

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Lise RABILLER

Le 24 septembre 2020

Les opioïdes : un verrou à la régénération chez le mammifère adulte ? Dialogue avec le système immunitaire et l'innervation sensorielle

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :

STROMALAB - Cellules stromales, homéostasie, plasticité et réparation tissulaire

Thèse dirigée par

Béatrice COUSIN et Cécile DROMARD BERTHEZENE

Jury

M. Emmanuel BOURINET, Rapporteur

M. Patrick COLLOMBAT, Rapporteur

M. Ali MOJALLAL, Rapporteur

Mme Isabelle CASTAN LAURELL, Examinatrice

Mme Béatrice COUSIN, Directrice de thèse

Mme Cécile DROMARD BERTHEZENE, Co-directrice de thèse

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaite remercier **Emmanuel Bourinet**, **Ali Mojallal** et **Patrick Collombat** d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et les travaux effectués durant mes 4 années de thèse. Je les remercie également pour la discussion très riche que nous avons pu avoir durant la soutenance de thèse. **Isabelle Castan**, merci d'avoir accepté de faire partie du jury et de l'avoir présidé, et merci pour tes conseils et ton aide tant quand j'étais en cours que quand je suis devenue mini-enseignante parmi vous.

Cécile, merci de m'avoir donné une chance de venir travailler sur ce projet, et quel projet ! En toute objectivité, c'est le plus chouette de tous les projets. J'ai beaucoup appris en travaillant avec toi que ce soit en neurophysiologie ou sur un plan plus personnel lors de nos nombreuses discussions au coin café. Merci de m'avoir écouté quand ça n'allait pas et de m'avoir remonté le moral dans les moments de doutes et de difficultés inhérent à une thèse. J'ai adoré faire équipe avec toi et porter ce magnifique projet le plus loin possible, il en vaut largement la chandelle. Merci également pour l'autonomie que tu as su me donner et la confiance que tu as placée en moi, qui m'ont permis de m'épanouir pleinement et de me faire évoluer de stagiaire, à doctorante, à mini-chercheuse (j'arrive pas à le croire). Pour terminer je souhaite également te remercier pour la découverte et l'initiation au monde de l'enseignement. Bon courage pour la suite, et je suis persuadée que la suite de ce projet sera tout aussi belle !!! ☺
Merci pour tout, vraiment !

Anne, nos chemins se sont croisés en troisième année de licence. Tout a commencé par de nombreuses discussions suscitées par mes interrogations, qui ont continué pendant ces 8 dernières années. J'ai été stimulé par chacune d'entre elles, elles m'ont toujours émerveillé et motivé à donner le meilleur de moi-même. Votre dévouement pour ce métier (que ce soit dans la recherche ou dans l'enseignement) m'a porté pendant toutes ces années et a entretenue ma passion pour ce monde (un peu fou) de la recherche ! Merci d'avoir su me faire confiance pendant toutes ces années, et de m'avoir donné les outils pour que je puisse avoir (un peu plus) confiance en moi dans ce monde jonché de perpétuel doute. Merci pour tout !

Louis, merci de m'avoir ouvert les portes du STROMALab il y a de ça 6 ans maintenant. J'ai eu la chance de grandir et m'épanouir dans ce laboratoire, professionnellement bien sûr mais également personnellement. Mon chemin a été ponctué par de nombreuses discussions

scientifiques tôt ou tard le soir avec vous, qui ont su faire évoluer ma façon d'aborder la science, qui m'ont poussé à remettre les dogmes en question et poussé dans mes retranchements, et pour tout ça, merci.

Merci à tout(e)s les STROMALabien(ne)s pour votre soutien quotidien mais également d'avoir rendu ce long chemin plus agréable ! **Corinne**, pour ta (très précieuse) aide en imagerie. **Manue** pour tes conseils et ta patience pour m'expliquer les mystères de la biologie moléculaire. **Jean Gérard** pour nos discussions personnelles et tes mots d'encouragement. **Sophie B** pour nos discussions philosophiques (et pour les autres qui l'étaient moins, sans en citer ...) dehors sur la terrasse en pause autour d'un café. **Nico** pour ta bonne humeur constante. **Mélanie** pour ton calme et ta bonne humeur. **Jenny** pour ta bonne humeur, tes conseils au labo et dans mes débuts de mini-enseignante. **Sophie D**, merci de m'avoir supporté dans mes débuts au cytomètre (tard le soir parfois), et merci pour les innombrables discussions en bas à Ranguel qui ont su me remotiver quand ça n'allait plus trop. **Yannick**, merci pour avoir toujours une réponse quand il faut m'aider sur les commandes en biochimie ou quand il faut m'aider à trouver un produit en biologie moléculaire. **Elodie « i »** pour m'avoir donné les clefs de ce super chouette projet il y a 6 ans (j'ai bien pris soin de ce gros bébé et je me suis éclatée). **Isabelle A**, pour être toujours motivée quand il s'agit de science et de la partager. Merci pour ton aide depuis le Master ! **Philippe** et **Paul** pour votre bonne humeur en duo. **Virginie RG**, merci d'avoir partagé un bout de route sur le projet immuno avec nous et d'avoir passé autant d'heure au cytomètre, heureusement que tu étais là ! **Isabelle** merci d'avoir su gérer mes requêtes de dernière minute et avoir toujours su trouver le dossier magique contenant les informations que je cherchais. **Suzy** j'ai au moins glissé ma tête 1500 fois au coin de ta porte en 6 ans, alors merci d'avoir géré mes nombreuses demandes de dernière minute en gestion qui m'ont à chaque fois sauvé la mise !

Mais je voudrais aussi remercier,

Mimi, merci pour tes conseils de manière générale, merci mille fois de m'avoir donné tous les meilleurs conseils de bonne conduite en laboratoire, de m'avoir expliqué soigneusement toutes les bases de la culture cellulaire, et de m'avoir aidé un nombre incalculable de fois en biologie moléculaire.

Christophe, merci pour ta bienveillance et ta patience dans l'apprentissage des soigneux gestes de chirurgie (pas merci pour les supers photos de moi avec les lunettes loupes en pièce sacrifice ahah). Tu m'as ouvert la voie sur tant de manips ! Merci mille fois pour tout ça, je te dois beaucoup. Merci d'avoir rendu les séjours en zones plus sympas, merci d'avoir toujours eu la solution à d'innombrables problèmes rencontrés, et merci pour ta bonne humeur !

Clément, merci pour la tonne de seringue/min que tu es capable de faire, pour ton aide sur les manips capsas (pas les plus simples...), pour tes solutions trouvées en 1 minute pour régler des problèmes (toujours) de dernière minute et pour ton aide de régisseur professionnel lors de la soutenance. Reste multitâche !

Béa, merci pour tout. Pour l'aide en cytométrie (durant des heures, et ce depuis le Master 2), pour l'aide lors de la rédaction de la demande FRM, d'abstracts ou encore dernièrement de ma thèse. Mais aussi pour le coaching perso dans les moments durs (de rédaction entre-autre), pour les « coups de pieds aux fesses » pendant les coups de mou, et de m'avoir aidé à porter ce (très chouette) projet immuno depuis toutes ces années.

Marielle, assieds-toi faut que j'te parle... merci pour toutes les questions que tu m'as posé auxquelles je n'avais souvent aucune réponse à te donner (ahah) et merci pour ce duo exclusif que nous avons formé en pharmacie, autour de lipectomies, d'aliqots de Naloxone, ou de supers reprises de Diam's. Je me rappellerai soigneusement de tous les conseils précieux que tu m'as partagé et merci pour tes encouragements pendant toutes les étapes un peu rude d'une thèse !

Luc, merci pour les conseils et la précieuse aide sur le projet neuro. J'ai été ravie de partager un bout de chemin et projet avec vous.

Audrey C, merci pour ta douceur et tes remarques toujours constructives et bienveillantes sur le projet. Merci pour tes encouragements depuis le Master, ça ne paraît rien, mais ça réchauffe dans les moments difficiles. Je suis ravie d'avoir pu faire quelques expériences en collaboration avec toi et Damien, les résultats sont très intéressants et j'espère qu'ils auront droit à une petite suite !

Coralie et Amandine, merci pour votre bonne humeur toujours au rendez-vous et vos conseils sur la vie en thèse/en post doc/de chercheur. **Amandine**, j'espère qu'après ces mois incertains, tu me feras re-voyager comme tu l'as fait l'année dernière. Je garde en mémoire nos discussions autour d'un peu de science et de beaucoup d'autres choses. Que la force des fascias soit avec vous pour longtemps ! 😊

Audrey V, merci pour ta franchise et merci de m'avoir fait autant rire, merci de m'avoir regardé avec ce regard qui dit « mais Lise tu fais exprès là ? », quand j'avais un petit bobo (ou que j'étais presque en train de mourir très objectivement...) Merci de m'avoir aidé à relativiser, merci pour tous tes conseils sur la façon de vivre une thèse et la recherche en général, ne change rien !

Claude K (chef !) et **Etienne M** pour vos conseils (toujours) avisés que ce soit en enseignement ou en recherche, et pour m'avoir fait rire beaucoup de fois avec vos anecdotes d'étudiants... 😊

Lionel M et **Bruno G** pour votre disponibilité, votre aide très précieuse et votre investissement sur le projet douleur/régénération. Merci de m'avoir formée un peu aux techniques d'étude du comportement et à la physiologie des opioïdes !

Agnès C et **Marie** pour votre aide sur le projet immuno/régénération. Marie, on se souviendra des manip lipidomiques qui nous ont donné du fil à retordre... Merci pour ton aide précieuse, sans toi, j'aurais abandonné à l'étape d'extraction ahah 😊

Marie-Laure, « cafééééé ? », merci pour ta patience dans ma formation cytométrie, merci pour les nombreux encouragements (jusqu'à exhiber Mini !!!), merci d'avoir été là tout simplement. Ta joie de vivre et les nombreuses discussions qu'on a eu m'ont fait avancer j'en suis plus que persuadée. On se retrouvera et je t'attends (encore, round 2) à Montréal ! 😊 En attendant continue d'animer ce bon vieux STROMAcomité des fêtes comme il ce doit !

