment plus facile. Un gros merci à vous Aurélien, Charline, Lian, Max, Alix, Emmanuelle et Sam, parce que sans vous, sans les bières improvisées, les nombreuses activités et les conversations de milieux de corridor, je ne pense pas que la route aurait été si plaisante. Un merci spécial à Lian, tes visites au labo (presque quotidiennes) venaient toujours ensoleiller mes journées. Nos lunchs et trajets de métros vont énormément me manquer.

Un gros merci à vous Papa et Maman, de toujours nous supporter dans toutes les choix les plus farfelus qu'on a voulu prendre. Salim, Jad et Nadi, frères ou amis, ça dépend de nos conversations, mais merci pour votre support constant que je sais que j'aurais pour toute notre vie.

Finalement, merci à toi Jen. J'imagine que pour toi ce doctorat devait sembler interminable, mais dans ces 7 dernières années, tu ne m'as jamais mis de pression pour que j'arrête cette aventure. Tu m'as toujours supporté et tu m'as laissé faire mon chemin, pour ça, je ne te remercierai jamais assez.

1-Introduction

La première étape de la méthode scientifique consiste à poser la question à laquelle nous voulons répondre. Suivi de cette question, le scientifique trouve les outils qui lui permettront d'y répondre. L'outil le plus important pour débiter sa recherche est le modèle d'étude. La justification du choix du modèle est une étape clé dans le contexte d'une étude scientifique. Durant mon parcours au doctorat, la pertinence du modèle de recherche a toujours été au cœur de nos discussions. Le modèle parfait n'existe pas. Pour chacune des questions, il y a un ou plusieurs modèles plus appropriés qui permettront de trouver les réponses à cette fameuse question. Dans cette thèse, la grande question est de savoir quelle est la suite d'événements de signalisation cellulaire qui permettent à un membre ou organe de régénérer parfaitement suite à une blessure/amputation. Un des modèles les plus appropriés pour répondre à cette question est la salamandre, la championne de la régénération chez les vertébrés.

1.1 Modèles de régénération

Les cellules souches occupent une place importante de la médecine régénérative. Par contre, nous sommes encore bien loin de faire pousser des organes à partir de celles-ci. Bien que l'idée soit prometteuse, dans le cas des cellules souches embryonnaires, le plus grand frein à cette recherche demeure la question éthique et la source de ces cellules souches. Dans le cas de cellules souches pluripotentes induites (IPSC), la tâche est extrêmement ardue de passer de cellules à organe complet. Afin de contourner ces problèmes, il faut parfois simplement regarder dans la nature pour trouver des exemples et comment comprendre la régénération. Heureusement, il existe plusieurs modèles dans le règne animal qui ont déjà trouvé le secret de la régénération (Figure 1).

1.1.1 Les Invertébrés

Un premier exemple d'invertébré avec une capacité de régénération est le ver planaire. La régénération de ce dernier est possible grâce à la présence de néoblastes dans l'ensemble de l'organisme. Ces cellules pluripotentes confèrent au ver planaire sa capacité de régénération ¹.

Un des traits connus chez ce modèle est qu'il serait capable de se régénérer jusqu'à 279 fois, si une planaire est coupée 279 fois, chaque morceau formerait un animal distinct. Plusieurs études de signalisation ont été faites chez ce modèle le rendant particulièrement intéressant. Ceci est dû à la facilité à faire des « knock-down » à l'aide d'ARN interférent. Il suffit d'intégrer l'ARNi dans la nourriture du ver planaire ². Il s'agit d'un avantage de premier plan pour l'utilisation de ce modèle. La régénération du ver planaire est assez bien caractérisée. Suite à une blessure, une mince couche d'épithélium couvre la blessure en l'espace d'une trentaine de minutes, grâce à la contraction musculaire. Une augmentation de la prolifération de cellules néoblastiques est observée au niveau de la blessure et forme le blastème. Ce blastème se redifférencie en nouveaux tissus ¹.

Outre le ver planaire, il existe d'autres exemples d'invertébrés qui ont une capacité de régénération. L'hydre est un modèle relativement couramment utilisé en recherche. Le criquet, le concombre de mer, les échinodermes et le lancelet ont une certaine capacité de régénération ³.

1.1.2 Mammifères

La régénération chez les mammifères est extrêmement limitée. Par contre, certains modèles sont intéressants à étudier. L'exemple de jeunes enfants capables de régénérer leur bout de doigt est assez frappant, mais il faut quand même garder certaines réserves. La régénération est très limitée puisque la blessure ne peut pas dépasser la première phalange et cette capacité est perdue assez rapidement avec l'âge ⁴. Ceci dit, des laboratoires ont exploité cette faible capacité de régénération chez les mammifères. Des groupes de recherche ont essayé de comprendre la régénération du bout de doigt chez la souris. L'amputation doit se faire au niveau de la première phalange. Suite à l'amputation, l'épiderme guérit et les cellules osseuses mortes sont nettoyées

par des ostéoclastes. L'épithélium de guérison est ensuite complété et des cellules de la moelle osseuse et du derme forment un blastème. Ce blastème reformera le bout du doigt^{5,6}.

L'autre forme de régénération chez les mammifères est observée chez le petit rongeur *Acomys*. Le modèle de blessure généralement utilisé chez *Acomys* est un punch au niveau de l'oreille. Il s'agit d'un modèle de recherche communément utilisé en guérison de la plaie. Bien que certains parlent de lui comme un animal capable de régénération, c'est plutôt un mammifère avec une excellente capacité de guérison⁶.

1.1.3 Lézard (gecko)

L'autotomie est un processus par lequel un lézard, par contraction musculaire, va laisser tomber un bout de sa queue, suite à une menace. Ceci permet de distraire un prédateur qui le poursuit. Bien sûr, il peut se permettre de faire ainsi, car il peut régénérer ce bout de queue. Ainsi, certains ont pris avantage de ce modèle afin d'étudier la régénération. Bien que le lézard puisse reformer sa queue d'un point de vue fonctionnel, les éléments structuraux ne sont pas identiques à la queue d'origine⁷. La nouvelle queue ne contient pas de vertèbres (sont remplacées par du cartilage), le ganglion rachidien n'est pas restauré, et les muscles ne sont pas rétablis dans leur structure normale. Ultiment, la queue est de plus petite taille. Chez le gecko, il y a certaines ressemblances avec les autres modèles de régénération. Suite à la blessure, un épithélium de guérison est formé. Sous cet épithélium, un blastème prolifère et forme éventuellement la nouvelle queue⁷.

1.1.4 Têtard de xénope

Le xénope est une grenouille qui possède une capacité de régénération lorsqu'il est encore à l'état larvaire. Après la métamorphose de têtard en grenouille, il perd cette capacité. La queue du têtard est le modèle de prédilection. La régénération est séparée en trois phases, « early », « intermediate » et « late »⁸. La première phase est caractérisée par une guérison de la plaie en

réponse aux espèces oxygénées réactives ⁹. La présence d'une réaction inflammatoire est observée et nécessaire à cette étape ¹⁰. Par contre, il semblerait que la réponse inflammatoire doit être réduite et de courte durée pour que la régénération soit efficace. La deuxième phase englobe le processus de la formation du blastème ¹¹. La dernière phase est celle où tous les tissus sont rétablis, c.-à-d. muscles, cartilage, moelle épinière ⁸.

1.1.5 Poisson-zèbre

Le poisson-zèbre est un modèle très intéressant, car non seulement il a une assez bonne capacité de régénération, mais les outils de laboratoire pour ce modèle se sont développés de façon exponentielle dans les dernières décennies. La facilité à produire des animaux transgéniques (« knock-out »/ « knock-in ») rend ce modèle très utile ³. Bien que le poisson-zèbre puisse régénérer plusieurs structures, il existe deux modèles (organes) d'études prédominants chez le poisson-zèbre, c.-à-d. la régénération de la nageoire et de l'apex du cœur. Suite à une amputation de la nageoire, il y a une étape de fermeture de plaie rapide qui forme un épithélium de guérison. Ceci est suivi d'une étape de dédifférenciation et de prolifération de cellules du mésenchyme donnant naissance à un blastème. Le blastème va croître, se redifférencier, et former la nouvelle nageoire. La nageoire caudale est une structure ne contenant pas de muscle. Elle ne contient que des cellules du derme et un squelette ¹². De plus, si l'amputation se fait plus loin que la nageoire il n'y a pas de régénération.

La régénération du cœur est un modèle d'étude intéressant puisqu'il passe par ce qu'on appelle une cicatrice transitoire. Une blessure commune utilisée dans le domaine de la régénération du cœur est la cryo-blessure. De l'azote liquide est appliqué sur le cœur ce qui cause de la nécrose et de l'apoptose ¹³. Suite à la blessure, il y a apoptose des cellules des tissus et de la fibrose qui donne naissance à un caillot de fibrine. Cette cicatrice est nettoyée et donne place aux cardiomyocytes qui reforment le cœur.

Le poisson-zèbre est aussi utilisé comme modèle d'étude de la guérison de la peau. Il s'agit d'un modèle de guérison sans cicatrice. La guérison d'une blessure excisionnelle de pleine épaisseur chez cet animal est un bon modèle pour comprendre la guérison parfaite ¹⁴. La guérison du

poisson-zèbre débute avec une phase de réépithélialisation très rapide. Suite à une biopsie à l'emporte-pièce de 2mm, la blessure est réépithélialisée en 12h. Il y a la formation d'un caillot sanguin qui semble ne pas avoir de rôle dans le processus ¹⁴. Chez les mammifères, le caillot permet notamment de contribuer à la production de cytokines servant à la fermeture de la plaie. Tout comme chez les mammifères, l'inflammation dans ce genre de blessure est très présente ¹⁵. Des animaux qui expriment un marqueur de neutrophiles et de macrophages fluorescent montrent beaucoup d'inflammation au site de la blessure. Suivant le processus, il est presque impossible de distinguer le site initial de la blessure. ¹⁴. Plusieurs voies de signalisations ont été étudiées dans le contexte de la régénération chez le poisson-zèbre (TGF- β , JNK, Wnt, etc) ¹⁶⁻¹⁸.

1.1.6 Salamandres

Tous les modèles animaux ci-dessus ont une capacité de régénération ou sont capables d'une guérison parfaite (sans formation d'une cicatrice). Par contre, les salamandres sont vraiment les championnes de la régénération chez les vertébrés ^{3,19}. Bien que ce ne soit pas toutes les salamandres qui puissent régénérer (eg. Mudpuppy), celles qui le peuvent le font de manière remarquable. Outre la perfection du produit de la régénération, le fait que les salamandres soient des vertébrés tétrapodes est un avantage important de l'utilisation des salamandres comme modèle de recherche ³. D'un point de vue phylogénétique, ils sont plus proches de l'humain que les poissons ou les invertébrés décrits dans les sections précédentes. Le triton et le pleurodèle de Walzl sont des salamandres couramment étudiées, par contre, il s'agit de salamandres terrestres rendant leur entretien difficile en laboratoire (nécessité de terrariums) ³. L'axolotl, ou salamandre mexicaine, garde son état néoténique (ne se métamorphose pas) et demeure donc aquatique tout au long de sa vie. La simplicité d'entretien d'un modèle animal aquatique a fait de l'axolotl la salamandre ayant pris le plus de place dans le monde de l'étude de la régénération. Présentement, une dizaine de laboratoires l'utilisent comme modèle.

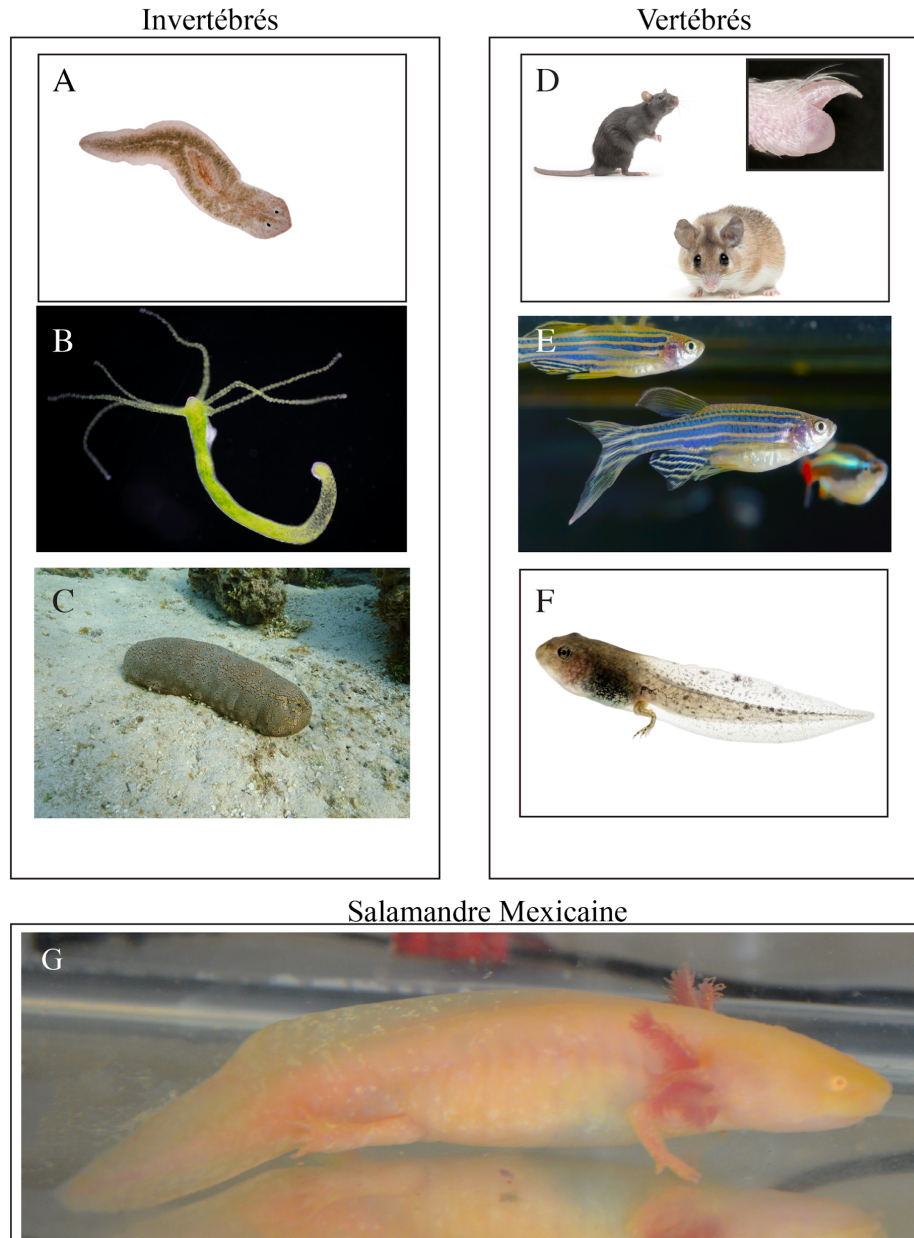


Figure 1. Photos d'animaux capables d'un certain niveau de régénération.

(A-C) Les invertébrés (A) le ver plantaire (B) l'hydre (C) le concombre de mer. (D-F) Les vertébrés. (D) Les mammifères (doigts de souris et Acomys), (E) le poisson-zèbre (F) le têtard de Xénope. (G) Les champions de la régénération, les salamandres (dans l'image l'axolotl).

1.2 Régénération de la patte chez la salamandre

Bien que l'axolotl puisse régénérer tous ses organes, le laboratoire a fait sa niche dans l'étude de régénération de la patte. La simplicité technique de l'amputation est la raison principale de ce choix. La facilité de la procédure permet d'avoir une reproductibilité presque parfaite dans le processus de régénération, le taux de réussite de régénération parfaite approche le 100% (observation faite au laboratoire). Le modèle de la patte est aussi un avantage, car d'un point de vue éthique, il est important de limiter les souffrances à l'animal. Une amputation au membre avant est pratiquement sans désagrément observable pour l'axolotl. Considérant les avantages qu'offre l'utilisation de la patte comme modèle, plusieurs groupes durant les dernières décennies ont choisi de s'en servir. Vu l'utilisation accrue du modèle, le processus a été très bien caractérisé d'un point de vue morphologique. Le processus peut être divisé en plusieurs stades distincts ²⁰.

Initialement, les stades étaient caractérisés visuellement (forme de la patte, caractéristique des cellules, présence de différents types cellulaires, etc.). Avec l'avancement de la biologie moléculaire, maintenant plusieurs marqueurs génétiques peuvent être associés à des stades/moments durant le processus de régénération. En plus des stades, le processus peut être séparé en deux grandes phases : la phase de préparation et celle de redéveloppement ²¹.

1.2.1 Vue d'ensemble

Suite à l'amputation, plusieurs événements de signalisation se mettent en marche, notamment par les cytokines stockées dans la matrice extracellulaire et relâchées suite à la blessure. Ceci permet de débiter la régénération. La première étape consiste en une fermeture de plaie excessivement rapide (entre 2h et 3h). Les kératinocytes au site de l'amputation migrent afin de couvrir la blessure. Une fois la plaie fermée par les kératinocytes, ces cellules forment ce qu'on appelle l'épithélium de guérison. Cet épithélium va proliférer et s'épaissir pour former le cap apical épithélial (AEC). Cette structure est le carrefour signalétique pour la régénération et qui permet d'enclencher les étapes suivantes du processus, la dédifférenciation des cellules au

niveau de la blessure (principalement le derme). Ces cellules dédifférenciées vont par la suite proliférer pour former le blastème, une masse de cellules dédifférenciées. En proliférant, ce blastème passe par trois stades, soit le bourgeon primaire (EB), le bourgeon moyen (MB) et le bourgeon tardif (LB), qui lui est distinct par son aplatissement. On commence à observer la condensation osseuse et l'indentation du premier doigt, une caractéristique du stade Palette (Pal). Par la suite, les cellules vont se différencier pour redonner les différents types cellulaires d'une patte normale, et nous observons les premiers signes de morphogénèse durant le stade de différenciation primaire (ED). Ceci se poursuit jusqu'à la complétion de la patte qui sera identique à celle avant l'amputation (Figure 2).

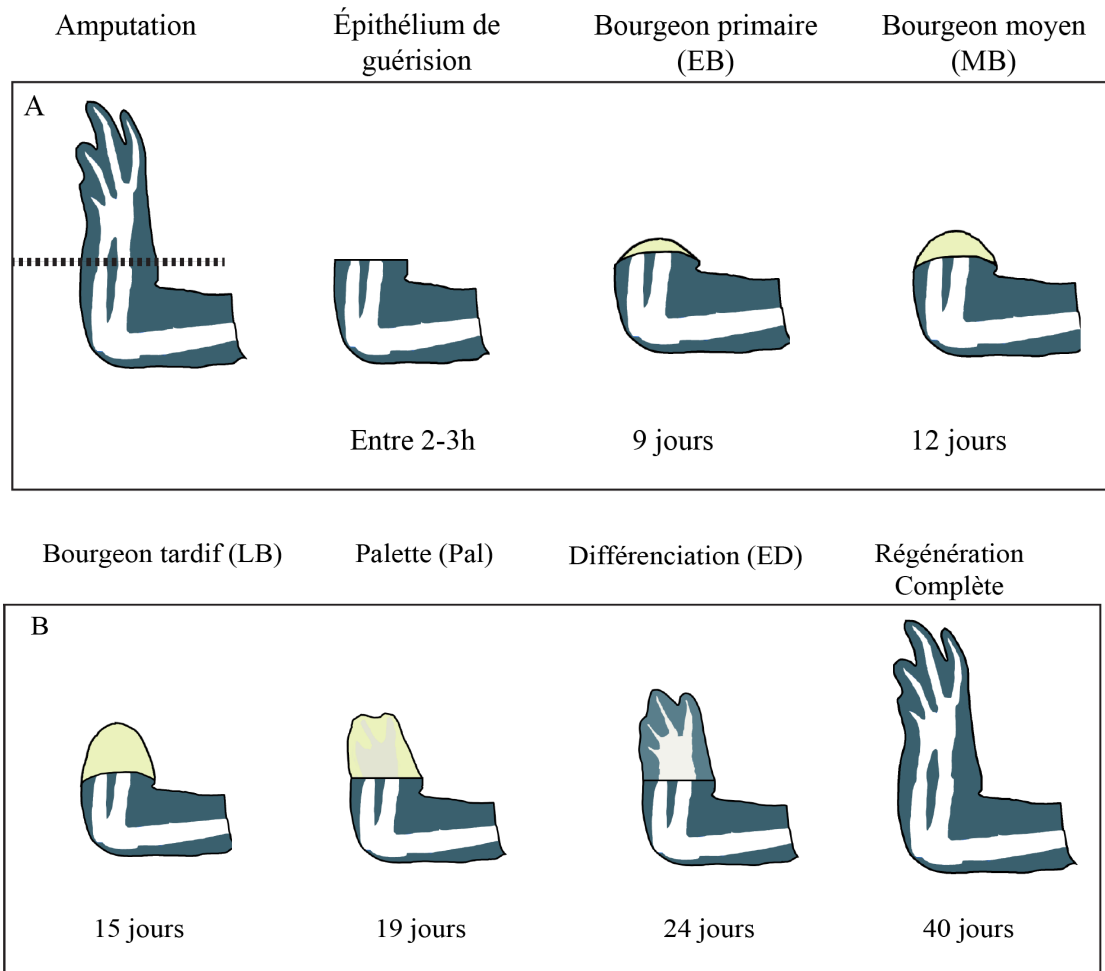


Figure 2. Représentation graphique des différents stades de régénération suite à une amputation distale (au niveau de l'avant-bras), suivant la nomenclature de Tank en 1974.

(A) La phase de préparation qui est caractérisée par la formation de l'épithélium de guérison et la dédifférenciation. Les cellules dédifférenciées prolifèrent formant le bourgeon primaire et éventuellement le bourgeon moyen. (B) La phase de redéveloppement commence par la phase de prolifération du blastème formant le bourgeon tardif. Au stade Palette, les os commencent à condenser et l'indentation du premier doigt est présente. L'étape de redifférenciation débute, et forme la nouvelle patte au stade de différenciation. Les temps de référence sont pour un animal d'environ 5cm.

1.2.2 Phase de préparation

Le moment exact de la séparation des deux phases du processus de régénération est sujet à discussion, mais de manière classique, du moment de l'amputation jusqu'au stade MB il s'agit de la phase de préparation. Du stade LB jusqu'à la fin, on parle de la phase de redéveloppement. Le stade LB correspond à la fin de la dépendance aux nerfs durant le processus²². La phase de préparation permet de mettre en place le blastème et la phase de redéveloppement. Il s'agit principalement d'une phase de guérison, de migration et de prolifération. On observe quelques similarités avec la guérison des plaies chez les mammifères. Suite à une amputation, nous observons l'activation de MMPs et un remodelage de la matrice extracellulaire. On observe une réponse immunitaire (bien que beaucoup moins intense que chez l'humain), une migration des fibroblastes et une dépendance des nerfs²². On semble observer des différences notables par rapport à l'humain. Chez l'axolotl, on ne détecte pas de myofibroblastes, il n'y a pas de dépôt de collagène et ultimement, elle ne forme pas de tissu cicatriciel²³.

1.2.2.1 Fermeture de plaie, formation de l'épithélium de guérison et l'AEC

La toute première étape du processus est la fermeture de la plaie par la migration des kératinocytes (étape qui est au cœur de cette thèse) formant l'épiderme de guérison. Suite à la fermeture, l'épiderme de guérison va s'épaissir par prolifération²¹. Ceci résulte en la formation de l'AEC, une structure indispensable au processus de régénération (Figure 3). Plusieurs études ont pu montrer son importance. Lorsque le membre amputé est inséré sur le flanc de l'animal, la blessure guérie et l'épithélium de guérison n'est pas formé au niveau du membre. Ceci empêche la régénération²⁴. Une autre expérience consistait à enlever mécaniquement l'épithélium de guérison. Le résultat de l'expérience : la régénération ne peut se produire. La procédure peut être faite plusieurs fois, et jamais un blastème ne sera formé²⁵. Ceci indique que la signalisation nécessaire au reste du processus se passe donc au niveau de l'AEC. Suite à l'amputation, un lambeau de peau peut être suturé, fermant ainsi la plaie complètement ou

partiellement. Conséquemment, la formation de l'épithélium de guérison ne se peut se produire puisque la migration des cellules épithéliales ne s'opère pas (empêchement par le lambeau de peau). La régénération est généralement inhibée ou un membre excentrique est formé²⁶. Toutes ces expériences indiquent l'importance de la migration des kératinocytes et la formation de l'épithélium de guérison. Chez les mammifères la séquence suite à une amputation est fortement différente puisque la plaie forme une cicatrice et la réépithélialisation complète de la plaie se fait plusieurs semaines après la blessure.

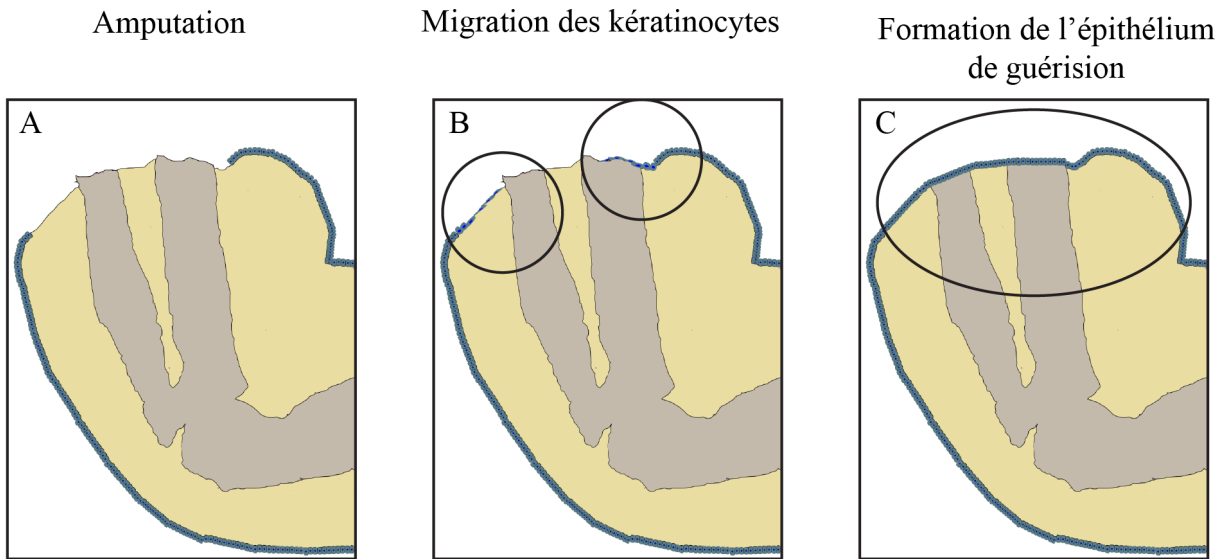


Figure 3. Représentation graphique de la fermeture de la plaie par migration des kératinocytes suite à l'amputation.

Il s'agit d'un point de vue d'une coupe sagittale d'une patte (A) Les kératinocytes avoisinant le site d'amputation n'ont pas bougé. (B) Les kératinocytes sont en train de migrer vers le centre de la plaie. (C) L'épithélium de guérison est formé et la migration des kératinocytes est terminée. Le processus prend entre 2h et 3h chez des animaux de 5cm.

1.2.2.2 Dédifférenciation, prolifération et formation du blastème

L'axolotl ne possède pas de bassin de cellules souches qui prolifèrent et qui donnent naissance au blastème lors d'amputation (comme chez le ver planaire par exemple). C'est accepté de manière générale que les cellules au niveau de la blessure (principalement du derme) se dédifférencient, bien que la démonstration n'eût jamais été faite d'un point de vue moléculaire. Quelques jours après l'amputation, les cellules perdent leurs caractéristiques spécifiques à leurs types cellulaires et prennent la forme de cellules rondes et dédifférenciées²¹. Dans les années 80, avec l'utilisation d'animaux diploïdes/triploïdes, il était possible de suivre les cellules. Une greffe de tissu d'un animal triploïde était faite sur un animal diploïde. Suite à l'amputation, il était possible de suivre les cellules triploïdes. Une greffe de peau d'un animal triploïde avait permis de montrer que 43% des cellules du blastème provenaient du derme. Ceci indiquait que les cellules du blastème provenaient des tissus matures de l'animal et donc inférait une dédifférenciation²⁷.

Récemment un article a été publié qui confirmait de manière plus moderne l'idée de dédifférenciation²⁸. Dans cet article les auteurs marquent les cellules du derme avec un anticorps anti-PRRX1, une protéine spécifique aux tissus conjonctifs (derme). Le tissu conjonctif est la source principale des cellules du blastème. Par FACS, ils séparent les cellules du derme (fluorescentes grâce au PRRX1) et font du séquençage d'ARN à une cellule à différents moments de la régénération. Ils ont fait de même pour une patte en développement à un stade comparable au blastème en régénération. Le séquençage a permis d'établir une signature d'expression génique des cellules du derme durant la régénération. Au début et à la fin du processus, la signature est celle d'un tissu conjonctif normal. Par contre, durant la régénération, suite à la formation du blastème la signature des cellules marquée s'apparente presque parfaitement aux cellules des pattes en développement embryonnaire. Ceci indique donc la présence d'une dédifférenciation²⁸.

Suivant leur dédifférenciation, les cellules vont proliférer. Cette prolifération va permettre l'accumulation des cellules pour former le blastème²⁸.

1.2.3 Phase de redéveloppement

Suite à la formation du blastème, le processus devient totalement indépendant des nerfs et la phase de redéveloppement peut débuter. Cette phase n'est pas une reprise complète du développement embryonnaire, par contre, on observe plusieurs similarités. L'expression de plusieurs gènes importants dans le développement est aussi retrouvée dans la régénération²².

1.2.3.1 Morphogénèse redifférenciation

La morphogénèse de la patte durant la régénération a beaucoup de similarités avec celle du développement, notamment avec l'expression des gènes qui y sont importants²². L'expression des gènes HoxA est un bon exemple. Les gènes HoxA (Gène homeobox) sont connus comme étant exprimés de manière proximodistale. Par exemple, le gène HoxA9 est exprimé dans la totalité du bourgeon du membre et HoxA13 est exprimé au point le plus distal. C'est d'ailleurs ce qui a été observé durant la régénération. Au stade LB, l'expression de HoxA9 est localisée dans la totalité du blastème, HoxA11 se retrouve dans une section plus distale et HoxA13 est limité au bout du blastème au niveau distal²⁹. Sonic Hedgehog est une protéine très étudiée dans le contexte du développement de la patte. Son expression localisée de manière très précise au niveau du bourgeon du membre est responsable du développement antéro-postérieur de la patte³⁰. Durant la régénération, SHH (Sonic Hedgehog) est localisé d'une manière limitée au niveau postérieur de la patte³¹. Une inhibition de sa signalisation par la Cycloamine cause une perte des éléments proximaux de la patte, et ce d'une manière dose dépendante. Une faible dose permet la formation de deux doigts tandis qu'une forte dose permet seulement la formation du doigt le plus antérieur³².

Sox9, un gène régulateur important de la chondrogenèse, est aussi exprimé durant le redéveloppement. Durant la reformation du squelette, l'expression du gène est observée en hybridation *in situ* « whole mount » au niveau des os en formation³³. Une inhibition des BMP (bone morphogenic protein) par le LDN-193189 cause aussi une diminution de l'expression de Sox9 (données non publiées). D'ailleurs plusieurs éléments du squelette sont manquants suite à un traitement au LDN-193189. Les gènes CBFA-1 (core binding factor), impliqués dans le

remodelage de l'os, et le PTHRP (parathyroid hormone related protein), impliqués dans la différenciation des chondrocytes ont aussi été détectés dans la patte en redéveloppement (données non publiées).

Pour ce qui est des muscles chez l'axolotl, le redéveloppement du muscle ne passe pas par le blastème. Une étude a montré que le nouveau muscle proviendrait de cellules satellites chez l'axolotl³⁴. Une observation intéressante est que dans le cas du triton, les muscles proviendraient de cellules dédifférenciées³⁴. Pax7 (paired box gene) un marqueur du phénomène est présent dans le blastème en redéveloppement chez l'axolotl, mais pas chez le triton³⁵.

1.3 Guérison de la peau chez les mammifères vs axolotl (sans cicatrice)

Chez l'axolotl, le modèle de guérisons de la peau (blessure de pleine épaisseur) est un très bon modèle pour comprendre l'absence de cicatrisation. De plus, l'axolotl est ce qu'on appelle un animal à peau serrée, il ne guérit pas par contraction de la peau. C'est semblable à ce qui est observé chez l'humain³. Afin de comprendre comment appliquer les connaissances acquises chez l'axolotl aux humains, il est important de comprendre les différences entre la réparation des tissus chez les deux espèces. Bien que les grandes étapes de guérison soient semblables, on observe des différences notables dans la durée, l'amplitude ou le moment où s'opèrent chacune de ces étapes lorsqu'on compare l'axolotl et les mammifères (Figure 4)³⁶.

Suite à une blessure chez les mammifères, un caillot sanguin est formé. Ce dernier sert de matrice provisoire durant la guérison. En plus de servir de protection, le caillot est un carrefour de signalisation permettant la guérison et relâche des cytokines et des facteurs de croissance. Ces facteurs vont permettre l'arrivée de cellules inflammatoires et aider au processus de réépithélialisation. Par chimiotaxie, les facteurs sécrétés par le caillot vont permettre d'orienter les cellules épithéliales en train de migrer. Ce processus de formation du caillot est appelé l'étape d'homéostasie¹⁵.

Les cellules inflammatoires vont ensuite se retrouver au niveau de la plaie via la circulation sanguine. Les premiers à arriver sont les neutrophiles. Les neutrophiles ont un rôle dans les

premières étapes de nettoyage de la plaie et de production de cytokines pro-inflammatoires qui permettront l'arrivée des monocytes. Les macrophages (état différencié des monocytes) vont rester au site de la blessure afin de phagocyter tous les débris cellulaires. Cette étape est la phase inflammatoire de la guérison¹⁵.

La réépithélialisation de la plaie débute assez rapidement après la blessure. Les kératinocytes aux sites de la blessure vont migrer afin de rétablir l'épiderme et fermer la plaie. Afin de pouvoir se faire un passage au travers du caillot, les cellules épithéliales vont produire des protéases (MMP) qui vont digérer la matrice provisoire. La réépithélialisation va durer plusieurs jours, même plusieurs semaines^{15,36,37}. Le contact entre les fronts de migration des cellules épithéliales va induire le signal afin de terminer la fermeture la plaie.

Suite à l'étape inflammatoire, les fibroblastes vont migrer et lentement remplacer le caillot sanguin par le tissu de granulation. Ces fibroblastes vont proliférer, et ce sont eux qui produiront les composantes de la nouvelle matrice. Ces derniers vont migrer vers le site de la blessure et déposer les collagènes qui formeront la cicatrice.

Les éléments principaux de la nouvelle matrice sont le collagène de type I, le collagène de type III et la fibronectine. Suite au dépôt de ces protéines de manière temporaire, des MMPs (matrix métalloprotéinase) vont remodeler la matrice et former la cicatrice de manière permanente.¹⁵

Les fibroblastes vont aussi se différencier en myofibroblastes qui vont exprimer des protéines, comme α -SMA et vont contracter la plaie. Une fois la guérison terminée, les fibroblastes et myofibroblastes sont détruits par apoptose.

Quelques études ont été menées dans le contexte de la guérison de la peau chez l'axolotl, et plusieurs différences peuvent être observées lorsque comparées aux mammifères. La première différence majeure est certainement l'étape de réépithélialisation. Dans une blessure par excision de 4mm, la blessure est fermée en 24h versus plusieurs jours (jusqu'à 10 jours) chez les mammifères. C'est donc beaucoup plus rapide. La formation d'un caillot sanguin est aussi observée chez l'axolotl, par contre, ce dernier est beaucoup plus mince et son importance n'est pas très claire^{23,36}.

La question du système immunitaire et de l'inflammation est au cœur de l'étude de la guérison sans cicatrices. Il semblerait qu'il existe une réponse inflammatoire suite à une blessure chez l'axolotl, par contre, cette dernière est beaucoup moins prononcée. Dans une blessure par excision, peu ou pas de neutrophile sont observés^{22,36}. L'hypothèse que cette faible réponse

immunitaire soit une des raisons de la régénération a souvent été posée. Durant la régénération, la déplétion de macrophages semble inhiber le processus. Ceci indique que la présence d'un système immunitaire inflammatoire est importante, mais doit être maintenue à un niveau très faible comparée à ce qui est observé chez les mammifères ³⁸.

La formation de la nouvelle matrice extracellulaire comporte aussi des différences entre la guérison des deux espèces. Chez les mammifères, le dépôt de collagène forme une cicatrice, ce qui n'est pas le cas chez l'axolotl. Chez l'axolotl, la composition de la nouvelle matrice est semblable aux mammifères en termes de protéines présentes. Ce qui diffère est la durée pendant laquelle elles sont exprimées et la quantité de protéines déposées dans la matrice. La matrice de transition (avant le remodelage) contient beaucoup plus de ténascine-C. La fibronectine et le collagène de type III sont exprimés de manière temporaire. Le collagène de type I est maintenu. Suite au remodelage, au lieu d'observer une cicatrice, le tissu est régénéré ³⁶.

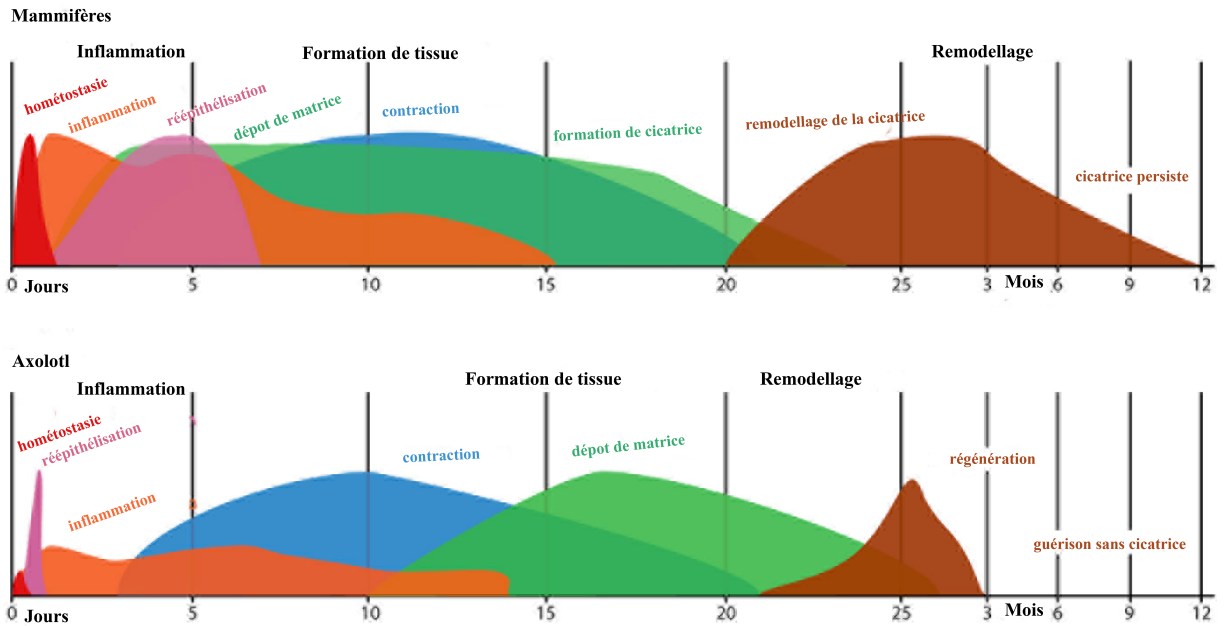


Figure 4. Comparaison entre la guérison des plaies cutanée chez l'axolotl vs la guérison chez les mammifères suite à une blessure de 4mm.