Nono l'affro, que dire. Merci pour ta bonne humeur et pour tous les fous rires qu'on a pu avoir, merci d'avoir souvent de nouvelles baskets au pied, ma passion pour ces chaussures n'a

fait qu'embellir mes journées quand je t'observais faire du moonwalk aussi bien chaussée dans tout l'open space (oui on t'a vu ne mens pas !). N'oublie pas, on ne désespère pas de la situation, on la laisse glisser (un peu comme quand tu fais un bon vieux moonwalk).

Loïc (Alias l'échappé), **Hélène**, « yyyyyeeeeesssss », le clan des trois Dr, crus 2016, mes camarades de promo, on a été dans la même galère (et dans la même super aventure à la fois) depuis le début ! Je vous souhaite une belle suite d'aventure en science ou ailleurs, on se croisera très certainement ! **Loïc**, merci pour ton humour (non je déconne :P), on a partagé de nombreuses soirées au labo et certaines dans les bars (quand tu ne t'échappais pas), ta détermination et tes grandes qualités en tant que pharmacien ET scientifique te feront aller très loin j'en suis intimement convaincue. **Hélène**, peu importe où ta route ira après cette année, en science ou ailleurs, je te souhaite une belle réussite !

David, **Chloé**, **Margot**, on ne s'est pas croisé longtemps, mais nul doute qu'on se serait bien entendu ! Vous apportez de la légèreté au labo, restez comme vous êtes !

Léa, pour ta douceur et ta bonne humeur toujours au rendez-vous, toujours motivée pour aller décompresser et boire des coups, ce fut un plaisir de partager un petit bout d'aventure avec toi.

Silveric, stagiaire de choc. T'as su canna(lise)r, moi et ma phobie des centrifugeuses, et ça, ce n'est pas rien ! T'as été d'une aide très précieuse pendant ces deux dernières années lors de tes deux stages ici. Tu as essuyé d'un coup de main toutes les choses affreuses que je te donnais à faire... (ahah, je plaisante !). J'espère que le projet a su te plaire et je te souhaite que de belles choses pour la suite ! On aura l'occasion de se recroiser autour d'une bière, je n'en doute pas !

Damien, merci pour ton aide quand il s'agit de faire des bêtises, et merci pour ton humour toujours au sommet (il réchauffe les cœurs gelés par le froid glacial Canadien raconte les légendes !). Chercheur brillant que tu es déjà, je sais que la suite sera belle et constructive pour toi, et de toute façon, on aura le temps de se raconter tout ça autour de supers bonnes poutines (ou tarte citron meringuée :P) futur copain de McGill ☺ ! Dernière ligne droite, t'es

le prochain et pas des moindres, je sais que tu vas exceller comme tu as toujours su faire ! Éclate-toi, la soutenance n'est pas du tout qu'un mauvais moment à passer ! N'oublie jamais que si tu as des questions en termes d'immigration, je suis là même si je suis aussi larguée que toi sur le sujet ahaha...

Adèle, je ne sais par où commencer. Merci d'avoir poussé les portes de STROMALab, cette aventure n'aurait jamais eu le même goût sans toi dans les parages. Je te remercie pour ton soutien sans faille et pour ta bonne humeur inégalable ! T'es la best partner in lab ever, la best partner in bière at lab ever (c'est presque comme « lab », mais tu rajoutes « bière » à côté) et j'espère bien croiser ta route en science ou ailleurs ! Mais je n'ai pas trop de doute là-dessus 😊. Je sais aussi que tu vas nous faire une super thèse (ça va aller comme sur des roulettes héhé), t'as toute l'étoffe d'une chercheuse aguerrie (curieuse, intelligente, travailleuse, n°1 au moonwalk dans les couloirs et j'en passe des bleus et des pas fraîches) et j'espère vraiment être là pour voir la concrétisation de ton travail acharné (plzzz envoie moi un ticket VIP pour assister aux coulisses de cette préparation) ! Surtout, reste comme tu es, ce monde a besoin de gens comme toi (et moi aussi d'ailleurs) ♥. PS : tu sais où me trouver à Montréal, si jamais.....

Philippe Gongora, mon professeur d'SVT (science de la Vie surtout, et de la Terre), de la seconde à la terminale S (spé bio inclus !), qui m'a fait découvrir le monde passionnant de la biologie et qui a (j'en suis intimement convaincue), largement contribué à m'amener là où je suis aujourd'hui. Merci d'avoir répondu présent le jour de ma soutenance, ça m'a beaucoup touché, et merci de m'avoir donné goût à la biologie si tôt. Je n'oublierai pas vos qualités, parmi lesquelles la pédagogie fait partie.

Enfin,

Laurette, Victor, mes acolytes (et quels acolytes ♥) de mes premiers jours sur ce sol Toulousain. Plus de 15 ans que ça dur, et ça ne va pas s'arrêter de si tôt ! On a « grandi » ensemble, fait pleins de bêtises ensemble (ça reste entre nous), partagé plein de choses ensemble. On se connaît par cœur, et vous avez toujours été là pour moi, dans les moments durs comme dans les beaux, et cette page me permet de verbaliser (peut-être pour la

première fois) mes remerciements pour tout ça, vraiment. Vous avez été d'un soutien sans faille dans beaucoup d'étapes, et je ne vous remercierai jamais assez pour ça. Je vous aime fort, pour très longtemps, des amitiés comme ça sont écrites et faites pour durer une vie ♥.

Billou, malgré la séparation géographique, tu as été un de mes premiers repères dans cette nouvelle vie Toulousaine. A chaque fois qu'on se voit c'est toujours aussi cool, même si tu rentres quand je m'apprête à repartir, je sais qu'on continuera à se voir pour encore de nombreuses années.

Montas la Zup, Hugro et Thidou, qu'est-ce qu'on a pu rigoler en seconde, en cours d'svt ou d'espagnol. C'est d'ici que tout part, et je suis heureuse de pouvoir encore rigoler aux éclats avec vous 12 ans plus tard. **Loulou**, nos chemins se sont brièvement croisés en 4^{ème} pendant ce fabuleux voyage scolaire dans la fin fond de l'Espagne, mais tout à réellement prit sens en 1^{ère} S4, et à la fac, copine de Biologie. **Shirley**, si j'ai eu mon Bac c'est sûrement grâce à tes fiches et à ta façon de me raconter la Biologie. Notre amitié ne se résume pas à ça, en sont témoins les nombreux moments qu'on a partagé depuis !

Célia, Cyrine, Inès, Marion et Sara, mon (super et meilleur) gang de biologie. Mes supportrices des premières heures sur les bancs de la fac, vous m'avez toujours soutenu et pour ça je ne vous remercierai jamais assez. Merci de m'avoir écouté parler de cette thèse, de m'avoir regardé manger/dormir/respirer « régénération/opioïdes », de m'avoir toujours dit que je pouvais le faire et d'avoir été là le jour de la concrétisation de tout ça. Vous avez rendu cette thèse plus légère grâce à tous ces moments passés ensemble à côtés de certaines longues journées au laboratoire, à toutes ces soirées, à tous ces voyages aux quatre coins du globe et surtout à tous ces moments de rigolade interminable. On a partagé tellement de choses, et on me dit dans l'oreillette que ce n'est que le début ! Notre route va continuer longtemps ensemble je n'en ai jamais douté, elle sera ponctuée par tout autant de bon moments (et bien plus encore) qu'on a su déjà partager, et ce, même si je pars de l'autre côté de l'océan (je vous y attends secrètement) ♥♥♥ - Restez toute comme vous êtes, j'ai vraiment de la chance de vous avoir rencontré. Je vous aime (très fort).

Agathe, [du latin ajate] pour les intimes. Petite (grande) sœur, supportrice de qualité quand il s'agit de ma connerie (oh combien encombrante) mais aussi de ce long parcours semé d'embûches. Tu as été ma bûcheronne helper, toujours là pour m'aider à soulever des montagnes (even if je n'ai pas la force requise) lors de ce long chemin, et me conseiller quand j'en avais besoin (c'est-à-dire tous le temps, you know). Continus de tracer ta route dans ton domaine, tu excelles et c'est beau à voir, tu as tellement de qualité, be confident (et je suis toujours là si tu as besoin ☺). On se chamaille comme on s'aime et c'est ça le plus important. Still the sœur you are, j'ai besoin de toi malgré ce que je fais croire sometimes♥ Love you gros comme ma connerie (imagine un peu).

Papa, Maman, la liste de ce pourquoi je vous remercie risquerait d'être aussi longue que cette thèse alors je vais essayer de faire précis/concis... Merci pour toute votre aide depuis toutes ces années d'études, si je suis là aujourd'hui c'est en grande (pour pas dire entièrement) grâce à vous ! Vous m'avez inculqué tellement de jolies valeurs pour évoluer dans ce monde. Merci d'être fiers de moi, et merci de m'avoir écouté parler biologie (= chinois) avec des étoiles dans les yeux ! Vous m'avez toujours poussé à faire ce qui me plaisait, et à me dire que j'étais capable de le faire, c'est chose faite ! Je vous aime fort fort fort♥.

Thibault, (Choupi ♥), tu as su rendre cette année tellement agréable (et je pèse vraiment mes mots). Partager ce magnifique début d'une longue aventure avec toi, je n'aurai pas pu imaginer mieux. Tu me fais rire, tu m'apprends des millions de choses (reste toujours aussi curieux !), on s'écoute et ON avance ENSEMBLE. Quand je regarde tout ce qu'on a vécu, je sais que la suite sera forcément belle, drôle, et pleine d'amour à tes côtés. Tu m'as supporté, porté, et encouragé pendant toute cette dernière ligne droite, et je te remercie vraiment fort mieux et plus vite pour ça ☺. Let's go to our best life, first stop: Montréal. Tu m'apaises et me rends la plus heureuse du monde Thibault Bru, je crois que des simples mots ne suffisent plus à décrire ce que je ressens. Je t'Aime avec un grand A, gros comme la terre ♥.