Figure modifiée et traduite de Seifert et al, 2012³⁶. Les différences sont la formation d'un caillot moins épais chez l'axolotl, une réépithélialisation beaucoup plus rapide (24h vs plusieurs jours), un niveau d'inflammation plus faible et ultimement un dépôt de collagène ne formant pas une cicatrice.

1.4 Signalisation clé, la voie des TGF- β

La signalisation TGF- β est observée dans plusieurs processus et son importance dans la guérison et dans la réparation est connue depuis plusieurs années. Elle est impliquée dans la réépithélialisation, dans l'inflammation et la production de matrice extracellulaire³⁹. Il existe plusieurs ressemblances entre la guérison et la régénération, il est donc logique d'étudier TGF- β dans le contexte de la régénération¹⁹. C'est pour cette raison que le laboratoire s'intéresse à cette voie.

1.4.1. Mécanisme de la voie canonique SMAD

Il existe trois isoformes connues de la cytokine TGF- β . Bien que chacune ait son rôle dans des contextes distincts, leur mécanisme de signalisation est le même^{40,41}. La cytokine se lie à son récepteur au niveau de la membrane cellulaire, le récepteur TGF- β type 2 (T β RII). Cette interaction va engendrer la dimérisation du récepteur à un second récepteur, le récepteur TGF- β type 1 (T β RI, aussi appelé ALK5). Suivant cette dimérisation, le T β RII va phosphoryler le T β RI et enclencher la cascade signalétique. L'inhibiteur pharmacologique SB-431542 empêche cette phosphorylation. Ce sont les protéines SMAD qui agissent comme acteurs intracellulaires. Pour la voie TGF- β 1, SMAD2 et SMAD3 jouent le rôle de facteur de transcription, SMAD4 d'activateur transcriptionnel et SMAD7 de répresseur de la voie. Ceci dit, une fois phosphorylé, le T β RI va activer SMAD2 ou SMAD3 par phosphorylation et ceux-ci pourront homodimériser ou hétérodimériser dans un complexe avec SMAD4, entrer au noyau et réguler l'expression des gènes cibles de la voie^{42,43}.

TGF- β est impliquée dans plusieurs processus cellulaires : prolifération, apoptose, migration et guérison des plaies (Figure 5)⁴².

1.4.2 La voie canonique SMAD durant la guérison

Dans le contexte de la guérison de la peau, la voie canonique SMAD est importante à plusieurs moments dans le processus. La signalisation TGF- β est nécessaire durant la réépithélialisation,

dans le processus d'inflammation, dans la production de la nouvelle matrice extracellulaire et son remodelage ³⁷.

La souris « knock-out » pour le récepteur de TGF- β de type 2 montre une guérison de moins bonne qualité ⁴⁴. Le SB-431542, inhibiteur de l'activation des SMADs, engendre une diminution la production de collagène (protéines principales des cicatrices) ⁴⁵.

L'activation de la protéine SMAD3 est associée à la formation des tissus cicatriciels. Une des meilleures démonstrations à ce jour est les souris SMAD3 nul. Cette souris montre des signes d'une meilleure guérison. Ceci se traduit par une réépithélialisation plus rapide, moins d'inflammation et moins de cicatrises ⁴⁶. La souris « knock-out » pour SMAD3 montre des signes de réduction d'inflammation dans le premier jour suivant la blessure. L'absence de SMAD3 causerait une diminution du nombre des monocytes au site de la blessure. Ceci serait dû à une diminution de l'activité chimiotaxique des monocytes. D'ailleurs, TGF- β est connu comme étant capable d'attirer les cellules immunitaires au site de la blessure ³⁷. Le SD-208, un autre inhibiteur de l'activation des SMADs, diminue le nombre de cellules immunitaires suite à une blessure ⁴⁷. De plus, les macrophages produisent du TGF- β qui, à son tour, attirera d'autres monocytes au niveau de la plaie ⁴⁸.

Plusieurs gènes impliqués dans la formation de la nouvelle matrice extracellulaire ont été établis comme cibles de TGF- β . TGF- β peut réguler certains MMPs, des protéases impliquées dans le remodelage de la matrice, en plus de pouvoir réguler les TIMP (des inhibiteurs des MMPs) ^{49,50}. De plus, TGF- β est responsable de l'expression de la fibronectine et de ténascine, des protéines faisant partie de la cicatrice. Une étude a développé un modèle de dominant négatif pour les T β RI et T β RII (sans activité kinase). Suite à un traitement au TGF- β , l'expression de ténascine et fibronectine est diminuée par rapport au contrôle ⁵¹.

1.4.3 Mécanisme de la voie non-canonique TAK1

Suite à la découverte de la voie TGF- β /SMAD, plusieurs études ont montré que la cytokine TGF- β pouvait activer d'autres voies de signalisations via ses récepteurs ⁵². La protéine TAK1 (TGF- β activated kinase 1) est classifiée comme une MAP3K (la MAP3K7). Son activation est notamment dépendante de la liaison de TGF- β aux récepteurs (TGF β RI et TGF β RII), mais est

totale indépendante de l'activité kinase du récepteur de type 1⁵³. Cette activation de TAK1 lui permet d'induire la phosphorylation de différentes protéines, notamment les protéines JNK et p38⁵⁴. Ces deux protéines ont d'ailleurs été identifiées comme pouvant être activées par la présence de TGF- β ⁵⁵. Il existe quelques modèles expliquant l'activation de TAK par TGF- β et subséquemment celle de p38 et JNK. L'activation de TAK1 est dépendante de la liaison de TGF- β à ses récepteurs, mais pas n'est pas dépendante de la phosphorylation du T β R1⁵⁶. Ceci explique pourquoi un inhibiteur comme le SB-431542 inhibe la voie canonique SMAD, mais n'a pas d'effet sur p38 et JNK. Le 5Z-7-Oxozeanol est un inhibiteur spécifique de TAK1. Cette molécule permet d'inhiber l'activité de p38 et JNK suite à l'activation par TGF- β sans affecter la phosphorylation de SMAD2 et SMAD3⁵⁷ (Figure 5).

L'activation de la protéine TRAF6 serait la première réponse suite à la liaison de TGF- β . TRAF6 serait lié au T β RI, suite à la dimérisation des deux récepteurs, il serait activé. Cette activation de TRAF6 va entraîner l'activation subséquente de TAK1 avec l'aide de TAB2^{55,58}.

1.4.4 La voie non-canonique TAK1 durant la guérison

L'implication de TGF- β dans la guérison peut non seulement passer par la voie canonique, mais aussi par l'activation de TAK1. Des traitements au 5Z-7-Oxozeanol inhibent l'expression de CTGF (connective tissue growth factor), l'endothéline et le collagène induit par TGF- β , tous des protéines importantes à la guérison⁵⁹. Dans cette même étude, les souris privées de TAK1 au niveau des fibroblastes montraient une guérison de la peau déficiente. Chez ces animaux, la vitesse de fermeture de la plaie est réduite et la quantité de tissu de granulation est moins importante par rapport aux animaux contrôles. La production d' α SMA (α -smooth muscle actine), et PCNA (proliferating cell nuclear antigen, un marqueur pour la prolifération) est diminuée dans les myofibroblastes. La phosphorylation de JNK et p38 est affectée dans le « knock-out », mais pas celle de SMAD3. Ceci indique que les effets observés sont associés à la voie de TAK1 et non celle des SMADs. Finalement, dans ces souris, le « knock-out » réduit la capacité des fibroblastes à proliférer, à s'attacher à la matrice extracellulaire et à migrer⁵⁹. Pour avoir une guérison adéquate, les fibroblastes vont contracter la matrice extracellulaire afin de former la cicatrice. Un modèle de fibroblastes TAK1 KO, montre une inhibition de JNK suite

à un traitement au TGF- β . Dans ces mêmes conditions, il y a une inhibition de l'expression de α SMA (protéines nécessaires à la contraction et marqueur de la fibrose). Finalement un essai qui mesure la force contractile montre une inhibition de cette mesure dans les cellules KO pour TAK1^{59,60}.

Un rôle de TAK1 pour l'inflammation a aussi été observé. C'est dans un des premiers articles qui ont montré l'effet du 5Z-7-Oxozeanol que cette observation a été faite. En plus de spécifiquement inhiber l'activation de p38 et JNK, l'expression des marqueurs de l'inflammation COX-2 (cyclooxygénase)2 et IL-1 (interleukin-1) sont réduits suite au traitement⁵⁷. Pour faire la démonstration *in vivo*, ils utilisent le modèle de renflement de l'oreille, un modèle utilisé dans l'étude des maladies de la peau et des allergies. Suite à des injections de chlorure de pychiril au niveau de l'oreille, il y a inflammation et un renflement. Lorsqu'ils traitent l'oreille avec du 5Z-7-Oxozeanol, il y a une diminution de l'épaisseur des oreilles par rapport aux contrôles. Ceci confirme que TAK1 joue un rôle durant l'inflammation⁵⁷.

En regardant l'ensemble de ces études, on remarque un rôle de TAK1 dans plusieurs sphères de la guérison. TAK1 peut jouer un rôle dans la fermeture de la plaie, la prolifération et la migration des fibroblastes, on peut l'associer au processus de fibrose par son rôle dans l'expression d' α SMA. Finalement, TAK1 a aussi une fonction durant l'inflammation.

Cette voie est donc une cible d'étude intéressante dans le contexte de guérison parfaite et la régénération.

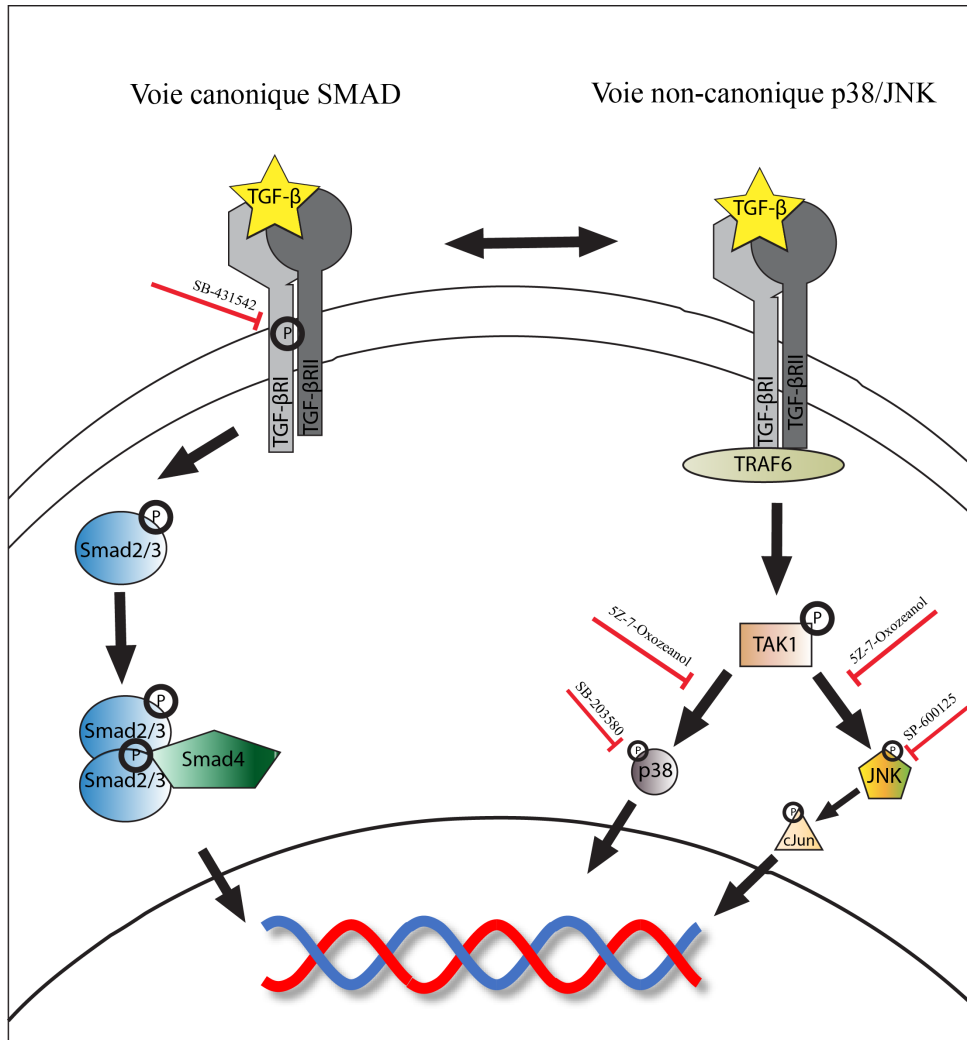


Figure 5. Schéma simplifié de la signalisation TGF- β /SMAD et TGF- β /p38/JNK.

Suite à la liaison de TGF- β au récepteur de types 2, il y a dimérisation avec le récepteur de type 1. Dans la voie canonique des SMADs, le récepteur T β RII phosphoryle le T β RI. Ce dernier phosphoryle SMAD2/3, ce qui induit le dimérisation (homo ou hétéro) avec l'aide de SMAD4. Le complexe entre au noyau et pourra agir comme régulateur transcriptionnel⁴². Dans la voie non-canonique p38/JNK, il n'y a pas de phosphorylation du récepteur de type I. La dimérisation des deux récepteurs va permettre l'activation de la protéine TRAF6 qui elle pourra activer TAK1. TAK1 peut ensuite activer les protéines JNK et p38 qui elles pourront agir comme kinase ou régulateur transcriptionnel⁵⁸.

1.5 La signalisation dans le contexte de la régénération

Avec l'essor de la biologie moléculaire dans les dernières décennies, comprendre la signalisation lors de la régénération est devenue, selon notre laboratoire, le chemin à prendre pour la compréhension du processus. En décelant comment la signalisation et sa régulation s'opèrent dans un modèle qui régénère, il sera possible de savoir quelles sont les protéines à cibler afin d'un jour d'appliquer les connaissances à l'humain.

Bien que nous étudions la régénération de la patte chez l'axolotl, nous pouvons aussi nous baser sur la littérature dans les études d'autres modèles animaux. Dans cette section, la signalisation lors du processus de régénération sera couverte chez les différents modèles.

1.5.1 Générale (p53, Wnt, ERK)

Avant d'entrer dans les détails des voies de signalisation les plus importantes pour cette thèse, voici un petit topo d'autres voies qui ont été étudiées dans le contexte de la régénération. Bien que très intéressante, ces derniers ne sont pas des axes de recherche de premier plan dans notre laboratoire.

Plusieurs études ont montré une importance pour différente voie de signalisation. Bien sûr, p53, une des protéines les plus étudiées dans le monde, a été identifiée lors du processus de régénération. L'utilisation d'un inhibiteur de p53, l' α -pifithrine, cause un arrêt de la régénération. C'est après la formation du blastème que l'effet semble être observé. Il semble que l'activité de p53 soit réduite au début du processus et que cela est nécessaire pour permettre l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire et la formation du blastème. En stabilisant le complexe p53/MDM2 avec la Nutlin, la formation du blastème est abrogée^{61,62}.

La voie Wnt/ β -caténine a aussi été étudiée durant la régénération. Chez l'axolotl, une surexpression de Axin1 et chez le Xénope une surexpression de DKK (dikkopf), des inhibiteurs intracellulaires de la voie Wnt ont introduit des problèmes dans le processus de régénération. La surexpression de DKK avait aussi un effet négatif sur la régénération de la nageoire chez le

poisson-zèbre. Chez le poisson et l'axolotl, l'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine semblait affecter la formation de l'AEC, sans par contre affecter la migration des kératinocytes¹⁸.

Du côté des MAPKs (mitogenic-activated protein kinase), ERK a été étudié chez le ver planaire. Un traitement au U0126 occasionne une inhibition de la régénération en bloquant la formation du blastème. Par contre, l'étape de guérison ne semble pas être affectée⁶³.

1.5.2 Signalisation des TGF- β

Le laboratoire s'est spécialisé dans l'étude la voie de TGF- β . La superfamille des TGF- β est composée de 8 voies de signalisation ayant des fonctions distinctes, mais dont le mécanisme est similaire. De ces huit voies, les cytokines TGF- β et BMP sont devenues des centres d'intérêt importants du laboratoire⁴². Cette section couvrira les études qui ont démontré l'importance de TGF- β et BMP dans le processus de régénération.

TGF- β est produite sous une forme latente et est stockée dans la matrice extracellulaire en s'y liant. Suite à une blessure, des protéases sont activées et vont libérer le TGF- β dans la matrice en clivant le site de liaison entre les deux et permettre son relâchement^{64,65}. D'ailleurs, chez l'axolotl, TGF- β est observé dans la peau mature²³.

Les premières études sur la voie TGF- β ont démontré que le SB-431542, un inhibiteur pharmacologique de la voie canonique de TGF- β , empêchait la formation du blastème. TGF- β est exprimé durant la phase de préparation jusqu'au stade de bourgeon primaire et la forme active de la protéine est détectée jusqu'à 48h post-amputation. Un traitement avec 25 μ M de cette molécule diminuait la prolifération des cellules du blastème et l'expression de gènes cibles de la signalisation de TGF- β ⁶⁶. Suite à cela, des études dans d'autres modèles de régénération ont aussi regardé cette voie. Durant la régénération de la queue de *Xenopus Laevis*, un traitement au SB-431542 prévient la formation de l'épithélium de guérison⁶⁷. La chose intéressante est que notre laboratoire n'a jamais pu faire le lien entre TGF- β et la fermeture de la plaie. Par contre, la dose de SB-431542 utilisées chez l'axolotl est de 25 μ M. Une dose de 100 μ M comme chez le xénope est toxique à court terme pour l'axolotl. La voie de TGF- β a aussi été observée lors de la régénération de la queue chez le gecko. L'étude en question nous informe que chez cet animal, TGF- β ainsi que l'Activine sont exprimées durant le processus de régénération. La protéine p-SMAD2 est aussi observée au niveau du blastème⁶⁸.

Suivant ces études, le laboratoire s'est concentré à comprendre comment SMAD2 et SMAD3 étaient régulés durant la régénération afin de pouvoir vraiment décortiquer la signalisation entourant TGF- β . Cette étude portait principalement sur la formation du blastème puisqu'aucun effet du SB-431542 n'était observé sur la fermeture de la plaie ou la phase de redéveloppement⁶⁶. Cet article montre par immunobuvardage de type Western que la forme phosphorylée de SMAD2 est présente entre 12h et 48h post-amputation et p-SMAD3 est activée plus tôt. Par contre, la détection de p-SMAD3 nécessite des réactifs de chimioluminescence beaucoup plus sensible et des temps d'expositions beaucoup plus longs que pour la détection de p-SMAD2. Ceci indique que la présence de SMAD3 est beaucoup plus faible que SMAD2. D'ailleurs, on observe une diminution de la forme totale de SMAD3 durant la phase de préparation. Une inhibition spécifique de p-SMAD3 par les inhibiteurs SiS3 et Naringenin ne montrent aucun effet sur la régénération comme observé avec SB-431542. Des expériences de surexpression de la forme constitutivement active de p-SMAD3 entraînaient l'apoptose des cellules dans une patte en régénération et dans la lignée de cellules en culture d'axolotl (AL-1). La conclusion de cette étude pointe vers une importance de SMAD2 et non de SMAD3 lors de la formation du blastème (migration et prolifération)⁶⁹. Il s'agit là d'une conclusion très intéressante puisque lorsque nous regardons la voie de TGF- β chez l'humain suite à une blessure, c'est SMAD3 qui est principalement activée. Cette activation mène à l'expression de plusieurs gènes profibrotique comme le collagène de type III et le collagène de type I⁷⁰. La présence de ces protéines entraîne la formation d'une cicatrice. Or, chez l'axolotl, nous voyons peu de SMAD3, une guérison axée vers la migration, la prolifération et surtout sans formation d'une cicatrice. Plus récemment, une nouvelle étude a confirmé l'importance de TGF- β dans la formation du blastème. Cette étude a fait du séquençage ARN et a montré que plusieurs cytokines étaient diminuées tôt dans le processus de régénération. Une des seules exceptions était la présence de la signalisation de TGF- β ⁷¹.

Une des choses qui ressort dans l'étude de TGF- β , c'est que cette voie semble être limitée à la phase de préparation. À partir du stade MB jusqu'à la fin de la régénération, nous n'observons plus de forme active de TGF- β , ni p-SMAD2 ou p-SMAD3⁶⁹. D'ailleurs, un traitement au SB-431542 débutant au stade LB, ne cause aucun effet sur le reste du processus de régénération (résultats non publiés).

Durant la phase de redéveloppement, ce sont les BMPs, un autre membre de la superfamille des TGF- β , qui sont observés. L'expression de BMP2 a été observée par hybridation *in situ*. Son expression apparaît au stade de bourgeon primaire (EB), au niveau distal du blastème, et ce jusqu'au stade LB. Au stade palette, son expression est plus antérieure, là où les deux premiers doigts se forment. Afin d'évaluer la fonction de BMP, une surexpression de BMP2 et de Noggin, un inhibiteur de BMP2, a été faite. Les deux surexpressions résultaient en un manque de doigts une fois la régénération complétée. La surexpression de BMP2 causerait une augmentation de l'apoptose et de la condensation, ce qui entraîne le manque de doigts. La surexpression de Noggin semblait inhiber la prolifération des cellules du blastème³¹.

Suite à cette étude, le laboratoire s'est tourné vers l'utilisation de petites molécules pharmacologiques. Les résultats décrits dans les prochaines lignes proviennent d'un projet en cours dans le laboratoire. Le LDN-193189 est un inhibiteur spécifique de la voie BMP/SMAD1/5. Ceci est beaucoup plus spécifique que la surexpression de Noggin, qui lui, inhibe toute la signalisation des BMPs sans discrimination. Le LDN-193189 permet de cibler seulement la voie BMP/SMAD. Cette étude montre que les effecteurs intracellulaires SMAD1/5 sont activés lors de phase de redéveloppement laissant croire à un rôle dans la morphogénèse et la redifférenciation. Les effets du LDN-193189 sur la régénération sont très intéressants et informent sur plusieurs rôles des BMPs durant la phase de redéveloppement. D'un point de vue phénotypique, le LDN-193189 cause une perte de la formation des doigts et de la chondrogenèse.

Plusieurs gènes cibles des BMPs sont inhibés suite au traitement. Il s'agit de plusieurs gènes de morphogénèse et différenciation. Les gènes *Msx1*, *Sox9* et *FGF8* sont ceux qui sortent du lot. L'inhibition des BMPs à différent moment lors du redéveloppement a permis de montrer son importance pour le développement proximodistal de la patte. Ce phénotype est aussi expliqué par une inhibition des gènes *HoxA13* et *HoxA11*.

1.5.3 Signalisation de p38 et JNK (MAPK)

Pour ce qui est de la régénération chez l'axolotl, aucune étude n'a encore été publiée pour les voies de p38 et JNK. Par contre en regardant dans d'autres modèles de régénération, on trouve

une certaine importance de ces deux voies pour le processus. JNK a été étudié dans plusieurs modèles de régénération. Chez le ver planaire une étude a montré qu'un traitement au SP-600125, un inhibiteur spécifique la voie JNK, avait des effets à différents moments durant le processus de régénération. Tout d'abord, le traitement en question empêchait la progression du cycle cellulaire des néoblastes. Suite à une amputation, le SP-600125 empêche l'étape de guérison. Lorsque le traitement est retardé de 12 heures permettant la formation de l'épithélium de guérison, la formation du blastème est inhibée ⁷². Une autre étude s'est concentrée sur cette voie de signalisation, cette fois-ci à l'aide d'un ARNi contre le gène JNK. À l'aide de cet outil, les auteurs montrent que JNK est nécessaire pour que la régénération se fasse de manière adéquate. Contrairement à l'autre étude, avec un ARNi, aucun effet n'est observé sur la fermeture de la plaie. D'autre part les auteurs mentionnent que JNK pourrait être important pour une signalisation adéquate entre le blastème et l'épithélium de guérison. Comme avec la SP-600125, ils observent une diminution de la progression du cycle cellulaire des néoblastes ⁷³.

Chez le poisson-zèbre, un rôle a été défini durant la guérison d'une plaie par excision. Dans ce modèle, la réépithélialisation se fait rapidement. Lorsqu'une blessure de 2mm est effectuée, la plaie est complètement fermée après 8h suivant la blessure. Cette fermeture se fait par migration des kératinocytes. L'étude a aussi tenté d'élucider la signalisation entourant cette migration. En utilisant une approche pharmacologique, ils ont inhibé la signalisation des SMADs, JNK et ROCK (une Rho GTPase). Tous les traitements ont montré une réépithélialisation plus lente. Par contre, un effet important a été observé sur la fermeture de la plaie avec un traitement à Cytochalasine D (inhibiteur de l'actine), l'inhibiteur de JNK et celui de ROCK. Seule, la Cytochalasine D entraînait un arrêt de la migration. Ceci les a amenés à la conclusion que la fermeture de la plaie serait dépendante du remodelage du cytosquelette et de la formation de lamellipodes. Ceci serait régulé par JNK et les Rho kinase ¹⁶.

Des études se sont aussi penchées sur la question de p38 dans le contexte de la régénération. Dans le contexte de la régénération du ver planaire une publication montre que p38 contrairement à ERK ne joue pas de rôle dans la formation du blastème ⁶³. Par contre, dans le modèle de régénération du cœur de poisson-zèbre, p38 aurait un rôle régulateur du processus. Dans ce contexte, il semblerait que p38 présent dans le cœur en régénération doit être inhibé pour permettre la prolifération des nouveaux cardiomyocytes ⁷⁴. Durant la régénération de la queue du gecko, les espèces réactives oxygénées ont un rôle durant la régénération, et la

régulation se fait par les MAPK, notamment p38. Suite à l'amputation, les ROS (reactive oxygen species) entraîneraient l'activation de p38 qui lui participerait à l'autophagie des muscles. Ceci serait nécessaire pour la régénération ⁷⁵. Une étude chez le ver planaire a tenté de comprendre comment le microbiote pouvait affecter la régénération et quelles sont les voies de signalisations qui sont impliquées. La régénération du ver planaire est inhibée suite à l'infection par certaines bactéries. Dans ce contexte, la surexpression de p38 semble induire l'apoptose, et une inhibition par ARNi semble sauver la régénération ⁷⁶.

En regardant ces différentes études, il semble qu'un rôle spécifique dans la régénération soit difficile à déterminer. Par contre, il s'agit certainement d'une cible d'intérêt dans le contexte de la régénération de la patte d'axolotl.

1.6 Transitions épithéliaux mésenchymateuses (EMT)

1.6.1 Concept général

Le concept général d'une EMT s'explique comme étant la capacité d'une cellule épithéliale d'acquérir un phénotype qui ressemble à une cellule mésenchymateuse. On parle ici d'une dépolarisation, d'une perte des jonctions cellule-cellule et d'une élongation de la cellule en transition. Ce changement de phénotype permet à une cellule épithéliale immobile de pouvoir migrer lorsqu'elle en a besoin (Figure 6). Le processus est réversible et la cellule finit par redevenir épithéliale, c'est pour cela que s'est caractérisée comme une transition. Depuis son identification, plusieurs études ont permis de caractériser des EMTs dans différents processus biologiques et de définir 3 types de EMT. À part les changements phénotypiques au niveau de la cellule, on observe aussi des changements au niveau de l'expression génique et au niveau moléculaire lors d'une transition. C'est d'ailleurs ces changements qui servent de marqueurs et à l'identification potentielle d'un processus EMT ⁷⁷.

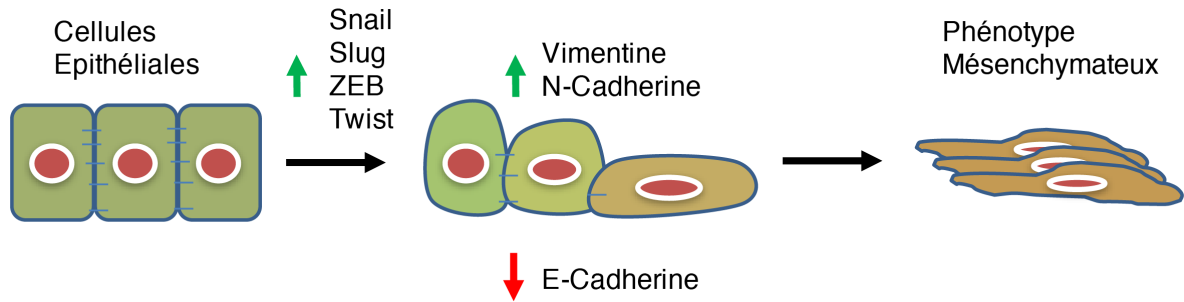


Figure 6. Représentation graphique simplifiée du processus de transitions épithéliaux mésochymateuse.

Suite à un signal, les cellules épithéliales vont augmenter l'expression de facteurs de transcription c.-à-d. Snail, Twists, ZEB. Ces régulateurs transcriptionnels vont induire l'expression de gènes nécessaires à la migration comme la Vimentine et N-Cadhérine et vont réduire l'expression de gènes épithéliaux comme E-Cadhérine. Ces changements vont entraîner le phénotype mésochymateux qui permettra aux cellules de migrer.

1.6.2 Les trois types de EMT

1.6.2.1 EMT développemental

La première observation des EMTs se fait lors du développement embryonnaire. Lors de la gastrulation, c'est-à-dire lorsque la blastula se différencie en gastrula, les cellules ectodermiques de l'épiblaste traversent une EMT et migrent afin de former le mésoderme de la gastrula ⁷⁸.

L'autre exemple de EMT embryonnaire s'opère suite à la formation de la crête neurale. La plaque neurale s'invagine et forme le tube neural. Une fois le tube neural formé, les cellules de la crête neurale se détachent de l'épiderme et vont passer par une EMT. Ceci permet aux cellules de migrer et d'éventuellement de différencier en différents types cellulaires. Les cellules de la crête neurale sont des progéniteurs notamment de cellules musculaire, nerveuse et de plusieurs autres types ⁷⁸.

Certaines études se sont aussi penchées sur l'importance des EMTs dans le contexte du développement de la patte. Le facteur de transcription Twist est important dans la différenciation des cellules durant le développement de la patte chez la souris. La souris « knock out » pour Twist montre une patte incomplète au stade 11.5 jours. L'expression de FGF10, FGF4 et FGF8 (fibroblast growth factor) est affectée ce qui a pour conséquence de perturber la signalisation de SHH. Ainsi, le « knock-out » a des problèmes de morphogénèse de la patte ⁷⁹.

Le poulet a longtemps été un modèle prédominant dans l'étude du développement de la patte chez le vertébré. Chez ce modèle, Slug, connu comme ayant un rôle dans les EMT de la crête neurale a aussi un rôle dans la morphogénèse de la patte. Ce dernier est exprimé au niveau du bourgeon du membre et son expression est diminuée suite au retrait de l'AER. Cet effet peut être renversé avec l'ajout de FGF2. La perte de Slug a pour effet de réduire le nombre de doigts ⁸⁰.

1.6.2.2 EMT dans le cancer

La grande majorité des études sur les EMTs se font dans le contexte du cancer. Il existe plusieurs types de cancer épithéliaux qui éventuellement métastasent et se retrouvent ailleurs dans le corps. Afin de pouvoir se déplacer, ces cellules cancéreuses traversent une EMT et peuvent

migrer vers la circulation sanguine et se retrouvent n'importe où dans le corps. Le cancer primaire va entrer dans le programme de EMT où des gènes comme Vimentine et N-Cadhérine vont être augmentés et E-Cadhérine et d'autres protéines de jonctions seront diminuées. De là, le changement pour un phénotype mésenchymateux de la cellule va lui permettre de se déplacer et envahir les tissus connexes. La métastase va donc coloniser le nouveau tissu et y proliférer^{77,81}.

Plusieurs formes de cancer profitent de ces transitions et former des métastases. Le nombre d'études qui portent sur les EMTs dans les différents types de cancer est énorme. Les cancers dans lesquelles une augmentation des gènes de EMT (Snail, Twist, ZEB, Vimentine, etc) a été observée sont : Mélanome de la peau, cancer du sein, du pancréas, du poumon, des reins, du foie, de la prostate, le cancer colorectal. Ceci en dit long sur l'importance de ce processus dans l'étude des métastases⁸¹.

1.6.2.3 EMT dans la guérison

Ce type de EMT est d'un intérêt particulier puisque notre laboratoire étudie la régénération qui est un type de guérison.

La présence de transitions durant la guérison est observée dans deux contextes. Durant le processus de cicatrisation (fibrose), les myofibroblastes permettent la contraction de la nouvelle matrice cellulaire. La source des myofibroblastes est une question encore posée dans le domaine de la guérison. Suite à une blessure, les fibroblastes vont se différencier en myofibroblastes. Par contre, certaines évidences semblent indiquer que les cellules épithéliales peuvent se transdifférencier (processus de EMT) et participer à la formation de myofibroblastes. Plusieurs marqueurs de EMT ont été détectés durant le processus de fibrose⁸². Par contre, chez l'axolotl, personne n'a été capable de détecter de myofibroblastes suite à une blessure²³. Ceci dit, il est peu probable d'observer ce genre EMT dans notre modèle d'étude.

L'autre observation de EMT faite lors de la guérison est dans le contexte de la réépithélialisation. Certains caractérisent ce type de migration comme un EMT partiel. Ceci est principalement dû au fait que toutes les signatures observées dans un EMT n'ont pas toujours été observées dans ce contexte, notamment la diminution de l'expression de E-Cadhérine⁸³. Une des premières

études a observé l'importance du facteur de transcription Slug durant la réépithélialisation. Les auteurs ont utilisé une souris KO pour le gène Slug. Suite à une blessure, ils ont pu montrer que la migration des kératinocytes était ralentie dans ce modèle de souris. De plus, une expérience de surexpression de Slug dans des cellules en culture a montré une augmentation de la vitesse de migration. Cette étude a montré une relation entre un gène associé au EMT et la migration des cellules épithéliales dans une blessure⁸⁴. Puisque cette étude a été menée dans des explants *ex vivo*, un autre groupe a réétudié la chose dans des souris vivantes. Dans une blessure par excision, les souris homozygotes à mutation nulle de Slug montraient une vitesse de réépithélialisation significativement plus lente que dans la souris de type sauvage, et ce sans avoir d'effet sur la prolifération. Dans ce contexte, l'expression de E-Cadhérine était maintenue dans le mutant et non détectable dans le contrôle⁸⁵.

Chez le poisson zébré, des études dans des extraits de kératinocytes en culture ont servi de modèle. L'idée consistait à mesurer l'expression de gènes suite à l'explantation en culture. Suite à la mise en culture de kératinocytes de poisson-zèbre, ces derniers acquièrent une motilité. Ceci dit, les résultats de cette étude montrent une augmentation de gènes reliés aux EMTs, comme Snail, Slug, Vimentine, N-Cadhérine. De plus, ils observent une diminution des gènes épithéliaux comme E-Cadhérine, et des protéines de jonction comme les Claudines. Ils observent aussi une augmentation de l'expression des cytokines TGF- β et TNF- α (tumor necrosis factor alpha). Afin de confirmer les résultats, des immunofluorescences montrent que E-Cadhérine diminue et N-Cadhérine augmente avec le temps suite à l'explantation. Ceci va de pair avec le processus de EMT et la migration⁸⁶.

Une étude plus récente s'est attardée à la protéine Vimentine qui est connue pour son rôle dans les EMTs et dans la guérison des plaies cutanées. Des blessures par excision et des brûlures chez les souris « knock-out » Vimentine servent de modèle d'étude. Suite à la blessure, les animaux de type sauvage sont réépithélialisés à 32% après 9 jours et la plaie est complètement fermée après 15 jours. En contrepartie, les animaux « knock-out » n'étaient qu'à 56% de fermeture après 15 jours. Cette étude a aussi fait le lien entre le ralentissement de la réépithélialisation et les EMTs. Chez les animaux contrôles, suivant la blessure, l'expression des protéines Slug et N-Cadhérine, des marqueurs de EMT, est fortement augmenté. Dans les animaux « knock-out » Vimentine, il n'y a aucune variation dans le programme de EMT. Les auteurs concluent donc

qu'en l'absence de Vimentine, il y a une dysfonction dans le processus de EMT et conséquemment la réépithélialisation de la blessure ⁸⁷.

Un des problèmes rencontrés durant les nombreuses revues de littérature au courant de mon doctorat est le manque d'études sur les EMT dans le contexte de la guérison et plus précisément dans des systèmes *in vivo* ⁸³. Pour nous, il s'agissait d'une belle opportunité d'étudier le processus de EMT chez l'axolotl et ajouter au bassin de littérature. D'ailleurs, une des questions soulevées dans le domaine des EMT est la surutilisation de culture cellulaire et le manque d'outil pour l'étude du processus chez des animaux vivants ⁸³.

1.6.3 Voies de signalisation impliquées dans les EMT

Plusieurs voies de signalisations se sont montrées comme pouvant réguler d'une manière ou d'une autre les transitions épithéliaux mésenchymateuses. TGF- β est certainement la plus étudiée dans ce contexte. Plusieurs études ont tenté d'élucider l'importance de cette dernière, notamment dans des kératinocytes en culture, ou dans des cancers épithéliaux. Une première démonstration fut la surexpression d'un dominant négatif du T β RII, inhibant la signalisation, résultant en une diminution de la progression du cancer du côlon ⁸⁸. Quand on regarde au niveau intracellulaire, le « knock-out » de SMAD4 (co-activateur des R-SMADs) réduit les transitions et l'invasion dans les cellules du cancer pancréatique ⁸⁹. De plus, en regardant l'expression des facteurs de transcription inducteurs de EMT, plusieurs sont induites par les SMAD2/3. Le complexe SMAD est capable de se lier au promoteur de Snail et peut aussi coopérer avec ce dernier afin d'inhiber l'expression de E-Cadhérine. Twist, Slug et ZEB sont aussi affectés lorsque la fonction de SMAD est bloquée ⁹⁰. Une première étude en 2005 a montré qu'un traitement au SB-431542 inhibait la migration des cellules cancéreuses et avait un effet sur les gènes de EMT. Ajouter du TGF- β réduit E-cadhérine et induit la migration suite à un essai « scratch ». En présence de SB-431542, l'expression de E-Cadhérine n'est pas affectée et les cellules ne peuvent migrer et refermer la section du tapis cellulaire « scratchée » ⁹¹. Ce genre d'expériences a ensuite été reproduit plusieurs fois en regardant d'autres gènes de EMT et en étudiant d'autres types cellulaires, soit cancéreux, ou des kératinocytes.

Les voies non-canoniques de TGF- β sont aussi capables d'initier le processus de EMT. Plusieurs voies non-SMAD ont été identifiées et la majorité a été associée au processus de EMT⁵². Je ne vais pas rentrer dans chacune des voies, puisqu'elles ne sont pas toutes pertinentes dans le contexte de cette thèse. Dans cette section, on se concentre essentiellement sur les voies non-canoniques p38 et JNK. En 2002, une étude a montré que les EMTs induits par TGF- β pouvaient nécessiter l'activation de p38. Dans des cellules de glandes mammaires, ils ont montré que p38 était activée suite à un traitement au TGF- β . De plus, suite à un traitement avec le SB-202190 (un inhibiteur de p38) ils bloquent spécifiquement l'activité de p38 et non celle des SMADs. Finalement, ils ont pu démontrer que la migration de ces cellules épithéliales était fortement affectée par le SB-202190⁹². Une autre étude s'est penchée sur les EMTs dans le contexte de la fibrose des alvéoles pulmonaires. Ces cellules épithéliales répondent à TGF- β par une augmentation des marqueurs de EMT et une diminution des marqueurs épithéliaux. À l'aide du SB-203580 (inhibiteur de p38) et d'un ARNsh, ils ont pu démontrer que l'expression de ces marqueurs était réduite. Dans cette même étude, ils ont aussi observé l'effet du SP-600125 (inhibiteur de JNK) et d'un ARNsh contre JNK sur l'expression de gène EMT. Ils ont observé la même chose que pour p38, ce qui confirme l'importance de ces deux protéines pour les EMTs suite à une activation par TGF- β ⁹³. L'implication de JNK dans les EMTs a aussi été établie dans différentes études. Dans des kératinocytes, TGF- β peut activer JNK et permettre l'expression des marqueurs de EMT. De plus, le SP-600125 inhibe cette expression tout en inhibant la migration⁹⁴. Ce même genre d'observation a été fait dans des cellules de rate péritonéale. Dans cette étude, ils ont montré une collaboration entre JNK et Smad3 pour le fonctionnement du programme de EMT⁹⁵.

En regardant ces études, on constate que les EMTs induites par TGF- β peuvent non seulement passer par les SMADs, mais aussi par les voies non-canoniques p38 et JNK. Comme mentionné plus haut, l'activation de p38/JNK (par TGF- β) se fait par l'activation de TRAF6 au récepteur et de TAK1. Dans le même article qui a élucidé ce mécanisme, les auteurs ont aussi observé le rôle de TRAF6 dans les EMTs de cellules mammaires épithéliales. Suite à un traitement au TGF- β , les cellules changeaient de forme et l'expression du marqueur de EMT N-Cadhérine était augmentée E-Cadhérine diminuée. Un ARN interférant contre TRAF6, enlevait tout signe du processus de EMT. Tout cela, n'avait aucun effet sur les SMAD2/3 confirmant l'importance de TAK1 pour les EMTs⁵⁸. L'importance de TAK1 pour les EMTs a été démontrée

de manière pharmacologique. Un traitement au 5Z-7-Oxozeanol de cellules épithéliales de rétines (RPE) abolit tous les signes de EMT et de migration suite à leur exposition à TGF- β ⁹⁶. Il existe bien sûr d'autres mécanismes d'induction de EMTs. La signalisation Wnt a souvent été associée aux EMTs. Cette dernière est très intéressante dans notre contexte puisque la voie Wnt/ β -caténine est connue comme étant importante lors de la régénération¹⁸. D'autres voies sont aussi intéressantes, comme la signalisation Notch et Hedgehog peut aussi jouer un rôle dans le EMTs. Il semblerait aussi que la signalisation entourant l'hypoxie puisse aussi induire le processus de EMT⁹⁰.

1.6.4 EMT dans la régénération ?

Quand on analyse la complexité de la régénération de la patte, on s'aperçoit que plusieurs processus biologiques y sont impliqués. On débute avec une phase de guérison, suivie d'une phase de migration et de prolifération (qui peut en quelque sorte être comparée aux cancers) et se termine avec une phase de redéveloppement. Ce qui est intéressant, c'est que les différentes formes de EMTs sont observées dans ces trois processus. Or, lorsque nous regardons la littérature, peu ou pas d'études ont été faites sur ces transitions dans le contexte de la régénération chez les salamandres. En 2002, une étude sur la régénération de la queue/moelle épinière montre que certaines cellules de l'ectoderme pouvaient se retrouver dans des tissus du mésoderme. Ceci indiquait une transition ectoderme/mésoderme qui pourrait s'apparenter à des EMTs⁹⁷. Dans l'étude de l'activité des SMADs lors de la régénération de la queue de gecko, les auteurs observent une augmentation de l'expression de Snail, Slug et ZEB dans le régénérat suite à l'amputation⁶⁸. Une étude du groupe de Tanaka a jeté son dévolu sur les protéines Twist1 et Twist3. Bien que ces facteurs de transcriptions soient connus comme pouvant être des initiateurs des EMTs, cette étude se concentrait sur leur importance dans la formation des muscles et non sur leur rôle dans la migration et le processus de EMT³⁵. Plus récemment, le groupe de Melton a montré la présence de Snail et Twist1 dans leurs résultats de séquençage d'ARN. Par contre, leur analyse s'arrête à l'observation de cette expression. Ils ne s'attardent pas à leur possible rôle dans le processus de régénération⁷¹.

1.7 Objectifs et hypothèses

Au début de mon doctorat, mon projet s'orientait dans la régulation de la voie de TGF- β , de la prolifération et de l'état de différenciation durant la formation du blastème. Avec le temps, nous avons saisi l'importance d'étudier les transitions épithéliales mésenchymateuses dans le contexte de la régénération, considérant la place que ces dernières ont dans différents systèmes. C'est de là que les principales hypothèses de cette thèse ont pris forme.

Le processus de transitions épithéliales mésenchymateuses participe à la régénération de la patte chez l'axolotl.

Afin d'y répondre, l'objectif est de caractériser les EMTs durant la régénération de la patte. Pour y arriver, je vais évaluer l'expression de marqueurs connus des EMTs, par des méthodes de PCR et d'hybridation *in situ*.

TGF- β est nécessaire à l'induction des EMT et à la fermeture de plaie, lors de la régénération de la patte.

L'objectif est d'inhiber les voies canoniques et non-canoniques de TGF- β qui sont connues comme étant régulatrices de la migration et des EMTs. Je vais ensuite observer l'effet sur la fermeture de la plaie et l'expression des marqueurs de EMT dans ces conditions.

Les protéines p38 et/ou JNK sont importants pour la régulation du cycle cellulaire lors de la formation du blastème.

L'objectif est d'inhiber p38 et JNK durant la totalité de la régénération et déterminer comment ceci affecterait l'état du blastème et l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation.

Les résultats découlant de ces hypothèses nous permettront d'établir des pièces de plus dans le casse-tête qu'est la signalisation de TGF- β durant la régénération de la patte.

2- Chapitre 1 - Article 1

Titre: Epithelial to mesenchymal transition is mediated by both TGF- β canonical and non-canonical signaling during axolotl limb regeneration

Auteurs: Fadi Sader, Jean-François Denis, Hamza Laref, Stéphane Roy

Reproduit avec permission et aucun changement n'a été apporté :

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Publié dans Scientific Reports

La publication finale disponible : <https://rdcu.be/bjYJJ>

2.1 Mise en contexte

Depuis la création du laboratoire, comprendre la signalisation qui permet à une patte amputée de régénérer chez l'axolotl est l'angle principal de recherche. Nous tentons de comprendre l'importance de la voie de TGF- β 1 dans la régénération depuis maintenant plus de 10 ans. L'importance de la voie canonique (SMAD2) lors de la formation du blastème est maintenant bien établie. Dans ce chapitre, nous avons tenté de comprendre son implication dans la fermeture de la plaie. En premier lieu, nous avons montré une régulation des marqueurs EMT dans la fermeture de plaie, mais aucune relation entre la voie TGF- β /SMAD et les EMTs n'a pu être faite. Nous nous sommes donc tournés vers une voie non-canonique connue comme ayant des rôles dans la migration de kératinocytes et la guérison, la voie TGF- β /p38/JNK. Le chapitre qui suit est l'intégralité de l'article publié dans la revue Scientific Reports. La publication finale est aussi disponible sur ce lien : <https://rdcu.be/bjYJJ>.

2.2. Contribution des auteurs

La conception et le design des expériences ont été faits par Fadi Sader et Stéphane Roy.

Les expériences ont été faites à presque 100% par Fadi Sader, Hamza Laref a fait quelques-unes des hybridations in situ. Jean-François Denis a aidé à la préparation des échantillons.

Fadi Sader et Stéphane Roy ont fait l'analyse des données.

Le projet a été subventionné et supervisé par Stéphane Roy.

L'écriture de l'article a été faite par Fadi Sader et Stéphane Roy

2.3 Texte de l'article - Epithelial to mesenchymal transition is mediated by both TGF- β canonical and non-canonical signaling during axolotl limb regeneration

2.3.1 Abstract

Axolotls have the amazing ability to regenerate. When compared to humans, axolotls display a very fast wound closure, no scarring and are capable to replace lost appendages perfectly. Understanding the signaling mechanism leading to this perfect healing is a key step to help develop regenerative treatments for humans. In this paper, we studied cellular pathways leading to axolotl limb regeneration. We focus on the wound closure phase where keratinocytes migrate to close the lesion site and how epithelial to mesenchymal transitions are involved in this process. We observe a correlation between wound closure and EMT marker expression. Functional analyses using pharmacological inhibitors showed that the TGF- β /SMAD (canonical) and the TGF- β /p38/JNK (non-canonical) pathways play a role in the rate to which the keratinocytes can migrate. When we treat the animals with a combination of inhibitors blocking both canonical and non-canonical TGF- β pathways, it greatly reduced the rate of wound closure and had significant effects on certain known EMT genes.

2.3.2 Introduction

Regenerative medicine aims to make human regeneration a reality and it has become a key part of biomedical research in the last 25 years. Many lines of enquiry are used in labs around the world to achieve or stimulate regeneration in humans. While research on stem cells takes an important part in the field, the study of regenerating animal models also represents a great avenue to understand how nature has achieved the ability to replace loss body parts or organs. Many animal models, from invertebrates to vertebrates, are capable of a certain amount of regeneration. Which animal model to study depends in great part on the question asked? Urodele amphibians (salamanders) are vertebrates that have the best regenerating abilities amongst

tetrapods. They are also the closest phylogenetically to humans with such abilities making them great models for studying regeneration ⁶⁹. In this study, the axolotl (*Ambystoma Mexicanum*) limb was used as a model to try and understand how regeneration proceeds in this animal. Many signaling pathways have been shown to be important for regeneration (TGF- β , BMP, p53, Wnt) but we are still in need of many answers before we can hope to fully understand this complex process ^{18,31,61,66}.

Axolotl limb regeneration is morphologically well characterized and separated in different clearly identifiable stages ^{20,98}. The process can be broken into in two major phases: the preparation phase in which the wound is closed and the blastema is formed; and the redevelopment phase where the limb structures reappear ^{21,22}. Following an amputation, keratinocytes quickly migrate to close the wound. Cells from the dermis and muscle dedifferentiate, migrate under the wound epidermis and proliferate to form the blastema. The proliferation of the blastema eventually transitions to the start of the second phase of regeneration: the redevelopment phase. The redevelopment phase is characterized by redifferentiation of the different cell types and the patterning of the new limb ¹⁹⁻²¹

In the present study, we wanted to assess whether the cellular process known as epithelial to mesenchymal transition (EMT) was involved in limb regeneration. EMTs are known to be involved in mammalian wound healing, development and cancer ^{77,82}. Interestingly limb regeneration begins with a wound healing phase (preparation phase), then goes through a proliferative state (which could be compared to cancer in some ways) and then finally goes in a phase of redevelopment, thus, making regeneration comparable to development. For each process mentioned, wound healing, cancer and development, many types of EMT have been described ⁹⁹. These transitions are described by a change in cellular behavior and shape of epithelial cells which are usually not mobile. Epithelial cells are polarized cell and during EMT they acquire a more elongated shape resembling a mesenchymal cell. The process is reversible, hence the term “transition”. EMTs are usually characterized with the regulation of the expression of different molecular markers ⁷⁷. The process can be observed experimentally by looking at the expression of typical markers (Snail, ZEB, Twist etc.), when some mesenchymal markers are upregulated in epithelial cells and epithelial markers are down-regulated (hence epithelial to mesenchymal transition). Expression of genes such as Snails, Twists or ZEBs is up-regulated during the EMT process. These transcription factors are associated with migration

as they induced the expression of proteins like Vimentin and N-Cadherin. They also have a role in inhibiting expression of epithelial markers, such as E-Cadherin⁷⁷.

EMTs are known to be regulated by many signaling pathways⁷⁷. The TGF- β pathway is amongst the most studied one associated with these transitions. Through its canonical (SMAD signaling) and non-canonical (p38 and JNK) pathways, TGF- β has a regulatory effect on EMTs^{77,92,94}. The TGF- β canonical pathway signals through the phosphorylation of the TGF- β receptor type II (T β RII) when the ligand (TGF- β 1, 2 or 3) binds to it. This binding lead to the dimerization with the TGF- β receptor type I (T β RI). T β RII phosphorylates T β RI which transduces the signal via the phosphorylated SMADs (SMAD2 /SMAD3) on their C-Terminus region and participates to the transcription of target genes⁴³. Non-canonical pathways can also be triggered when the T β RI/II complex activates certain MAPK's pathways. The mechanism has not been studied as extensively as the canonical pathway; however, some studies have started to unravel how TGF- β can activate those pathways. TGF- β is known for its activation of the TAK1 (TGF- β activated kinase 1) MAPK. TAK1 can then activate by phosphorylation the p38 (on the Thr180/182) and/or JNK (on the Thr183/Tyr185) pathways^{55,100,101}. The activation of TAK1 is via the TRAF6 protein. Following TGF- β activation, TRAF6 is polyubiquitinated and this step leads to TAK1 activation. This activation is dependent of the binding between TRAF6 and the TGF- β receptor complex⁵⁸. In another study, it was shown that TRAF6 ubiquitination leads to the subsequent ubiquitination of TAK1, which is TGF- β ligand dependent. This modification is necessary for TAK1 phosphorylation and kinase activity^{58,102,103}. TRAF6 was also shown to be important for EMT, which confirms the importance of TGF- β non-canonical pathway in the process⁵⁸.

During axolotl limb regeneration, the TGF- β canonical signaling pathway is essential. If the pathway is blocked with SB-431542, the SMADs are not phosphorylated and formation of the blastema does not occur^{66,69,104}. It was shown previously that TGF- β is present in axolotl skin, thus stored in the ECM and ready to be activated following an injury²³. This explains in part the fast response and the presence of active TGF- β right after the amputation. In other regenerating models, TGF- β has also been shown to be important. The wound epidermis formation is blocked in *Xenopus* tail regeneration when the animals are treated with 100 μ M of

SB-431542⁶⁷. TGF- β has also been shown to be necessary for heart regeneration in zebrafish¹⁷.

As for the non-canonical pathways in regeneration, JNK has been shown to be necessary for blastema formation in the planarian model. Treating planarian with the JNK inhibitor SP-600125 prevents proliferation and blastema formation. In the same study, they show that wound healing is also inhibited by SP-600125⁷². In zebrafish wound closure of a partial/full thickness wound is driven by the JNK pathway¹⁶. The MAPK p38, another non-canonical TGF- β target, was shown to regulate heart regeneration in zebrafish⁷⁴. In the planarian, p38 inhibition with SB-203580, a p38 specific inhibitor, did not show any effect on blastema formation¹⁷. Taken together, all these studies show that both canonical and non-canonical TGF- β pathways are involved regeneration in different animal models.

In the present study, we have performed experiments showing that different EMT markers are expressed during the process of limb regeneration. We also show that EMT is regulated in a biphasic manner during regeneration. The expression of the different markers correlates with the wound closure phase (very early in the process in which keratinocytes migrate) and redevelopment phase (the latter stage of regeneration). However, not all genes are showing this bi-phasic regulation in both phases. These results point to two different EMT signatures during regeneration. To understand the importance of signaling regulating the expression of these EMT markers during the first phase (wound healing/closure), we used a pharmacological approach. We used inhibitors targeting the SMADs, p38 and JNK. We show the specificity of all the inhibitors, as each of them do not block the other's activation. Inhibiting SMADs, p38 and JNK individually showed no effect on wound closure and EMT markers expression. To observe an effect on EMT, animals had to be treated with a combination of inhibitors blocking SMAD, p38 and JNK. Consequently, wound closure was significantly delayed. The results demonstrate that all three pathways participate in the wound closure process. To further confirm that JNK and p38 roles in EMTs and wound closure are TGF- β dependent, we took advantage of the TAK1 inhibitor and showed similar results from the ones we observed when using the specific inhibitors to both proteins. All together, these results support the hypothesis that EMTs are important during limb regeneration. Also, their regulation is dependent in part on the TGF- β canonical and non-canonical pathways.

2.3.3 Results

2.3.3.1 EMT markers are regulated during limb regeneration

The regulation of known EMT markers was evaluated during the regeneration process. We started by measuring the expression of EMT markers by RT-qPCR on a regeneration time course covering all the major stages of regeneration. Many genes are known to be EMT markers. In this study, we looked at the transcription factors Snail, Slug, Twist1, Twist3, ZEB1 and ZEB2. The expression of mesenchymal markers Vimentin and N-Cadherin was also assessed as was the epithelial cell marker E-Cadherin. We performed RT-qPCR on a full regeneration time course and normalized each time point to the $t = 0\text{h}$ (considered basal level). The results show an up-regulation of Snail, Slug, Vimentin, N-Cadherin, ZEB1, ZEB2, Twist1 and Twist3 from 30 minutes to 3h hour post-amputation (Figure 1A-H). Interestingly, expression of these mesenchymal markers correlates with the wound closure process following injury. These RT-qPCR results also show a second phase of expression of EMT markers. When we look at the re-development phase later in regeneration, we observe that Snail, Twist 1, Vimentin and N-Cadherin are up-regulated (Figure 1A, C, G, H). This shows a bi-phasic regulation of EMT with a specific gene expression signature for each phase.

Seeing how EMT markers specific to the mesenchymal state were regulated, we looked at the epithelial marker E-Cadherin, known to be down-regulated in EMT. Results show that E-Cadherin is maintained to a relatively basal level throughout the regeneration process (Figure 1I). By comparing these different results, we observe that E-Cadherin is at a very low level compared to mesenchymal markers such as Snail and Vimentin during regeneration.

Altogether, these results suggest that EMT markers are expressed during regeneration and expression of various markers display different signatures depending if we look at the wound closure

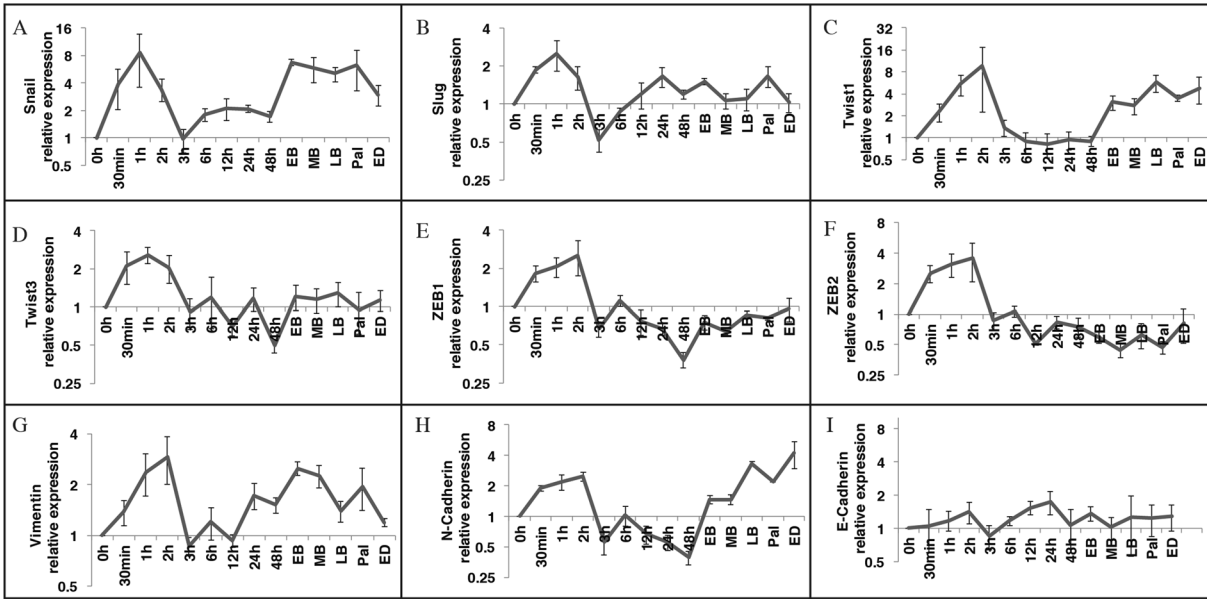


Figure 7. Figure 1. RT-qPCR on EMT markers during axolotl limb regeneration.

Tissue harvested at different time points during regeneration. Each time point is relativized on the T = 0 h (basal level). **(A–H)** Relative expression of different mesenchymal markers; **(A)** Snail, **(B)** Slug, **(C)** Twist1, **(D)** Twist3, **(E)** ZEB1, **(F)** ZEB2, **(G)** Vimentin, **(H)** N-Cadherin. **(I)** Relative expression of epithelial marker E-Cadherin. Normalized using GAPDH. Mean \pm s.e.m, N = 3.

2.3.3.2 EMT markers expression is localized in migrating keratinocytes and in blastema

The previous section showed a regulation of EMT markers during regeneration. RT-qPCR offers good quantitative results but it does not provide information on the localization or cells expressing the genes of interest. *In situ* hybridization combined with Tyramide Signal Amplification (TSA) was used to determine which cells were expressing the markers studied in Figure 1. We were able to design working probes specific for Snail, Vimentin and N-Cadherin (Figure 2). Interestingly, the three genes were not detected in $t = 0h$, as seen in the RT-qPCR results in Figure 1. The expression is observed in migrating keratinocytes 1h and 2h post-amputation. Following wound closure at 3h post-amputation, we still observed expression of these markers in the AEC. The expression is reduced to an undetectable level at 48h post-amputation (Supplementary Figure 1).

The RT-qPCR results in Figure 1 also showed expression of some of the markers during redevelopment phase. We performed *in situ* hybridization for later time points to compare the different cell types expressing EMT markers at the early stage of regeneration vs later stages. Starting at early bud, we observe expression of these markers in blastemal mesenchymal cells (Supplementary Figure 1).

We also looked at the epithelial marker E-Cadherin (Supplementary Figure 2) and we see no expression in migrating epithelial cells. We start seeing E-Cadherin expression when the keratinocytes just finished migrating over the open wound to close it.

Together these results corroborate with the RT-qPCR results (Figure 1).

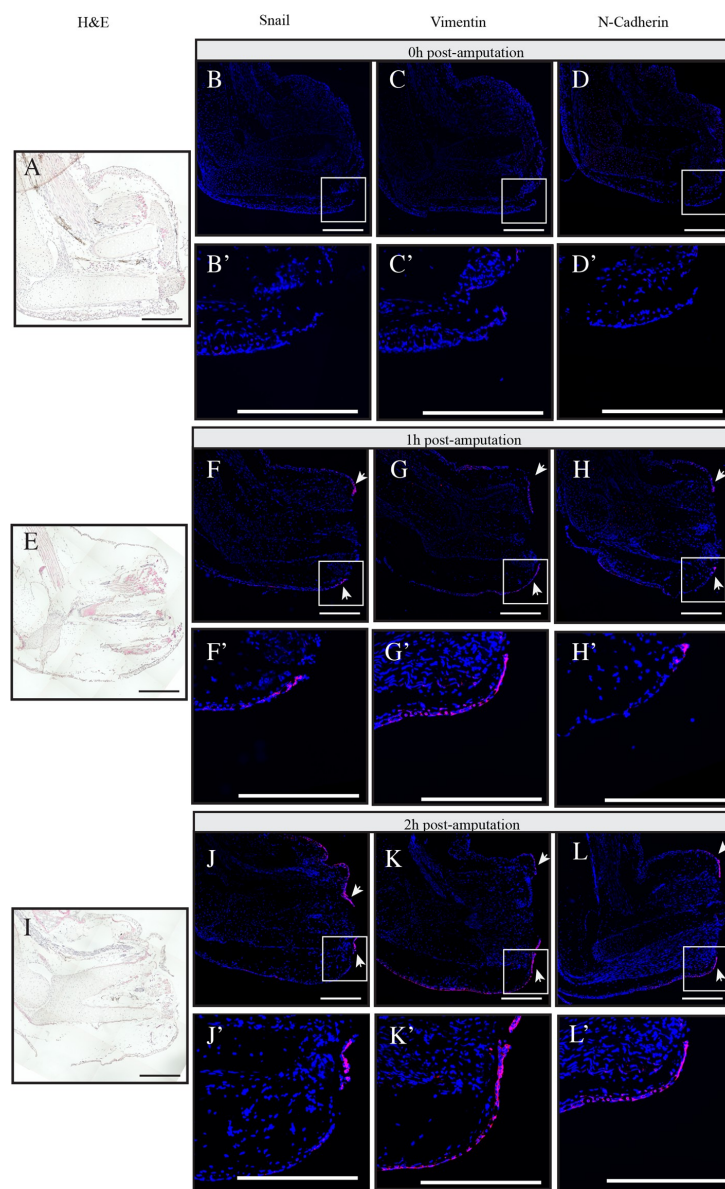


Figure 8. Figure 2. *In situ* hybridization using tyramide signal amplification showing the expression of EMT markers during regeneration.

Different regeneration time points (**A–D**) Time 0 h, (**E,F**) Time 1 h post-amputation, (**I–L**) Time 2 h post-amputation. (**A,E,I**) Hematoxylin and eosin (**H & E**) coloration. Overlay of nuclei staining with DAPI (blue) and *In situ* hybridization with Cy5 (red) for (**B–B'**,**F–F'**,**J–J'**) Snail, (**C–C'**,**G–G'**,**K–K'**) Vimentin, (**D–D'**,**H–H'**,**L–L'**) N-Cadherin. White boxes represent magnified areas. White arrows show the signal in migrating epithelia. Scale bars are 200µm. Composite images are shown.

2.3.3.3 JNK, p38 and TGF- β pathways as potential regulators for EMT markers

Seeing how EMT markers were regulated during regeneration, we wanted to understand what signaling pathways were responsible for modulating their expression. TGF- β is a well-known pathway for regulating EMT. We have previously shown that SB-431542, a TGF- β /SMAD canonical pathway inhibitor prevents blastema formation at 25 μ M and blocks phosphorylation of Smad2 and Smad3^{66,69}. With SB-431542 (inhibitor of the canonical pathway) treatments, no effect was observed on wound closure⁶⁶. TGF- β also acts via non-canonical pathways and can activate MAPKs such as p38 and JNK. We wondered whether these pathways could play a role in wound closure. In addition, p38 and JNK have been shown to be involved in modulating the EMT process. We looked at both p38 and JNK pathways to assess whether they could be involved in the EMT process during regeneration. Since it was never done before, we first looked at the regulation of both proteins during the regeneration process (Figure 3). For JNK, we used an antibody targeting the phosphorylation sites at Thr183 and Tyr185. The antibody can detect the two isoforms of JNK known p46 and p54. Both isoforms are quickly activated, starting around 1h post-amputation. The JNKp54 is down regulated at 6h. The p46 isoform's activation is maintained up to EB (Figure 3A). For p38, we used an antibody recognizing the Thr180/Tyr182 phosphorylated site. We observed phosphorylation very early in the process, starting at 1h post-amputation, up to EB (Figure 3B). The expression patterns of the two phosphorylated proteins correspond to the expression of the EMT markers during wound closure, as they are active in the first few hours following amputation. These results suggest that p38 and JNK are potential regulators of EMT at the beginning of regeneration since their activation corresponds to the upregulation of EMT markers during regeneration.

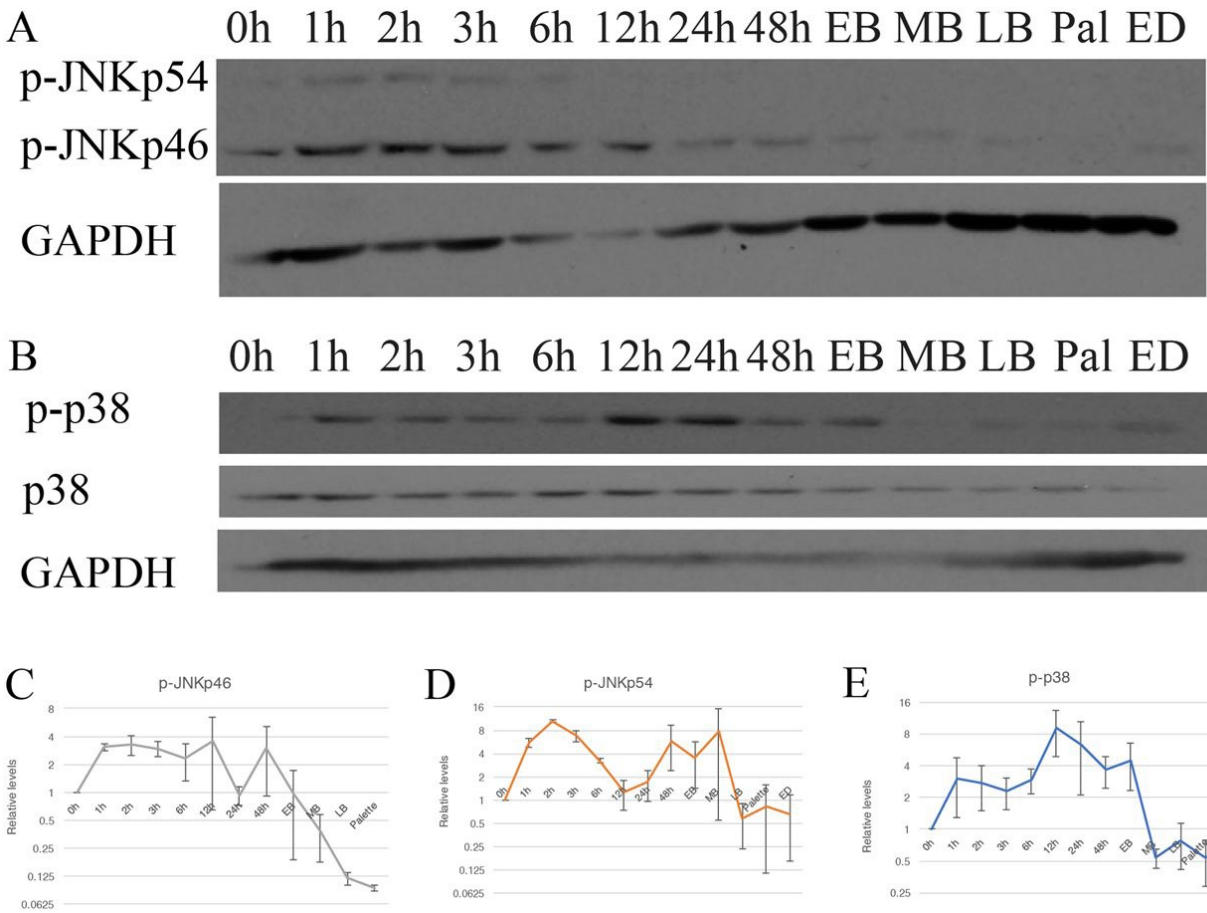


Figure 9. Figure 3. JNK and p38 activation during axolotl limb regeneration.

Western Blot analysis showing (A) p-JNK and (B) p-p38 and total p38 during the course of normal limb regeneration. GAPDH is used as a loading control. (C–E) Band quantification normalized on GAPDH and relativized on T = 0 h for (C) p-JNKp46, (D) p-JNKp54 and (E) p-p38. Means \pm s.e.m. N=3.

2.3.3.4 Effect of SB-431542, SB-203580 and SP-600125 on phosphorylation and wound closure

A pharmacological approach was used to understand if these different signaling pathways are important for wound closure and EMT during regeneration. SB-431542 was used to block the canonical TGF- β pathway. We showed in a previous study that SB-431542 blocks p-SMAD2 and p-SMAD3⁶⁹. SB-203580 was used to block p38 and SP-600125 to block JNK. Since the 2 latter inhibitors have never been used in axolotls before, we tested these inhibitors to make sure that they were functional and specific in regenerating axolotl limbs. The 1h post-amputation time point was selected since it corresponds to the peak of EMT marker expression. In Figure 4, we show that SB-431542 blocks p-SMAD2 without reducing the levels of p-JNK and p-p38 (Figure 4B). Similar results are observed while treating with SB-203580 as p-p38 is reduced but not p-SMAD2 or p-JNK (Figure 4C). When animals are treated with SP-600125, p-JNK is reduced but not p-SMAD2 and p-p38 (Figure 4D-E). The effects observed for p-SMAD2 when treated with SB-431542, p-p38 when treated with SB-203580, p-JNKp46 and p-JNKp54 when treated with SP-600125 where all significantly inhibited compared to the DMSO control. The levels of all the other conditions were not affected by the treatments. One-way ANOVA tests allowed us to compare the different treatments to each other. When looking at p-SMAD2 we observe a significant effect when treated with SB-431542 vs treatment with SP-600125 or SB-2013580. When looking at p-JNKp54, treatment with SP-600125 shows a significant effect compared to SB-431542 or SB-2013580. The second isoform, p-JNKp46 only shows a significance with a $p < 0.1$, but a clear tendency is shown that there is a difference between the SP-600125 and the 2 other treatments. The same is observed for p-p38 where the tendency shows that p-p38 is specifically reduced by the SB-203580 compared to the two other treatments.

These results confirm that we are able to block TGF- β canonical and non-canonical pathways with pharmacological inhibitors in regenerating limbs.

To understand whether p38 and JNK had a role in wound closure we treated animals with both inhibitors and did histology to assess epidermal migration. As Figure 4 shows, at 6h post-amputation we observe a fully closed wound in all treatments (Figure 4F-I). Treatment with SB-431542 also causes no effect on wound closure confirming the results from Levesque et al.,

2007 (Figure 4G). Seeing how none of these had any effects on wound closure, we wondered if by blocking one of the proteins the others could take over and drive wound closure.

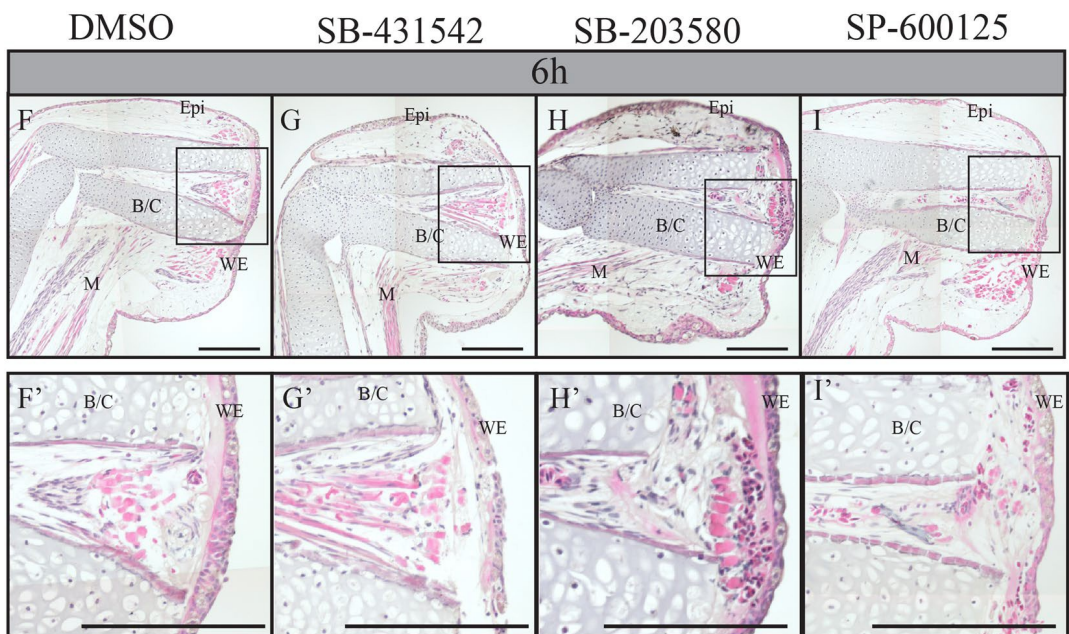
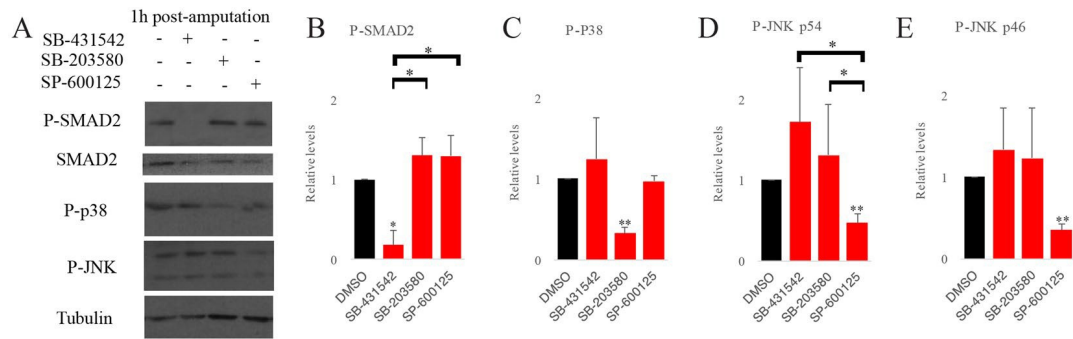


Figure 10. Figure 4. SB-431542, SB-203580 and SP-600125 treatments show no effect on wound closure.

(A) Western Blot analysis showing the effect of SB-431542, SB-203580 and SP-600125 on SMAD2, p38 and JNK phosphorylation 1 h post-amputation. Tubulin is used as a loading. (B–E) Band quantification of p-SMAD2, p-p38 and p-JNK and normalization on Tubulin (n=3). A one sample Student's t test was performed to compare each treatment to the DMSO control (relative value adjusted to 1 to allow comparison between experiments), represented by the asterisks over each bar in the graph. A one-way ANOVA was done to compare the different treatments together, represented by the asterisks over the brackets. *p<0.05, **p<0.005, Means ±s.e.m. Hematoxylin and eosin staining on treated axolotl limbs 6 h post-amputation. (F, F') DMSO treated animals (G, G') SB-431542 treated animals (H, H') SB-203580 treated animals (I, I') SP-600125 treated animals. All treatments show no effect on wound closure as the wound epidermis is formed as in the control. Scale bars are 200µM. Composite images are shown. (WE) wound epidermis, (M) Muscle, (Epi) Epidermis, (B/C) Bone and cartilage. The black rectangles show the fully formed wound epidermis in the magnified panels (F', G', H', I').