Lise Rabiller (Bru)

Table des matières

TABLE DES MATIERES.....	1
ABREVIATIONS	3
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
RESUME SCIENTIFIQUE	9
RESUME GRAND PUBLIC	12
INTRODUCTION	13
CHAPITRE I. DE LA REGENERATION A LA CICATRISATION.	13
<i>I Régénération : modèles d'étude et étapes précoces</i>	<i>14</i>
A Généralités.....	14
B Les espèces modèles servant à l'étude de la régénération	14
C Les étapes précoces des processus de régénération.....	18
<i>II De la perte de la capacité de régénération à la cicatrisation : cas du mammifère adulte.....</i>	<i>23</i>
A La régénération chez le mammifère	23
B La cicatrisation	27
CHAPITRE II. INNERVATION ET REGENERATION.....	29
<i>I Organisation du système nerveux.....</i>	<i>29</i>
A Le système nerveux périphérique afférent ou sensoriel	30
B Le système nerveux périphérique efférent ou moteur.....	32
C Les boucles sensori-motrices	33
<i>II Le système nerveux contrôle la régénération chez les espèces non mammaliennes</i>	<i>34</i>
A Ce que nous apprennent les invertébrés.....	34
B Ce que nous apprennent les vertébrés non mammaliens.	36
<i>III Le système nerveux contrôle la réparation chez le mammifère.....</i>	<i>40</i>
A Le système nerveux contrôle la régénération au stade néonatal.....	40
B Le système nerveux contrôle la régénération chez le mammifère adulte.....	40
C Le système nerveux contrôle la cicatrisation chez le mammifère adulte.....	42
CHAPITRE III. SYSTEME IMMUNITAIRE ET REGENERATION	45
<i>I Organisation générale et rôles du système immunitaire</i>	<i>45</i>
A Le système immunitaire inné.....	46
B Le système immunitaire adaptatif	54
C Les différentes phases de la réponse inflammatoire au cours des processus de réparation	55
D Implication du système immunitaire au cours de la réparation	57
E Dialogue entre système nerveux et système immunitaire	63
CHAPITRE IV. OPIOIDES.....	66
<i>I Nociception et douleur.....</i>	<i>66</i>

Table des matières

A	Mécanismes moléculaires à l'origine de la nociception	67
B	Méthodes d'évaluation de la douleur.....	68
II	<i>Les opioïdes</i>	70
A	Opioïdes endogènes et exogènes	70
B	Récepteurs aux opioïdes et signalisation intracellulaire.....	72
C	Effets des opioïdes sur la réponse inflammatoire	74
III	<i>Implication des opioïdes au cours des processus de réparation tissulaire</i>	76
	ETUDE EXPERIMENTALE.....	78
I	<i>Modèle d'étude des processus de cicatrisation et de régénération chez le mammifère adulte : le tissu adipeux inguinal sous cutané (TAsc) murin.</i>	80
A	Innervation du TAsc	80
B	TAsc et cellules immunitaires	82
C	Les cellules souches/stromales mésenchymateuses du TAsc.....	82
D	ASCs et médecine régénératrice.....	83
II	<i>Effet(s) des opioïdes sur la réponse inflammatoire aiguë au cours des processus de régénération tissulaire.</i>	86
A	Contexte scientifique	86
B	Démarche expérimentale	87
C	Résultats et Interprétations.....	88
D	Résultats complémentaires	93
III	<i>Les nocicepteurs sont indispensables à la régénération chez la souris adulte.</i>	97
A	Contexte scientifique	97
B	Résultats et interprétations.....	99
C	Résultats complémentaires	104
5	Importance des voies nociceptives ascendantes.....	107
	DISCUSSION.....	109
I	<i>Importance de la réponse inflammatoire au cours des processus de régénération</i>	109
II	<i>Identification des fibres nerveuses qui contrôlent la régénération</i>	114
III	<i>Dialogue entre le système immunitaire et le système nerveux au cours de la régénération.</i>	118
IV	<i>Les capacités de régénération ont disparu au cours de l'évolution</i>	119
A	Mise en cause de la complexification du système immunitaire ?	119
B	Mise en cause du système opioïde ?	120
	BIBLIOGRAPHIE	123

Abréviations

15-dPGJ2	15-Deoxy-Delta-12,14-prostaglandin J2
LOX	Lipoxygénase
AA	Acide Arachidonique
ACh	Acétylcholine
AMPC	Adenosine MonoPhosphate cyclique
ARN	Acide Ribonucléique
ASC	Adipose Stromal Cell
ASICs	Acid-Sensing Ion Channels
ATP	Adenosine TriPhosphate
BMP	Bone Morphogenic Protein
CCL	Chemokine C-C motif ligand
CD	Cluster de Différenciation
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CGRPRL	Calcitonin Gene Related Peptide Receptor Like
COX	Cyclooxygénase
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
CSM	Cellule Stromale Mésoenchymateuse
CXCL	Chemokine C-X-C motif ligand
DAMGO	[D-Ala ² ,N-Me-Phe ⁴ ,Gly ⁵ -ol]-Enkephalin acetate salt
DAMP	Damaged Associated Molecules Pattern
DOR	Delta Opioid Receptor
EAOs	Espèces Actives de l'Oxygène
EGF	Epithelial Growth Factor
ERK	Extracellular signal- Regulated Kinase
FALCs	Fat-Associated Lymphoid cluster
FCγ	Fragment Constant gamma
FGF	Fibroblast Growth Factor
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GDNF	Glial-Derived Neurotrophic Factor
GIRK	G protein-regulated Inward Rectifying K ⁺ channels
GRK	G protein-coupled Receptors Kinase

Abréviations

Hh	Hedgehog
HMGB1	High Mobility Group Box 1
Hox	Homéobox
HTM	High Threshold Mechanoreceptors
IB4	Isolectine B4
ICV	Intracérébroventriculaire
IFNγ	Interféron gamma
IL	Interleukine
ILC2	Innate Lymphocyte de type 2
IR	Index de Régénération
KO	Knockout
KOR	Kappa Opioid Receptor
LB	Lymphocyte B
LOX	Lipoxygénase
LP	Lipectomie
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTA4	Leucotriène A4
LTB4	Leucotriène B4
LTM	Low Threshold Mechanoreceptors
M-CSF	Macrophages Colony Stimulating Factor
MAPK	MAP Kinase
MCP1	Monocytes Chemoattractant Protein 1
MCT1	Monocarboxylate transporteur isoforme 1
MCT4	Monocarboxylate transporteur isoforme 4
MEC	Matrice Extracellulaire
MMP	Métalloprotéases
MO	Moelle Osseuse
MOR	Mu Opioid Receptor
Mph	Macrophages
MPO	Myéloperoxydase
P2X3	Récepteur Purinergique
MRL	Murphy Roth Large
NA	Noradrénaline

Abréviations

nAG	newt Anterior Gradient
NaIM	Naloxone Méthiodide
NET	Neutrophil Extracellular Traps
Nf-kB	Nuclear factor-kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killer
NK-1	Neurokinine 1 (Substance P)
NOX	NADPH Oxydase
OGF	Opioid Growth Factor
Opr	Opioid receptor
ORL1	Opioid Receptor Like 1
OSM	Oncostatine M
PAMP	Pathogen Associated Molecules Pattern
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PENK	Pro enképhaline
PGD2	Prostaglandine D2
PGE2	Prostaglandine E2
PGF2	Prostaglandine F2
PGI2	Prostaglandine I2
PKA	Protéine Kinase A
PKB	Protéine Kinase B
POMC	Proopiomélanocortine
PPARγ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PPRE	PPAR γ response element
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
ROC	Regeneration Organizing Cells
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
RXR	Retinoid X Receptor alpha
S1P	Sphingosine 1 Phosphate
SC	Sous cutané
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SHh	Sonic Hedgehog

Abréviations

SI	Système Immunitaire
SN	Système Nerveux
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
Srap	starfish regeneration associated protease
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TA	Tissu Adipeux
TAsc	Tissu Adipeux sous-cutané
TGFβ	Tissue Growth Factor-beta
TH	Tyrosine Hydroxylase
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNFα	Tumor Necrosis Factor-alpha
tPA	tissue-type Plasminogen Activator
TrkA	Tropomyosin receptor kinase A
TRPA1	Transient Receptor Potential Ankyrin 1
TRPM8	Transient Receptor Potential Mucolipin 8
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
TTX	Tétradotoxine
TXA2	Thromboxane A2
UCP1	Uncoupling Protein 1
uPA	urokinase-type Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor