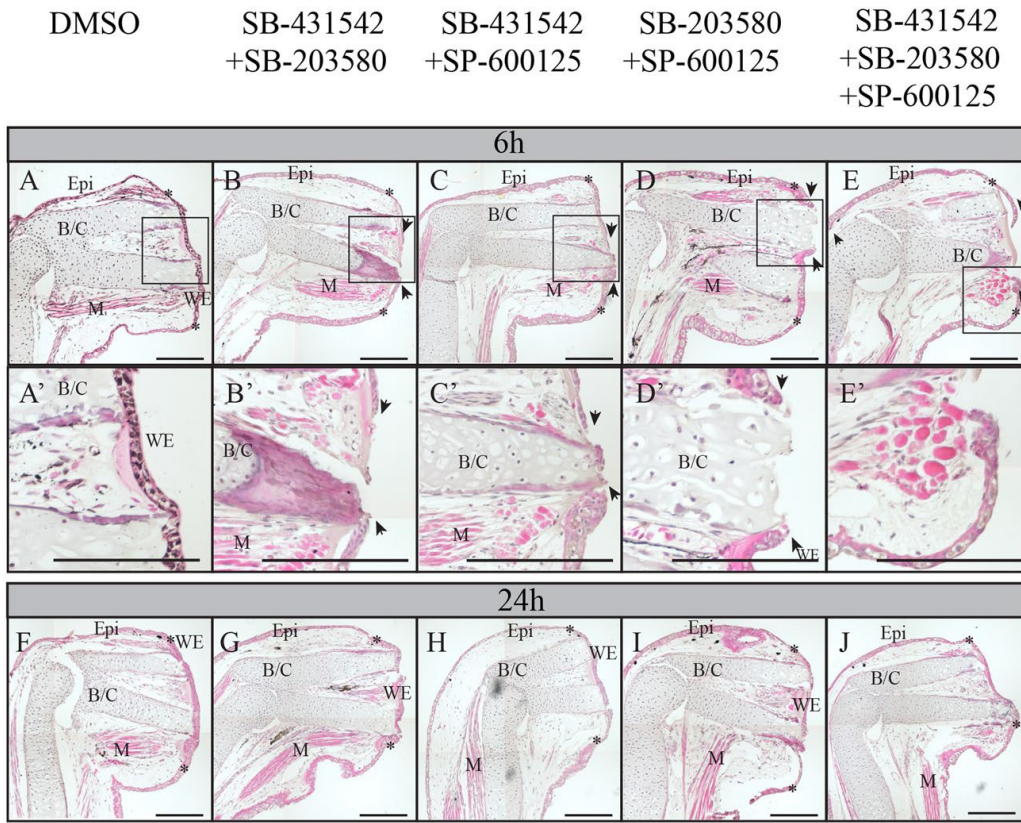
2.3.3.5 Effect of combination of inhibitors on wound closure

To observe if the different pathways could take over one another, we tested different combinations of treatments with the different inhibitors on animals. Wound closure was assessed in animals treated with different combinations of treatments using histology and compared them to DMSO control 6h post-amputation (Figure 5A). In a normal limb of animals 4-5 cm long, the wound is closed between 2-3h post-amputation (Supplementary Figure 3). Therefore, 6h was a good time-point to observe a possible effect on wound closure. Following the treatments with combinations of SB-431542/SB-203580, SB-431542/SP-600125 or SB-203580/SP-600125, we observe that the wound is not fully closed which indicates a delay compared to the DMSO control (Figure 5A vs B-D).

By treating with all three inhibitors, we see the wound is not healed after 6h indicating that a significant inhibition is occurring (Figure 5E).

We also show results at 24h post-amputation. At this time point, all of the treated animals show a closed wound (Figure 5F-J). This result shows a delay in the process but not a full inhibition. In panel K of figure 5 we determined the percentage of closure for each treatment and observed a more severe inhibition when all drugs were combined suggesting some interaction between canonical and non-canonical signaling.

We also wanted to look at the effect of these treatments on the expression of EMT markers. We again used the 1h post-amputation time point as it showed the maximum expression for all markers. When doing RT-qPCR on the combination of only 2 inhibitors, very few to no inhibition is observed. When we combine of all three inhibitors (blocking all three pathways), we see an effect on the expression of most EMT markers. We observe a significant inhibition on Slug, ZEB2, Twist1, Twist3, Vimentin and N-Cadherin (Supplementary Figure 4)



K Wound closure 6h
p-a

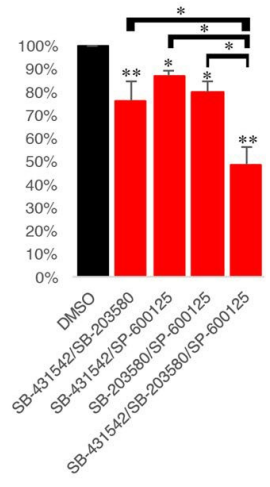


Figure 11. Figure 5. Effect of combinations of SB-431542, SB-230580 and SP-600125 on wound closure.

Hematoxylin and eosin staining on treated axolotl limbs. (A–E) 6 h post-amputation (A) DMSO control, the wound is fully closed; (B) SB-431542 and SB-203580 treatment, wound epidermis is not formed; (C) SB-431542 and SP-600125 treatment, wound epidermis is not formed; (D) SB-203580 and SP-600125 treatment, wound epidermis is not formed; (E) SB-431542, SB-203580 and SP-600125 treatment, wound epidermis is not formed. (F–J) 24 h post-amputation, (F) DMSO control, the wound is fully closed; (G) SB-431542 and SB-203580 treatment, the wound is fully closed; (H) SB-431542 and SP-600125 treatment, the wound is fully closed; (I) SB-203580 and SP-600125 treatment, the wound is fully closed; (J) SB-431542, SB-203580 and SP-600125 treatment, the wound is fully closed. (K) Average percentage of wound closure of each treatment 6 h post-amputation. A Student's t test was performed to compare each treatment to DMSO control (fully closed wound, 100%), represented by the asterisks over each bar in the graph. A one-way ANOVA was done to compare the different treatments together, represented by the asterisks over the brackets. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, Means \pm s.e.m. Scale bars are 200 μ m. Composite images are shown. (WE) wound epidermis, (M) Muscle, (Epi) Epidermis, (B/C) Bone and cartilage. The black rectangles show the fully formed wound epidermis or the open wounds, which is magnified in (A', B', C', D', E'). Asterisks show the site of amputation. Black arrowheads show the migrating keratinocytes.

2.3.3.6 Effect of TAK1 inhibition on wound closure and p38/JNK phosphorylation

The proteins p38 and JNK can be activated via many different signaling pathways, not only TGF- β ⁵⁴. Their activation by TGF- β is known to go through the MAPK TAK1 (TGF- β activated kinase 1)^{54,55,105}. To confirm that the involvements of p38 and JNK in limb regeneration EMTs are TGF- β dependent, we took advantage of the commercially available TAK1 inhibitor, the 5Z-7-oxozeanol. It was shown to block TAK1 activity and p38/JNK phosphorylation⁵⁷. First, we had to assess if the inhibitor was specifically blocking the TGF- β non-canonical pathway, but had no effect on the canonical pathway. In Figure 6, we see that p-p38 and p-JNK are reduced by a treatment with 5Z-7-Oxozeanol. Inhibition levels are very similar between the 5Z-7-Oxozeanol and the p38 and JNK specific inhibitors. All the proteins observed showed a 70% inhibition except for the p-JNKp54 isoform that showed a 60% inhibition when treated with the SP-600125. Also, p-SMAD2 is not affected when we only treat the animals with the TAK1 inhibitor, but is when we add the SB-431542 (Figure 6A-B).

As we did in the previous section, we looked at wound closure following the treatments with the TAK1 inhibitor. Treating only with the 5Z-7-Oxozeanol blocks p38 and JNK and shows a delay in wound closure 6h post-amputation. The migrating keratinocytes have not closed the wound. When we combined SB-431542 and 5Z-7-Oxozeanol, we observed that the wound is not closed 6h hour post-amputation, and the effect seems stronger as the wound has not begun to heal (Figure 6F-H & L). At 24h post-amputation, the wound is fully closed confirming a delay, but again not a full inhibition of the process (Figure 6I-K). These results indicate that the regulation of p38 and JNK during EMT and wound closure are TGF- β dependent.

We looked at the effect of these treatments on the expression of the EMT markers. When only treating with the 5Z-7-Oxozeanol we observe limited inhibition on EMT markers as only ZEB2 and Slug are reduced by the treatment. When blocking both canonical and non-canonical pathways with the combination of SB-431542/5Z-7-Oxozeanol we observe a stronger inhibition. The genes Slug, ZEB2, Twist3, Vimentin and N-Cadherin are all significantly reduced while Snail, ZEB1 and Twist1 don't show a significant inhibition (Supplementary Figure 5).

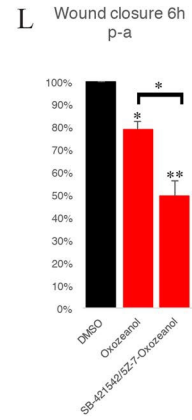
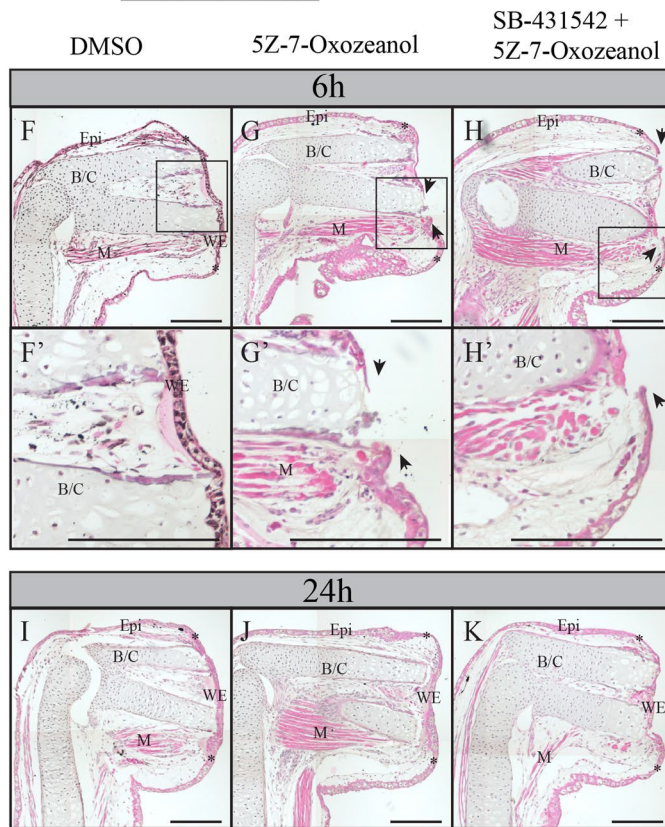
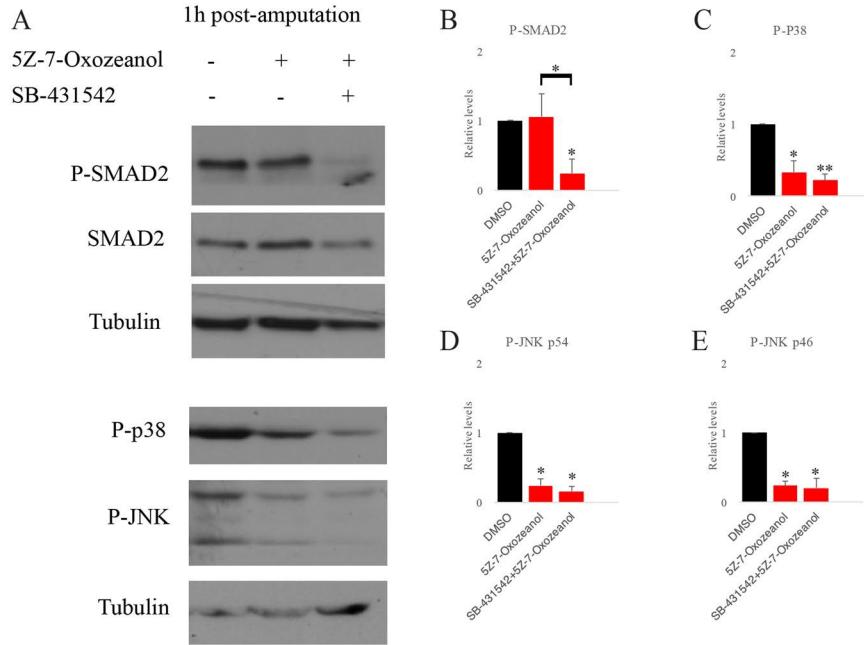


Figure 12. Figure 6. Effect of 5Z-7-Oxozeanol on protein phosphorylation and wound closure.

(A) Western Blot analysis showing the effect of 5Z-7-Oxozeanol and SB-431542 on SMAD2, p38 and JNK phosphorylation 1 h post-amputation. Tubulin is used as a loading. (B–E) Band quantification of (B) p-SMAD2, (C) p-p38 and (D, E) p-JNK, normalization on Tubulin (N=3). A one sample Student's t test was performed to compare each treatment to DMSO control (relative value of 1 to compare between experiments), represented by the asterisks over each bar in the graph. A one-way ANOVA was done to compare the different treatments together, represented by the asterisks over the brackets. *p <0.05, **p <0.005, Means \pm s.e.m. (F–K) Hematoxylin and eosin staining on treated axolotl limbs. (F–H) 6 h post-amputation (F, F') DMSO control, the wound is fully closed (G, G') 5Z-7-Oxozeanol treatment, wound epidermis is not formed (H, H') Combination of 5Z-7-Oxozeanol and SB-431542 treatment, wound epidermis is not formed. (I–K) 24 h post-amputation. (I) DMSO control, the wound is closed (J) 5Z-7-Oxozeanol treatment, the wound is closed (K) Combination of 5Z-7-Oxozeanol and SB-431542 treatment, the wound is closed. (L) Average percentage of wound closure of each treatment 6 h post-amputation. A one sample Student's t test was performed to compare each treatment to DMSO control (fully closed wound, 100%), represented by the asterisks over each bar in the graph. A one-way ANOVA was done to compare the different treatments together, represented by the asterisks over the brackets *p <0.05, **p <0.005, Means \pm s.e.m. Scale bars are 200 μ m. Composite images are shown. N=3. (WE) wound epidermis, (M) Muscle, (Epi) Epidermis, (B/C) Bone and cartilage. The black rectangles show the fully formed wound epidermis or the open wound, which is magnified in (A',B',C',D',E'). Asterisks show the site of amputation. Black arrowheads show the migrating keratinocytes.

2.3.4 Discussion

Epithelial to mesenchymal transitions are present in many different biological processes. From development to cancer progression and wound healing, these behavioral changes in epithelial cells are important for cellular migration. During EMT, cells lose their polarity and anchorage to gain the ability to migrate⁷⁷. In the case of limb regeneration almost no data is available regarding EMT and how it is controlled. Regeneration is a combination of wound healing followed by a proliferation phase and a development phase. Seeing how EMTs are involved in these cellular processes in other systems, it was interesting to study their expression during regeneration.

The expression profile experiments demonstrated that there was a wound healing and a redevelopment stage of EMT during limb regeneration. Wound epidermis formation occurs very early following amputation and is a crucial step for regeneration to proceed. Both the wound healing and redevelopment phases are of interest but it was decided to focus on the wound healing for the present study as it coincides with TGF- β activation as our lab has shown in previous publications^{66,69}.

RT-qPCR and *in situ* hybridization results not only showed a regulation of multiple EMT markers, but also that two EMT signatures can be observed between the wound healing and redevelopment phases of regeneration. All the mesenchymal markers we looked at were up-regulated during the wound healing phase. As for E-Cadherin, it did not show much regulation in qPCR results during the whole regeneration process. When looking at the redevelopment phase, only Snail, Twist1, N-Cadherin and Vimentin were increased. During the wound closure phase, the *in-situ* hybridization shows that the EMT genes are localized in the migrating keratinocytes. The genes observed in redevelopment phase were localized in the blastema which is made of mesenchymal cells. E-Cadherin was not observed in migrating keratinocyte, but its expression was detected when the wound closes and the epithelial cells anchor themselves together.

The RT-qPCR and *in situ* hybridization results corroborated each other and allowed the identification of two EMT phases. In the first few hours following amputation, expression of EMT markers is observed in migrating keratinocytes. This expression is short lived, and by 3h

post-amputation it is fading in keratinocytes. At 48 hours, we did not detect signal anymore. Later, as shown with RT-qPCR results, expression is detected at time points when the blastema starts to form at the early bud stage. The signal grows stronger as the redevelopment phase progresses up to early differentiation stage.

In this study, we did not focus on the redevelopment phase, but in future studies it would be of interest to evaluate if EMT is important at this point during regeneration. Other studies have that EMT genes are important during limb bud development. Seeing how the redevelopment phase of regeneration has some similarity with embryonic development, these EMT might play a role in regeneration similar to what is observed during embryonic development. The Twist transcription factors have been shown to play an important role in the growth and differentiation of the mouse limb bud ¹⁰⁶. Interestingly, this potential importance of Twist during limb regeneration has also been observed ³⁵. Another study looked at the Slug transcription factor during chick limb development. This paper showed that Slug was expressed in undifferentiated mesenchyme and was important for the maintenance of the progress zone ⁸⁰. It is possible that these EMT genes during limb redevelopment are there to maintain the mesenchymal cells of the blastema into a dedifferentiated state, as it is observed in development.

The wound closure steps result in the formation of the wound epidermis. If the epidermis is mechanically removed the limb will never regenerate ²⁵. An interesting aspect of wound closure in salamander regeneration is the speed with which it occurs. In mammals, reepithelization can take many days or even weeks to complete ³⁶. Wound closure is usually complete within a few hours in axolotls ^{36,107}. EMTs have been shown to play an important role in wound healing in mammals in two ways. Some evidence shows that myofibroblasts can arise from the epidermal cells that underwent an EMT program ¹⁰⁸. In the case of axolotl, myofibroblasts are not detectable in axolotl ^{3,36}. The second case of EMT in wound healing is for the migration of keratinocytes during reepithelization. In the case of reepithelization, a lot of EMT traits have been shown, like cell motility and the reduction of epithelial traits ⁸³. At the molecular level, some EMT characteristics have been observed. Vimentin knockout mice show a major defect in the reepithelization process, but also in their EMT program in the case of an excision injury ⁸⁷. Slug “knock-out” mice show a reduced reepithelization ^{85,109}. Slug is the only EMT transcription factor that has been shown to have a functional role in reepithelization. In the axolotl, we observe an up-regulation of 6 transcription factors (Figure 1) ⁸³. We also observe a

correlation in the delay of wound closure with the reduced expression of Slug, Twist1, Twist3 and ZEB2 suggesting they play a part in the wound closure process (Supplementary Figure. 4, 5). It could be that the faster rate of wound epidermis formation in axolotl compared to mammal results from higher number of EMT inducing genes involved in the reepithelization process. TGF- β /SMAD canonical pathway had no effect on wound closure rates in axolotls ⁶⁶. Our Western Blot results showed that the non-canonical factors p38 and JNK were active during this wound closure phase. Considering these results, we also tested their importance in wound closure. Treating these animals with specific inhibitors for JNK and p38 showed no effect either on wound closure. To ascertain the specificity of the pharmacological inhibitors we looked at the phosphorylation of the different targets. We showed that each inhibitor blocks its predicted target, but also that they were specific and did not inhibit the other targets. Seeing how complex limb regeneration is, we thought that when blocking one pathway another one could take over or compensate and complete the wound closure, since the Western Blot results showed no inhibition of the non-targeted proteins.

Treating animals with combinations of SB-431542/SB-203580, SB-431542/SP-600125 and SB-203580/SP-600125 showed a reduced rate in the wound closure at 6h post-amputation with all of these treatments not fully closed. When treating with all three inhibitors at the same time, we observed an even more important delay in wound closure. In this case the leading keratinocytes don't seem to have started to migrate at 6 hours post-amputation as they are still very close to the amputation site. Thus, when blocking all 3 pathways, we get a stronger effect on wound closure. These results could mean two things. First, either the participation of all three pathways are necessary for the process. Secondly, they could compensate for each other during wound healing, if one is blocked the two others can take over.

JNK and p38 are proteins central to many signaling pathways. Consequently, we could not determine if their activation was TGF- β dependent using their specific inhibitors. The 5Z-7-Oxozeanol blocks the kinase action of TAK1, the kinase responsible for TGF- β dependent activation p38 and JNK. With both treatment combinations of SB-203580/SP-600125 or 5Z-7-Oxozeanol, we start to understand how the signaling occurs during regeneration. The effect of 5Z-7-Oxozeanol on wound closure was similar to the combination of SB-203580/SP-600125 leading to the conclusion that activation of p38 and JNK during wound closure was TGF- β dependent. The combined treatment with SB-431542 and 5Z-7-Oxozeanol showed similar

results when compared to the combined treatment with SB-431542/SB-203580/SP-600125. We saw a stronger effect on wound closure than when only treating with 5Z-7-Oxozeanol. Following these results, we also did the RT-qPCR of the different treatments on EMT genes. We see the highest level of inhibition with both SB-431542/5Z-7-Oxozeanol and SB-431542/SB-203580/SP-600125 treatments. This correlates to the histology results as we observe a more pronounced effect on wound closure in these treatments.

Results show that we can only slow down the process of wound closure as when we look at 24h post-amputation with a treatment of SB-431542/SB-203580/SP-600125 or with the SB-431542/5Z-7-Oxozeanol the wound is closed. Seeing how we can block all these pathways, we believed we would be able to block wound closure. As mentioned earlier, the axolotl limb is a complex structure with many cell types. In addition, multiple pathways beside TGF- β could be involved in wound closure. Not all EMT genes were reduced following TGF- β inhibition (e.g. Snail, ZEB1 and Twist1) which would support/suggest the presence of other pathways being active. The participation of another pathway would make sense considering the importance of EMT processes in regeneration and wound healing.

In this paper, we show that EMT is important in the context of regeneration since the process is tightly linked with keratinocytes migration and wound closure. This is the first step for perfect healing, since it leads to the formation of the apical epidermal cap (AEC), a fundamental structure for regeneration²⁵. We also show how robust wound closure is in axolotls. Even if we block both canonical and non-canonical TGF- β pathways the animal is still capable of eventually closing its wound, showing the importance of the process. The study also provides additional data on EMTs in wound healing in an *in vivo* model. Future experiments looking at alternate pathways involved in mediating EMTs will be important to fully understand this process during regeneration.

2.3.5 Material and Methods

2.3.5.1 Animal care

Axolotl were purchased from Ambystoma Genetic Stock Center (Lexington, KY) and caring was done according to Denis et al. 2016. For all experiments, animals were between 4 and 5cm

long, and were about 4 months old. Each drug was added to the water at the determined concentration. The SB-431542 was purchased from Sigma-Aldrich (S4317), the SB-203580 and SP-600125 from Selleckchem (S1076 and S1460). All inhibitors were diluted at a concentration of 10mM in DMSO (Fisher Scientific BP231-100). The appropriate amounts of 10mM stock were then diluted to the desired concentration for each experiment directly in 5mL of 20% Holtfreter's solution for each animal. The solutions were changed daily and all treatments were started 24 hours before amputation. For details of each inhibitor see Table 1. All animal experimentations were approved by the animal care and ethics committee of Université de Montréal (approval code: CDEA#17-123) which is recognised by the Canadian Council for Animal Care.

2.3.5.2 RNA isolation and RT-qPCR

Regenerating limb tissues were harvested including 1mm of stump from the amputation level for each time-point studied. Tissues were shredded in Invitrogen™ TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, 15596026) using syringes (18-23 gauges). RNA was isolated following manufacturer's guideline. The RNA quantification was done according to Denis et al. 2016. For each sample, 200ng of RNA were reverse transcribed (RT) using SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, 11754050), using the manufacturer's guidelines. RTs were diluted 1:8 in RNase free water to a final volume of 160µL.

For qPCR, 2µL of cDNA were used per reaction in our lab made mastermix [(1X Standard *Taq* reaction buffer (New England Biolabs), 0.5mM MgSO₄, 0.33X SYBR Green I (Life Technologies, S7580), 0.2mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific, 10297018), 0.5 units of Hot Start *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, M0495S)] and the volume was completed to 20µL with RNase free water. Primers (forward and reverse) for each gene of interest were added at a final concentration of 0.25µM. qPCR reactions were done on the LightCycler® 480 Instrument (Roche). The program used was: 2 minutes denaturation at 94°C, 40 cycles of [15sec 94°C denaturation, 30sec 60°C annealing, 60sec 72°C elongation]. A 10 minutes melt curve was done to confirm primer specificity. Primers are listed in Table 2.

2.3.5.3 *In situ* hybridization using Tyramide Signal Amplification (TSA)

Regenerating limbs were harvested at desired time points post-amputation and fixed overnight at 4°C in 4% PFA in 0.7X PBS. Samples were paraffin embedded, cut to a thickness of 10µm using a microtome, dried overnight, deparaffinised in toluene and rehydrated in decreasing concentration of ethanol. Following rehydration, samples were treated with proteinase K (Thermo Fisher Scientific, 25530015) at 5µg/mL in 0.1M TrisHCL pH7.5, 50mM EDTA pH8.0 in PBS-T. Samples were then fixed 5 minutes in 4% PFA in 0.7X PBS and rinsed in 0.7X PBS. Pre-hybridization was done at 42°C for 1 hour in hybridization solution (50% Formamide (Fisher Scientific, BP227-100), 2X SSC, 1X Denhardt's, 0.5% Sodium pyrophosphate (Sigma Aldrich, P8135), 0.5% SDS, 25µg/mL salmon sperm DNA (Thermo Fisher Scientific, 15632011), 250µg/mL yeast tRNA, 0.25M TrisHCl). For hybridization, the probes were diluted at 5µg/mL in hybridization solution. Hybridization was done O/N at 42°C. On the next day, slides were rinsed successively in 2X SSC, 2XSSC/50% formamide and 1X SSC at hybridization temperature, and then rinsed in 0.1X SSC and 0.7X PBS at room temperature. Samples were blocked 1h at room temperature in 10% sheep serum (Sigma Aldrich, S3772) in MAB-T (100mM NaCl, 100mM maleic anhydride, 0.3% Triton, pH7.5). Incubation with anti-digoxigenin (Roche, 11093274910) 0.002µg/µL in blocking solution O/N at 4°C. The next day, slides were rinsed 3 times in MAB-T and incubated with anti-mouse antibody (Biorad, 170-6516) 1:400 in blocking solution for 1 hour at RT. Samples were rinsed 3 times in MAB-T and incubated 7 minutes with Tyramide-CF640R (Biotium, 92175) in 0.005% H₂O₂ 0.7X PBS and rinsed 3 times in 0.7X PBS. Mounting was done using ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Thermo Fisher Scientific, 36931). Slides were analysed with a Zeiss Axio Imager M2 Optical Microscope (Zeiss, Munich, Germany). Pictures were taken with the AxioCam Monochrom Mr using tiling. A composite image was made followed by a stitching step and cropped to show the area of interest.

2.3.5.4 Protein isolation and Western blotting

Proteins were harvested at different time points post-amputation and included 1mm of stump from the amputation site. Samples were sonicated in 50 μ L of Laemmli solution containing 200mM DTT and 50mM of NaF using the Sonic Dismembrator Model 100 (Fisher Scientific) for 10 seconds on ice. The proteins were quantified using the EZQ[®] Protein quantification kit (Thermo Fisher, R33200) following manufacturer's guidelines. For Western blotting, 20 μ g of each sample was used as described in Denis et.al 2016. Identical conditions were used for all antibodies. Blocking was done 1 hour at RT in 10% Chicken serum (Thermo Fisher, 16110082) in TBS-T. Primary antibodies incubations were done at 4°C O/N. The p-JNK (Cell Signaling Technology, Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), 4668), p-p38 (Cell Signaling Technology, Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182), 9211), total p38 (Cell Signaling Technology, p38 MAPK, 9212), p-SMAD2 (Cells Signaling Technology, Phospho-SMAD2, 3108) and total SMAD2 (Cell Signaling Technology, SMAD2, 5339) antibodies were used 1/1000 in (5% BSA, 0.2% Tween20, 0.002% NaN₃ in 1X TBS). The loading controls: GAPDH (Sigma-Aldrich, Anti-GAPDH, G8795) was used at 1:10000 in blocking solution and α -Tubulin at 1:5000 (Neomarkers, α -Tubulin, DM1A) in blocking solution. For immuno-detection, we used Lumili-light^{Plus} ECL (Roche, **12015196001**) for p-JNK, p-p38, total p38, p-SMAD2 and the 20X LumiGlo[®] ECL Reagent (Cell Signaling Technology, 7003) for GAPDH, Tubulin and total SMAD2. Revelation was done using auto-radiographic films (Progene, 39-20810).

2.3.5.5 Eosin and Hematoxylin coloration

Regenerating limbs were processed as described above for paraffin embedment. Slides were successively put in Mayer's hematoxylin (Dako Cytomation, S3309) for 75sec, thoroughly rinsed in water, put in 0.08% NH₄OH for 20sec, in 80% ethanol for 1 min, in Eosin for 30sec and rinsed in 80% ethanol for 30sec. Samples were dehydrated in 95% ethanol two times for 1 min, 100% twice for 1 minute and two times in xylene for 1 minute. Mounting was done in PermountTM Mounting medium (Fisher Scientific, Sp15-100). Slides were visualised using a Zeiss Axio Imager M2 Optical Microscope (Zeiss, Munich, Germany). Picture were taken with the Axiocam 506 color using tiling. A composite image was made followed by a stitching step and cropped to show the area of interest.

2.3.6 Acknowledgements:

We would like to acknowledge the help of Dr. Antonio Nanci for the use of histology and microscopy facility. We also would like to thank Pierre Rompré, expert in biostatistics in the Faculty of Dentistry at Université de Montréal, for help with the statistical analyses.

2.3.7 Competing interests:

The authors declare that there are no competing interests both financial and non-financial.

2.3.8 Author contributions:

FS performed all the experiments and wrote the manuscript. JFD helped with the amputations and preparation of the samples. HL did some of the *in-situ* hybridization experiments. SR supervised the project, helped with the drafting of the manuscript and the design of the experiments

2.3.9 Funding

This research was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research [MOP: 111013] to S.R.

2.3.10 Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38171-5>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or

format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Tableau I. Table 1. Details of the inhibitors used

Inhibitor	Company	Doses used
SB-431542	Sigma Aldrich (S4317)	25 μ M
SB-203580	Selleckchem (S1076)	50 μ M
SP-600125	Selleckchem (S1450)	5 μ M
5Z-7-Oxozeanol	Millipore Sigma (499610)	1 μ M

Tableau II. Table 2. List and sequence of the RT-qPCR primers

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
GAPDH	TTGTCCTACGTGTGCTGTCTGT	TCACACAGTGCCAAGATAAGTGTT
Snail	AGAAGGAGTATGTCAGCCTGGG	TGAGAACGGCTTTTCACCTGT
Slug	ATGCTGTAGGGAGAGCGTGGAG	CAGCTCGCTGTAGTTGGGCTTCT
Twist1	ACATTGCCACACTCCATTT	TAGACACCGGATCCATCAGC
Twist3	GCTATGCCTTCTCGGTTTGG	ACTTTCAGGTGGGGGTTCCT
ZEB1	GAGGAGGACGAGAAAGATGTTGA	CACTCATGGGTATGTCCTCTTCC
ZEB2	TGTTTATGGGAAGTTAGGTCAGCA	GTCCATCGAATGATCTCCAT
Vimentin	GCCTTCAGGACGAAATCCAG	CAGTGATCCTGCACTCCTCG
N-Cadherin	CAGCCGGATACTCTGGAACC	GTCCCAATGTCACCAGGAT
E-Cadherin	CTTTGTTGCCCCCTGATGA	TACGCATTACGTCTGGTCGG

Tableau III. Table 3. Sequence of primers used for probe synthesis

Gene	Forward sequence	Reverse sequence (with T7 promoter sequence)
		TAATACGACTCACTATAGGG
Snail	AGAAGGAGTATGTCAGCCTGGG	AAGGCCCGGTTGCAGTG
		TAATACGACTCACTATAGGG
Vimentin	AAGAGCTCGTCCTACCGCAG	TCGGCCAGGGAGAAGTCC
		TAATACGACTCACTATAGGG
N-Cadherin	CAGCCGGATACTCTGGAACC	TGCTCCCCACCACTACTTGAA
		TAATACGACTCACTATAGGG
E-Cadherin	ACCACGAGAATTTTCAATTTGC	CCCAGTGTAACAGCAATGGTG

2.3.11 Supplementary information

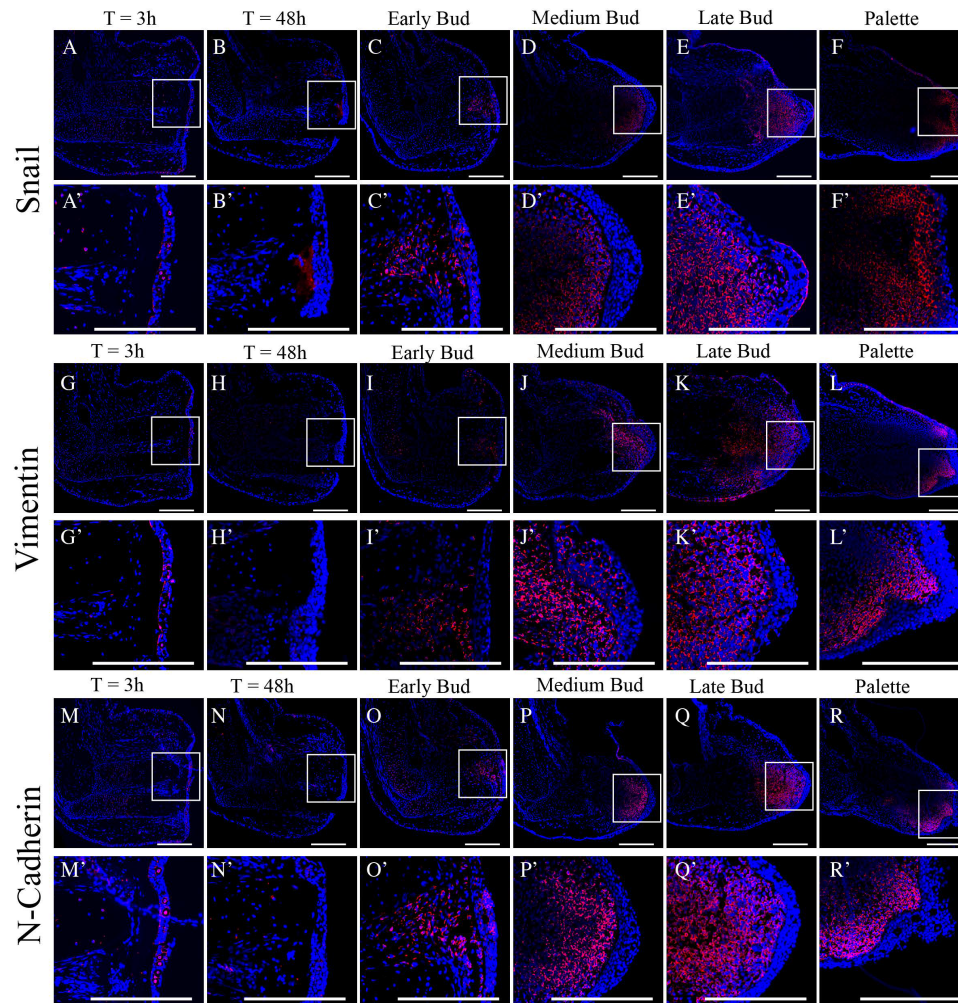


Figure 13. Supplementary Figure 1 In situ hybridization using tyramide showing the expression of Snail, Vimentin and N-Cadherin during regeneration.

(A, G, M) 3h post-amputation. (B, H, N) 48h post-amputation. (C, I, O) Early Bud stage. (D, J, P) Medium Bud stage (E, K, Q) Late Bud stage (F, L, R) Palette stage. Overlay of nuclei staining with DAPI (blue) and *In situ* hybridization with Cy5 (red) for (A-F and A'-F' magnified view of box) Snail; (G-L and G'-L' magnified view of box) Vimentin; and (M-R and M'-R' magnified view of box) N-Cadherin. White boxes represent magnified areas. Scale bars are 200 μ m. Composite images are shown.

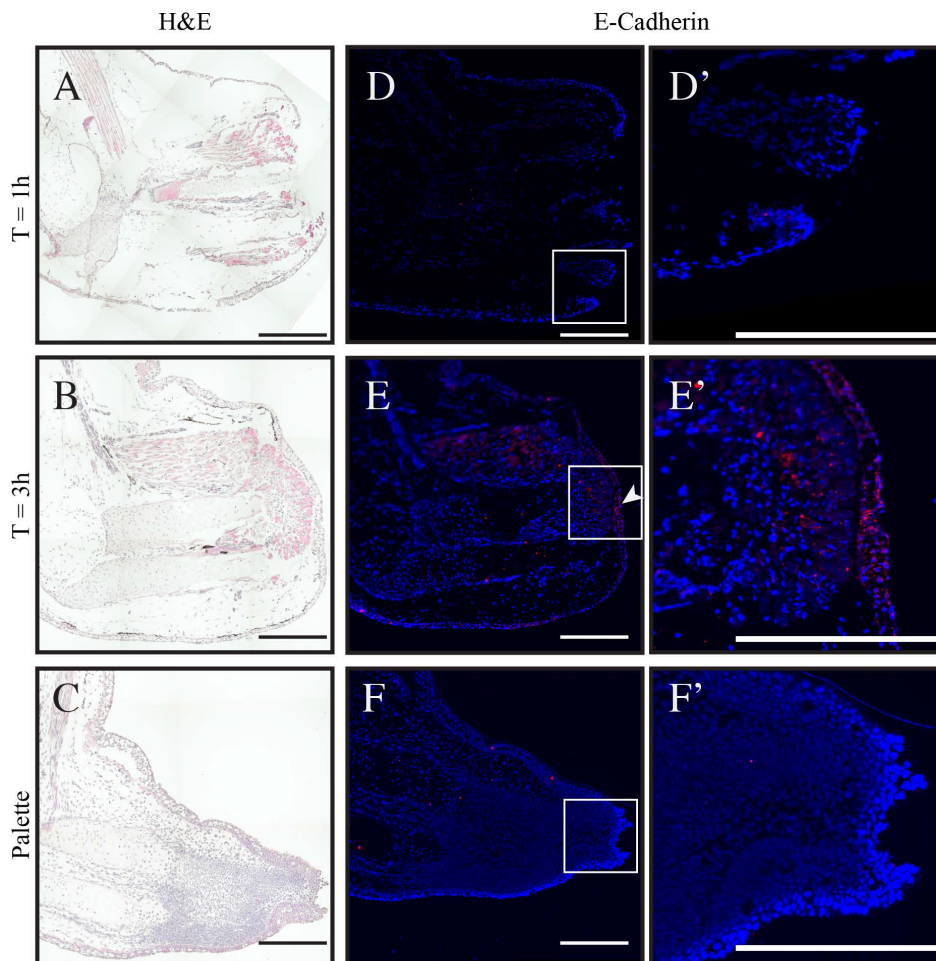


Figure 14. Supplementary Figure 2 In situ hybridization using tyramide showing the expression of E-Cadherin during regeneration.

Different regeneration time points (A, D) Time 1h post-amputation, (B,E) Time 2h post-amputation with a closed wound, (C, F) Stage palette. (A-C) Hematoxylin and eosin coloration. (D-F) Overlay of nuclei staining with DAPI (blue) and In situ hybridization with Cy5 (red) for E-Cadherin (D'-F' magnified view of box). White boxes represent magnified areas. White arrows show the signal in recently formed epithelia. Scale bars are 200 μ m. Composite images are shown.