Table des illustrations

- Figure 1.** Espèces capables de régénérer : des invertébrés aux vertébrés.
- Figure 2.** Régénération morphallactique et épimorphique chez l'hydre.
- Figure 3.** Espèces capables de régénérer : les invertébrés.
- Figure 4.** Espèces capables de régénérer : les vertébrés non mammaliens.
- Figure 5.** Schéma illustrant les processus d'hémostase post lésionnelle.
- Figure 6.** Étapes précoces de la régénération : formation de l'épithélium de fermeture, mise en place de la cape épithéliale et formation du blastème au cours des processus de régénération ; exemple du membre chez l'axolotl.
- Figure 7.** Mammifères adultes capables de régénérer.
- Figure 8.** Cicatrisation : exemple de la peau.
- Figure 9.** Organisation du système nerveux.
- Figure 10.** Les fibres sensorielles afférentes.
- Figure 11.** Signatures moléculaires des nocicepteurs.
- Figure 12.** Système nerveux périphérique efférent.
- Figure 13.** Arc réflexe polysynaptique.
- Figure 14.** Système nerveux et régénération de l'hydre.
- Figure 15.** Système nerveux et régénération du ver planaire.
- Figure 16.** Système nerveux et régénération de l'étoile de mer.
- Figure 17.** Système nerveux et régénération du membre chez la salamandre.
- Figure 18.** Système nerveux et régénération chez le poisson zèbre.
- Figure 19.** Système nerveux et régénération chez le mammifère adulte.
- Figure 20.** Publication d'articles scientifiques sur le thème « cellules immunitaires et régénération »
- Figure 21.** Acteurs cellulaires et moléculaires du système immunitaire inné.
- Figure 22.** Médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique.
- Figure 23.** Activation et la production d'espèces actives de l'oxygène par la NADPH oxydase 2 membranaire.
- Figure 24.** La réponse inflammatoire suite à une lésion tissulaire.
- Figure 25.** Acteurs cellulaires et moléculaires de la réponse inflammatoire : phase d'inflammation et de résolution de l'inflammation.
- Figure 26.** Schéma simplifié de la signature métabolique des macrophages pro- et anti-inflammatoires.
- Figure 27.** La production d'EOs est indispensable aux processus de régénération.
- Figure 28.** Expression d'IL1b au cours de la régénération de la moelle épinière chez le poisson zèbre.
- Figure 29.** Corrélation entre l'évolution du système immunitaire et les capacités de régénération.
- Figure 30.** Voies centrales (supra spinales) de la douleur.
- Figure 31.** Voies ascendantes et descendantes impliquées dans la sensibilité nociceptive.
- Figure 32.** Canaux ioniques et activation des nocicepteurs.
- Figure 33.** Action des médiateurs périphériques de l'inflammation sur les terminaisons des nocicepteurs.

- Figure 34.** Méthode d'évaluation de la sensibilité nociceptive.
- Figure 35.** Signalisation moléculaire de la nociception.
- Figure 36.** Innervation efférente et afférente du TAsc.
- Figure 37.** Nombre de publications scientifiques sur le thème « Cellules mésenchymateuses du TA et médecine régénérative ».
- Figure 38.** Présentation du tissu adipeux sous-cutané et de la lipectomie.
- Figure 39.** Modèle de régénération induite du TAsc.
- Figure 40.** Résumé Graphique des résultats de l'article 1.
- Figure 41.** Apoptose cellulaire post LP en condition de cicatrisation (NaCl) ou de régénération (NaIM).
- Figure 42.** La NaIM modifie le profil métabolique des cellules du front de lésion 3 jours après la lipectomie.
- Figure 43.** Implication de PPAR γ au cours de la régénération du TAsc.
- Figure 44.** Étude à grande échelle de l'expression génique des macrophages dans différentes conditions de réparation tissulaire.
- Figure 45.** Effet d'HMGB1 sous sa forme réduite sur les ASCs de Tasc après lésion.
- Figure 46.** Les ASCs présentes sur le front de lésion 24 heures après la lipectomie, ont une morphologie différente entre les conditions cicatrisante et régénérante.
- Figure 47.** Les souris invalidées pour le précurseur des enképhalines (penk) régénèrent spontanément leur TAsc.
- Figure 48.** Évaluation de la douleur chez les souris MRL et C57BL/6 en condition basale.
- Figure 49.** Évaluation de la douleur chez les souris MRL et C57BL/6 après injection intrapéritonéale de Morphine.
- Figure 50.** Évaluation de la douleur et la régénération du TAsc.
- Figure 51.** Dénervation sensorielle.
- Figure 52.** Dénervation sensorielle 21 jours après traitement à la capsaïcine.
- Figure 53.** Résumé Graphique des résultats de l'article 2.
- Figure 54.** Effet de la capsaïcine sur la biologie du TA.
- Figure 55.** Effet du CGRP sur la réponse inflammatoire précoce induite par la lipectomie.
- Figure 56.** Niveau d'expression du récepteur au CGRP et de ses co-récepteurs dans les ASCs.
- Figure 57.** Effet du CGRP sur la prolifération et la migration des ASCs.
- Figure 58.** Effet de la substance P sur la régénération du TAsc et la migration des ASCs.
- Figure 59.** Implication des voies nociceptives ascendantes au cours des processus de régénération ?
- Figure 60.** Résumé graphique des résultats de thèse.

Résumé scientifique

L'étude des processus de réparation tissulaire constitue, de nos jours, un axe majeur de recherche dans le domaine biomédical. En effet, la capacité d'un tissu à régénérer après une lésion a été progressivement perdue au cours de l'évolution, laissant place au développement d'un tissu fibrotique associé à une perte de fonction, aussi appelé cicatrisation. L'étude de la régénération chez les espèces encore dotées de cette capacité, comme chez l'hydre, le poisson zèbre ou encore la salamandre, a permis de mettre en évidence le rôle substantiel du système immunitaire et de l'innervation. En revanche, la nature du verrou mis en place au cours de l'évolution, empêchant la régénération d'avoir lieu chez le mammifère reste très peu documentée. Des résultats publiés précédemment par mon laboratoire montrent qu'il est possible de déclencher les processus de régénération chez une souris C57BL/6 qui n'en n'est pas capable spontanément, grâce à l'administration d'un antagoniste des récepteurs aux opioïdes, la Naloxone Méthiodide. Les opioïdes exogènes comme la Morphine, en plus des opioïdes sécrétés de façon endogène après une lésion, sont utilisés depuis très longtemps pour prendre en charge la douleur péri-opératoire. Par ailleurs, les opioïdes sont décrits comme étant i) de puissants immunosuppresseurs et ii) capables d'agir sur les fibres sensorielles à l'origine de la perception douloureuse, en inhibant l'activité de ces dernières. Lors de ma thèse nous avons donc proposé que les opioïdes puissent constituer un verrou au processus de régénération chez les mammifères en empêchant la mise en place d'une réponse inflammatoire adéquate et/ou l'activation efficace des fibres sensorielles suite à une lésion. D'une part, nos résultats montrent, i) que la signature cellulaire (neutrophiles, monocytes, macrophages) et moléculaire (cytokines, chimiokines et médiateurs lipidiques) des phases précoces de l'inflammation post-lésionnelle permet de prédire l'issue de la réparation tissulaire (i.e cicatrisation *versus* régénération), ii) que les neutrophiles sont la source cellulaire d'espèces actives de l'oxygène (EAOs) requises pour permettre la régénération et iii) que les macrophages dérivés de l'hématopoïèse endogène du tissu adipeux sous cutané permettent au tissu de régénérer grâce à leur haut potentiel d'élimination des neutrophiles (aussi appelé efférocytose), contrairement aux macrophages d'origine médullaire qui, eux, favorisent la mise en place d'une cicatrice. D'autre part, nous montrons grâce à l'utilisation i) du test comportemental Von Frey classiquement utilisé dans le domaine de la douleur et ii) d'un outil développé au laboratoire basé sur la mesure de la pupille, que la régénération induite après un traitement à la Naloxone Méthiodide est associée à une perception douloureuse significativement augmentée. La douleur pouvant être un reflet de l'activation des fibres sensorielles, nous avons donc spécifiquement détruit ces dernières. Cette dénervation des fibres sensorielles inhibe la régénération induite après un traitement à la

Naloxone Méthiodide. Enfin, les fibres sensorielles semblent être indispensables en raison de leur sécrétion locale du neuropeptide CGRP, qui contrôlerait i) la mise en place de la réponse inflammatoire requise à la régénération et ii) le remodelage tissulaire en activant la migration des cellules mésenchymateuses vers le site de lésion. L'ensemble de ces résultats nous permet aujourd'hui de proposer comme traitement péri-opératoire/post-lésionnel, la co-administration de Morphine et de CGRP, permettant ainsi à la régénération tissulaire d'avoir lieu tout en gérant la douleur, chez le mammifère adulte.

English version :

Inhibition of regeneration mechanisms and induction of tissue fibrosis are classic outcomes of tissue repair in adult mammals. Because fibrosis leads to loss of tissue function, studying the processes of tissue repair remains a major issue in regenerative medicine. Studying regeneration in species with this ability, such as hydra, planarian, zebrafish or salamander, has highlighted the substantial role of immune system and innervation during regeneration processes. The nature of the locks developed during the evolution that prevent regeneration in mammals remains poorly documented. Previously published results from my laboratory showed that administration of an opioid receptor antagonist, also called Naloxone Methiodide, can induce tissue regeneration in a non-regenerative strain of mice (C57Bl/6). Exogenous opioids such as morphine, in addition to those being endogenously secreted after injury, have been used for decades in the management of perioperative pain. Opioids are also described as i) potent immunosuppressors and ii) able to act on the sensory fibers to silence electrical activity of these fibers. During my thesis, we hypothesized that opioids could be a lock for regeneration processes by preventing an acute and intense inflammatory response and/or the activation of sensory fibers after injury. On one hand, our results demonstrate for the first time in mice, i) that the cellular (neutrophils, monocytes, macrophages) and molecular (cytokines, chemokines and lipid mediators) signature of the early phases of post-lesional inflammation can predict the outcome of tissue repair (i.e scar healing versus regeneration), ii) granulocytes are the cellular source of reactive oxygen species required for regeneration, and iii) that, unlike classical macrophages derived from medullar hematopoiesis which promote scar formation after injury, macrophages derived from endogenous hematopoiesis of subcutaneous adipose tissue allow tissue regeneration thanks to their high neutrophil clearance potential after Naloxone methiodide treatment. On the other hand, by using the behavioral Von Frey test and the measurement of pupil diameter in order to assess pain perception, we also show that the regeneration induced after Naloxone Methiodide treatment is strongly correlated with an increase in pain perception. As pain depend on harmful signals detection by sensory fibers, we specifically destroyed these peripheral neurons. This denervation leads to the inhibition of previously induced tissue regeneration. Moreover, these sensory fibers appear to act through their

Résumé scientifique

peripheral secretion of the CGRP neuropeptide. This molecule could control the establishment of adequate inflammatory response and initiate efficient tissue remodeling by activating mesenchymal cells migration to the injured area. Altogether, our results allow us to propose co-administration of Morphine with CGRP as a perioperative/post-lesional treatment allowing tissue regeneration and pain management.