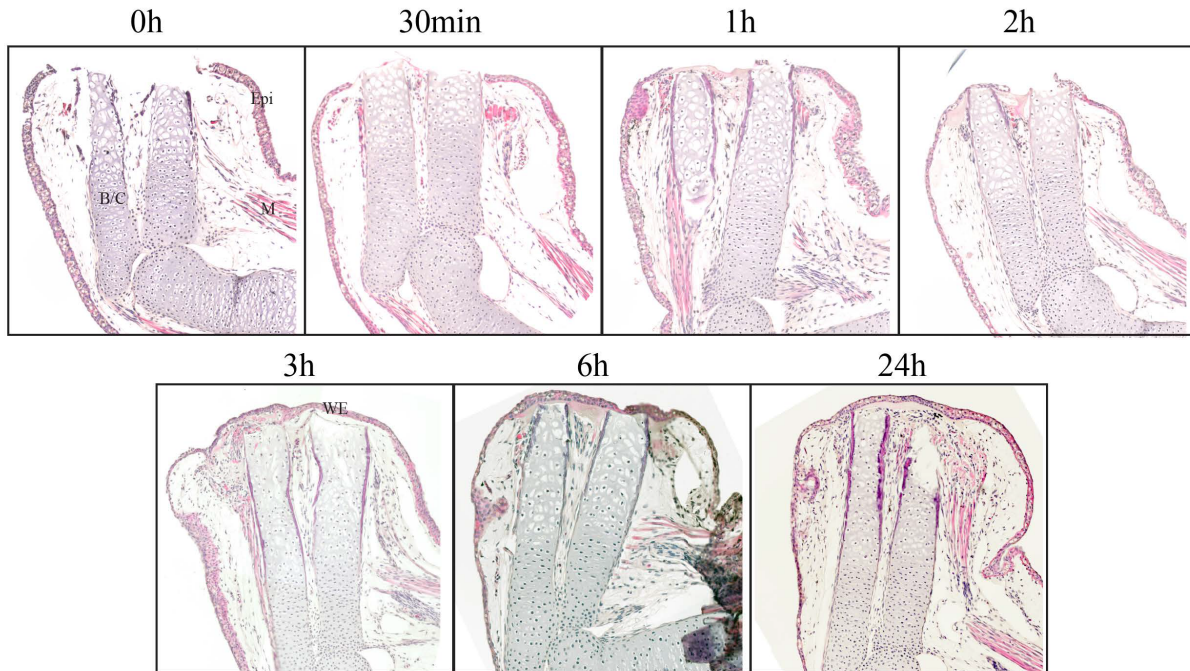


Figure 15. Supplementary Figure 3 Time course of normal wound closure following limb amputation in axolotls.

Hematoxylin and Eosin Staining showing time points from 0h (Animals are fixed after amputation) to 24h. Within 3h wound is closed and the epidermis has covered the injury site and formed the wound epidermis. Animals are between 4 and 5 cm. (WE) wound epidermis, (M) Muscle, (Epi) Epidermis, (B/C) Bone and cartilage.

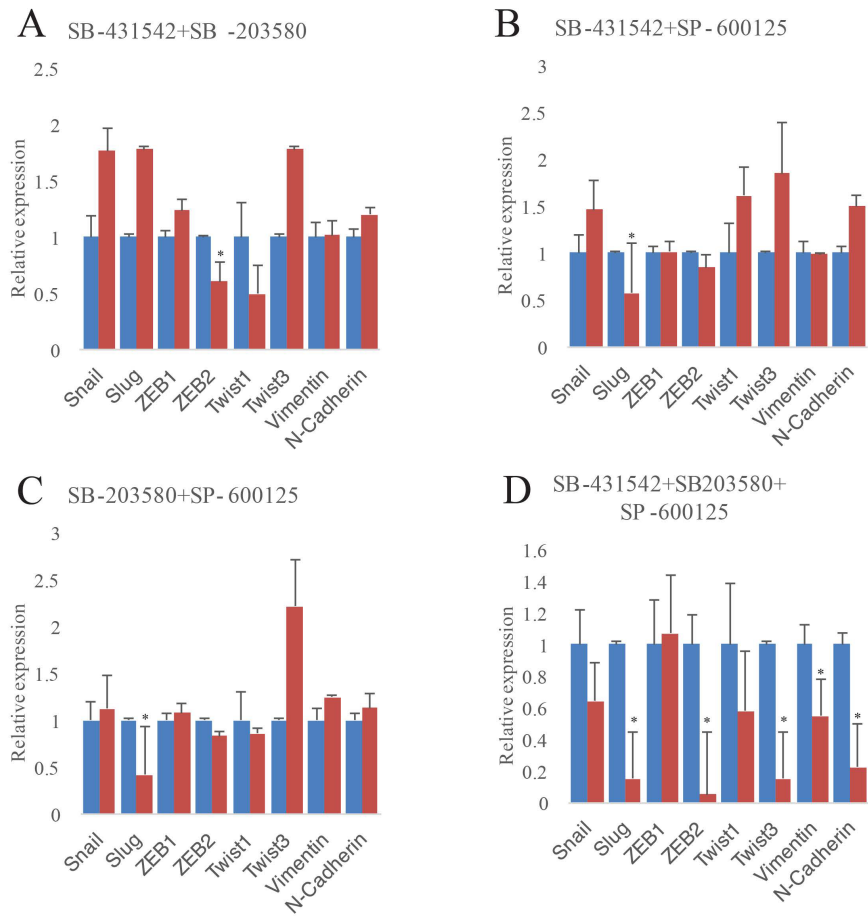


Figure 16. Supplementary Figure 4 RT-qPCR for EMT markers on axolotl limb for animal treated with different combinations of SB-431542, SB-203580 and SP-600125.

Animals were treated 24h before amputation and 1h post-amputation before harvesting. Blue bars are DMSO controls and red bars are for animals treated with; (A) SB-431542 and SB-203580, (B) SB-431542 and SP-600125, (C) SB-203580 and SP-600125 and (D) SB-431542, SB-203580 and SP-600125. Using Excel, a two-tailed Student's t test was performed to compare DMSO controls to the different treatments * $p < 0.05$, Means \pm s.e.m. (normalized using GAPDH), N = 4.

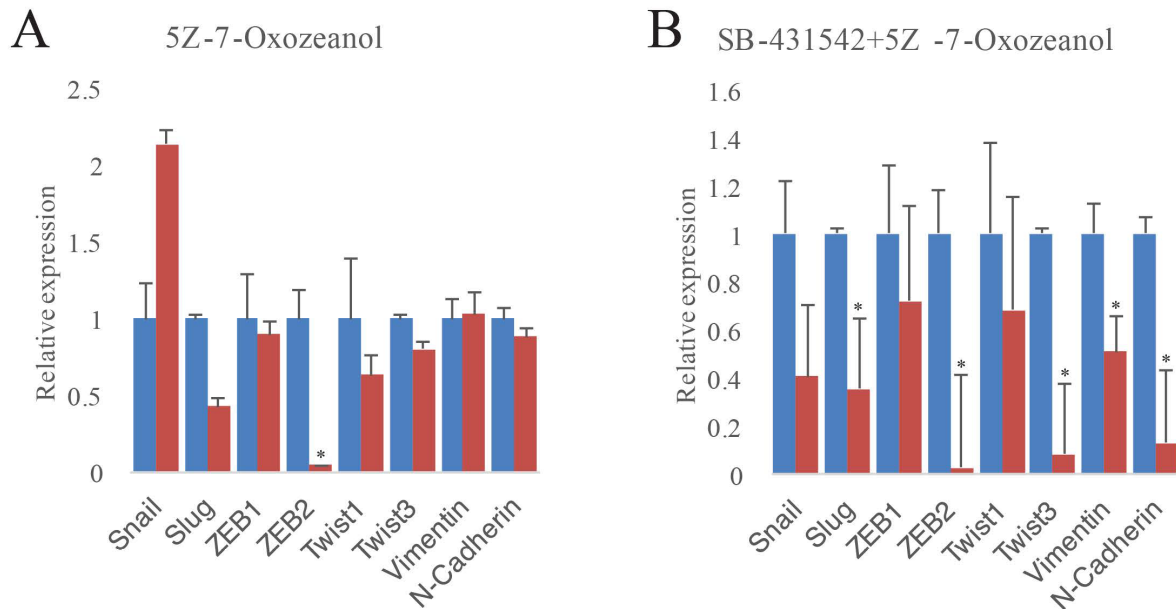


Figure 17. Supplementary Figure 5 RT-qPCR for EMT markers on axolotl limb for animal treated with combination of 5Z-7-Oxozeanol and SB-431542.

Animals were treated 24h before amputation and 1h post-amputation before harvesting. Blue bars are DMSO controls and red bars are for animals treated with; (A) 5Z-7-Oxozeanol, (B) SB-431542 and 5Z-7-Oxozeanol. Using Excel, a two-tailed Student's t test was performed to compare DMSO controls to the different

3 – Chapitre 2 - Article 2

Titre: JNK and p38 are involved in blastema progression independently of TGF- β during axolotl limb regeneration

Auteurs: Fadi Sader et Stéphane Roy

L'article est présentement en préparation et sera soumis sous peu

3.2. Contribution des auteurs

La conception et le design des expériences ont été faits par Fadi Sader et Stéphane Roy.

Les expériences ont été faites à 100% par Fadi Sader.

Fadi Sader et Stéphane Roy ont fait l'analyse des données.

Le projet a été subventionné et supervisé par Stéphane Roy.

L'écriture de l'article a été faite par Fadi Sader et Stéphane Roy

3.2 Mise en contexte

Après le premier article qui montrait l'importance de p38 et JNK dans la fermeture de la plaie, la suite logique était de déterminer s'ils avaient une fonction plus tard dans la régénération. Nous savions que les deux protéines étaient actives assez longtemps durant la phase de préparation et au début de la phase de redéveloppement. Nous avons donc fait des traitements avec les inhibiteurs de p38 et JNK durant toute la régénération. Afin de savoir si l'activation de p38 et JNK était dépendante de TGF- β , nous avons aussi fait des traitements avec le 5Z-7-Oxozeol. Présentement, l'article est en préparation et sera soumis sous peu

3.3 Texte de l'article - JNK and p38 are involved in blastema progression independently of TGF- β during axolotl limb regeneration

3.3.1 Abstract

Axolotls have the impressive ability to perfectly regenerate lost body parts following an injury. Understanding how this process happens would be of great benefits to the regenerative medicine field. In this study, we use the axolotl limb as a model to comprehend the signalling occurring during regeneration. The proteins p38 and JNK are central to many processes and are known to be involved in cell cycle regulation. Here we linked the activity of p38 and JNK to a function in the blastema progression. We treated animals with the pharmacological inhibitors SB-203580 and SP-600125 to block both proteins activity. We show a role for p38 and JNK in blastema progression and differentiation. Additionally, we showed that by treating the animals with a TAK1 inhibitor, the 5Z-7-Oxozeanol, no effect was observed on regeneration. This confirmed that the activation in the latter stages of limb regeneration of p38 and JNK was modulated independently to the TGF- β signalling shown to be involved in the early part of regeneration. This study put us one step forward in the comprehension of the signaling necessary to regenerate.

3.3.2 Introduction

Understanding the process of appendage regeneration resides in solving the signalling that occurs in regenerating models. During the last decade or so, we know more of which pathways are involved in regeneration. The axolotl, or Mexican salamander, is a model of choice when it comes to perfect regeneration in vertebrates³. An injury to an organ or a limb will result in the exact replica as before the damage. Contrary to humans and other mammals, axolotl will not

form a scar, thus allowing regeneration to take place²³. The axolotl limb has been a predominant model to understand perfect healing, mostly for the technical simplicity of performing the amputation. The process is well characterized and can be separated in two distinct phases. The preparation phase begins right after the amputation starting with a wound closure step, dedifferentiation, migration and proliferation. These steps result in the formation of the blastema, a structure composed of proliferating undifferentiated cells. Once the blastema formed, the second phase often referred to as the redevelopment phase can begin. As the name states, it has some similarities with embryonic development²². This phase is characterized by redifferentiation of the cells and the patterning of the newly formed limb²¹.

Many studies have tried to identify signalling pathways important for regeneration. The multifunctional cytokine TGF- β has been associated more than once to a proper regeneration. Inhibiting its signaling will prevent blastema formation in axolotl limbs and will prevent wound closure in *Xenopus Leavis* tail regeneration¹¹⁰. A treatment with a TGF- β inhibitor results in the lack of blastema formation in axolotl limb regeneration^{66,69}. More recently, single cell RNAseq experiments at different time points of regeneration showed that TGF- β signalling is one of the only cytokines expressed during preparation phase⁷¹.

TGF- β can function through its canonical SMAD pathway and many other non-canonical pathways¹⁰¹. TGF- β binds to its receptor at the membrane (known as the type 2 TGF- β receptor, T β RII). That receptor will dimerize with the type 1 TGF- β receptor (TGF- β I). Following this step, the T β RII can phosphorylate the T β RI that subsequently activates SMAD2 and SMAD3 that act as intracellular effectors⁴³. This is known as the canonical TGF- β pathway. Many non-SMAD pathways exist and they usually don't need the phosphorylation of the T β RI but do need the formation of the complex between the two receptors. A well-known pathway is the TGF- β activation of p38 and JNK through the TAK1 kinase. The dimerization of both receptors will induce the activation of the TRAF6 protein. The signaling cascade will then proceed and activate TAK1^{56,58}. Following TAK1 activation, p38 and JNK are phosphorylated and will themselves induce the activation of target genes for different cellular processes^{54,100}.

In an earlier study, we have linked both canonical and non-canonical TGF- β pathways to the process of wound closure in axolotls. Wound closure requires keratinocyte migration and is partially blocked when both the SMAD and p38/JNK pathways are inhibited¹¹¹. As wound

closure occurs very early during limb regeneration, in this particular study we focused only the first few hours post-amputation of regeneration¹¹¹. The involvement of SMAD2/3 has been extensively studied, especially in the process of blastema formation during the preparation phase of regeneration^{66,69}. However, the non-canonical p38/JNK pathway has yet to be studied during later stages of axolotl limb regeneration. Therefore, we focused on understanding if p38 and JNK had a role in stages other than wound closure during regeneration and if TGF- β was involved in their signalling. Interestingly, both proteins seem to play a role in the progression of the blastema past MB. With these treatments, no effect was observed on the formation of the blastema. When compared to DMSO controls no significant difference is observed up to the MB stage. Additionally, the effect we observe on regeneration following p38 and JNK inhibition is independent of TGF- β .

3.3.3 Results

3.3.3.1 Individual inhibition of p38 and JNK shows no effect on regeneration.

In a previous study, we showed by Western Blot that both p-p38 and p-JNK were increased quickly following amputation and were maintained to a certain level up to around the LB stage. Here we performed immunofluorescence for p-p38 and p-JNK on regenerating limbs at 24h post-amputation and LB stage to confirm these observations with another technique. The results show an expression of the two proteins in the AEC at both time points (Figure 18A-D). This would suggest a potential role for both proteins at different stages of regeneration, as we showed in a previous study that they were involved in wound closure¹¹¹.

To investigate if indeed p-p38 and p-JNK had a function later in regeneration, we performed inhibition of both pathways using SB-203580 as an inhibitor of p38 and SP-600125 as an inhibitor of JNK. We used concentration of 50 μ M for SB-203580 and 5 μ M for SP-600125 and started treating animals 24h before the amputation. When looking at the end of the regeneration process, we see no distinguishable differences in the morphology of the limb in treated animal compared to the DMSO controls (Figure 18E-H). This suggests that individually, inhibiting p38 or JNK shows no effect on limb regeneration.

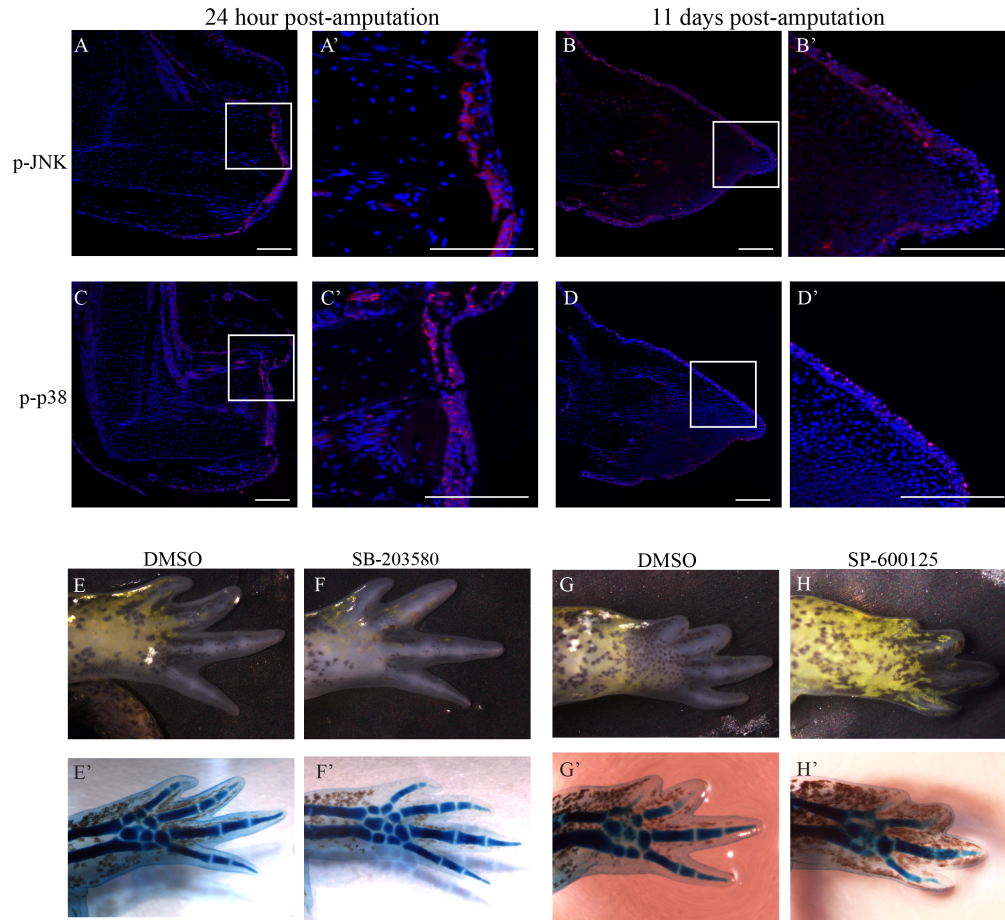


Figure 18. Expression of p-38 and p-JNK and effect of their inhibition on regeneration.

(A-B) Immunofluorescence with tyramide amplification of p-p38 (A, A') 24h post-amputation and (B, B') 11 days post-amputation. (C-D) Immunofluorescence with tyramide amplification of p-JNK (C, C') 24h post-amputation and (D, D') 11 days post-amputation. Overlay of nuclei staining with DAPI (blue) and immunofluorescence with Cy5 (red). White boxes represent magnified areas. Both proteins are expressed in epithelial cells. Scale bars are 200 μ m. Composite images are shown and were taken using a Zeiss Axioimager microscope. (E-H) Pictures of regenerated limbs following a treatment with (E, E', G, G') DMSO (controls); (F, F') p38 inhibitor SB-203580 at 50 μ M; and (H, H') JNK inhibitor SP-600125 at 5 μ M. (E', F', G', H') Victoria blue staining for cartilage. No effect is observed in SB-203580 and SP-600125 treated animals. Pictures were taken on a Leica MZ16F stereoscope with a Lumenara Infinity2 camera.

3.3.3.2 Combining both p38 and JNK inhibitors shows a lack of blastema progression

The proteins p38 and JNK both have similar function in some context. They both have roles in differentiation, control of the cell cycle, inflammation and metastasis⁵⁴. When we block only one of the proteins, we don't observe any effect on regeneration. This could be because they have similar functions and one can take over the inhibited one. To answer this, we used a combination of both SB-203580 and SP-600125. To further understand the signaling surrounding the activation of p38 and JNK, we also did treatments with 5Z-7-Oxozeanol, a TAK1 inhibitor. TAK1 is a kinase responsible for the activation of p38 and JNK following TGF- β signaling. The results show that the treatments SB-203580/SP600125 show no significant effect on blastema formation since the treated limbs are very similar to the controls up to medium bud stage (around 12 days post-amputation) (Figure 19). However, after that point, we observe a clear difference in the rate to which the blastema progresses between the DMSO and the SB-203580/SP600125 treatment. The lack of progression doesn't translate to a full inhibition of regeneration. The treated animals still slowly progress to a stage that could be defined as late bud. At this point regeneration stops. This could mean an inhibition of differentiation of the blastema cells (Figure 19).

When we compare the 5Z-7-Oxozeanol treated animals to the DMSO controls, we observe no effect on blastema formation or progression. Both conditions regenerate at the same rate and normally.

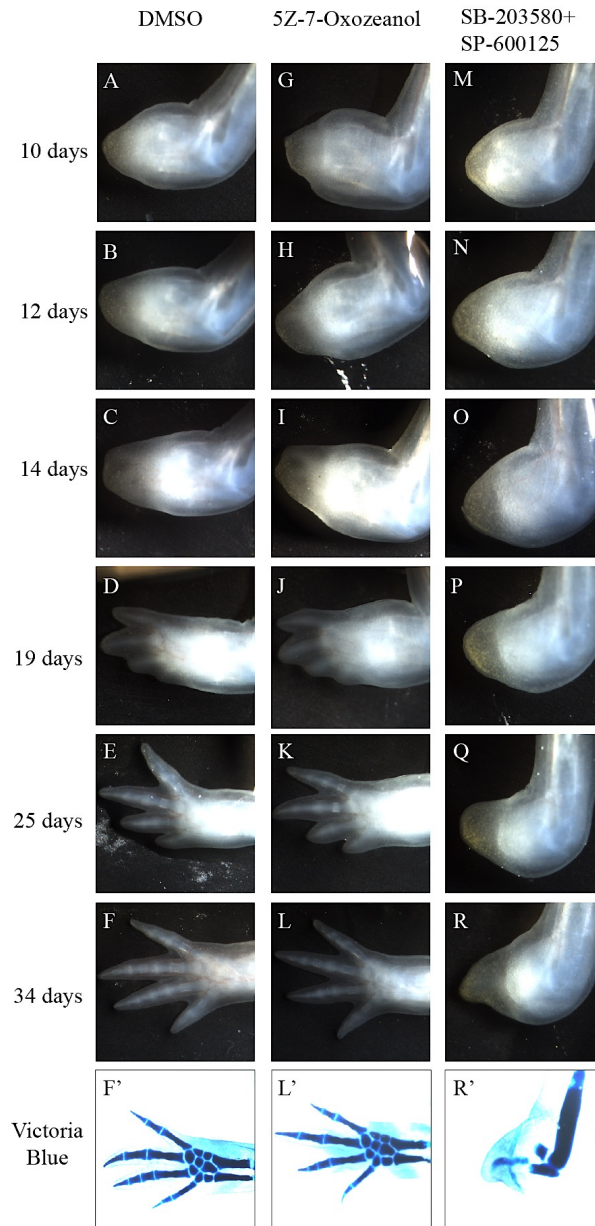


Figure 19. Effect of inhibition of p38/JNK and TAK1 on regeneration.

Pictures of a time course of regenerating limbs following treatments with (A-F, F') DMSO (controls) (G-L, L') TAK1 inhibitor 5Z-7-Oxozeanol at 1 μ M, and (M, R, R') a combination of p38 inhibitor SB-203580 and JNK inhibitor SP-600125 at 50 μ M and 5 μ M. (F', L', R') Victoria blue staining for cartilage at the end of regeneration. Pictures were taken on a Leica MZ16F stereoscope with a Lumenara Inifinity2 camera.

3.3.3.4 Combination of SB-203580 and SP-600125 shows reduced proliferation

The results in the previous section showed that following MB stage a significance reduction in the rate of blastema progression occurs. We wondered whether this would be caused by a lack of cellular proliferation as this coincides with the peak in proliferation during regeneration¹⁹. To answer that question, we performed BrdU injections of treated animals and did immunofluorescences on the harvested limbs. The results show a reduction in the number of proliferating cells in the SB-203580/SP-600125 treatment compared to DMSO controls. Only 20% of the cells had incorporated BrdU vs 60% in the DMSO condition (Figure 20A, B, G). When we look at the 5Z-7-Oxozeanol treated animals, no effects were observed in the number of proliferating cells compared to controls. We observed a 60% incorporation of BrdU (Figure 20A, C, G).

We also wanted to assess if there was an abnormal amount of apoptosis in the SB-203580/SP-600125 treated animals that could explain the delay/inhibition in regeneration. During the blastema proliferation stage in normal regeneration, not much apoptosis is observed¹¹². In the SB-203580/SP-600125 treated animals, there is no more apoptosis than in DMSO control or the 5Z-7-Oxozeanol treatment (Figure 20D-F). These results suggest that the lack of blastema progression is mostly due to reduced proliferation and not a higher level of apoptosis.

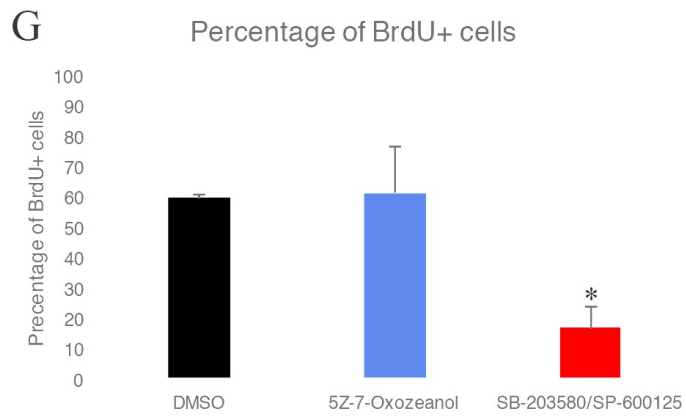
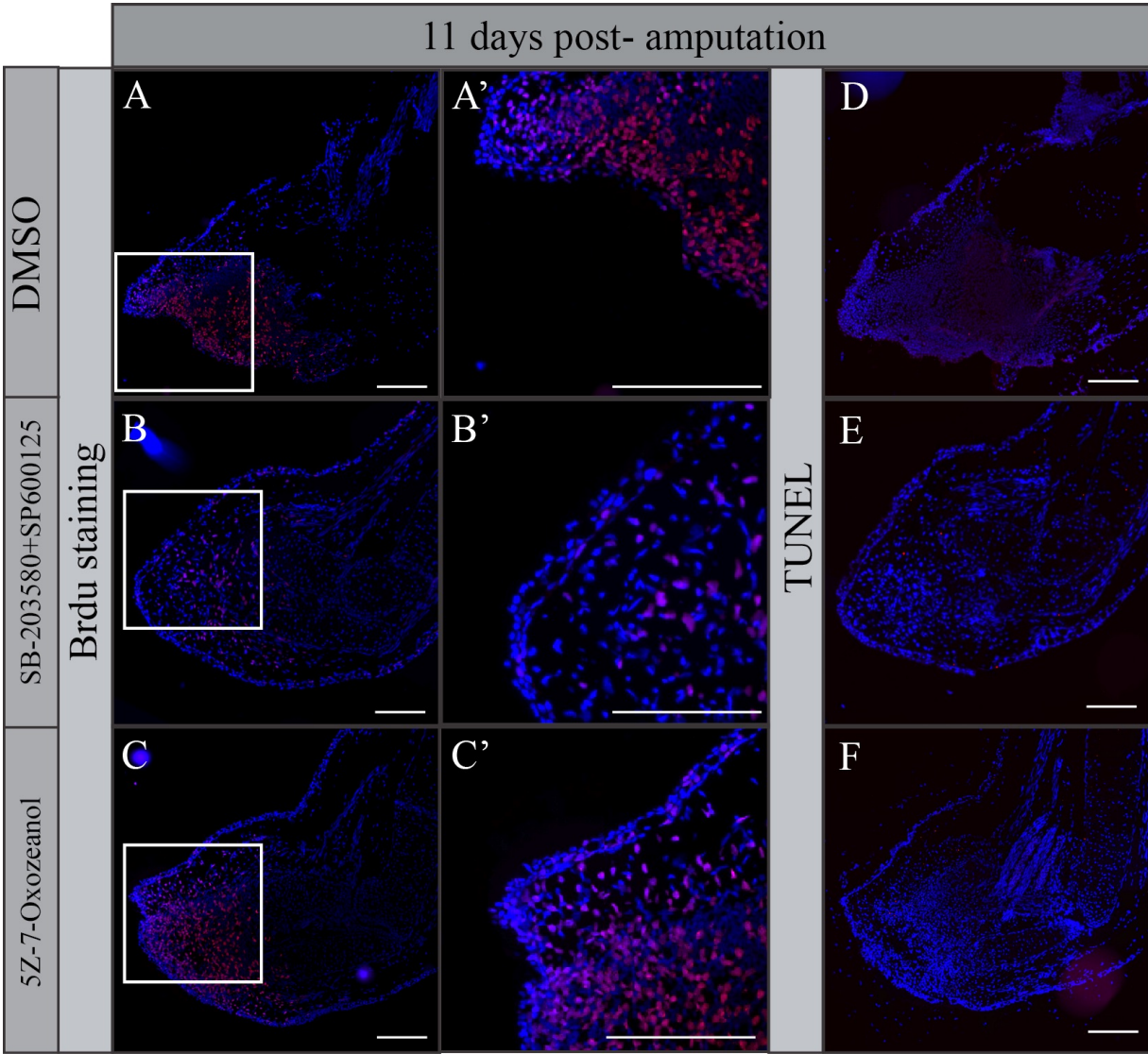


Figure 20. Effect on blastema proliferation and apoptosis of the combination of SB-203580/SP600125 and 5Z-7-Oxozeanol.

Limbs were harvested 11days post-amputation. (A-C) BrdU staining with overlay of nuclei staining with DAPI (blue) and immunofluorescence of proliferating cells (red). (A, A') DMSO controls; (B, B') is a combination of p38 inhibitor SB-203580 and JNK inhibitor SP-600125 at 50 μ M and 5 μ M; and (C, C') TAK1 inhibitor 5Z-7-Oxozeanol at 1 μ M. White boxes represent magnified area displayed in A'-C'. (D-F) TUNEL assay with overlay of nuclei stained with DAPI (blue) and immunofluorescence of apoptic cells (red). (D) DMSO controls; (E) combination of p38 inhibitor SB-203580 and JNK inhibitor SP-600125 at 50 μ M and 5 μ M; and (F) TAK1 inhibitor 5Z-7-Oxozeanol at 1 μ M. Scale bars are 200 μ m. Composite images are shown and were taken using a Zeis Axioimager microscope. (G) Cell count of BrdU positive cells compared to total cells (DAPI) for each treatment. Cell count was done with ImageJ. Using Excel, a two-tailed Student's t test was performed to compare DMSO controls to each treatment *p <0.05. Means \pm s.e.m. N = 3.

3.3.3.5 Expression of multiple genes is affected by SB-203580/SP-60125 treatments

To evaluate how p38 and JNK affected regeneration, we measured the expression of different genes following the SB-203580/SP-600125 treatments. We performed RT-qPCR on limbs that were harvested at 11 days post-amputation following the different treatments. We looked at gene expression of ATF3, SOX9, CyclinD1, BMP2 and BMP7 (Figure 21).

ATF3 is a known target gene of the p38 and is significantly reduced when we block p38 and JNK pathways¹¹³. We also looked at CyclinD1 as a marker for proliferation. The results show an inhibition following SB-203580/SP-60125 treatment. This observation corroborates with the BrdU results in figure 20.

BMPs are involved in limb development and their role in the redevelopment phase of regeneration has also been previously shown^{31,114}. Interestingly we see no effect on the expression of BMP2 but we see a significant inhibition of BMP7.

SOX9 is a marker of chondrogenesis and was shown to be expressed in redeveloping bones during regeneration^{33,115}. It is also a target of BMP signaling. Here we show that the inhibition of p38 and JNK also affects SOX9 expression.

Altogether, the results suggest that p38 and JNK can influence in many ways the blastema, from proliferation to differentiation.

When we look at the 5Z-7-Oxozeanol treatments, no effect is observed on the expression of the genes we looked. This correlates with the fact that we do not see any effect on regeneration following that treatment.

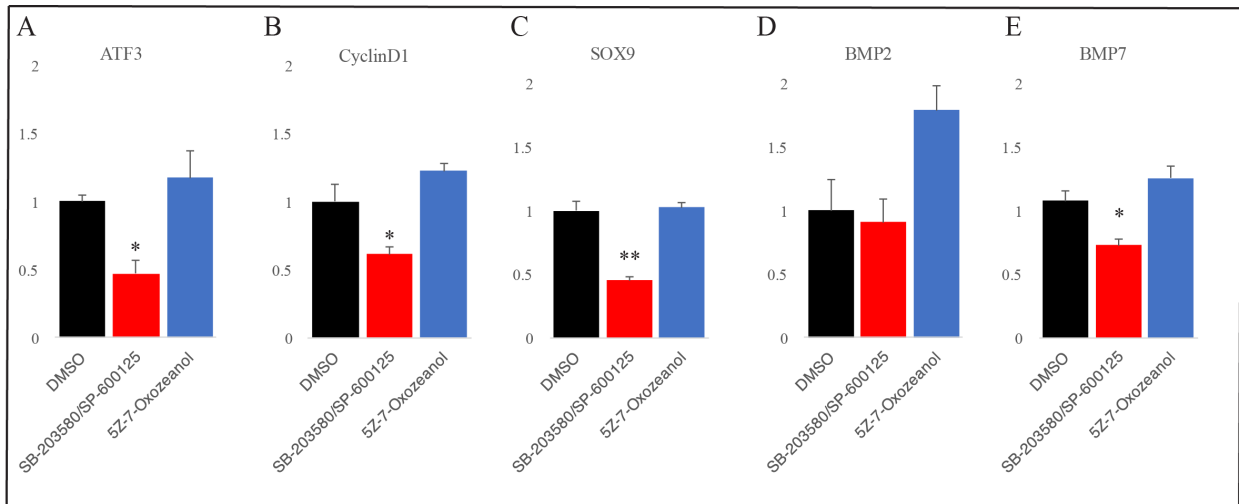


Figure 21. Effect of treatments on various gene expression.

RT-qPCR of harvested limbs 11 days post-amputation following treatments. Animal treatments began 24h before amputation with DMSO (black bars), combination of SB-203580 and SP-600125 (red bars) and 5Z-7-Oxozeanol (blue bars). Gene expression was measured and relativized on the DMSO controls for (A) ATF3, (B) CyclinD1, (C) SOX9, (D) BMP2, and (E) BMP7. Using Excel, a two-tailed Student's t test was performed to compare DMSO controls to each treatment *p <0.05, **p<0.005. Means±s.e.m. (normalized using GAPDH as a loading control), N = 4.

3.3.4 Discussion

The first results in Figure 1 are the immunofluorescence showing an expression of p-p38 and p-JNK during various time points of regeneration. The fact that they are active at these points in regeneration is an indicator that both proteins might play a role at different moments of regeneration. Simply looking at their expression is not enough to conclude that they do have a function in the process. Although their presence is a good indication of a potential function, to assess their role we need to perform inhibition experiments. To do so, we used SB-203580 and SP-600125, these are known p38 and JNK inhibitors^{93,116}. The results show no effect on regeneration. Limbs of treated animals showed a similar rate of regeneration as the DMSO control and showed no morphological difference at the end of the process. By simply looking at these results, we could assume neither protein has a function during the regeneration process. Considering both p38 et JNK are closely related and have generally similar functions in cells, it is possible that by inhibiting singularly each protein, the other one can take over the missing function⁵⁴. In a previous study, we showed that inhibiting JNK and p38 at the same time, can result in different outcomes compared to blocking them individually¹¹¹. To observe a negative effect on wound closure in the first hours of regeneration, we needed to at least block p38 and JNK, showing they have very interconnected roles¹¹¹. Knowing this, we decided to do the same experiment on a full regeneration treatment. The results show that by using a combination SB-203580/SP-600125 we obtain an effect on blastema progression. When looking at Figure 2, up to 12 days post-amputation, we don't see any effect compared to the DMSO treated animal. Therefore, the blastema is able to form, but following that point the blastema stopped progressing in the SB-203580/SP-600125 treated animals. This result suggests a role for either p38, JNK or both after the progression of the blastema. To evaluate what caused that lack of progression we performed BrdU and Tunel assays. This lack of progression was actually associated with a reduction in cellular proliferation. The results in Figure 3 show a reduced amount of cell containing BrdU. Around 60% of the cells were proliferating in DMSO controls and around 20% in the SB-203580/SP-600125 treated animals. The RT-qPCR results on Figure 4 also show an inhibition of CyclinD1's expression following the same treatment. No effect was observed for apoptosis. When looking at p38 and JNK, they have been associated with the

regulation of cell cycle progression and apoptosis^{54,117}. When we look at p38, its function has been mostly associated with cell cycle arrest. However, it has also been shown to play a role in inducing cell cycle progression in hematopoietic and cancer cells^{54,118}. In the case of JNK, it has been associated with cell cycle arrest following stress, but its involvement in cell cycle progression has also been shown many times¹¹⁹⁻¹²⁴. In pulmonary endothelial cells the JNK/c-Jun pathway is needed for proliferation¹²⁰. The SP-600125 has also been shown to inhibit proliferation in cancer cells¹¹⁹. Both p38 and JNK have shown the ability to play dual roles depending on the situation especially in cancer cells. The blastema is a highly proliferative structure of undifferentiated cells and our results suggest that in this particular situation JNK and p38 are involved in cell cycle progression rather than cell cycle arrest. Interestingly, in planaria, JNK has been shown to be important for the entry in mitosis of the neoblasts⁷². Therefore, our results are in line with the known roles for p38 and JNK in the literature.

Both p38 and JNK have been associated with differentiation¹¹⁷. The results in Figure 2 shows in the treated animals with SB-203580/SP-600125 a blastema that slowly progresses up to LB then stops. In normal regeneration, after late bud, cells start to differentiate. It seems from these results that regeneration halts at that moment, suggesting an inhibition of differentiation.

Victoria blue is a histologic coloration that stains for cartilage. The animals we use for our experiments are 4-5cm long and haven't calcified bones yet. We use Victoria blue to stain their skeleton. The results in Figure 3 in the panel R' show that cartilage seems to have formed a little bit. But, when we compare to the DMSO control in panel F', the SB-203580/SP-600125 shows a clear lack in bone formation. This suggests that skeletal differentiation is inhibited.^{115,125} To assess if chondrogenesis was in fact affected by the treatment, we performed the RT-qPCR for SOX9, a marker for the process^{115,125}. The results show a significant inhibition of SOX9 in the SB-203580/SP-600125 condition compared to DMSO. This indicates that the formation of the new skeleton is affected by the regulation of p38 and JNK. We also see an effect on BMP7 expression. SOX9 is known to be regulated by BMPs¹²⁶. This creates a relationship between p38/JNK and the BMP pathways, which could be involved in bone formation during the redevelopment phase.

We showed in a previous study that p38 and JNK were regulated by TGF- β during wound closure¹¹¹. To see if the effects observed with the combination SB-203580/SP-600125 is related

to TGF- β , we also did a 5Z-7-Oxozeanol treatment (Figure 2G-L). This inhibitor blocks TAK1 signaling, which is responsible for the TGF- β activation of p38 and JNK, giving us an opportunity to link p38 and JNK to TGF- β ⁵³. The results show no effect on regeneration compared to what we see with SB-203580/SP-600125 treatments. This suggests that the role of p38 and JNK in blastema progression and differentiation is independent of TGF- β . This is in agreement with previous results showing that activation of TGF- β is limited to the first few days of regeneration ⁶⁹. JNK and p38 are MAPK central to many pathways, and it is possible that other growth factors or cytokines are responsible for p38 or JNK activation during blastema progression ⁵⁴. Interleukin 22 is an example of a cytokine that can activate MAPK pathways such as p38 and JNK ¹²⁷. The EGFR pathway is also responsible to induce p38 and JNK ¹²⁷. Another potential activator of the pathway is IL-8. This cytokine has been shown to be expressed in blastema progenitors during regeneration, and also has been shown to be responsible for p38 and JNK activation in the literature ^{71,128}. Interestingly, an overexpression of IL-8 during regeneration results in a higher level of EDU+ cells in the blastema and its knockdown with a morpholino reduces the size of the blastema ⁷¹. Those results correlate with the effect we observe following p38 and JNK inhibition.

Our data clearly indicates that p38 and JNK activation in the redevelopment phase of regeneration is TGF- β independent. Many pathways could be involved in the regulation of both proteins. Future studies will be required to fully determine what controls the activation of p38/JNK in the redevelopment phase of regeneration.

3.3.5 Material and methods

3.3.5.1 Animal care

Axolotls were purchased from Ambystoma Genetic Stock Center (Lexington, KY) and husbandry were done according to Denis et al. 2016 ⁶⁹. The inhibitors were diluted to a 10mM stock solution in DMSO (Fisher Scientific BP231-100). The appropriate concentration of each drug was then obtained by diluting the stock solution directly in 5mL of 20% Holtfreter's solution for each animal. SB-203580 and SP-600125 were purchased from Selleckchem (S1076 and S1460). 5Z-7-Oxozeanol was purchased from Millipore-Sigma (499610). The solutions

were changed daily to ensure a constant concentration. Treatments began 24 hours before amputation. All animal experimentations were approved by the animal care and ethics committee of Université de Montréal (approval code: CDEA#17-123) which is recognised by the Canadian Council for Animal Care.

3.3.5.2 RNA isolation and RT-qPCR

RNA isolation and reverse transcription were done as described in Sader et. al 2019 ¹¹¹. qPCR was done using a lab made mastermix [(1X Standard *Taq* reaction buffer (New England Biolabs), 0.5mM MgSO₄, 0.33X SYBR Green I (Life Technologies, S7580), 0.2mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific, 10297018), 0.5 units of Hot Start *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs, M0495S)]. The primers for each gene were added at a final concentration of 0.25µM. 2µL of cDNA (made of the reverse transcription reaction) were added completing the reaction volume to 20µL. qPCR was done on the LightCycler®96 with a program of: 2 minutes denaturation at 94°C, 40 cycles of [15sec 94°C denaturation, 30sec 60°C annealing, 60sec 72°C elongation]. A 10 minutes melt curve was done to confirm primer specificity.

3.3.5.3 BrdU and Tunel assay

For BrdU, animals were injected 12h prior to fixation with a ratio of 10µL per gram of body mass with BrdU Labelling Reagent (Invitrogen, 000103). Animals were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.7X PBS overnight at 4°C. Following fixation, limbs were rinsed 3 times in 0.7X PBS and paraffin embedded in an embedding station and placed in paraffin blocks. Samples were cut with a microtome to a 10µm thickness. BrdU labeling was done according to Guimond et al. 2007 ³¹. TUNEL assay were done according to Denis et. al 2016 ⁶⁹.

3.3.6 Acknowledgements

We would like to acknowledge the help of Dr. Antonio Nanci for the use of histology and microscopy facility.

3.3.7 Competing interests

The authors declare that there are no competing interests both financial and non-financial.

3.3.8 Author contributions

FS performed all the experiments and wrote the manuscript. SR supervised the project, helped with the drafting of the manuscript and the design of the experiments.

4 – Discussion

Comme tout projet de recherche, mon doctorat adresse une grande question. Dans mon cas, nous nous demandons comment l'axolotl, ce vertébré tétrapode, est capable de régénérer. Au cours des dernières années, notre laboratoire s'est orienté vers la compréhension de la signalisation menant à la régénération. C'est dans cette direction que nous avons tenté dans les différents projets de répondre à la question ci-dessus. Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de faire un pas de plus dans cette quête. L'idée de comprendre la signalisation a pour objectif à plus long terme de trouver quelles voies ciblées lorsque nous allons vouloir développer des traitements chez l'humain. Cette approche permettra aussi de comparer la guérison chez les mammifères et chez l'axolotl.

4.1 Réépithélialisation chez les animaux capables de régénération

Lorsque nous regardons les différences entre la guérison chez les mammifères et la guérison/régénération chez l'axolotl, la vitesse de réépithélialisation en est une assez marquante³⁶. L'une se fait en plusieurs jours et l'autre en quelques heures. En faisant une revue de littérature des différents modèles de régénération, on remarque que tous ont une fermeture de plaie excessivement rapide. Nous savons que la formation de l'épiderme de guérison est indispensable à la régénération, par contre, est-ce que le fait qu'il se forme aussi rapidement est nécessaire pour avoir une régénération de l'organe perdu ? C'est à se poser la question si d'induire une réépithélialisation plus rapide chez l'humain permettrait de régénérer ou du moins avoir une guérison sans cicatrice. La façon que je vois la chose est que l'axolotl guéri lentement, mais plus proprement, et les mammifères guérissent rapidement, mais de manière plus grossière. Peut-être qu'une réépithélialisation plus rapide permet la protection et la signalisation nécessaire pour l'organisme puisse ensuite prendre le temps de faire guérison plus axée vers la régénération. Pour arriver à point, il faut d'abord comprendre comment l'axolotl est capable d'une migration épithéliale aussi rapide. C'est ce que nous avons fait dans le projet présenté dans le premier chapitre de la thèse. Les résultats présentés dans ce chapitre amènent de

nouvelles données permettant de mieux comprendre le phénomène/processus. Afin de pousser plus loin cette observation, on pourrait imaginer une étude qui comparerait en parallèle la réépithélialisation entre l'axolotl et un modèle animal qui ne régénère pas. Ainsi, on pourrait comparer les gènes exprimés et comment les voies de signalisations varient entre les deux types de guérisons.

4.2 EMT dans la migration des kératinocytes et le développement de la patte

Dans le chapitre 1, nous établissons un lien entre les EMTs et la fermeture de la plaie. Chez les mammifères, cette relation a déjà été faite, mais certaines personnes affirment que la réépithélialisation serait ce qu'ils considèrent une EMT partielle⁸³. Par contre, très peu d'études se sont concentrées sur la question dans des modèles *in vivo*⁸³. Ceci rend la comparaison entre les mammifères et ce que nous avons observé chez l'axolotl plus difficile. Les études qui s'y sont attardées à la guérison chez la souris n'ont proposé que les gènes Slug et Vimentine comme étant les seuls ayant un rôle pour la réépithélialisation^{80,84,87}. Durant la régénération, nous avons pu observer une augmentation très rapide de plusieurs marqueurs de EMT. Snail, Slug, les Twists, ZEBs, N-Cadhérine et Vimentine sont augmentés durant la fermeture de la plaie (Figure 7). En regardant cela, il serait possible que cette activation rapide de l'ensemble de ces inducteurs de EMT permette à l'axolotl d'avoir une migration beaucoup plus rapide que des animaux ne pouvant pas régénérer. Dans ce cas, il faudrait potentiellement induire un certain nombre de gènes inducteurs de EMTs, ce qui pousserait les kératinocytes à migrer très rapidement suite à une blessure.

Dans le même article, nous observons une deuxième phase d'expression de marqueurs de EMT durant la période de redéveloppement. Quelques hypothèses peuvent découler de cette vague d'expression. Comme mentionné dans l'introduction, des facteurs comme Slug et Twist ont déjà été étudiés dans le contexte du développement de la patte. Il est possible que l'expression de facteur EMT ne soit pas nécessairement liée à un processus de transition, mais que les gènes en question aient un rôle propre dans la morphogénèse de la patte. Étudier la fonction de ces gènes

et quelle signalisation les induit serait certainement un projet futur d'intérêt. L'étude de la phase de redéveloppement est assez intéressante dans un contexte plus large. La capacité de l'animal de reformer la copie de la patte avant l'amputation est quand même assez impressionnante. Chaque élément qui participe à la morphogénèse de la patte sont indispensables à la quête de la compréhension de la régénération. Là est l'importance de comprendre le rôle de ces marqueurs EMT dans la phase de redéveloppement. Si leur rôle est central au processus, il faut le comprendre.

À l'extérieur des gens travail sur la régénération, les résultats de EMT chez l'axolotl sont particulièrement intéressants, parce qu'ils permettent d'avoir un modèle in vivo pour l'étude de ce processus.

4.3 Voies de signalisation nécessaires à la fermeture de la plaie.

Le chapitre 1 de la thèse englobe plusieurs points intéressants pour l'avancement des connaissances de la régénération de la patte. Un de ces aspects est la meilleure compréhension de la signalisation entourant le processus de fermeture de la plaie. Nous savons depuis longtemps que la vitesse de migration des kératinocytes est très rapide chez l'axolotl, et que le processus était indispensable à la régénération afin de permettre la formation de l'AEC²⁵. Par contre, peu ou pas d'études se sont concentrées sur la signalisation qui entoure le phénomène. Chez *Xenopus*, une dose de 100µM de SB-431542 empêche la fermeture de la plaie reliant les SMADs au processus. Chez l'axolotl, une dose 100µM de SB-431542 est toxique pour les animaux. Dans notre modèle, nous n'avons pas pu faire une telle observation aux doses non toxiques pour l'animal, c.-à-d. 25µM. chez le poisson-zèbre, JNK a été associé à la fermeture de la plaie pour les blessures la peau, mais il s'agit d'un modèle légèrement différent de la régénération d'un membre donc il est possible que les éléments nécessaires à la fermeture de la blessure ne soient pas les mêmes que ceux d'une patte amputée.

Dans ce chapitre, nous avons montré que la fermeture de la plaie serait dépendante en partie de la cytokine TGF-β et ce via les voies canoniques SMAD et non canoniques p38/JNK. Par contre, inhiber singulièrement ces voies ne présentait aucun phénotype quant à la migration des kératinocytes. Afin de voir un effet, nous devions inhiber au moins deux voies simultanément,

et l'inhibition des trois voies donne un phénotype beaucoup plus important. (Figure 10 et Figure 11). Une des conclusions tirées de ce résultat est qu'éventuellement la plaie ferme, malgré le ralentissement observé. Ceci nous laisse croire que d'autres voies participent aussi au processus.

4.3.1 Autres voies non canoniques de TGF- β

TGF- β est une cytokine centrale à plusieurs processus, et bien que la voie SMAD soit la plus étudiée, plusieurs voies non canoniques sont connues. Dans le chapitre 1, nous nous sommes intéressés à la voie TAK1/p38/JNK, mais considérant l'activation rapide de TGF- β suite à l'amputation, il serait logique de penser que d'autres voies puissent être activées.

La voie ERK est impliquée dans plusieurs processus cellulaires, et peut aussi être activée par TGF- β ^{52,129}. D'ailleurs la voie TGF- β /ERK est impliquée dans la guérison et le processus de migration via les EMTs ^{99,130}. Pour ces raisons, ERK pourrait potentiellement être une bonne cible d'étude dans le contexte de la fermeture de la plaie durant la régénération. Par contre, des résultats préliminaires de notre laboratoire semblent indiquer que ERK est activé lors de la phase de redéveloppement. Cependant, ces résultats n'incluent pas les premières heures de la régénération.

La voie PI3K/Akt est un autre pouvant être activé par TGF- β ^{52,131}. Dans ce cas, c'est particulièrement intéressant puisque PI3K/Akt est connue comme pouvant induire les EMTs de manière dépendante de TGF- β ¹³². À ce jour, la signalisation en question n'a pas été étudiée dans le contexte de la régénération épimorphique. Il s'agit d'une autre voie de signalisation avec un potentiel de recherche intéressant pour la régénération.

4.3.2 Signalisation autre que TGF- β

Le laboratoire se concentre beaucoup sur TGF- β , puisque nous possédons une expertise dans ce sujet. Par contre, il existe des protéines capables de jouer un rôle dans la migration et les EMTs n'étant pas dépendantes de TGF- β .

La voie Wnt/ β -caténine a des fonctions cellulaires dans différents contextes, notamment dans la prolifération et la différenciation ¹³³. Elle détient aussi certaines fonctions durant le développement de la patte, dans la formation de l'AER ¹⁸. Son implication dans le processus de EMT a aussi été étudiée, durant la gastrulation ¹³⁴. L'expression de facteurs de transcription inducteurs de EMT dans plusieurs cancers peut aussi être stimulée par la voie Wnt/ β -caténine ⁷⁷. Durant la régénération de la patte chez l'axolotl, l'inhibition de Wnt par la surexpression de DKK (inhibiteur de Wnt) montre des défauts dans la formation de l'AEC. Dans cette étude, les auteurs indiquent que la migration des cellules épithéliales n'est pas affectée. Il serait donc intéressant de voir si, par une inhibition pharmacologique (il existe plusieurs inhibiteurs disponibles commercialement), nous serions capables d'avoir une inhibition plus spécifique et peut-être voir un effet sur la migration ¹⁸. Ce que nous avons aussi montré dans l'article 1 est la robustesse du processus de fermeture de la plaie. Même en bloquant trois voies de signalisation, la fermeture se produisait. Il est possible qu'il soit de même pour Wnt, c'est-à-dire, de bloquer juste la voie canonique ne serait pas suffisant et il faudrait inhiber des voies non canoniques en même temps que la voie Wnt/ β -caténine. D'ailleurs certaines voies non canoniques Wnt ont des rôles dans les EMTs ¹³⁵. Une étude a montré que le récepteur Frizzled2, suite à l'activation par Wnt5, pouvait activer une voie non-canonique, c'est-à-dire celle ne passe par β -caténine. Les auteurs proposent une voie Wnt5/Frizzled2/Stat3 qui induit les EMTs ¹³⁵.

La protéine Stat3 est une cible d'intérêt dans le laboratoire, car nous pensons qu'elle aurait un rôle dans la régulation de SMAD3 ¹³⁶. Ainsi, nous savons par immunobuvardage de type Western que la Tyrosine705 de Stat3 est phosphorylée durant la phase de préparation. En plus de ces résultats, Stat3 a été associée à la migration des cellules par l'induction de EMT en plus d'avoir un rôle dans la guérison des plaies ^{137,138}. La signalisation de Stat3 se fait généralement par les interleukines et des études ont montré que les Interleukines 6, 10 et 22 peuvent activer la signalisation de Stat3 ^{137,139,140}. Dans le cas de l'activation par IL-22, l'observation a été faite au niveau des kératinocytes durant la guérison des muqueuses orales ¹³⁹. Il s'agit d'un mode de guérison qui forme très peu de tissu cicatriciel et qui peut jusqu'à un certain point être comparé à la régénération ¹⁴¹. Durant la régénération de la patte, plusieurs interleukines sont exprimées tôt dans le processus ³⁸. L'hypothèse serait donc que des Interleukines activent Stat3 au niveau de la Tyrosine705 qui induirait des EMTs pour la fermeture de la plaie.

4.4 Initiation vs vitesse de fermeture

Bien que le chapitre 1 nous ait permis d'élucider une partie de la signalisation qui entoure la fermeture de la plaie, comme tout projet, nous avons eu certaines limitations. Dans cette étude, nous avons mesuré la fermeture de la plaie par des colorations histologiques à différents moments dans la régénération. Bien que ceci nous ait permis de répondre aux questions posées dans l'article, cette méthode donne simplement des clichés instantanés de là où la fermeture est rendue au moment de la récolte des tissus. Ainsi, nous avons été capables de voir des retards dans la fermeture de la plaie, mais nous ne pouvions pas vraiment mesurer une vitesse de migration. Ceci m'a amené à la question suivante, en inhibant les SMADs, p38 et JNK, est-ce que le retard observé dans la fermeture est causé par un ralentissement de la vitesse de fermeture ou bien, est-ce que nous causons un retard dans l'initiation de la fermeture ? Une façon de répondre à cette question serait de monitorer la fermeture de la plaie en direct. Il existe notamment des techniques d'imagerie en direct chez le poisson-zèbre et plus récemment chez l'axolotl^{142,143}. Avec ce genre de méthode, il est possible d'observer chaque type cellulaire et leur déplacement dans le temps. Cette technique a été utilisée afin de localiser les cellules qui se retrouvent dans le blastème. Ainsi chaque type cellulaire était marqué par une protéine fluorescente dépendante d'un promoteur spécifique à ce type cellulaire. Dans notre cas, nous ne serions intéressés qu'aux cellules de l'épiderme. Un marquage ne serait même pas nécessaire puisque les cellules épithéliales sont facilement localisables sans fluorescence¹⁴³. L'idée serait d'imager les pattes d'axolotl en régénération traitée avec différents inhibiteurs. Ainsi, suite à un traitement ciblant des voies de signalisation en question, nous pourrions voir si après l'amputation chez les animaux traités, les kératinocytes prennent plus de temps à débiter leur migration. L'autre cas serait de voir, si les kératinocytes commencent leur migration en même temps que les contrôles, mais qu'ils se déplacent plus lentement. Ceci signifierait que la vitesse de migration est affectée.

Avec ce résultat, nous pourrions décortiquer la fermeture de la plaie et savoir quelle signalisation permet sa régulation, de l'initiation jusqu'à la fermeture. Dans cette optique, on pourrait comparer à ce qui se passe chez les mammifères et savoir quelle serait la séquence d'expression et d'activation de gènes permettant une migration rapide.

4.5 JNK et p38 : fonction pour les deux ou compensation

Le chapitre 2 se consacre à l'importance de p38 et JNK durant la progression du blastème. Ce que nous observons est qu'en inhibant p38 seul ou JNK seul, la régénération semble se faire normalement et aucun effet clair n'est observé d'un point de vue morphologique à la fin de la régénération. Comme dans le premier chapitre, nous avons combiné deux inhibiteurs ciblant spécifiquement p38 et JNK. Avec la combinaison du SB-203580 et SP-600125, on observe un effet négatif sur la régénération. Jusqu'au stade de bourgeon moyen (MB), il n'y a pas de différences significatives entre le contrôle DMSO et le traitement SB-203580/SP-600125. Passé cette étape, on commence à voir une différence dans la progression du blastème. D'ailleurs nos résultats montrent une diminution de la prolifération dans le blastème dans les animaux traités expliquant en partie le retard (Figure 20).

La question que je me suis posée, lequel de p38 ou JNK a réellement un rôle à jouer dans la progression du blastème ? La combinaison des deux inhibiteurs ne permet de répondre à la question puisqu'on ne peut pas distinguer l'effet de chaque inhibiteur. Les résultats des traitements nous suggèrent que les deux protéines sont nécessaires pour la régénération. Par contre, il se peut que l'absence de phénotypes lorsqu'on fait les traitements individuels (Figure 18), soit dus à une compensation. JNK et p38 sont deux protéines qui ont des fonctions semblables, font souvent un « cross-talk » et peuvent être activés par des voies de signalisation similaire⁵⁴. Dans un système complexe comme des tissus de pattes d'axolotl, il est donc logique d'observer une compensation entre deux protéines aussi intimement liées. Dans ce cas, une des deux protéines aurait un rôle pour permettre la régénération normale, et en son absence l'autre pourrait compenser et remplir la fonction perdue. Avec les outils que nous avons chez l'axolotl, il est difficile de penser à une expérience qui permettrait de faire la distinction entre les deux protéines. L'utilisation d'une surexpression d'un dominant négatif pourrait être une option. En surexprimant un dominant-négatif de p38 par exemple, on pourrait inhiber la voie. Par contre, le dominant négatif saturerait la machinerie qui ne pourrait pas se tourner vers l'activation de JNK. La même expérience avec un dominant-négatif pour JNK pourrait être faite.

Bien que les résultats soient très intéressants, les limitations techniques viennent quand même mettre un bémol à l'interprétation des résultats. Il est possible que les non-effets observés lors

des traitements soient causés par une inhibition insuffisante ou une perte d'inhibition avec le temps des molécules pharmacologiques. Il s'agit d'une des limites de l'utilisation de ce genre de méthode. Afin d'y répondre, nous pourrions utiliser une autre méthode le « knock-down » tel que des morpholinos ou des « antisens » qui donne des bons effets d'inhibition au niveau de la traduction de l'ARN.

4.6 Dépendance de TGF- β limitée à la phase de préparation

Le laboratoire a montré dans les dernières années l'importance de TGF- β durant le processus de régénération. L'expression de TGF- β est observée jusqu'au stade de bourgeon primaire (EB) et la forme active de la protéine est détectée jusqu'à 48h post-amputation. Suite à l'amputation, les traitements au SB-431542 empêchent la formation du blastème et un traitement qui débute après la formation du blastème ne montre aucun effet sur la régénération^{66,69}. Dans les deux articles de cette thèse, nous étudions les voies non canoniques de TGF- β , c'est pour cela qu'il était important de faire les expériences avec l'inhibiteur de TAK1. Ces traitements permettent de faire le pont entre p38/JNK et TGF- β car TAK1 est activé par TGF- β et active ensuite p38/JNK.

Dans le premier chapitre, nous avons investigué finement la fermeture de la plaie très tôt dans la régénération. Lorsque nous combinions le SB-203580 et le SP-600125, nous observions un phénotype semblable que chez les animaux traités avec le 5Z-7-Oxozeanol (inhibiteur spécifique de TAK1). Dans les deux cas, la fermeture de la plaie avait progressé moins rapidement que les contrôles d'environ 20% (Figure 11 et Figure 12). Ces résultats indiquent que l'importance de p38 et JNK dans la fermeture de la plaie est dépendante de TGF- β .

Dans le deuxième article, nous avons étudié l'effet de la combinaison du SB-203580 et du SP-600125 sur le reste du processus de régénération. Nous avons aussi comparé ce traitement à un traitement au 5Z-7-Oxozeanol. Dans ce contexte, nous avons observé des différences entre les deux traitements. L'inhibiteur de TAK1 ne présentait aucun phénotype apparent tout comme le contrôle. Le traitement SB-203580/SP-600125 montrait un manque de progression du blastème. Cette différence entre les deux traitements indique que l'activation de p38 et JNK serait

indépendante de TGF- β après la formation du blastème. La suite du projet serait maintenant de déterminer comment p38 et JNK sont activés suite à la formation du blastème. Plusieurs MAPK peuvent activer p38 et JNK, des exemples sont MKK-4, MKK-3 ou MKK-6¹⁴⁴.

L'autre observation intéressante est que l'effet semble être observé vers le stade de bourgeon moyen (MB), c'est-à-dire après la formation du blastème et après la période d'expression de TGF- β . Les premiers résultats indiquant que l'importance de TGF- β serait limitée à la phase de préparation avant la formation du blastème datent de 2007. Or, les résultats actuels découlant de la combinaison des deux chapitres confirment cette affirmation, et ce plus de 10 ans plus tard. En regardant tout cela, il semble qu'il y ait un genre de « switch » dans la signalisation de TGF- β . La fermeture de la plaie se fait via les voies canoniques et non canoniques, mais une fois la plaie fermée, toute la signalisation se déplace vers les SMAD (spécifiquement SMAD2, un traitement avec l'inhibiteur spécifique pour SMAD3 n'a aucun effet). Suite à la fermeture de la plaie, inhiber TAK1 ne présente aucun phénotype, mais le SB-431542 empêche la formation du blastème. Avec les résultats obtenus jusqu'à maintenant, il est difficile d'établir comment ce « switch » s'opère une fois la plaie fermée. La différence fondamentale entre la voie canonique et la voie TAK1 est l'activation de la cascade au niveau des récepteurs de TGF- β . Dans la voie non-canonique, le tout passe par l'activation de TRAF6. Mon hypothèse serait que suite à la fermeture de la plaie, le niveau ou l'activité de TRAF6 serait diminué. La régulation de TRAF6 est encore un peu nébuleuse, mais une étude a développé un modèle pour expliquer son activation/inhibition. TRAF6 serait dans une structure fermée, lorsqu'inactive. Un signal au niveau de la cellule causerait un changement de conformation et TRAF6 passerait à une forme ouverte. Ceci permettrait à une E2 conjuguase de polyubiquitiner TRAF6, ce qui lui permettra d'activer des protéines en aval. Son inactivation passerait par une déubiquitination et le retour à sa conformation fermée. Ainsi, suite à la fermeture de la plaie, TRAF6 pourrait être inhibé, ce qui résulterait en l'arrêt de la signalisation de TAK1. Toute l'activité des récepteurs de TGF- β se tournerait donc vers la voie des SMADs pour le reste de la phase de préparation.

4.7 Modèle pour la régénération

Au début de mon doctorat, le laboratoire commençait à avoir une certaine idée de comment les TGF- β s pouvaient réguler la régénération et un modèle de signalisation commençait à prendre

forme. Depuis, trois projets distincts ont permis de faire avancer nos connaissances dans le sujet. Un premier projet se concentrait sur la signalisation des SMAD2/3 durant la formation du blastème. Ce projet a permis de mettre SMAD2 au cœur de la phase de préparation pour la prolifération et la migration ⁶⁹. Les BMPs et la voie des SMAD1/5 ont été étudiés durant la phase de redéveloppement. Ils sont associés à la morphogénèse et la formation normale du patron de la patte. Des gènes impliqués dans la chondrogenèse comme SOX9 ont aussi été associés à la voie BMP/SMAD (projet en cours). Finalement, le dernier projet était le mien, où je me suis concentré sur la toute première étape de la régénération, la fermeture de la plaie. Nous avons pu faire le lien entre des voies non canoniques de TGF- β . Éventuellement, ce projet nous a menés à découvrir une fonction pour p38 et JNK durant la progression du blastème. Avec tout cela, j'ai pu mettre en place un modèle de signalisation. La Figure 22 démontre le progrès accompli au laboratoire dans la compréhension de la signalisation durant la régénération (Figure 22).

L'importance du modèle présenté est accrue, quand on pense que notre groupe de recherche est un des seuls dans le monde qui tente de comprendre la signalisation permettant la régénération épimorphique. En connaissant ce contexte, on comprend l'importance de ce qui est présenté dans la thèse et publié par le laboratoire depuis sa création. Nous avons mis au cœur de nos recherches la voie TGF- β , mais au-delà de cette voie, nous tentons de comprendre la signalisation. Si d'autres groupes de recherche travaillent à décortiquer d'autres voies de signalisation entourant la régénération, on pourra ajouter plus de pièces au casse-tête qui est présenté dans cette thèse.

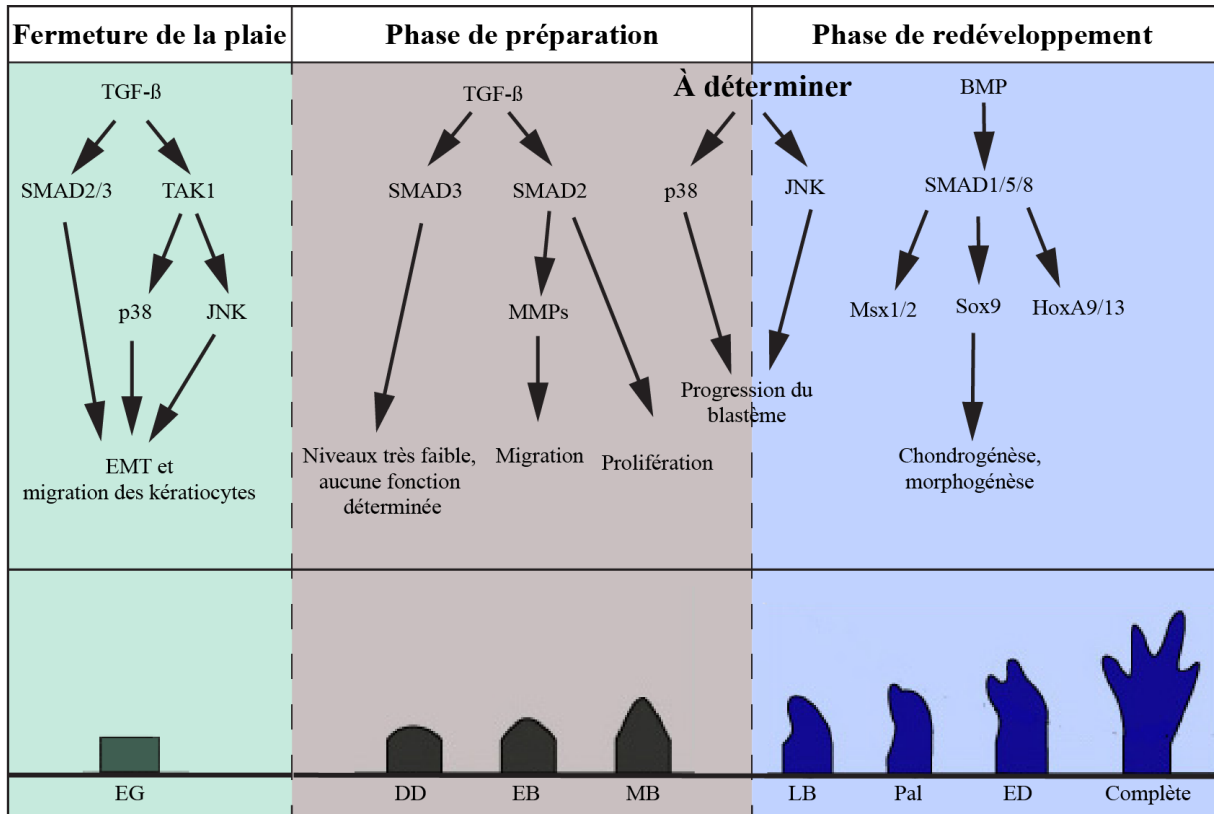


Figure 22. Représentation de la signalisation des TGF-βs durant la régénération.

Les trois étapes distinctes de la régénération sont présentées montrant l'importance TGF-β au début du processus pour la fermeture de plaie via les voies canoniques et non canoniques. Par la suite, TGF-β active principalement les SMADs où SMAD2 est important pour la migration et la prolifération des fibroblastes menant à la formation du blastème. Après le bourgeon primaire, la régénération devient indépendante de TGF-β. Le mode de régulation de p38 et JNK durant la progression du blastème ne sont pas encore connus. Au début de la phase redéveloppement la régénération devient dépendante des BMPs. (EG) Épithélium de guérison, (DD) dédifférenciation, (EB) bourgeon primaire, (MB) bourgeon moyen, (Pal) palette et (ED) stade de différenciation.

5 - Conclusion

Mon grand questionnement a toujours été quelles sont les différences entre les modèles qui régénèrent et ceux qui cicatrisent. D'un côté, est-ce que ce sont la séquence des gènes et des protéines qui sont fondamentalement différentes ? De l'autre côté, est-ce que c'est la régulation des protéines et leur séquence d'expression/activation qui entraînent la divergence ? Je pense que c'est un peu la réponse 1 et un peu la réponse 2. Certaines protéines comme les SMAD2/3 sont quasi identiques entre l'humain et l'axolotl. Au niveau protéique, il y a presque 100% d'homologie. Malgré cette forte ressemblance, l'activation des SMADs est totalement différente entre les deux espèces suite à une blessure. Chez l'humain, TGF- β active fortement SMAD3 qui permet la guérison par cicatrisation. Chez l'axolotl c'est SMAD2 qui est activé et un blastème est formé. D'autre part, certaines protéines n'ont presque aucune homologie, des exemples sont p53 ou la SnoN (environ 70% pour les deux protéines). Il semble avoir certaines situations où les différences sont au niveau de l'homologie et d'autres où c'est une question de comment les protéines sont régulées.

Dans mon projet, les protéines comme TGF- β , p38 et JNK ont des rôles très similaires chez l'humain et l'axolotl puisqu'ils travaillent pour permettre la migration des cellules épithéliales et qu'ils jouent des rôles dans le cycle cellulaire et la différenciation. Les protéines JNK et p38 ont une forte homologie avec celle de l'humain (environ 92% pour les deux). Les sites de phosphorylation importants pour leurs activations sont aussi conservés. Par contre, la grosse différence entre l'humain et l'axolotl est qu'au lieu d'entraîner une réépithélialisation lente et une cicatrisation, on observe une migration rapide et une régénération par un blastème. J'y vois la situation où la régulation de p38 et JNK serait différente entre les deux espèces.

Mon hypothèse est que la régénération implique des éléments de signalisation presque identiques à l'humain, mais que les éléments qui les régulent sont différents. Ceci a pour conséquence de rendre la séquence d'expression et d'activation différente, ce qui mène à une régénération. Afin de comprendre la régénération, il faut travailler en deux étapes : 1) trouver la hiérarchie d'activation et d'expression des protéines (ce qui a été accompli dans ce projet pour plusieurs protéines) et 2) Trouver les protéines régulatrices et leurs différences avec l'humain

qui permettent les étapes nécessaires au bon moment pour une régénération (ce qu'il nous reste à faire).

D'un point de vue plus fondamental, ce projet de doctorat a permis de mieux comprendre la régénération sous plusieurs aspects. Chez l'axolotl, aucune étude avant la nôtre ne s'est concentrée sur les voies de signalisation qui permettent la fermeture rapide la plaie suite à l'amputation. Nous comprenons mieux comment TGF- β régule la régénération et comment les protéines p38 et JNK sont impliquées dans la progression du blastème. En plus de mieux comprendre la régénération, nous avons ajouté au bassin de littérature quant à l'implication des transitions épithéliaux mésenchymateuses durant la guérison/régénération dans un modèle *in vivo*

Bibliographie

- 1 Reddien, P. W. & Sanchez Alvarado, A. Fundamentals of planarian regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 725-757, doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.095114 (2004).
- 2 Rouhana, L. *et al.* RNA interference by feeding in vitro-synthesized double-stranded RNA to planarians: methodology and dynamics. *Dev Dyn* **242**, 718-730, doi:10.1002/dvdy.23950 (2013).
- 3 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).
- 4 Illingworth, C. M. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *J Pediatr Surg* **9**, 853-858 (1974).
- 5 Seifert, A. W. & Muneoka, K. The blastema and epimorphic regeneration in mammals. *Dev Biol* **433**, 190-199, doi:10.1016/j.ydbio.2017.08.007 (2018).
- 6 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).
- 7 Gilbert, E. A., Delorme, S. L. & Vickaryous, M. K. The regeneration blastema of lizards: an amniote model for the study of appendage replacement. *Regeneration (Oxf)* **2**, 45-53, doi:10.1002/reg2.31 (2015).
- 8 Chen, Y., Love, N. R. & Amaya, E. Tadpole tail regeneration in *Xenopus*. *Biochem Soc Trans* **42**, 617-623, doi:10.1042/BST20140061 (2014).
- 9 Love, N. R. *et al.* Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nat Cell Biol* **15**, 222-228, doi:10.1038/ncb2659 (2013).
- 10 Mescher, A. L., Neff, A. W. & King, M. W. Changes in the inflammatory response to injury and its resolution during the loss of regenerative capacity in developing *Xenopus* limbs. *PLoS One* **8**, e80477, doi:10.1371/journal.pone.0080477 (2013).

- 11 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).
- 12 Pfefferli, C. & Jazwinska, A. The art of fin regeneration in zebrafish. *Regeneration (Oxf)* **2**, 72-83, doi:10.1002/reg2.33 (2015).
- 13 Gonzalez-Rosa, J. M., Burns, C. E. & Burns, C. G. Zebrafish heart regeneration: 15 years of discoveries. *Regeneration (Oxf)* **4**, 105-123, doi:10.1002/reg2.83 (2017).
- 14 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).
- 15 Martin, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81 (1997).
- 16 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).
- 17 Chablais, F. & Jazwinska, A. The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on TGFbeta signaling. *Development* **139**, 1921-1930, doi:10.1242/dev.078543 (2012).
- 18 Kawakami, Y. *et al.* Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev* **20**, 3232-3237, doi:10.1101/gad.1475106 (2006).
- 19 Wallace, H. *Vertebrate limb regeneration*. (Wiley, 1981).
- 20 Tank, P. W., Carlson, B. M. & Connelly, T. G. A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J Morphol* **150**, 117-128, doi:10.1002/jmor.1051500106 (1976).
- 21 Gardiner, D. M., Carlson, M. R. & Roy, S. Towards a functional analysis of limb regeneration. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 385-393, doi:10.1006/scdb.1999.0325 (1999).
- 22 Roy, S. & Levesque, M. Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? *ScientificWorldJournal* **6 Suppl 1**, 12-25, doi:10.1100/tsw.2006.324 (2006).
- 23 Levesque, M., Villiard, E. & Roy, S. Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **314**, 684-697, doi:10.1002/jez.b.21371 (2010).
- 24 Goss, R. J. The regenerative responses of amputated limbs to delayed insertion into the body cavity. *Anat Rec* **126**, 283-297 (1956).

- 25 Thornton, C. S. The effect of apical cap removal on limb regeneration in *Amblystoma* larvae. *Journal of Experimental Zoology* **134**, 357-381, doi:doi:10.1002/jez.1401340209 (1957).
- 26 Mescher, A. L. Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *J Exp Zool* **195**, 117-128, doi:10.1002/jez.1401950111 (1976).
- 27 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).
- 28 Gerber, T. *et al.* Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. *Science* **362**, doi:10.1126/science.aaq0681 (2018).
- 29 Roensch, K., Tazaki, A., Chara, O. & Tanaka, E. M. Progressive specification rather than intercalation of segments during limb regeneration. *Science* **342**, 1375-1379, doi:10.1126/science.1241796 (2013).
- 30 Tickle, C. & Towers, M. Sonic Hedgehog Signaling in Limb Development. *Front Cell Dev Biol* **5**, 14, doi:10.3389/fcell.2017.00014 (2017).
- 31 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, doi:10.1186/1471-213X-10-15 (2010).
- 32 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).
- 33 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).
- 34 Sandoval-Guzman, T. *et al.* Fundamental differences in dedifferentiation and stem cell recruitment during skeletal muscle regeneration in two salamander species. *Cell Stem Cell* **14**, 174-187, doi:10.1016/j.stem.2013.11.007 (2014).
- 35 Kragl, M. *et al.* Muscle and connective tissue progenitor populations show distinct Twist1 and Twist3 expression profiles during axolotl limb regeneration. *Dev Biol* **373**, 196-204, doi:10.1016/j.ydbio.2012.10.019 (2013).

- 36 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 (2012).
- 37 Pakyari, M., Farrokhi, A., Maharlooei, M. K. & Ghahary, A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Advances in wound care* **2**, 215-224, doi:10.1089/wound.2012.0406 (2013).
- 38 Godwin, J. W., Pinto, A. R. & Rosenthal, N. A. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 9415-9420, doi:10.1073/pnas.1300290110 (2013).
- 39 Leask, A. & Abraham, D. J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* **18**, 816-827, doi:10.1096/fj.03-1273rev (2004).
- 40 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).
- 41 Massague, J., Blain, S. W. & Lo, R. S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295-309 (2000).
- 42 Massague, J. TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 616-630, doi:10.1038/nrm3434 (2012).
- 43 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).
- 44 Denton, C. P. *et al.* Inducible lineage-specific deletion of TbetaRII in fibroblasts defines a pivotal regulatory role during adult skin wound healing. *J Invest Dermatol* **129**, 194-204, doi:10.1038/jid.2008.171 (2009).
- 45 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).
- 46 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).

- 47 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).
- 48 Wahl, S. M., McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Dougherty, E. B. & Dougherty, S. F. Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* **593**, 188-196 (1990).
- 49 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).
- 50 Blavier, L. *et al.* TGF-beta3-induced palatogenesis requires matrix metalloproteinases. *Mol Biol Cell* **12**, 1457-1466, doi:10.1091/mbc.12.5.1457 (2001).
- 51 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).
- 52 Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research* **19**, 128-139, doi:10.1038/cr.2008.328 (2008).
- 53 Kuk, H., Hutchenreuther, J., Murphy-Marshman, H., Carter, D. & Leask, A. 5Z-7-Oxozeanol Inhibits the Effects of TGFbeta1 on Human Gingival Fibroblasts. *PLoS One* **10**, e0123689, doi:10.1371/journal.pone.0123689 (2015).
- 54 Wagner, E. F. & Nebreda, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9**, 537-549, doi:10.1038/nrc2694 (2009).
- 55 Wang, W., Zhou, G., Hu, M. C., Yao, Z. & Tan, T. H. Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction. *J Biol Chem* **272**, 22771-22775 (1997).
- 56 Kim, S. I. *et al.* Transforming growth factor-beta (TGF-beta1) activates TAK1 via TAB1-mediated autophosphorylation, independent of TGF-beta receptor kinase activity in mesangial cells. *J Biol Chem* **284**, 22285-22296, doi:10.1074/jbc.M109.007146 (2009).