Résumé grand public

La capacité à régénérer a été progressivement perdue au cours de l'évolution au profit de la cicatrisation qui, bien que beaucoup plus rapide, conduit à une perte fonctionnelle du/des tissu(s) lésé(s). Limiter la mise en place d'un tissu cicatriciel en identifiant et promouvant les mécanismes de régénération constitue donc l'enjeu majeur de la médecine régénérative. Sur un modèle murin d'agression tissulaire massive, nous montrons que i) une réponse inflammatoire importante mais transitoire est requise pour permettre la régénération de l'organe lésé et ii) le signal douloureux généré au niveau du site de lésion, permet la sécrétion locale de molécules pro-régénérantes. Ces résultats originaux nous permettent de proposer une stratégie thérapeutique pour prendre en charge la douleur après une lésion, tout en permettant la régénération chez le mammifère.

English version :

The ability to regenerate has been lost during evolution since organisms such as hydra or salamander are able to rebuild an entire organ after ablation while the mammal is not. Instead, the adult mammal displays scar healing, a much faster repair process but that leads to an irreversible loss of tissue functions. Using a model of induced-regeneration after massive resection in rodents, we demonstrate that i) an acute (massive but transient) inflammatory response is essential for a complex tissue regeneration and ii) the detection of pain signal by sensory fibers within the injured tissue induce the local secretion of pro-regenerative molecules. These original results allow us to propose a therapeutic strategy allowing tissue regeneration and efficient pain management.

Invertébrés

Vertébrés

Mammifères

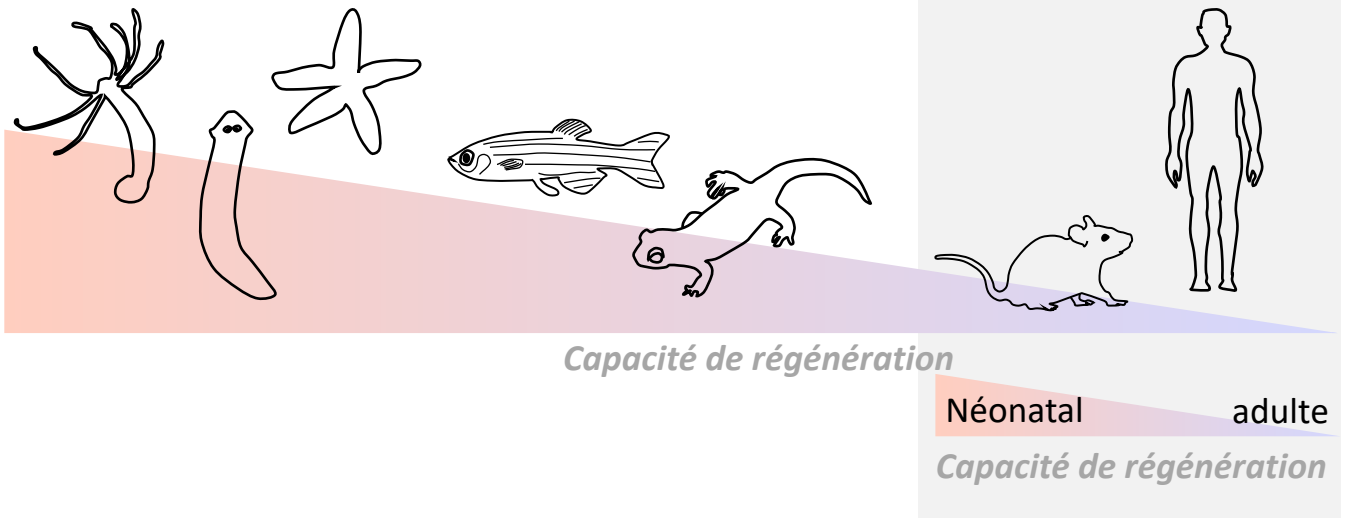


Figure 1. Espèces capables de régénérer : des invertébrés aux vertébrés.

De gauche à droite : Capacité de régénération chez les invertébrés (l'hydre, le ver planaire et l'étoile de mer), les vertébrés non mammaliens (le poisson zèbre et la salamandre), et chez les mammifères (la souris et l'homme). Les capacités de régénération sont décroissantes au cours de l'évolution et décroissantes au cours de la vie chez le mammifère. (Adapté de Forbes et coll. 2014)

Introduction

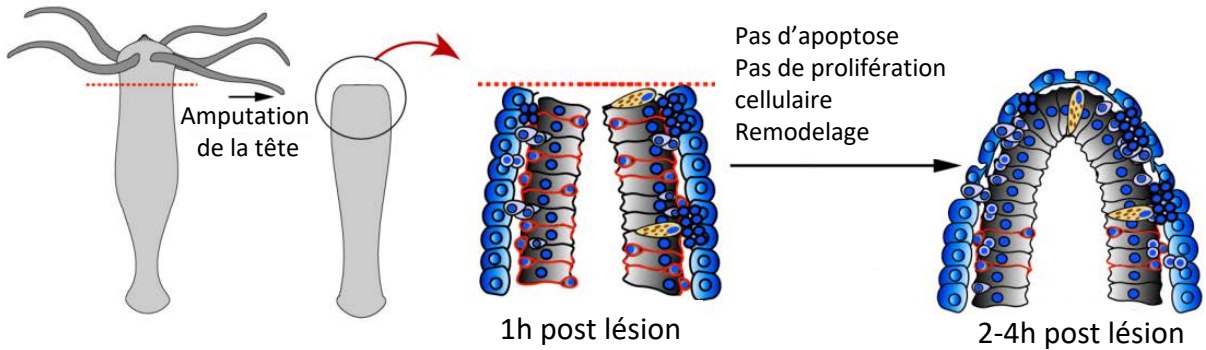
Chapitre I. De la régénération à la cicatrisation.

Tous les êtres vivants sont capables à des degrés divers, de pouvoir, en réponse à une agression, réparer la partie du corps lésée. L'organisme peut être atteint à différents niveaux (tissus, organes, membres) et l'intensité de la **lésion** peut être variable (lésion superficielle, ablation partielle, ablation totale d'un organe ou d'un membre entier). Quel que soit le niveau auquel l'organisme est atteint et l'intensité du dommage, deux types de réparation littéralement opposés peuvent se mettre en place : une régénération ou une cicatrisation.

Selon l'Encyclopédie Universalis, la **régénération** désigne les phénomènes de réparation au cours desquels un individu retrouve son intégrité ; elle permet la récupération à l'identique de la forme et de la fonction de la partie lésée. Par exemple, chez le poisson zèbre, la régénération de la nageoire caudale après section permet de reformer les rayons osseux ainsi que la peau, les vaisseaux et les nerfs, et donc de récupérer une nageoire intègre et fonctionnelle². Ce processus de régénération peut s'appliquer non seulement aux tissus, aux organes ou à un membre entier, comme la patte chez la salamandre, mais également de manière encore plus impressionnante, à l'organisme entier comme c'est le cas chez le ver planaire qui est capable de régénérer son corps à partir d'un fragment. Cette capacité de régénération a progressivement disparu au cours de l'évolution des espèces, jusqu'à devenir quasiment nulle chez les mammifères adultes^{2,3} (Figure 1). Après une lésion, on assiste chez ces derniers, à la mise en place de façon précoce et très rapide, d'un tissu conjonctif fibreux qui permet de refermer la plaie rapidement. Cette réponse à une lésion tissulaire correspond à la **cicatrisation**, qui aboutit systématiquement à la perte de fonctionnalité du tissu lésé, ainsi qu'à une incapacité à récupérer sa morphologie initiale.

Dans ce chapitre, nous allons successivement présenter i) les organismes / tissus modèles utilisés dans le domaine de la régénération, ii) les grandes étapes cellulaires et moléculaires des processus de réparation qui opposent la régénération à la cicatrisation et iii) les rares exceptions subsistant chez le mammifère adulte où la régénération persiste.

A Régénération morphallactique



B Régénération épimorphique

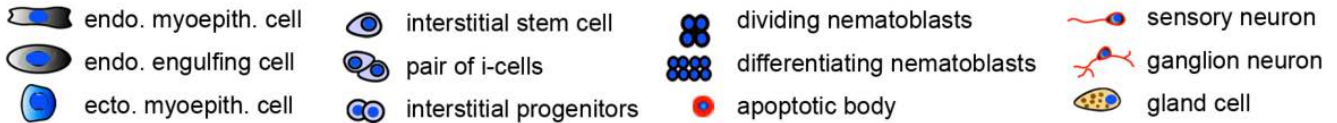
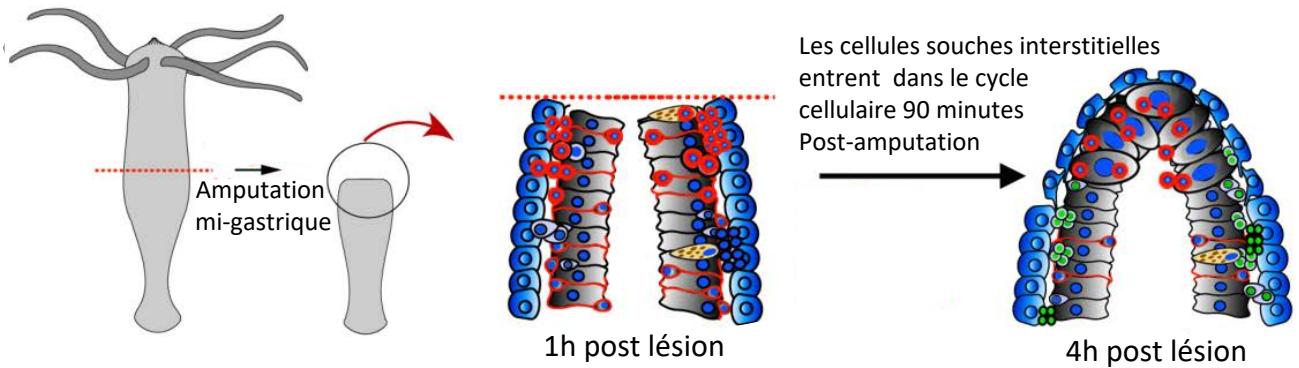


Figure 2. Régénération morphallactique et épimorphique chez l'hydre.