- 57 Ninomiya-Tsuji, J. *et al.* A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* **278**, 18485-18490, doi:10.1074/jbc.M207453200 (2003).
- 58 Yamashita, M. *et al.* TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* **31**, 918-924, doi:10.1016/j.molcel.2008.09.002 (2008).
- 59 Guo, F., Hutchenreuther, J., Carter, D. E. & Leask, A. TAK1 is required for dermal wound healing and homeostasis. *J Invest Dermatol* **133**, 1646-1654, doi:10.1038/jid.2013.28 (2013).
- 60 Shi-wen, X. *et al.* Requirement of transforming growth factor beta-activated kinase 1 for transforming growth factor beta-induced alpha-smooth muscle actin expression and extracellular matrix contraction in fibroblasts. *Arthritis Rheum* **60**, 234-241, doi:10.1002/art.24223 (2009).
- 61 Villiard, E. *et al.* Urodele p53 tolerates amino acid changes found in p53 variants linked to human cancer. *BMC Evol Biol* **7**, 180, doi:10.1186/1471-2148-7-180 (2007).
- 62 Yun, M. H., Gates, P. B. & Brookes, J. P. Regulation of p53 is critical for vertebrate limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 17392-17397, doi:10.1073/pnas.1310519110 (2013).
- 63 Tasaki, J. *et al.* ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration. *Development* **138**, 2417-2427, doi:10.1242/dev.060764 (2011).
- 64 Worthington, J. J., Klementowicz, J. E. & Travis, M. A. TGFbeta: a sleeping giant awoken by integrins. *Trends Biochem Sci* **36**, 47-54, doi:10.1016/j.tibs.2010.08.002 (2011).
- 65 Shi, M. *et al.* Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* **474**, 343-349, doi:10.1038/nature10152 (2011).
- 66 Levesque, M. *et al.* Transforming growth factor: beta signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PLoS One* **2**, e1227, doi:10.1371/journal.pone.0001227 (2007).
- 67 Ho, D. M. & Whitman, M. TGF-beta signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Dev Biol* **315**, 203-216, doi:10.1016/j.ydbio.2007.12.031 (2008).

- 68 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* **242**, 886-896, doi:10.1002/dvdy.23977 (2013).
- 69 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).
- 70 Chen, S. J. *et al.* Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *J Invest Dermatol* **112**, 49-57, doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00477.x (1999).
- 71 Tsai, S. L., Baselga-Garriga, C. & Melton, D. A. Blastemal progenitors modulate immune signaling during early limb regeneration. *Development* **146**, doi:10.1242/dev.169128 (2019).
- 72 Tasaki, J., Shibata, N., Sakurai, T., Agata, K. & Umesono, Y. Role of c-Jun N-terminal kinase activation in blastema formation during planarian regeneration. *Dev Growth Differ* **53**, 389-400, doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01254.x (2011).
- 73 Almuedo-Castillo, M. *et al.* JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling. *PLoS genetics* **10**, e1004400, doi:10.1371/journal.pgen.1004400 (2014).
- 74 Jopling, C., Sune, G., Morera, C. & Izpisua Belmonte, J. C. p38alpha MAPK regulates myocardial regeneration in zebrafish. *Cell Cycle* **11**, 1195-1201, doi:10.4161/cc.11.6.19637 (2012).
- 75 Zhang, Q. *et al.* Reactive oxygen species generated from skeletal muscles are required for gecko tail regeneration. *Sci Rep* **6**, 20752, doi:10.1038/srep20752 (2016).
- 76 Arnold, C. P. *et al.* Pathogenic shifts in endogenous microbiota impede tissue regeneration via distinct activation of TAK1/MKK/p38. *Elife* **5**, doi:10.7554/eLife.16793 (2016).
- 77 Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-196, doi:10.1038/nrm3758 (2014).
- 78 Lim, J. & Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* **139**, 3471-3486, doi:10.1242/dev.071209 (2012).

- 79 O'Rourke, M. P., Soo, K., Behringer, R. R., Hui, C. C. & Tam, P. P. Twist plays an essential role in FGF and SHH signal transduction during mouse limb development. *Dev Biol* **248**, 143-156 (2002).
- 80 Ros, M. A., Sefton, M. & Nieto, M. A. Slug, a zinc finger gene previously implicated in the early patterning of the mesoderm and the neural crest, is also involved in chick limb development. *Development* **124**, 1821-1829 (1997).
- 81 Mittal, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol* **13**, 395-412, doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043854 (2018).
- 82 Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **119**, 1420-1428, doi:10.1172/JCI39104 (2009).
- 83 Haensel, D. & Dai, X. Epithelial-to-mesenchymal transition in cutaneous wound healing: Where we are and where we are heading. *Dev Dyn* **247**, 473-480, doi:10.1002/dvdy.24561 (2018).
- 84 Savagner, P. *et al.* Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* **202**, 858-866, doi:10.1002/jcp.20188 (2005).
- 85 Hudson, L. G. *et al.* Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2). *J Dermatol Sci* **56**, 19-26, doi:10.1016/j.jdermsci.2009.06.009 (2009).
- 86 McDonald, T. M. *et al.* Zebrafish keratocyte explant cultures as a wound healing model system: differential gene expression & morphological changes support epithelial-mesenchymal transition. *Exp Cell Res* **319**, 1815-1827, doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.036 (2013).
- 87 Cheng, F. *et al.* Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, E4320-E4327, doi:10.1073/pnas.1519197113 (2016).
- 88 Oft, M., Heider, K. H. & Beug, H. TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* **8**, 1243-1252 (1998).

- 89 Takano, S. *et al.* Smad4 is essential for down-regulation of E-cadherin induced by TGF-beta in pancreatic cancer cell line PANC-1. *J Biochem* **141**, 345-351, doi:10.1093/jb/mvm039 (2007).
- 90 Gonzalez, D. M. & Medici, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* **7**, re8, doi:10.1126/scisignal.2005189 (2014).
- 91 Halder, S. K., Beauchamp, R. D. & Datta, P. K. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. *Neoplasia* **7**, 509-521 (2005).
- 92 Bakin, A. V., Rinehart, C., Tomlinson, A. K. & Arteaga, C. L. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* **115**, 3193-3206 (2002).
- 93 Chen, H. H., Zhou, X. L., Shi, Y. L. & Yang, J. Roles of p38 MAPK and JNK in TGF-beta1-induced human alveolar epithelial to mesenchymal transition. *Arch Med Res* **44**, 93-98, doi:10.1016/j.arcmed.2013.01.004 (2013).
- 94 Santibanez, J. F. JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Lett* **580**, 5385-5391, doi:10.1016/j.febslet.2006.09.003 (2006).
- 95 Liu, Q. *et al.* A crosstalk between the Smad and JNK signaling in the TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in rat peritoneal mesothelial cells. *PLoS One* **7**, e32009, doi:10.1371/journal.pone.0032009 (2012).
- 96 Dvashi, Z., Goldberg, M., Adir, O., Shapira, M. & Pollack, A. TGF-beta1 induced transdifferentiation of rpe cells is mediated by TAK1. *PLoS One* **10**, e0122229, doi:10.1371/journal.pone.0122229 (2015).
- 97 Echeverri, K. & Tanaka, E. M. Ectoderm to mesoderm lineage switching during axolotl tail regeneration. *Science* **298**, 1993-1996, doi:10.1126/science.1077804 (2002).
- 98 Iten, L. E. & Bryant, S. V. Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, rate, and stages. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* **173**, 263-282, doi:10.1007/BF00575834 (1973).
- 99 Kalluri, R. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest* **119**, 1417-1419, doi:10.1172/JCI39675 (2009).

- 100 Moriguchi, T. *et al.* A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem* **271**, 13675-13679 (1996).
- 101 Zhang, Y. E. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res* **19**, 128-139, doi:10.1038/cr.2008.328 (2009).
- 102 Sorrentino, A. *et al.* The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol* **10**, 1199-1207, doi:10.1038/ncb1780 (2008).
- 103 Kim, S. I. & Choi, M. E. TGF-beta-activated kinase-1: New insights into the mechanism of TGF-beta signaling and kidney disease. *Kidney Res Clin Pract* **31**, 94-105, doi:10.1016/j.krcp.2012.04.322 (2012).
- 104 Benazet, J. D. & Zeller, R. Vertebrate limb development: moving from classical morphogen gradients to an integrated 4-dimensional patterning system. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001339, doi:10.1101/cshperspect.a001339 (2009).
- 105 Kim, S. I. *et al.* TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F1471-1478, doi:10.1152/ajprenal.00485.2006 (2007).
- 106 O'Rourke, M. P., Soo, K., Behringer, R. R., Hui, C.-C. & Tam, P. P. L. Twist Plays an Essential Role in FGF and SHH Signal Transduction during Mouse Limb Development. *Developmental Biology* **248**, 143-156, doi:10.1006/dbio.2002.0730 (2002).
- 107 Carlson, M. R., Bryant, S. V. & Gardiner, D. M. Expression of Msx-2 during development, regeneration, and wound healing in axolotl limbs. *J Exp Zool* **282**, 715-723 (1998).
- 108 Stone, R. C. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res* **365**, 495-506, doi:10.1007/s00441-016-2464-0 (2016).
- 109 Weber, C. E., Li, N. Y., Wai, P. Y. & Kuo, P. C. Epithelial-mesenchymal transition, TGF-beta, and osteopontin in wound healing and tissue remodeling after injury. *J Burn Care Res* **33**, 311-318, doi:10.1097/BCR.0b013e318240541e (2012).

- 110 Ho, D. M., Yeo, C. Y. & Whitman, M. The role and regulation of GDF11 in Smad2 activation during tailbud formation in the *Xenopus* embryo. *Mech Dev* **127**, 485-495, doi:10.1016/j.mod.2010.08.004 (2010).
- 111 Sader, F., Denis, J. F., Laref, H. & Roy, S. Epithelial to mesenchymal transition is mediated by both TGF-beta canonical and non-canonical signaling during axolotl limb regeneration. *Sci Rep* **9**, 1144, doi:10.1038/s41598-018-38171-5 (2019).
- 112 Vlaskalin, T., Wong, C. J. & Tsilfidis, C. Growth and apoptosis during larval forelimb development and adult forelimb regeneration in the newt (*Notophthalmus viridescens*). *Dev Genes Evol* **214**, 423-431, doi:10.1007/s00427-004-0417-1 (2004).
- 113 Lu, D., Chen, J. & Hai, T. The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *The Biochemical journal* **401**, 559-567, doi:10.1042/bj20061081 (2007).
- 114 Li, X. & Cao, X. BMP signaling and HOX transcription factors in limb development. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **8**, s805-812 (2003).
- 115 Bi, W., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* **22**, 85-89, doi:10.1038/8792 (1999).
- 116 Masamune, A. *et al.* A c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor SP600125 (anthra[1,9-cd]pyrazole-6 (2H)-one) blocks activation of pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* **310**, 520-527, doi:10.1124/jpet.104.067280 (2004).
- 117 Chambon, J. P., Nakayama, A., Takamura, K., McDougall, A. & Satoh, N. ERK- and JNK-signalling regulate gene networks that stimulate metamorphosis and apoptosis in tail tissues of ascidian tadpoles. *Development* **134**, 1203-1219, doi:10.1242/dev.002220 (2007).
- 118 Plataniias, L. C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* **101**, 4667-4679, doi:10.1182/blood-2002-12-3647 (2003).
- 119 Moon, D. O. *et al.* JNK inhibitor SP600125 promotes the formation of polymerized tubulin, leading to G2/M phase arrest, endoreduplication, and delayed apoptosis. *Exp Mol Med* **41**, 665-677, doi:10.3858/emm.2009.41.9.073 (2009).
- 120 Ma, J. *et al.* Activation of JNK/c-Jun is required for the proliferation, survival, and angiogenesis induced by EET in pulmonary artery endothelial cells. *J Lipid Res* **53**, 1093-1105, doi:10.1194/jlr.M024398 (2012).

- 121 Hideshima, T. *et al.* Biologic sequelae of c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK) activation in multiple myeloma cell lines. *Oncogene* **22**, 8797-8801, doi:10.1038/sj.onc.1206919 (2003).
- 122 Potapova, O. *et al.* Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. *Molecular and cellular biology* **20**, 1713-1722 (2000).
- 123 Mingo-Sion, A. M., Marietta, P. M., Koller, E., Wolf, D. M. & Van Den Berg, C. L. Inhibition of JNK reduces G2/M transit independent of p53, leading to endoreduplication, decreased proliferation, and apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* **23**, 596-604, doi:10.1038/sj.onc.1207147 (2004).
- 124 Du, L. *et al.* Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity: evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *J Biol Chem* **279**, 11957-11966, doi:10.1074/jbc.M304935200 (2004).
- 125 Akiyama, H. [Sox family regulate chondrogenesis]. *Clin Calcium* **16**, 368- 372, doi:CliCa0602368372 (2006).
- 126 Pan, Q. *et al.* Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J Cell Physiol* **217**, 228-241, doi:10.1002/jcp.21496 (2008).
- 127 Lejeune, D. *et al.* Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* **277**, 33676-33682, doi:10.1074/jbc.M204204200 (2002).
- 128 Parhar, K., Ray, A., Steinbrecher, U., Nelson, C. & Salh, B. The p38 mitogen-activated protein kinase regulates interleukin-1beta-induced IL-8 expression via an effect on the IL-8 promoter in intestinal epithelial cells. *Immunology* **108**, 502-512, doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01603.x (2003).
- 129 Mulder, K. M. & Morris, S. L. Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem* **267**, 5029-5031 (1992).
- 130 Wang, Y., Rouabhia, M. & Zhang, Z. Pulsed electrical stimulation benefits wound healing by activating skin fibroblasts through the TGFbeta1/ERK/NF-kappaB axis.

- Biochimica et biophysica acta* **1860**, 1551-1559, doi:10.1016/j.bbagen.2016.03.023 (2016).
- 131 Wilkes, M. C. *et al.* Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res* **65**, 10431-10440, doi:10.1158/0008-5472.Can-05-1522 (2005).
- 132 Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. & Arteaga, C. L. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* **275**, 36803-36810, doi:10.1074/jbc.M005912200 (2000).
- 133 Katoh, M. Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (Review). *International journal of oncology* **51**, 1357-1369, doi:10.3892/ijo.2017.4129 (2017).
- 134 Nakaya, Y. & Sheng, G. Epithelial to mesenchymal transition during gastrulation: an embryological view. *Dev Growth Differ* **50**, 755-766, doi:10.1111/j.1440-169X.2008.01070.x (2008).
- 135 Gujral, T. S. *et al.* A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cell* **159**, 844-856, doi:10.1016/j.cell.2014.10.032 (2014).
- 136 Wang, G. *et al.* STAT3 selectively interacts with Smad3 to antagonize TGF-beta signalling. *Oncogene* **35**, 4422, doi:10.1038/onc.2016.145 (2016).
- 137 Gyamfi, J., Lee, Y. H., Eom, M. & Choi, J. Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Sci Rep* **8**, 8859, doi:10.1038/s41598-018-27184-9 (2018).
- 138 Dauer, D. J. *et al.* Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene* **24**, 3397-3408, doi:10.1038/sj.onc.1208469 (2005).
- 139 Yu, R. *et al.* IL-22 mediates the oral mucosal wound healing via STAT3 in keratinocytes. *Arch Oral Biol* **72**, 14-20, doi:10.1016/j.archoralbio.2016.08.001 (2016).

- 140 Niemand, C. *et al.* Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J Immunol* **170**, 3263-3272 (2003).
- 141 Sader, F., Denis, J. F. & Roy, S. Tissue regeneration in dentistry: Can salamanders provide insight? *Oral Dis* **24**, 509-517, doi:10.1111/odi.12674 (2018).
- 142 Tornini, V. A. *et al.* Live Monitoring of Blastemal Cell Contributions during Appendage Regeneration. *Curr Biol* **26**, 2981-2991, doi:10.1016/j.cub.2016.08.072 (2016).
- 143 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).
- 144 Mendelson, K. G., Contois, L. R., Tevosian, S. G., Davis, R. J. & Paulson, K. E. Independent regulation of JNK/p38 mitogen-activated protein kinases by metabolic oxidative stress in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12908-12913 (1996).

Annexe 1 - Effet des doses élevées de SB-431542 sur la fermeture de la plaie

Présentation

Certaines études avaient préalablement montré qu'un traitement au SB-431542 inhibait la fermeture de la plaie chez *Xenopus Laevis*. Les doses de SB-431542 utilisés était de 100 μ M. Les premières études avec le SB-431542 dans notre laboratoire avaient montré qu'une dose aussi élevée était toxique pour les animaux. Les animaux meurent quelque jour après le début du traitement. Dans le chapitre 1, un traitement a une dose de 25 μ M ne cause aucun effet sur la fermeture de la plaie. Nous avons donc conclu que chez l'axolotl, ce n'est pas TGF- β /SMAD qui régulait le processus et ce qui amené aux résultats présentés dans le chapitre 1 sur la participation des voies non canoniques. Par contre, puisque la fermeture de la plaie se fait rapidement, nous avons quand même tenté de voir quel serait l'effet d'un traitement d'une haute de SB-431542 chez l'axolotl. Nous avons donc testé l'effet de doses de 50 μ M et 100 μ M. Nous avons bel et bien confirmé que ceci causait un délai dans la fermeture de la plaie. Dû à la forte toxicité causée par cette expérience, nous n'avons jamais poursuivi ce projet et c'est pour cela que ces résultats n'ont pas été publiés.

Résultats

Les doses élevées de SB-431542 ont un certain effet inhibiteur sur l'expression des marqueurs EMT

Nous avons cherché à savoir s'il y aurait un effet inhibiteur des différentes drogues sur l'expression des marqueurs EMT. Pour effectuer ces expériences, les animaux ont été traités avec l'inhibiteur 24 heures avant l'amputation. Après l'amputation, le traitement a été poursuivi jusqu'à la récolte de l'ARN une heure après l'amputation. Ce temps a été choisi, car il correspond au pic d'expression de la majorité des marqueurs dans les résultats RT-qPCR dans la Figure 7 (Figure 23). Lorsque nous utilisons des doses plus élevées de SB-431542 (50 μ M et 100 μ M) Nous avons un effet inhibiteur sur l'expression de certains marqueurs de EMT. Les deux concentrations ont montré une inhibition de Snail, Slug, ZEB1, ZEB2 Twist1 et Vimentine (Figure 23). Nous observons également une certaine augmentation d'E-Cadhérine à 100 μ M en corrélation avec ce que nous connaissons dans la littérature. L'étape suivante consistait à déterminer si cette inhibition de l'expression des gènes était traduite en un phénotype lors de la régénération.

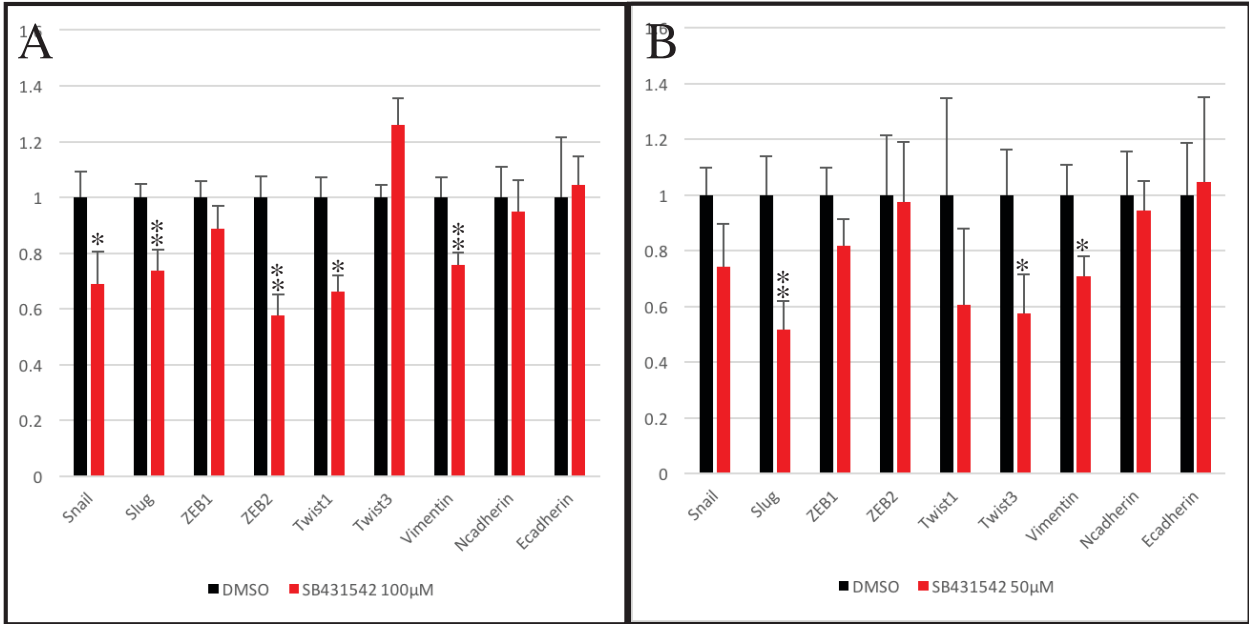


Figure 23. Q-RT-PCR mesurant l'expression de marqueurs EMT dans des pattes d'axolotl 1h post-amputation.

Les animaux ont été traités 24h avant l'amputation et 1h post-amputation avant la récolte des pattes et l'extraction de l'ARN. Les barres noires représentent les animaux contrôle DMSO et les barres rouges représentent les animaux traités avec ; (A)100µM of SB431542, (B) 50µM of SB431542. Un test de t de Student a été effectué pour évaluer si les différences sont significatives **P <0.05, *P<0.1, Moyenne ± s.e.m. (l'expression des gènes est normalisée sur l'expression du gène de ménage GAPDH)

Effet de hautes doses de SB-431542 sur la fermeture de la plaie

Dans le chapitre 1 à la Figure 7, nous montrons que l'expression des marqueurs EMT est exprimée au cours des 2 premières heures de la régénération et est localisée dans des cellules en migration fermant la plaie. Dans la section précédente, nous montrons un certain effet des drogues sur les marqueurs EMT. Pour évaluer si l'inhibition des marqueurs EMT s'est traduite par une inhibition de la fermeture de la plaie, nous avons utilisé les mêmes traitements que dans la section précédente et avons examiné la fermeture de la plaie par histologie.

Les animaux ont été traités 24 heures avant l'amputation avec 25 μM et 50 μM de SB-431542. Après l'amputation, le traitement a été poursuivi pendant 6h après la blessure. Nous avons récolté les pattes traitées 6h après l'amputation pour nous assurer que la plaie est complètement fermée dans le contrôle DMSO (la plaie se ferme habituellement entre 2h et 3h après l'amputation chez des animaux de 4-5 cm). Nous avons comparé le contrôle aux différents traitements. Le SB-431542 à une concentration de 25 μM ne montre aucun effet sur l'état de la fermeture de la plaie (Figure 24A-B).

Chez les animaux où nous avons utilisé une dose 50 μM de SB-431542, nous avons observé une gamme de phénotypes. Chez 5 animaux sur 8, la plaie était complètement fermée (Figure 24D). Chez un animal, nous avons observé un retard dans la fermeture de la plaie (Figure 24E). Les deux autres animaux n'ont montré aucun signe de migration des kératinocytes après 6h (Figure 24F).

En traitant des animaux avec 50 μM de SB-431542, il semble que nous soyons dans une zone grise pour la fermeture de la plaie, car une partie seulement de l'animal semble montrer un retard dans le processus de fermeture de la plaie normal.

Nous avons testé l'effet une dose encore plus élevée de SB-431542. Il a déjà été publié chez *Xenopus* que 100 μM de SB431542 était suffisant pour bloquer la fermeture de la plaie⁶⁷. Nous avons donc fait de même pour axolotl, à 6h et 3h après l'amputation. Nous observons un retard dans la fermeture de la plaie dans tous les animaux traités. Chez les contrôles DMSO, la plaie est complètement fermée 3h après l'amputation et aucun des animaux traités ne présentait une plaie complètement fermée 3h et 6h après l'amputation (Figure 24G-J).

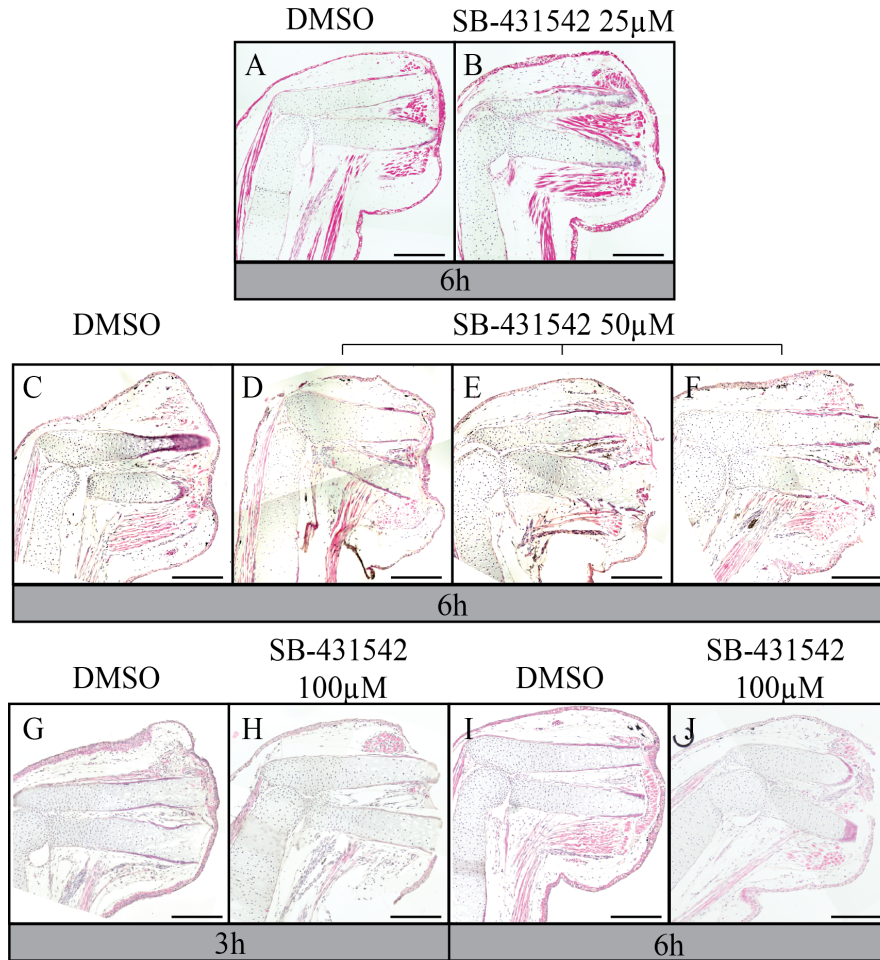


Figure 24. Effet d'un traitement de 50μM et 100μM de SB-431542 sur la fermeture de la plaie suite à l'amputation de la patte d'axolotl.

Coloration à l'éosine et l'hématoxyline sur les pattes d'axolotls traités. (A-F) 6h post-amputation (A) Control DMSO, la plaie est complètement fermée. (B) Traitement avec 25μM de SB-431542, la plaie est complètement fermée (C) Contrôle DMSO (D-F) Gamme de phénotypes suite au traitement avec 50μM de SB-431542 (D) la plaie est complètement fermée (E) la plaie est partiellement fermée, (F) aucune migration. (G-H) 3h post-amputation, (G) Control DMSO, la plaie est complètement fermée. (H) Animaux traités avec 100μM de SB-431542, aucune migration n'est observée. (I-J) 6h post-amputation, (I) Control DMSO, la plaie est complètement fermée. (J) Animaux traités avec 100μM de SB-431542, aucune migration n'est observée. L'échelle est de 500μm. Des images recomposées sont présentées.

Analyse de l'annexe 1

Les résultats présentés dans cette annexe sont intéressants, mais difficiles à interpréter considérant la létalité de la dose utilisée. En faisant abstraction de la dose d'inhibiteur, ces résultats suggèrent que les SMADs seraient impliqués dans la fermeture de la plaie et potentiellement plus importants que les voies non-canonique, comme décrit dans le chapitre 1. Quand on regarde dans le chapitre 1, une dose de 25 μ M de SB-431542 occasionne une inhibition presque totale de la phosphorylation de SMAD2, donc il est difficile d'associer l'effet à 100 μ M à une plus forte inhibition des SMADs. Ceci étant dit, j'ai deux hypothèses concernant l'effet observé sur la fermeture de la plaie en présence de hautes doses de SB-431542. Premièrement, la santé de l'animal est mise en péril. Il est connu qu'un animal qui n'est pas en santé (c.-à-d. Malnutrition, trop forte exposition à la lumière) la régénération est affectée ¹⁹. Ainsi, puisque les doses de SB-431542 de 50 μ M ou 100 μ M affecte la santé de l'animal et le programme de régénération est ralenti afin de que l'animal conserve son énergie pour sa survie. Ceci se traduirait par un arrêt de la migration des cellules.

L'autre possibilité est qu'à des doses très élevées, le SB-431542 soit beaucoup moins spécifique. Ainsi, il inhiberait potentiellement d'autres voies de signalisation, p38 et JNK en l'occurrence, ce qui expliquerait le retard dans la fermeture de la plaie dans ces conditions.

Annexe 2 – Article de Revue – Tissue regeneration in dentistry : Can salamander provide insight

Dans cette annexe se trouve la version intégrale d'un article de revue sur lequel je suis le premier auteur. Cet article traite de l'importance de l'étude de modèles comme l'axolotl pour la recherche clinique en médecine dentaire.

Reproduit avec permission

Le manuscrit est publié dans la revue Oral Diseases.

Lien à l'article complet : <https://doi.org/10.1111/odi.12674>

Tissue regeneration in dentistry: Can salamanders provide insight?

F Sader¹ | J-F Denis¹ | S Roy^{1,2} 

¹Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

²Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

Correspondence

Stéphane Roy, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.
Email: stephane.roy@umontreal.ca

Funding information

Canadian Institute for Health Research; Fond Québécois de la Recherche Nature et Technologie (FQRNT); Faculty of Graduate Studies at the Université de Montréal; Network of Recherche en Santé Buccale et Osseuse

The ability to regenerate damaged tissues would be of tremendous benefit for medicine and dentistry. Unfortunately, humans are unable to regenerate tissues such as teeth and fingers or to repair injured spinal cord. With an aging population, health problems are more prominent and dentistry is no exception as loss of bone tissue in the orofacial sphere from periodontal disease is on the rise. Humans can repair oral soft tissues exceptionally well; however, hard tissues, such as bone and teeth, are devoid of the ability to repair well or at all. Fortunately, Mother Nature has solved nearly every problem that we would like to solve for our own benefit and tissue regeneration is no exception. By studying animals that can regenerate, like Axolotls (Mexican salamander), we hope to find ways to stimulate regeneration in humans. We will discuss the role of the transforming growth factor beta cytokines as they are central to wound healing in humans and regeneration in Axolotls. We will also compare wound healing in humans (skin and oral mucosa) to Axolotl skin wound healing and limb regeneration. Finally, we will address the problem of bone regeneration and present results in salamanders which indicate that in order to regenerate bone you need to recruit non-bone cells. Fundamental research, such as the work being performed in animals that can regenerate, offers insight to help understand why some treatments are successful while others fail when it comes to specific tissues such as bones.

KEYWORDS

Axolotl, dentistry, periodontal disease, regeneration, tgf- β , wound healing

1 | INTRODUCTION

Regenerative medicine has emerged in the last 25 years or so as a new field of medicine that promises (or hopes) to cure most ailments resulting from tissue destruction/degeneration. As one can imagine the list of ailments which would benefit from this is quite long, most of the images that come to mind when talking regeneration are associated with amputees or spinal cord injuries; however, with an aging population, it is becoming quite apparent that being able to stimulate tissue regeneration would be, to say the least, very useful. Most of the age-related diseases are due to loss of function resulting from tissue degeneration (Alzheimer's, osteoporosis, arthritis, Parkinson's, cardiac insufficiency, etc.). Medicine is not the only health-related discipline that awaits the new applications promised by regeneration, dentistry

is also facing multiple similar challenges. Of course we would all like to be able to regenerate those lost teeth due to our childhood sugar craves, but it is likely that this will have to wait for a few decades at least. At the moment, one of the biggest challenges in dentistry is the increased prevalence of periodontal disease (Ebersole et al., 2016; Eke et al., 2015). Many laboratories are working on finding solutions to the loss of bone and cementum, but it remains a challenge to this day (Ripamonti, 2016). Periodontal diseases and tooth loss are not the only aspect of dentistry that would benefit from regeneration; oral cancers often result in surgical removal of large segments of the tongue or jaw. Therefore, improved wound healing or regenerating complex tissue sections would be beneficial. At the moment, regenerative medicine is more a subject found in research laboratories using model organisms than clinical applications.

Wound healing is an essential process that enables living organisms to recover from injuries. This process leads to formation of scar tissues in human (and mammals in general) in most cases (Martin, 1997). Although rapid healing of open wounds is important to reduce the risks of infection, it is most often associated with scarring. Scarring is the deposition of abnormally organized collagen fibers in the extra cellular matrix (ECM) that is responsible for many problems from esthetic appearances to the loss of function. Understanding how humans could heal with minimal scarring is a prominent part of the current skin research field. When looking at wound healing in humans, one interesting exception to scarring is noticed in the outstanding healing capacity of the oral mucosa (Denis, Levesque, Tran, Camarda, & Roy, 2013). Following surgery/injury in the mouth, the healing is operated with very little fibrosis. This lead to the idea that, even in humans, the molecular pathways needed for near perfect healing (often referred to as regeneration) are present, although restricted to a specific area.

For practical and obvious ethical reasons, wound healing is studied in model organisms. In some of these models, the wound healing process is far better, yielding perfect regeneration and recovery of function of the affected organ instead of scarring. One of the best examples of a model organism displaying scarless wound healing and regeneration is the Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) (Figure 1a). It is capable of regenerating most of its organs, and this, throughout its

life. This animal model can heal wounds without scarring (Levesque, Villiard, & Roy, 2010; Levesque et al., 2007) and is capable of regenerating an entire limb following amputation (Roy & Lévesque, 2006). This latter process is perfect as all tissue types are correctly replaced and the size of the regenerated limb matches the size of the animal. Recently, we demonstrated that this animal can also heal large mandibular excisional punches through sections of the jaw and regenerate the lost tissues without any scars (Charbonneau, Roy, & Tran, 2016).

In these examples, the regeneration process begins with a wound closure phase which is initiated with keratinocyte migration that is analogous to wound healing observed in humans. A major difference between the two is that the cellular migration covering the wound in this regenerating animal is faster than what is observed in humans and other mammals (Han et al., 2005). Inflammation is also less prominent, and no scar tissue is formed following the wound healing process (Levesque et al., 2010; Seifert, Monaghan, Voss, & Maden, 2012). These differences are not due to the presence of unique molecular pathways used in Axolotls that are absent in humans or vice versa. In fact, it seems that they are linked to the way these pathways are modulated/recruited in response to wounding (Roy & Lévesque, 2006).

Using animal models to study wound healing/regeneration is a necessity. It is presently impossible to reproduce the complexity of

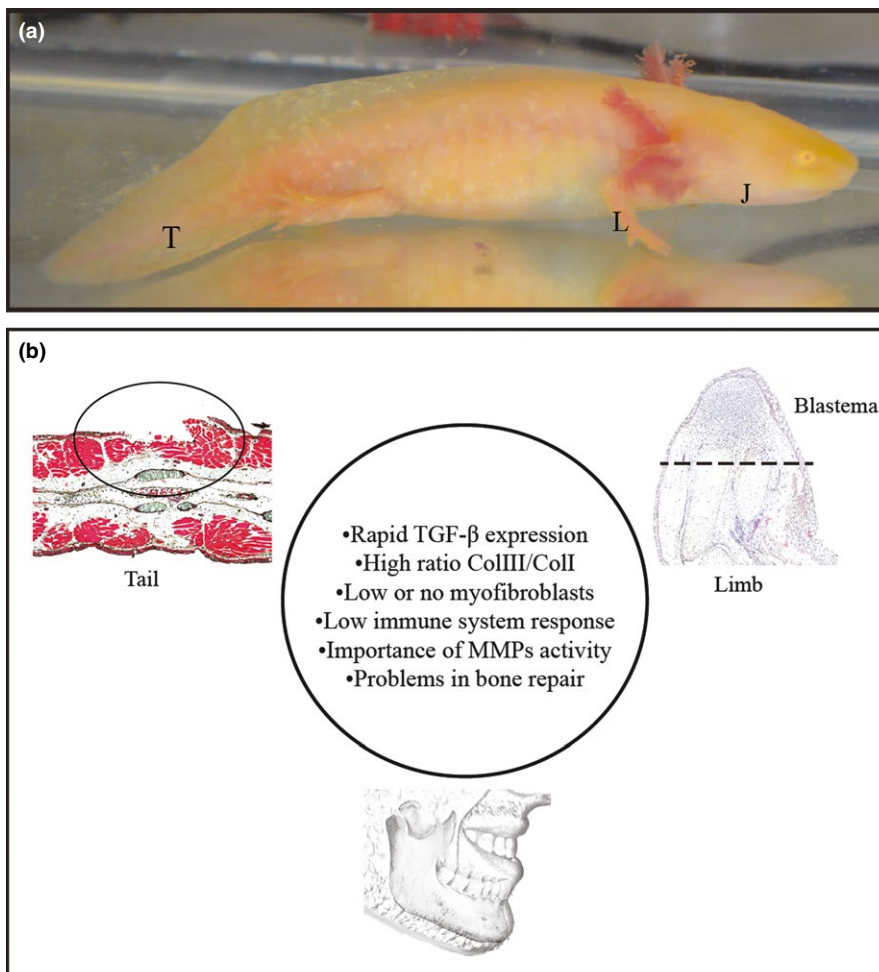


FIGURE 1 Comparison between Axolotl wound healing, limb regeneration, and human oral wound healing. (a) Picture of an albino Axolotl. Tail (T); limb (L); lower jaw (J) are capable of regeneration following an amputation. (b) Comparison of gene expression and extra cellular matrix elements between Axolotl tail excisional wound (wound is circled), regenerating limb and human oral injury. Blastema: an accumulation of dedifferentiated cells mostly composed from mesenchymal and muscle cells which migrated under the wound epithelium and are proliferating to give rise to the regenerated tissue

the interactions between tissues, ECM, nerves, and the immune system response occurring during wound healing in *in vitro* settings. In addition, one has to take in consideration that not every epidermis of the body heals the same. A good example of this latter point is the oral mucosa in humans which heals to near perfection (Szpaderska, Zuckerman, & DiPietro, 2003). It is important to compare what is found in experimental animal models to what is known about human wound healing. As we understand more how perfect healing is orchestrated in model organisms, we start to observe many similarities with what is known about oral healing in humans (Figure 1b). In addition to identify the similarities, differences are also being observed which are important to help our understanding of what may be the best approaches to stimulate perfect healing in humans.

This review will focus on underlining the similarities and differences between Axolotls and humans keeping in mind what differentiates the “perfect” wound healing of Axolotls to what happens in a human skin wound. The emphasis will be on a well-characterized signaling pathway, the transforming growth factor beta (*tgf-β*) pathway. It is an important signaling pathway as it is linked to cellular proliferation and migration, inflammation, and scarring (Branton & Kopp, 1999; Heldin, Miyazono, & ten Dijke, 1997; Klass, Grobbelaar, & Rolfe, 2009; Massagué, 1987). It has been described in human skin wound healing and oral wound healing as well as during the regeneration process in Axolotls. How *tgf-β* signaling occurs in both models will be addressed along with its importance in the regulation of the ECM, the immune response, and implications in perfect healing and regeneration. Finally, bone regeneration which represents one of the major impediments in dentistry will also be discussed as it represents a tissue of exception in Axolotls. The lack of bone regeneration in humans is accentuated in periodontal diseases which can lead to tooth loss or in situations where critical gaps in bones occur and healing/repair becomes impossible. Bone represents an interesting tissue and the Axolotl may offer important insight on why our efforts to stimulate its regeneration have been paved with difficulties and clinical results have not yet reached the desired outcome.

2 | TGF-β

The *tgf-β* superfamily comprises a large number of structurally related polypeptide growth factors capable of regulating a multitude of cellular processes including cell proliferation, lineage determination, differentiation, motility, adhesion and death. Expressed in complex temporal and tissue-specific patterns, *tgf-β* and related factors play a prominent role in development, homeostasis and repair of virtually all tissues in organisms from fruit fly to human. Together, these factors account for a substantial portion of the intercellular signals governing cell fate (Hoffmann, 1991; Hogan, 1996). *Tgf-β* signaling has been shown to be important during development, wound healing, bone fracture healing and in compensatory liver hyperplasia following partial hepatectomy (Braun et al., 1988; Gabbiani, 2003; Massague, 2000; Zentella & Massague, 1992). Different *tgf-β* family members have been associated with different aspects of wound healing: for

example, *tgf-β1* favors more rapid wound closure with the formation of scar tissue in mammals and *tgf-β3* favors a slower and less fibrotic healing process (Branton & Kopp, 1999; Martin, 1997). *Tgf-β2* on the other hand is the least modulated during mammalian wound healing and studies have shown that it is not a major participant in the *tgf-β* signaling observed during wound healing (Frank, Madlener, & Werner, 1996).

The *tgf-β* signal is transduced by a pair of transmembrane serine/threonine kinases, known as type I (TβR-I) and type II (TβR-II) receptors (Cheifetz et al., 1987; Massague, 1998). According to the current model of *tgf-β* signaling, the binding of *tgf-β* to the TβR-II, a constitutively active kinase, leads to the recruitment and phosphorylation of the TβR-I resulting in its activation. The activated TβR-I then propagates the signal inside the cell by phosphorylating *Smad2* and/or *Smad3*. Phosphorylated *Smad2* and/or *Smad3* are released from the receptor and form a complex with *Smad4*. This heteromeric *Smad* complex then translocates to the nucleus and interacts with DNA to regulate target gene expression by recruiting transcriptional co-activators and corepressors (Cheifetz et al., 1987; Roberts, 1998; Wrana & Attisano, 2000).

Interestingly, in wound healing, *tgf-β* has some positive effects in stimulating cellular migration, but also has an important role in scar formation (Branton & Kopp, 1999; Leask & Abraham, 2004). To make matters more complicated, recent work by us and others has shown that *tgf-β* signaling is also essential for tissue regeneration in different organisms (Ho & Whitman, 2008; Levesque et al., 2007).

3 | TGF-β IN ORAL WOUND HEALING

The role of *tgf-β* in wound healing has been described in detail in multiple publications (Diegelmann & Evans, 2004; Martin, 1997). Dormant in the matrix, it is activated by an array of enzymes including matrix metalloproteases (MMPs) and fibrin. As previously mentioned, the expression of *tgf-β* is linked to scar tissue formation. The closest to scar-free healing we find in adult humans is oral wound healing. Interestingly, oral wound healing quality is preserved, even at an advanced age (Denis et al., 2013). Although *tgf-β1* is associated with the formation of scar tissue, it is present during oral wound healing. However, a second isoform (*tgf-β3*) is also expressed. It has been reported that the ratio of *tgf-β3* on *tgf-β1* in oral wound healing is much higher when compared to other types of wound healing (Eslami et al., 2009). Expression of *tgf-β*, following oral injury, is rapidly increased but does not persist compared to what is observed in other wounds. This could potentiate a different gene expression pattern, leading to better healing. In addition, scar tissue formation is often associated with a strong immune response (Harty, Neff, King, & Mescher, 2003; Stramer, Mori, & Martin, 2007). In the case of oral wound healing, the inflammation response is low compared to the response observed in cutaneous wounds corroborating the fact that these wounds heal with low amounts of scarring could be partly due to the low immune response (Szpaderska et al., 2003).



4 | TGF- β IN REGENERATION AND SCARLESS WOUND HEALING

Because of the important role of *tgf- β* in wound healing, our laboratory has been interested for many years in the role this cytokine could play in regeneration. We have shown that *tgf- β* is essential for regeneration: if it is inhibited with SB-431542 (*tgf- β* inhibitor), regeneration does not occur (Levesque et al., 2007). In Axolotls, *tgf- β* is quickly activated following an amputation similar to what has been reported in oral wounds as mentioned above (Levesque et al., 2007). When looking at excisional skin wounds (punch wounds), the same thing is observed as in regenerating limbs (Levesque et al., 2010). Even in the case of a punch wound through the mandibular area, the same thing is observed (Charbonneau et al., 2016). What is interesting in these cases is that the Axolotl does not form a scar following injuries even if *tgf- β* is highly upregulated. In a skin wound, *tgf- β* is usually associated with scarring which is clearly not the case in this regenerating animal model. In the Axolotl regenerative process, *tgf- β* 1 is the cytokine driving the cells to replace the lost tissues because expression of *tgf- β* 3 isoform is hardly detectable and the expression of *tgf- β* 2 isoform is not regulated during regeneration (Roy's lab unpublished data). Expression of *tgf- β* 1 in humans is critical for wound healing to occur, but its sustained expression over multiple days leads to the formation of scar tissue. This is most likely due to the fact that the collagen type I promoter contains a SBE motif (Smad binding element) and is a known target of *Smad3*. Nevertheless, in oral wound healing, activation of *tgf- β* does not induce significant fibrosis and little scar tissue can be observed (Larjava et al., 2011; Szpaderska et al., 2003). We have been working over the last decade at understanding what causes that difference in response to *tgf- β* during Axolotl tissue regeneration. Many hypotheses have been put forth to explain this lack of scar tissue. In our regeneration model, we showed that following amputation, *Smad3* and *pSmad3* are maintained at a very low level even when *tgf- β* is active. Therefore, *tgf- β* can signal through *pSmad2* (which is not associated with fibrosis). Is there, in salamanders, a response following injury that could maintain *pSmad3* to a low level even with a high level of *tgf- β* ? There is also the possibility that the differences reside in the amount of *tgf- β* stored in the matrix. The response to *tgf- β* , as for many other cytokines, can be modulated depending on the quantity that is present in the ECM. It could be that Axolotls have lower amounts of residing *tgf- β* which may modulate a response that is less profibrotic. It is, at present, difficult to fully compare human and Axolotl skin side by side to assess whether this is the case because the differences that could be noticed may be due, for example, to a lower affinity of the antibodies for the Axolotl protein.

5 | TGF- β TARGET IN ECM

The ECM plays a key role in wound healing and scarring. The "improper" remodeling of the matrix results in scarring and a lack of flexibility (Degen & Gourdie, 2012). Molecules such as hyaluronic acid (HA) and fibronectin provide a favorable environment for migration

and remodeling while myofibroblasts, that express alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and collagens, are associated with scar formation (Gabbiani, 2003). Collagens produced during wound healing are the main element present in the scar tissue (Degen & Gourdie, 2012). The process of ECM remodeling is an important step in wound healing. The MMPs, known *tgf- β* targets, are the major enzyme group involved in the remodeling process (Toriseva & Kahari, 2009). This section will cover the importance and the differences between the ECM components and enzymes responsible for its remodeling.

When tissues are injured, they produce new ECM at the wound site. The major components include collagens and fibronectin (Degen & Gourdie, 2012). The expression of collagen type I and collagen type III has been well studied in different wound healing models (Seifert et al., 2012; Wong et al., 2009). In general, collagen type I is the main ECM component that forms a mesh with good tensile strength but lower flexibility when compared to mesh formed by collagen type III. Scar tissue is mostly composed of collagen type I that has not been properly remodeled or set down. In oral wounds, little scar tissue is observed and this correlates with a higher ratio of collagen type III to type I than what is observed in skin wound healing models (Larson, Longaker, & Lorenz, 2010). In the Axolotl skin wound healing process, collagen type III is deposited first and is slowly replaced by collagen type I (Seifert et al., 2012).

Other important components of the ECM include HA and fibronectin. In oral wound healing, HA and fibronectin are abundant creating a permissive environment for cellular migration (Degen & Gourdie, 2012). This correlates with a better healing process than what is observed in other wound healing models. During Axolotl regeneration, the presence of fibronectin is also important (Christensen & Tassava, 2000). The aberrant presence of fibronectin is also detected in animals injected with bleomycin, indicating that scar formation in Axolotl is possible but is not linked to the deposition of collagen type I and they are not hypertrophic (Levesque et al., 2010). These components of the ECM are produced mostly by fibroblasts that are implicated in the formation of scar tissues. Some fibroblasts are capable of producing considerable amounts of *tgf- β* following injury and are also responsible of expressing collagens. These specialized fibroblasts are often termed myofibroblasts because they express α -SMA and are capable of contracting the wound (Gabbiani, 2003). In oral wound healing, few myofibroblasts are detected (Shannon, McKeown, Lundy, & Irwin, 2006). Similarly, during Axolotl regeneration and skin wound healing, no cells expressing α -SMA are observed (Levesque et al., 2007, 2010). Some α -SMA expressing cells can be observed when animals are depleted of macrophages which leads to a loss of regenerative capacity and scar tissue deposition composed of collagens (Godwin, Pinto, & Rosenthal, 2013).

In addition to ECM proteins, some enzymes are essential for the wound healing process. The protease family MMP and inhibitor TIMP (tissue inhibitor of MMP) are highly expressed following wounding (Kahari & Saarialho-Kere, 1997). Depletion of some of these MMPs can lead to abnormal wound healing (example in knockout [KO] mice) (Cho et al., 2016). In oral wound healing, high levels of numerous MMPs are observed (McKeown et al., 2007; Stephens et al., 2001). This

provides a migration permissive environment that promotes fibroblast and immune cell invasion. In the Axolotl regeneration process and skin wound healing MMPs are also observed (Ashcroft et al., 1999; Denis et al., 2016; Seifert et al., 2012; Yang & Bryant, 1994; Yang, Gardiner, Carlson, Nugas, & Bryant, 1999). Some of these enzyme are regulated by *tgf- β* (namely MMP2 and MMP9) (Denis et al., 2016), and they are essential for this process because inhibition of MMP activity leads to a loss of regenerative capacity (Vinarsky, Atkinson, Stevenson, Keating, & Odelberg, 2005). These observations point out that regulation of collagens and enzymes responsible for their remodeling is coregulated. Although *tgf- β* plays a central role, other signals are required to ensure proper deposition and remodeling of ECM.

Tgf- β canonical signaling operates via two intracellular proteins, *Smad2* and *Smad3* as mentioned above. These two proteins are known to be activated by the *tgf- β* receptors, but their role in wound healing is clearly different. In normal wound healing, activation of *Smad3* in mesenchymal cells is associated with the expression of ECM components such as collagens which eventually leads to the formation of scar tissue (Flanders, 2004). On the other hand, the activation of *Smad2* is associated with cellular migration and proliferation of mesenchymal cells (Brown, Pietenpol, & Moses, 2007). To understand the role of these proteins, different KO mouse models were produced targeting components of the *tgf- β* pathway. However, most of these mutants were embryonic lethal (Song, Estrada, & Lyons, 2009). The exception is the *Smad3* KO which is viable and fertile (Zhu, Richardson, Parada, & Graff, 1998). These mice also display an interesting wound healing phenotype: they have faster re-epithelialization, less scar tissue formation, and a weak immune

response following injury (Ashcroft & Roberts, 2000; Ashcroft et al., 1999). In palatal wound healing, they show accelerated wound healing with a lower expression of *tgf- β 1* following injury (Jinno, Takahashi, Tsuchida, Tanaka, & Moriyama, 2009). When *Smad2* is overexpressed in keratinocytes, gingival wound closure is slower and more scar tissue is formed (Tomikawa et al., 2012). In this case, however, cells overexpressing *Smad2* are eliminated by apoptosis which could explain the increase in scarring and slower rate of wound closure (Fujita et al., 2012). As limb regeneration in Axolotls occurs without the formation of scar tissue, we have looked at the activation of these two *Smad* proteins in these animals. During Axolotl limb regeneration, activation of *Smad3* is rapid but weak and short-lived compared to the activation of *Smad2*. *Smad2* is activated when mesenchymal cells are migrating and proliferating to give rise to the regenerative structure known as "blastema". We also demonstrated that the activity of *Smad3* is not essential for the regeneration process to occur and we showed that overexpression of the protein leads to apoptosis (Denis et al., 2016). In addition, the immune response is weak following amputation which is reminiscent of what is observed in the *Smad3* KO mouse (Mescher & Neff, 2006).

6 | BONE REGENERATION

As discussed in the previous sections, the quality of oral wound healing in humans is very good and is achieved with minimal scarring. Therefore, why should we try to improve oral wound healing? Does anything relating to it need improvement? The biggest issue

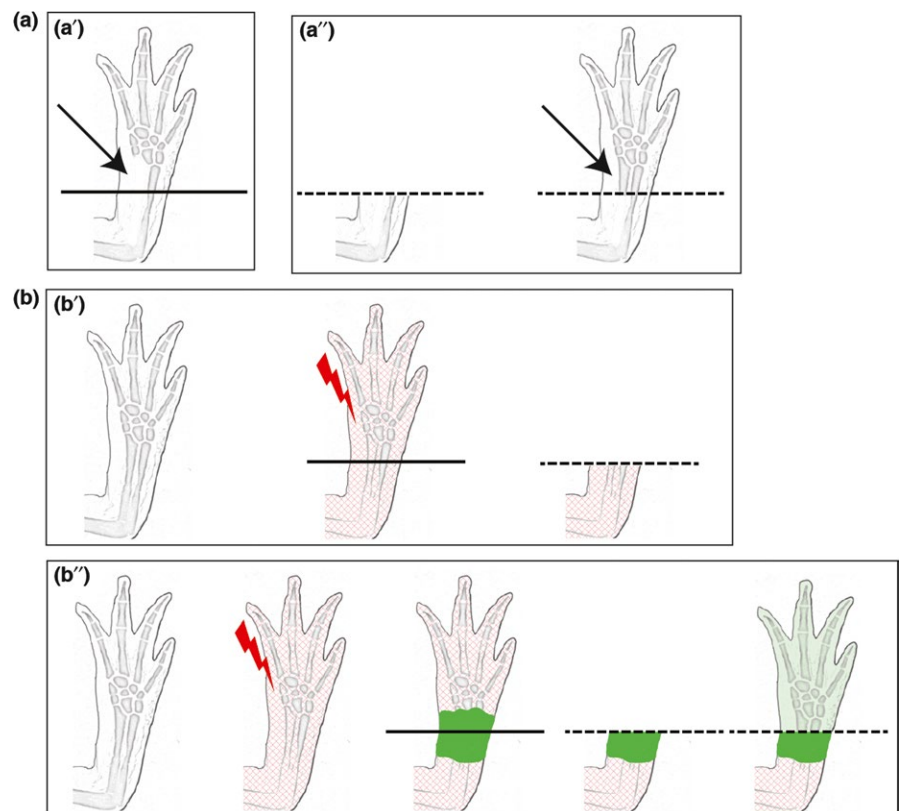


FIGURE 2 Schematic representation of bone extirpation and limb irradiation in Axolotl. (a) Ulna extirpation experiment. (a') Following extirpation, no bone regeneration is observed (black arrow points to where the missing ulna should be). (a'') After amputation, the regenerated part is perfect including the ulna (black arrow points to the ulna that is present only in the regenerated portion of the limb). (b) Limb irradiation and skin graft experiment. (b') X-ray irradiation (red lightning) followed by amputation results in absence of regeneration. (b'') X-ray irradiation followed by a non-irradiated skin graft (green area). After amputation through the skin graft, the limb is perfectly regenerated except for muscles

following an injury of the orofacial sphere is not soft tissue repair; it is related to the bone repair which has been historically difficult to treat for every types of bone (Griffin et al., 2015). We can use the example of periodontal diseases which has been related with age and inflammation (Ebersole et al., 2016). A study in 2015 confirmed a high prevalence of periodontitis among adults in the USA (Eke et al., 2015). The study showed that 46% of adults had periodontitis with 8.9% suffering from a severe form. When they looked at attachment of the teeth, 19.3% of sites with periodontitis showed signs of attachment loss (Eke et al., 2015). In addition to periodontal disease, which ultimately leads to bone loss if untreated, other conditions can also lead to bone loss. In many situations, bone loss is a serious problem for human health, osteoporosis being the most prominent example but other problems also exist (e.g., bone fracture or bone cancer). For example, when a bone fracture or the excision of a tumor requires the removal of a fragment of bone, it will often lead to the creation of a gap that is too large to heal on its own. Such gaps are referred to as critical gaps which means they will not heal (Schmitz & Hollinger, 1986). Some solutions have been developed, but they have their limits. The use of bone graft and Emdogain® are two examples of attempts to fix critical gaps (Esposito, Grusovin, Papanikolaou, Coulthard, & Worthington, 2009). However, although these latter compounds present some success in the clinic, there are still many instances where the lack of bone regeneration represents a major hurdle preventing the desired clinical outcome (Ghanbari & Vakili-Ghartavol, 2016).

We know Axolotls and other salamanders are champions of regeneration. This remarkable ability to regenerate represents the main reason for studying them in order to understand the fundamentals of epimorphic tissue regeneration. What is particularly interesting in the case of the Axolotl is that even though it can perfectly regenerate a full limb following an amputation (removing all tissue types: soft and hard like bones), if you only remove a critical size section of bone this section will not regenerate (Hutchison, Pilote, & Roy, 2007). Various examples have been reported showing that a specific lack of bone regeneration exist in these animals when only the bone is amputated. Richard Goss, a pioneer in the field of regeneration, showed a specific lack of regeneration in bones (Goss, 1969). One experiment of particular interest that he performed was a simple extirpation of the ulna in the forelimb of salamanders (Goss, 1956). Following this extirpation, the bone did not regenerate. However, when these forelimbs containing only one bone were amputated, regeneration occurred normally in the section of forearm that regenerated. The interesting thing is that the missing part of the ulna, proximal to the amputation site, did not regenerate at all, nevertheless, the extirpated part of the bone distal to the amputation site did regenerate normally just as if the bone had been there in the stump (Figure 2a; Goss, 1956). Another experiment of interest in the literature has also shown the lack of bone participation in the regeneration process using an entirely different approach. Studies demonstrated that X-ray irradiation inhibits limb regeneration in salamanders (Maden & Wallace, 1976). Dunis and Namenwirth devised an intricate experiment where after irradiation with X-ray,

they grafted a non-irradiated skin cuff around the circumference of part of the arm (the graft came from a triploid Axolotl to allow tracing of grafted cells). Once the skin graft healed, they proceeded to amputate the irradiated limb through the non-irradiated skin graft and the limb was able to regenerate normally except for muscles (Dunis & Namenwirth, 1977). This experiment showed that the skin (epidermis and dermis) had everything essential to promote perfect regeneration (including bones that were triploid in the regenerated section) except for muscles (Figure 2b). Recently, the group of Tanaka reproduced these results using transgenic GFP animals which confirmed the work by Dunis and Namenwirth where regenerated bone can be provided from cells derived from the dermis (Kragl et al., 2009).

Our laboratory has published, a few years ago, a paper on Axolotl bone healing. In this article, the surgical procedures were simple: first, a simple fracture was inflicted with scissors on the ulna without removing anything; and second, part of the ulna was removed leaving a critical gap between the remaining parts (4 mm; Figure 3). The results went in the same direction as the aforementioned studies in that the bone did not regenerate on its own. The bone was not able to regenerate and the separated parts did not rejoin even 6–7 months post-surgery (Figure 3b) (Hutchison et al., 2007). In addition, it showed that healing of a non-stabilized bone fracture in Axolotls healed just as in mammals (Hutchison et al., 2007).

All the above examples were carried out in salamander limb but what happens in the case of an oral injury. Salamanders have amazing regenerating capacities, and their oral tissues are also capable of regeneration. It was Goss and Stagg in 1958 that first surgically removed part of the jaw in a Newt (*Notophthalmus viridescens*). Their observations showed that the mandible and teeth could regenerate when the amputation had a rostro-caudal orientation. The second type of injury they did was to remove the mouth floor without touching the mandible. Recently, our group published a paper that also looked at oral tissue regeneration. In this paper, a 4-mm punch biopsy was used to make a full excision in the mandibular region. All tissues, including a part of the tongue (which in Axolotls contains cartilage), were removed (Charbonneau et al., 2016). This study presented an extensive time course (up to 180 days following injury) with an in depth histological analysis of the regeneration process. All tissues were reformed but one; the tongue cartilage could not regenerate, even 6 months after the punch was made (Charbonneau et al., 2016) (Figure 3c–f). This result is very similar to the critical gap in the forelimb observed by our laboratory in 2007 (Figure 3b; Hutchison et al., 2007).

All these data combined point to one thing: bones do not regenerate well, if at all, when they are specifically targeted. During the regeneration process, it seems like bones do not participate to the appearance of new tissues. Mesenchymal cells, acting as progenitors, are necessary to reform the new bone as demonstrated with the rescue of regeneration with the triploid skin graft on irradiated limbs (Dunis & Namenwirth, 1977) and the use of transgenic Axolotls by Tanaka's group which confirmed these evidences in a very elegant way using GFP marked cells (Kragl et al., 2009).

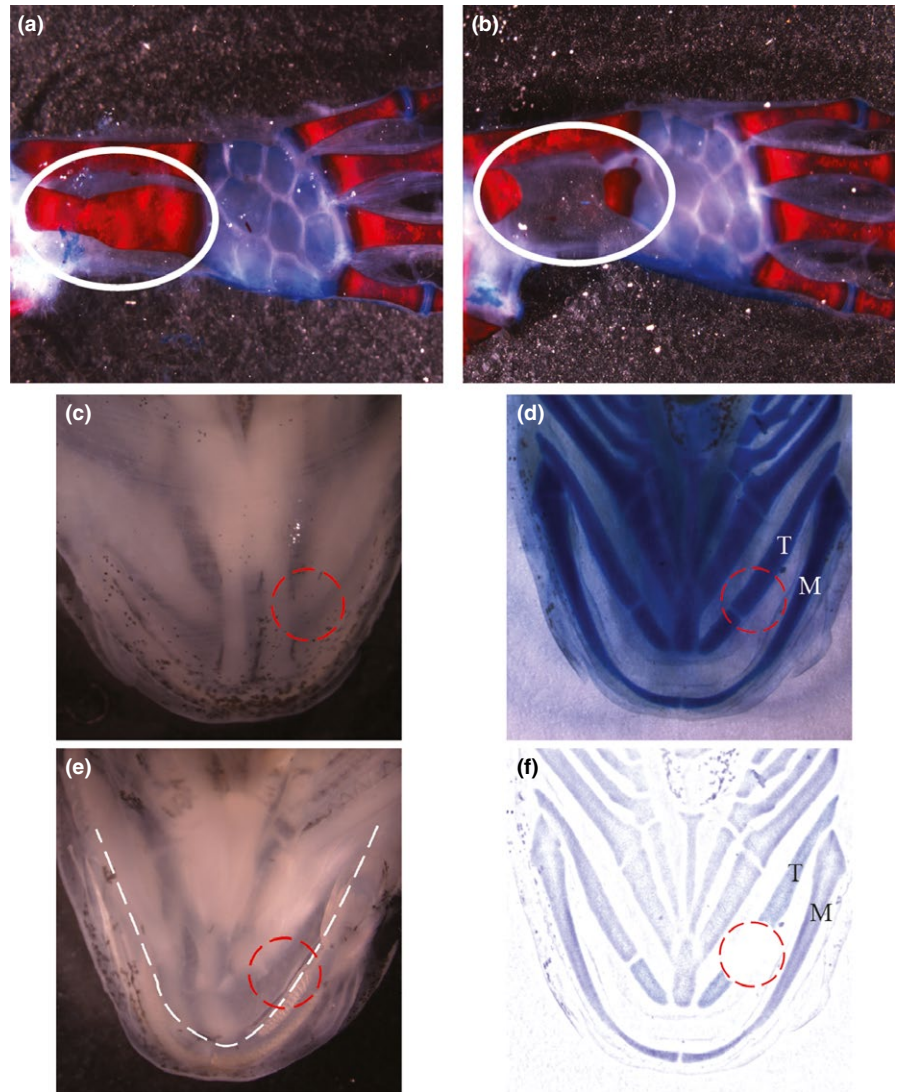


FIGURE 3 Forelimb bone gap and oral punch experiments. (a,b) Alizarin red/alcian blue coloration of forelimb bone fractures. (a) Clear cut union fracture wound 7 months post-injury showing bone healing and a callus formation (white oval). (b) Four-mm bone gap 7 months post-injury showing no healing (white oval). (c) Ventral view of Axolotl mandibular region. (d) Victoria blue staining (cartilage) of ventral mandibular region. Mandible (M) and tongue cartilage (T) are visible. (e) Inside view of Axolotl mandibular region (tongue contour is highlighted with dotted line). (f) Cartoon showing 180 days postinjury showing how tongue cartilage was not reformed. Red circle shows punch wound area

7 | CONCLUSION

Oral wound healing is an example of the capacity of humans to heal with low scarring. This strongly suggests that all the necessary signals for near perfect healing are present in humans. To achieve similar wound healing in other sites, we need a better understanding of how this perfect healing is orchestrated at the cellular and molecular level. The Axolotl is an excellent model to study because it has perfect healing capacities and shares many similarities with oral wound healing. Another important reason to study different organisms is that we can discover fundamental processes governing how, in our case, tissues are repaired or why they failed to regenerate. For example, the difficulty researchers have had in inducing bone regeneration maybe due to a fundamental resistance or complete lack of regenerative potential of bone itself. Obviously, bone can repair fractures and it is constantly renewing itself through the action of osteoblasts and osteoclasts. However, when a fracture reaches a critical size, it becomes very difficult to induce its regeneration. From what has been observed in Axolotls, an animal that can perfectly regenerate an entire limb, it seems that bones do not

participate to the regeneration process (at least not on their own). Looking at how Mother Nature has solved tissue regeneration in different organisms could be useful in guiding where we should invest our research efforts. Maybe what needs to be done in order to stimulate bone regeneration is to figure out which cells are responsible for bone regeneration in animals such as Axolotls and try to identify whether similar cells exist in humans in order to recruit them to the task. Research can sometimes seem very fundamental and academic with limited applications, but often this type of work is what yields important discoveries about how biology works which can lead to applications in the clinic.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Roy lab members for their comments and for reviewing the manuscript. Work performed in the Roy laboratory is funded by the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the Fond Québécois de la Recherche Nature et Technologie (FQRNT). F Sader was supported by a scholarship from the Faculty of Graduate Studies at the Université de Montréal, and JF Denis is



supported by a scholarship from the Network of Recherche en Santé Buccale et Osseuse (RSBO).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F Sader participated in the writing of the manuscript and made the figures. JF Denis helped with the writing, and S Roy wrote and supervised the work leading to this manuscript.

REFERENCES

- Ashcroft, G. S., & Roberts, A. B. (2000). Loss of Smad3 modulates wound healing. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *11*, 125–131.
- Ashcroft, G. S., Yang, X., Glick, A. B., Weinstein, M., Letterio, J. L., Mizel, D. E., Anzano, M., Greenwell-Wild, T., Wahl, S. M., Deng, C., & Roberts, A. B. (1999). Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature Cell Biology*, *1*, 260–266.
- Branton, M. H., & Kopp, J. B. (1999). TGF-beta and fibrosis. *Microbes and Infection*, *1*, 1349–1365.
- Braun, L., Mead, J. E., Panzica, M., Mikumo, R., Bell, G. I., & Fausto, N. (1988). Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: A possible paracrine mechanism of growth regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*, 1539–1543.
- Brown, K. A., Pietenpol, J. A., & Moses, H. L. (2007). A tale of two proteins: Differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *Journal of Cellular Biochemistry*, *101*, 9–33.
- Charbonneau, A. M., Roy, S., & Tran, S. D. (2016). Oral-facial tissue reconstruction in the regenerative axolotl. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, *326*, 489–502.
- Cheifetz, S., Weatherbee, J. A., Tsang, M. L.-S., Anderson, J. K., Mole, J. E., Lucas, R., & Massagué, J. (1987). The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell*, *48*, 409–415.
- Cho, H., Balaji, S., Hone, N. L., Moles, C. M., Sheikh, A. Q., Crombleholme, T. M., Keswani, S. G., & Narmoneva, D. A. (2016). Diabetic wound healing in a MMP9-/- mouse model. *Wound Repair and Regeneration*, *24*, 829–840.
- Christensen, R. N., & Tassava, R. A. (2000). Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Developmental Dynamics*, *217*, 216–224.
- Degen, K. E., & Gourdie, R. G. (2012). Embryonic wound healing: A primer for engineering novel therapies for tissue repair. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, *96*, 258–270.
- Denis, J. F., Levesque, M., Tran, S., Camarda, A. J., & Roy, S. (2013). 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.
- Denis, J. F., Sader, F., Gatien, S., Villiard, E., Philip, A., & Roy, S. (2016). Activation of Smad2 but not Smad3 is required for mediating TGF-beta signaling during limb regeneration in axolotls. *Development*, *143*, 3481–3490.
- Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, *9*, 283–289.
- Dunis, D. A., & Namenwirth, M. (1977). The role of grafted skin in the regeneration of X-irradiated axolotl limbs. *Developmental Biology*, *56*, 97–109.
- Ebersole, J. L., Graves, C. L., Gonzalez, O. A., Dawson, D. 3rd, Morford, L. A., Huja, P. E., Hartsfield, J. K. Jr, Huja, S. S., Pandruvada, S., & Wallet, S. M. (2016). Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontology*, *2000*, *72*, 54–75.
- Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Slade, G. D., Thornton-Evans, G. O., Borgnakke, W. S., Taylor, G. W., Page, R. C., Beck, J. D., & Genco, R. J. (2015). Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *Journal of Periodontology*, *86*, 611–622.
- Eslami, A., Gallant-Behm, C. L., Hart, D. A., Wiebe, C., Honardoust, D., Gardner, H., Hakkinen, L., & Larjava, H. S. (2009). Expression of integrin α 6 and TGF-beta in scarless vs scar-forming wound healing. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *57*, 543–557.
- Esposito, M., Grusovin, M. G., Papanikolaou, N., Coulthard, P., & Worthington, H. V. (2009). Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Systematic Review*, CD003875.
- Flanders, K. C. (2004). Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *International Journal of Experimental Pathology*, *85*, 47–64.
- Frank, S., Madlener, M., & Werner, S. (1996). Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *Journal of Biological Chemistry*, *271*, 10188–10193.
- Fujita, T., Alotaibi, M., Kitase, Y., Kota, Y., Ouhara, K., Kurihara, H., & Shuler, C. F. (2012). Smad2 is involved in the apoptosis of murine gingival junctional epithelium associated with inhibition of Bcl-2. *Archives of Oral Biology*, *57*, 1567–1573.
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology*, *200*, 500–503.
- Ghanbari, H., & Vakili-Ghartavol, R. (2016). Bone Regeneration: Current Status and Future Prospects, Advanced Techniques in Bone Regeneration, Dr Alessandro Zorzi (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/63912.
- Godwin, J. W., Pinto, A. R., & Rosenthal, N. A. (2013). Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*, 9415–9420.
- Goss, R. J. (1956). The relation of bone to the histogenesis of cartilage in regenerating forelimbs and tails of adult *Triturus viridescens*. *Journal of Morphology*, *98*, 89–123.
- Goss, R. J. (1969). *Principles of Regeneration*. New York: Academic Press.
- Griffin, K. S., Davis, K. M., McKinley, T. O., Anglen, J. O., Chu, T.-M. G., Boerckel, J. D., & Kacena, M. A. (2015). Evolution of bone grafting: Bone grafts and tissue engineering strategies for vascularized bone regeneration. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, *13*, 232–244.
- Han, M., Yang, X., Taylor, G., Burdsal, C. A., Anderson, R. A., & Muneoka, K. (2005). Limb regeneration in higher vertebrates: Developing a roadmap. *Anatomical Record. Part B, New Anatomist*, *287*, 14–24.
- Harty, M., Neff, A. W., King, M. W., & Mescher, A. L. (2003). Regeneration or scarring: An immunologic perspective. *Developmental Dynamics*, *226*, 268–279.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., & ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, *390*, 465–471.
- Ho, D. M., & Whitman, M. (2008). TGF-beta signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Developmental Biology*, *315*, 203–216.
- Hoffmann, F. M. (1991). Transforming growth factor-beta-related genes in *Drosophila* and vertebrate development. *Current Opinion in Cell Biology*, *3*, 947–952.
- Hogan, B. L. (1996). Bone morphogenetic proteins in development. *Current Opinion in Genetics & Development*, *6*, 432–438.
- Hutchison, C., Pilote, M., & Roy, S. (2007). The axolotl limb: A model for bone development, regeneration and fracture healing. *Bone*, *40*, 45–56.

- Jinno, K., Takahashi, T., Tsuchida, K., Tanaka, E., & Moriyama, K. (2009). Acceleration of palatal wound healing in Smad3-deficient mice. *Journal of Dental Research*, *88*, 757–761.
- Kahari, V. M., & Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*, *6*, 199–213.
- Klass, B. R., Grobbelaar, A. O., & Rolfe, K. J. (2009). Transforming growth factor beta1 signalling, wound healing and repair: A multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgraduate Medical Journal*, *85*, 9–14.
- Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H., & Tanaka, E. M. (2009). Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, *460*, 60–65.
- Larjava, H., Wiebe, C., Gallant-Behm, C., Hart, D. A., Heino, J., & Hakkinen, L. (2011). Exploring scarless healing of oral soft tissues. *Journal of the Canadian Dental Association*, *77*, b18.
- Larson, B. J., Longaker, M. T., & Lorenz, H. P. (2010). Scarless fetal wound healing: A basic science review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *126*, 1172–1180.
- Leask, A., & Abraham, D. J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB Journal*, *18*, 816–827.
- Levesque, M., Gatien, S., Finsson, K., Desmeules, S., Villiard, E., Pilote, M., Philip, A., & Roy, S. (2007). Transforming growth factor: Beta signaling is essential for limb regeneration in axolotls. *PLoS One*, *2*, e1227.
- Levesque, M., Villiard, E., & Roy, S. (2010). Skin wound healing in axolotls: A scarless process. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution*, *314B*, 684–697.
- Maden, M., & Wallace, H. (1976). How x-rays inhibit amphibian limb regeneration. *Journal of Experimental Zoology*, *197*, 105–113.
- Martin, P. (1997). Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*, *276*, 75–81.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry*, *67*, 753–791.
- Massague, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *1*, 169–178.
- Massagué, J. (1987). The TGF- β family of growth and differentiation factors. *Cell*, *49*, 437–438.
- McKeown, S. T., Barnes, J. J., Hyland, P. L., Lundy, F. T., Fray, M. J., & Irwin, C. R. (2007). Matrix metalloproteinase-3 differences in oral and skin fibroblasts. *Journal of Dental Research*, *86*, 457–462.
- Mescher, A. L., & Neff, A. W. (2006). Limb regeneration in amphibians: Immunological considerations. *TSW Development & Embryology*, *1*, 1–11.
- Ripamonti, U. (2016). Redefining the induction of periodontal tissue regeneration in primates by the osteogenic proteins of the transforming growth factor-beta supergene family. *Journal of Periodontal Research*, *51*, 699–715.
- Roberts, A. B. (1998). Molecular and cell biology of TGF-beta. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, *24*, 111–119.
- Roy, S., & Lévesque, M. (2006). Limb regeneration in axolotl: Is it superhealing? *TSW Development & Embryology*, *6*, 12–25.
- Schmitz, J. P., & Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics*, *205*, 299–308.
- Seifert, A. W., Monaghan, J. R., Voss, S. R., & Maden, M. (2012). Skin regeneration in adult axolotls: A blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PLoS One*, *7*, e32875.
- Shannon, D. B., McKeown, S. T., Lundy, F. T., & Irwin, C. R. (2006). Phenotypic differences between oral and skin fibroblasts in wound contraction and growth factor expression. *Wound Repair and Regeneration*, *14*, 172–178.
- Song, B., Estrada, K. D., & Lyons, K. M. (2009). Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *20*, 379–388.
- Stephens, P., Davies, K. J., Occeleston, N., Pleass, R. D., Kon, C., Daniels, J., Khaw, P. T., & Thomas, D. W. (2001). Skin and oral fibroblasts exhibit phenotypic differences in extracellular matrix reorganization and matrix metalloproteinase activity. *British Journal of Dermatology*, *144*, 229–237.
- Stramer, B. M., Mori, R., & Martin, P. (2007). The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *The Journal of Investigative Dermatology*, *127*, 1009–1017.
- Szpaderska, A. M., Zuckerman, J. D., & DiPietro, L. A. (2003). Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *Journal of Dental Research*, *82*, 621–626.
- Tomikawa, K., Yamamoto, T., Shiomi, N., Shimoe, M., Hongo, S., Yamashiro, K., Yamaguchi, T., Maeda, H., & Takashiba, S. (2012). Smad2 decelerates re-epithelialization during gingival wound healing. *Journal of Dental Research*, *91*, 764–770.
- Toriseva, M., & Kahari, V. M. (2009). Proteinases in cutaneous wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *66*, 203–224.
- Vinarsky, V., Atkinson, D. L., Stevenson, T. J., Keating, M. T., & Odelberg, S. J. (2005). Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. *Developmental Biology*, *279*, 86–98.
- Wong, J. W., Gallant-Behm, C., Wiebe, C., Mak, K., Hart, D. A., Larjava, H., & Hakkinen, L. (2009). 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 and Regeneration*, *17*, 717–729.
- Wrana, J. L., & Attisano, L. (2000). The Smad pathway. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *11*, 5–13.
- Yang, E. V., & Bryant, S. V. (1994). Developmental regulation of a matrix metalloproteinase during regeneration of axolotl appendages. *Developmental Biology*, *166*, 696–703.
- Yang, E. V., Gardiner, D. M., Carlson, M. R., Nugas, C. A., & Bryant, S. V. (1999). Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Developmental Dynamics*, *216*, 2–9.
- Zentella, A., & Massague, J. (1992). Transforming growth factor beta induces myoblast differentiation in the presence of mitogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*, 5176–5180.
- Zhu, Y., Richardson, J. A., Parada, L. F., & Graff, J. M. (1998). Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell*, *94*, 703–714.

How to cite this article: Sader F, Denis J-F, Roy S. Tissue regeneration in dentistry: Can salamanders provide insight? *Oral Dis*. 2018;24:509–517. <https://doi.org/10.1111/odi.12674>