(A) La régénération morphallactique après amputation de la tête de l'hydre comprend un processus de remodelage des cellules restantes sans prolifération cellulaire ni apoptose. (B) La régénération épimorphique après amputation mi-gastrique de l'hydre met en jeu une prolifération de cellules progénitrices pour former un bourgeon précurseur du membre/organe.

I Régénération : modèles d'étude et étapes précoces

A Généralités

Depuis plusieurs décennies, les études permettant d'identifier les étapes et les éléments clés nécessaires à la régénération sont menées sur des organismes de complexité variable, allant des invertébrés (l'hydre, le ver planaire ou encore l'étoile de mer) aux vertébrés non mammaliens (tels que le poisson zèbre, et les amphibiens urodèles comme la salamandre, le triton ou l'axolotl). Si les mammifères sont capables de régénérer certains tissus au stade fœtal et néonatal, ils en sont en revanche majoritairement incapables au stade adulte (Figure 1).

La régénération est un phénomène complexe, initié lors d'une agression de l'organisme, et qui fait intervenir plusieurs acteurs cellulaires et moléculaires, coordonnés dans le temps et l'espace. Historiquement, deux types de régénération ont été définis par Thomas Hunt Morgan en 1901 : la morphallaxie et l'épimorphose⁴ (Illustré en Figure 2A et 2B avec l'amputation de la tête et du corps de l'hydre respectivement). La morphallaxie se définit comme une régénération tissulaire en l'absence de prolifération et d'apoptose cellulaire. Cette régénération se fait par remaniement des tissus restants *via* des étapes de dédifférenciation et de re-différenciation cellulaire pour former des tissus nouveaux par métaplasie (Encyclopédie Universalis). L'épimorphose, elle, se définit comme une régénération au cours de laquelle les tissus régénérés se mettent en place à partir d'un bourgeon cellulaire appelé blastème (que nous définirons mieux dans le paragraphe C). Ce blastème est formé par la prolifération et l'accumulation de cellules multipotentes indifférenciées à partir desquelles se remettent en place les différents tissus (Encyclopédie Universalis).

B Les espèces modèles servant à l'étude de la régénération

1 Les invertébrés

i L'hydre

L'hydre appartient à la famille des cnidaires. Depuis plus de deux cents ans, elle constitue un modèle d'étude de la régénération. Dans les années 1740, Trembley et collaborateurs (coll.) ont découvert que couper une hydre en plusieurs morceaux conduisait à la formation de plusieurs petites hydres (Figure 3A). Le corps de l'hydre est composé d'une tête avec des tentacules à une extrémité, et d'un pied à l'autre extrémité, reliés par une colonne creuse où se situe le système digestif. L'hydre ne contient que 3 populations cellulaires principales qui « s'auto-renouvellent » : Les cellules épithéliales de l'ectoderme, les cellules épithéliales de l'endoderme et les cellules souches interstitielles provenant majoritairement de l'ectoderme^{5,6}. De nombreuses études montrent que tout fragment isolé du corps de l'hydre, pour peu qu'il soit composé de quelques centaines de cellules épithéliales, peut régénérer

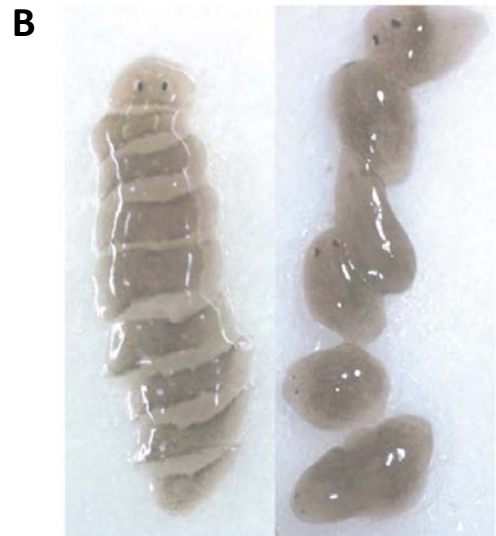
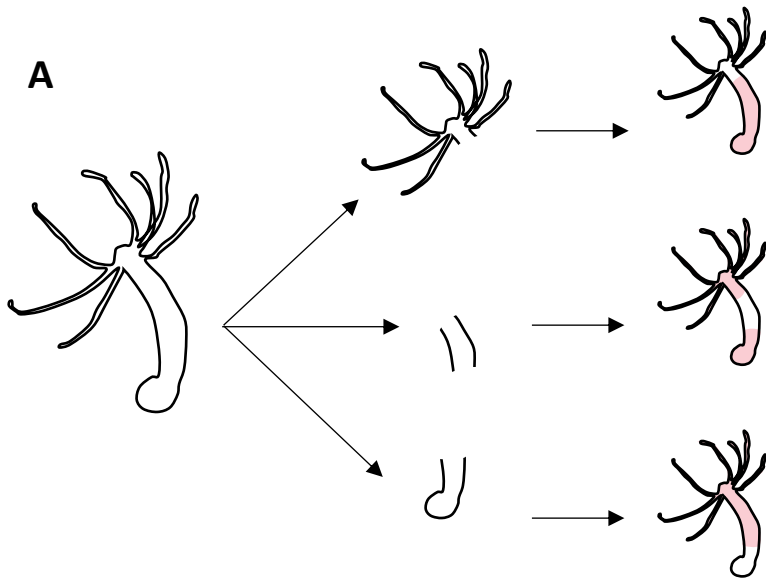


Figure 3. Espèces capables de régénérer : les invertébrés.

(A) Régénération de l'hydre après amputation de la tête, du tronc ou du pied (*Adapté de Rottinger et coll. 2017*) La partie rose correspond à la partie qui régénère. (B) Régénération du ver planaire après amputation dans divers plan le long de l'axe antéro-postérieur. Ce dernier peut régénérer un nouvel organisme en entier avec la même orientation antéro-postérieure en une semaine (*Kiyokazu 2003*).

en une version miniature de l'animal^{7,8,9}. De même que la dissociation des cellules qui composent l'hydre sont capables de donner naissance à une nouvelle hydre après réagrégation et réorganisation et ce, en seulement 4 à 7 jours¹⁰.

La régénération se met en place de deux façons différentes chez l'hydre ; par morphallaxie après toute amputation à distance du milieu du tube gastrique, et par épimorphose lorsque le plan de coupe est situé en position mi-gastrique (Figure 2). Dans le cas de l'épimorphose, les cellules situées sur le plan de coupe rentrent en apoptose et sécrètent le facteur Wnt3a¹¹. L'activation de cette très conservée voie de signalisation Wnt permettra notamment de stimuler la prolifération compensatoire des cellules situées à proximité, pour permettre la régénération de la tête l'hydre. Cette voie de signalisation est contrôlée par une autre famille de gènes très conservée ; la famille des gènes Homéobox (*Hox*). Bien que le nombre d'études soit très limité concernant la réelle fonction de ces derniers au cours des processus de régénération, leur expression est augmentée chez l'hydre après amputation de la tête¹².

La capacité fascinante qu'a l'hydre à régénérer après amputation est aussi due à un remaniement drastique de la matrice extracellulaire (MEC) dans les heures suivant l'amputation. Très rapidement, les composants de la MEC se rétractent pour permettre aux cellules de l'endoderme et de l'ectoderme de communiquer directement les unes avec les autres. Ces cellules vont alors sécréter activement des composés de la MEC et permettre aux cellules de migrer et reconstituer la partie manquante du corps de l'hydre¹³. Toute perturbation pharmacologique de la synthèse de cette MEC ou des interactions entre les cellules et la MEC, conduit à l'inhibition de la régénération de l'hydre¹³.

ii Le ver planaire

La capacité de régénération exceptionnelle du ver planaire a été découverte il y a plus de cent ans par Thomas Hunt Morgan qui a observé que cet animal pouvait générer un nouveau ver à partir d'un simple fragment de son corps¹⁴ (Figure 3B). Ceci est possible grâce à la présence de cellules souches réparties le long de l'axe antéro-postérieur du ver planaire, les néoblastes, qui sont capables de se différencier en cellules matures spécifiques d'un tissu en fonction de leur position sur cet axe^{15,16}. La meilleure illustration de l'importance de ces néoblastes est l'impossibilité pour un ver préalablement irradié (les néoblastes étant alors majoritairement détruits), de régénérer. L'injection d'une dizaine de néoblastes dans un ver planaire irradié suffit à ce dernier pour qu'il récupère ses capacités de régénération¹⁷. Après lésion, les néoblastes sont recrutés aux abords du site de lésion et prolifèrent, formant ainsi un amas de cellules indifférenciées (appelé blastème, que nous décrirons plus loin dans ce chapitre) qui permettront de reformer la partie manquante par épimorphose.

A l'échelle moléculaire certains facteurs de croissance de la famille des EGFs (Epidermal Growth Factors) régulent la prolifération des cellules souches (néoblastes) lors de la régénération du ver¹⁷.

C'est notamment la fixation de la Neuregulin7 sur son récepteur EGFR3 qui régule la division asymétrique des néoblastes et donc la taille du blastème pro-régénérant¹⁸ ; et l'utilisation d'ARN interférant codant pour *Egfr3* supprime la capacité de régénération du ver planaire¹⁸. La voie de signalisation de ces facteurs de croissance peut se superposer à la signalisation Wnt et Hedgehog (Hh), qui sont, elles, requises pour maintenir la polarité antéro-postérieure, aussi bien pour le maintien de l'homéostasie qu'au cours de la régénération. Il a notamment été rapporté que la voie Wnt était requise pour la spécialisation de la partie postérieure du ver lors de sa régénération^{19,20}. La production de Wnt est assurée par les cellules souches sous le contrôle d'un gène appartenant à la famille des gènes *Hox* : *Djlslet*²¹.

Le ver planaire ne fait pas figure d'exception concernant l'implication de la MEC au cours des processus de régénération. Quatre gènes codant pour des métalloprotéases (MMP : enzymes protéolytiques spécialisées dans la dégradation de la MEC) ont été identifiés chez le ver (contre plus de 20 chez le mammifère), et l'inhibition de ces gènes inhibe la régénération spontanée du ver planaire²².

iii L'étoile de mer

L'étoile de mer est un échinoderme composé d'un disque central d'où partent 5 bras ou plus²³. La cavité corporelle est constituée d'un coelome complexe formé de trois composantes principales : le système digestif et gonadique, le système périhémal correspondant aux appareils vasculaire et lymphatique, et enfin un système hydraulique pour permettre la locomotion²³. Cet animal est capable de régénérer aux stades larvaire et adulte. Chez l'adulte, une régénération est observée lors de la reproduction asexuée qui se fait par auto-amputation (phénomène de fission au cours duquel chaque partie redonne une étoile de mer entière) ou après une attaque par un prédateur²³. Selon les équipes scientifiques mais aussi selon la classe d'étoile de mer utilisée, ce sont les mécanismes de régénération du bras, du système nerveux (SN), ou encore du système gastrique qui sont étudiés. L'étude de la régénération du bras de l'étoile est la plus courante et permet clairement de mettre en évidence trois phases lors de la régénération : i) une phase de fermeture de la plaie (que l'on pourrait assimiler à l'épithélium de fermeture, que nous présenterons plus loin dans ce chapitre), ii) une première phase de régénération précoce et iii) une seconde phase de régénération, dite tardive. La fermeture de la plaie correspond successivement à l'hémostase, la ré-épithélialisation et la formation d'un tissu de granulation provisoire formant un œdème. Après une à deux semaines, alors qu'aucun tissu régénéré n'est visible, la 2^{ème} phase intervient pour permettre de reconstruire le bras à proprement parler. Enfin, trois à quatre mois post-amputation, le SN et les systèmes de locomotion se différencient pour finaliser la formation du bras²⁴.

Les études s'intéressent, désormais, à l'aspect moléculaire de cette régénération. Elles montrent ainsi une activation transitoire du gène *Srap* (pour *starfish regeneration associated protease*) ainsi que

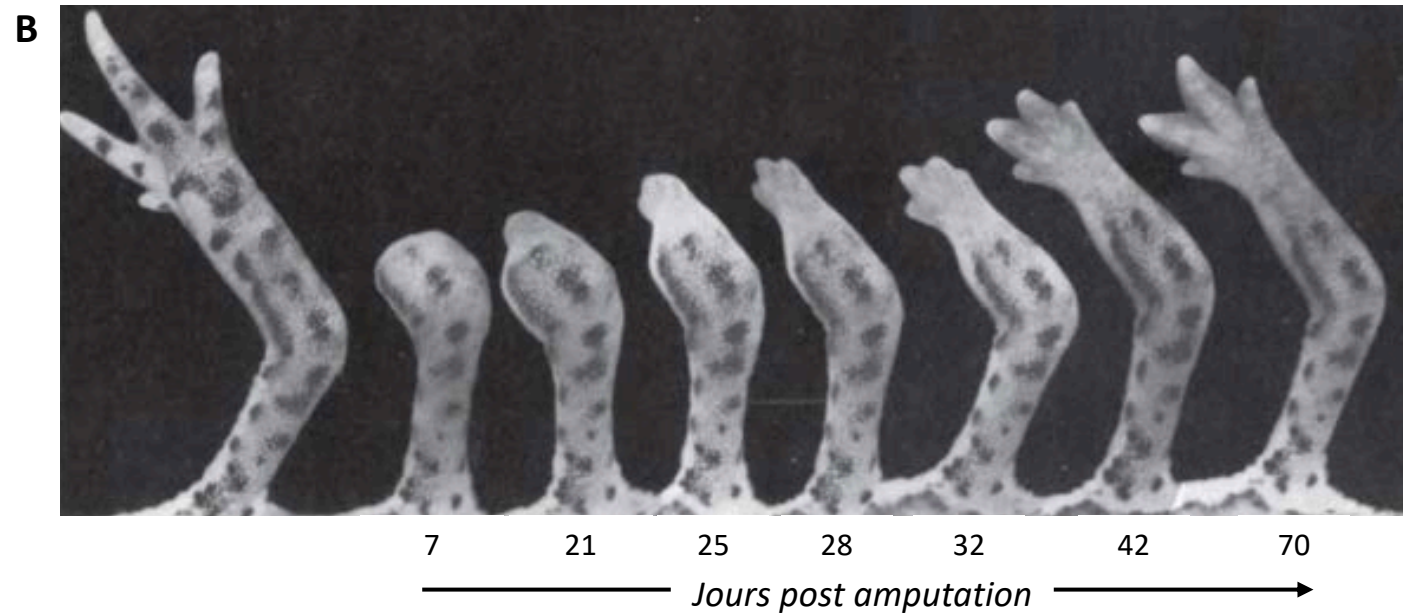
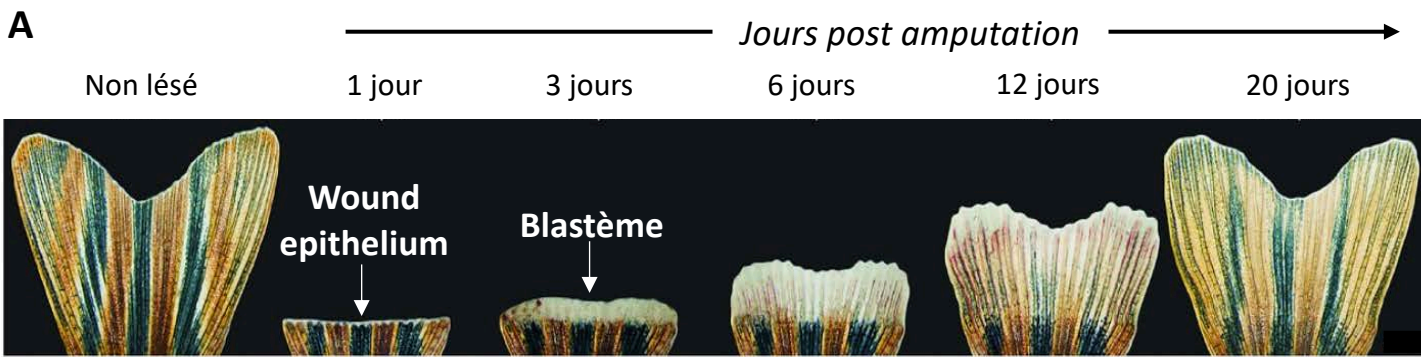


Figure 4. Espèces capables de régénérer : les vertébrés non mammaliens.

(A) Cinétique de régénération de la queue du poisson zèbre: de la mise en place du wound épithélium, en passant par la formation du blastème jusqu'à la régénération (*Sehring et coll. 2019*). (B) cinétique de régénération du membre après amputation chez la salamandre à différents temps post-amputation (*Goss 1969*).

d'une dizaine de gènes *Hox*, que ce soit au stade larvaire ou adulte^{25,26,27}, suggérant de nouveau, un rôle clef pour ces gènes. Cependant, ces études restent encore descriptives chez l'étoile de mer et ne permettent pas de mettre en évidence de véritables liens de cause à effet entre ces gènes et les processus de régénération.

Malgré des outils pharmacologiques et moléculaires limités pour étudier ces invertébrés, et bien que ces animaux soient éloignés de nous sur l'échelle de l'évolution, ils nous permettent d'aborder les grands principes de la régénération (morphallaxie et épimorphose), ainsi que les changements morphologiques qui s'opèrent au cours des grandes étapes de cette dernière. Au-delà de la capacité exceptionnelle qu'ont l'hydre et le ver planaire à régénérer l'entièreté de leur corps en seulement quelques jours, les différentes études sur ces organismes modèles mettent en lumière l'implication de voies de signalisation très conservées au cours de l'évolution (Wnt, Hh et gènes *Hox*). Ces voies de signalisation et gènes ont également des rôles déterminants au cours du développement de l'organisme, et il n'est donc pas surprenant de les voir impliqués au cours des phénomènes de régénération. Aussi, des événements de remodelage tissulaire ont commencé à être identifiés chez ces espèces, parmi lesquels le remodelage de la MEC, qui en étant « permissive », accompagne la migration et la prolifération des progéniteurs au cours de la régénération.

2 Les vertébrés non mammaliens

Même si cette capacité incroyable de régénération de l'organisme entier n'est pas retrouvée dans les groupes zoologiques plus évolués, certaines espèces au sein des vertébrés ont gardé cette rare aptitude à régénérer, à l'échelle des tissus, des organes ou d'un membre entier.

i Le poisson zèbre

Les modèles classiques d'étude de la régénération chez le poisson zèbre sont des lésions de la nageoire dorsale, pectorale ou caudale. La nageoire pectorale, par exemple, repousse totalement par épimorphose en 20 jours après son amputation (Figure 4A). Chez cet organisme modèle, un autre organe fait l'objet de nombreuses études depuis quelques années : le cœur^{28,29}. Ces modèles ont permis de décrypter, de nouveau, le rôle pivot joué par les gènes *Hox* et nous révèlent aussi l'implication de deux grands systèmes dans la régénération, le système nerveux (SN) et le système immunitaire (SI).

Chez le poisson zèbre, l'origine des cellules qui participent à la régénération est variable en fonction de l'organe ou du tissu lésé. Ces cellules sont issues i) soit d'une prolifération de cellules initialement différenciées (c'est le cas lors de la régénération cardiaque, les cardiomyocytes se différencient et

prolifèrent pour participer à la régénération cardiaque³⁰), ii) soit d' une trans-différenciation de cellules différenciées (Lu et coll. décrivent une trans-différenciation des cellules α en cellules β dans le pancréas, après lésion de cet organe³¹) ou encore iii) d'une différenciation de précurseurs et/ou de cellules souches résident(e)s en cellules spécialisées spécifiques des différents tissus (comme c'est le cas pour les cellules souches satellites Pax7⁺ lors de la régénération du muscle³²).

Les nombreux outils génétiques disponibles chez cette espèce facilitent grandement l'identification des acteurs moléculaires clefs ; ainsi, des expériences de gain et perte de fonctions ont montré notamment l'implication des voies de signalisation du FGF (Fibroblast Growth Factor) et de Wnt^{33,34} sous contrôle de l'acide rétinoïque.

ii Les amphibiens : exemple des urodèles

Les amphibiens de l'ordre des Urodèles, auquel appartiennent la salamandre, le triton et l'axolotl, sont les vertébrés qui ont gardé la capacité de régénérer la plus fascinante puisqu'ils sont capables de régénérer entièrement et en 70 jours, une patte amputée (Figure 4B). Ces animaux sont également capables de régénérer, leur queue, leur moelle épinière, leur cristallin, ainsi qu'une partie du cœur^{35,36,37}. Il est intéressant de noter que chez les urodèles, cette capacité de régénération existe au stade larvaire comme au stade adulte alors que chez les amphibiens de l'ordre des anoures, comme par exemple le Xénope, cette capacité disparaît lors de la métamorphose³⁸. La régénération du membre reste le meilleur exemple pour étudier un phénomène complexe de régénération. Les différents apports scientifiques de ce modèle seront développés ultérieurement dans ce chapitre, mais aussi dans les chapitres 2 et 3 portant sur le SN et le SI.

Les études menées chez ces espèces « pionnières » ont permis de clarifier les grandes étapes du processus de régénération, ainsi que les principaux acteurs cellulaires et moléculaires fondamentaux que nous allons présenter dans la partie suivante.

C Les étapes précoces des processus de régénération

1 Mise en place de l'hémostase

On désigne sous le nom d'hémostase, l'ensemble des phénomènes grâce auxquels l'organisme permet l'arrêt d'une hémorragie (Encyclopédie Universalis). La rupture de l'intégrité tissulaire suite à une lésion entraîne systématiquement des brèches vasculaires. La formation d'un caillot au niveau de ces dernières est donc indispensable pour stopper l'hémorragie. L'hémostase se déroule en trois temps que sont l'hémostase primaire, secondaire et tertiaire, grâce à un équilibre très complexe faisant

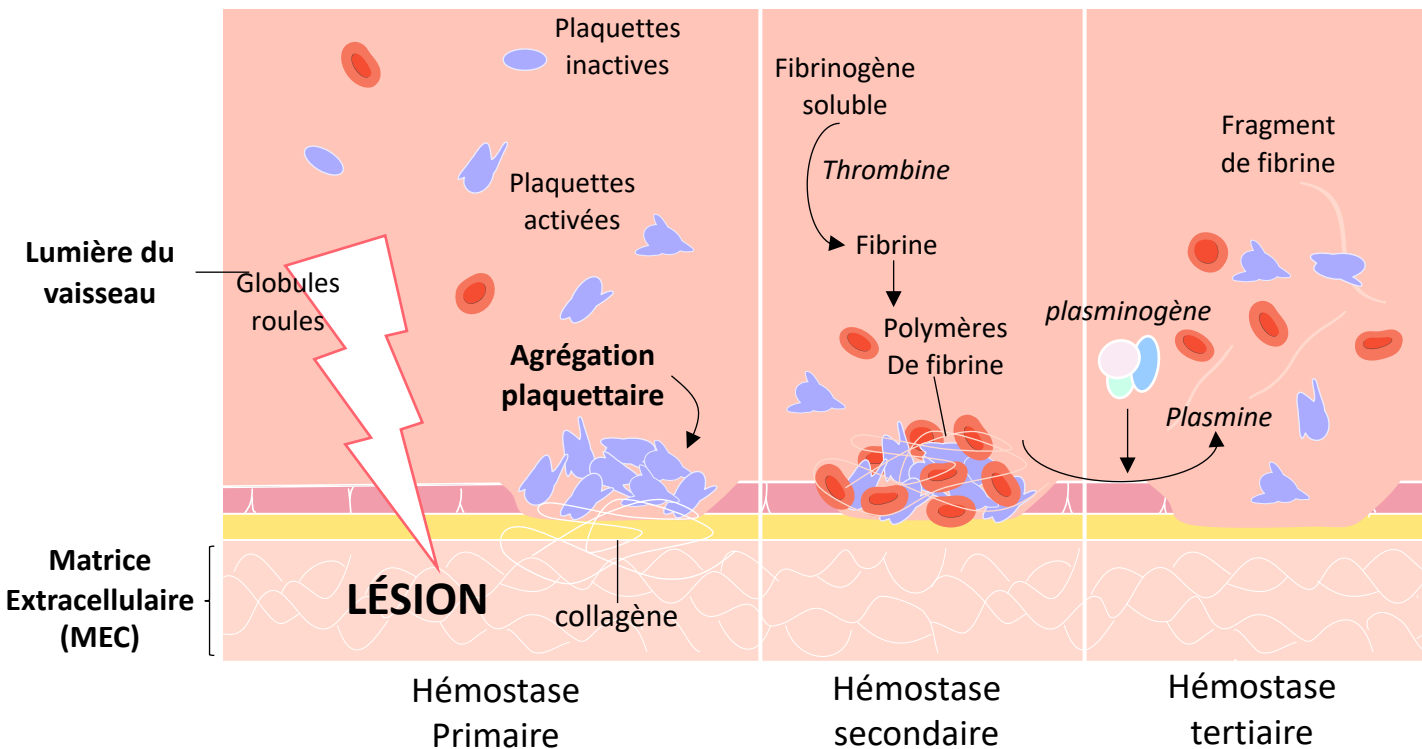


Figure 5. Schéma illustrant les processus d'hémostase post lésionnelle.
 Suite à une lésion tissulaire, une brèche vasculaire va se créer. Une accumulation de collagènes et de plaquettes va venir combler cette brèche, formant ainsi le clou plaquettaire lors de l'hémostase primaire. Lors de l'hémostase secondaire, la thrombine va permettre la production de fibrine, pour consolider le clou plaquettaire. Enfin, dans la phase d'hémostase tertiaire, le clou plaquettaire sera désagrégé, majoritairement sous l'effet de la plasmine.

intervenir les plaquettes, des facteurs coagulants, des inhibiteurs de coagulation et le système fibrinolytique (Figure 5).

L'hémostase primaire a lieu dans les premières minutes après la lésion et s'accompagne d'une vasoconstriction locale visant à diminuer le flux sanguin et concentrer le nombre de plaquettes. Ces dernières vont adhérer à la MEC sous-endothéliale accessible, ce qui conduit à la formation d'un « clou plaquettaire »^{39,40}.

L'hémostase secondaire consiste en la consolidation du premier thrombus par agrégation de globules rouges dans un réseau de fibrine. Cette étape de coagulation résulte de la sécrétion en grande quantité, du facteur III. A terme cela entraîne, *via* l'activation de la thrombine, le clivage du fibrinogène (soluble) en fibrine (insoluble).

L'hémostase tertiaire consiste en la fibrinolyse du caillot de fibrine précédemment formé. Pour cela, le plasminogène (qui circule sous forme inactive) est activé par le tPA (tissue-type Plasminogen Activator) ou par l'uPA (urokinase-type Plasminogen Activator). Cette activation conduit à la formation de plasmine, capable de couper et dégrader le réseau de fibrine⁴¹. Cette étape permet de restaurer le flux sanguin à l'endroit de la lésion. De plus, l'adhésion des plaquettes à la fibrine est inhibée assurant ainsi la résolution du clou plaquettaire associé^{42,43,44}. (Figure 5).

Si la résultante de cette hémostase est l'arrêt des écoulements par fermeture de la plaie, elle permet aussi l'arrivée des cellules immunitaires sur le site de lésion et leur adhésion à l'endothélium vasculaire (cet aspect sera développé dans le chapitre 3, dédié au SI).

Suite à cette phase d'hémostase, la plaie est définitivement fermée grâce à la formation d'un épithélium de fermeture.

2 Formation de l'épithélium de fermeture

Il est aussi plus communément appelé « Wound Epithelium » et fait partie des événements précoces requis pour permettre la régénération dans la majorité des contextes de lésion, et ceci chez la majorité des espèces capables de régénérer (le corps de l'hydre et du ver planaire, la nageoire du poisson zèbre, le membre de la salamandre). La formation de cet épithélium de fermeture consiste en la migration de kératinocytes le long du plan d'amputation ou de lésion. Ces cellules prendront alors une identité transitoire et spécialisée. Même si la fonction principale de cet épithélium de fermeture est encore mal comprise, nous pouvons affirmer que ce dernier permet au moins la fermeture de la zone lésée pour contenir les liquides et mettre les tissus intérieurs potentiellement exposés à l'environnement extérieur « à l'abri » d'agressions extérieures. Notons que cet épithélium se met également en place lors d'agression interne à l'organisme : par exemple dans le cadre de la régénération du cœur chez le poisson zèbre, où l'épicarde joue le rôle d'épithélium de fermeture⁴⁵. Son caractère indispensable a été démontré relativement tôt, puisque des expériences réalisées par Mescher et coll. en 1976,

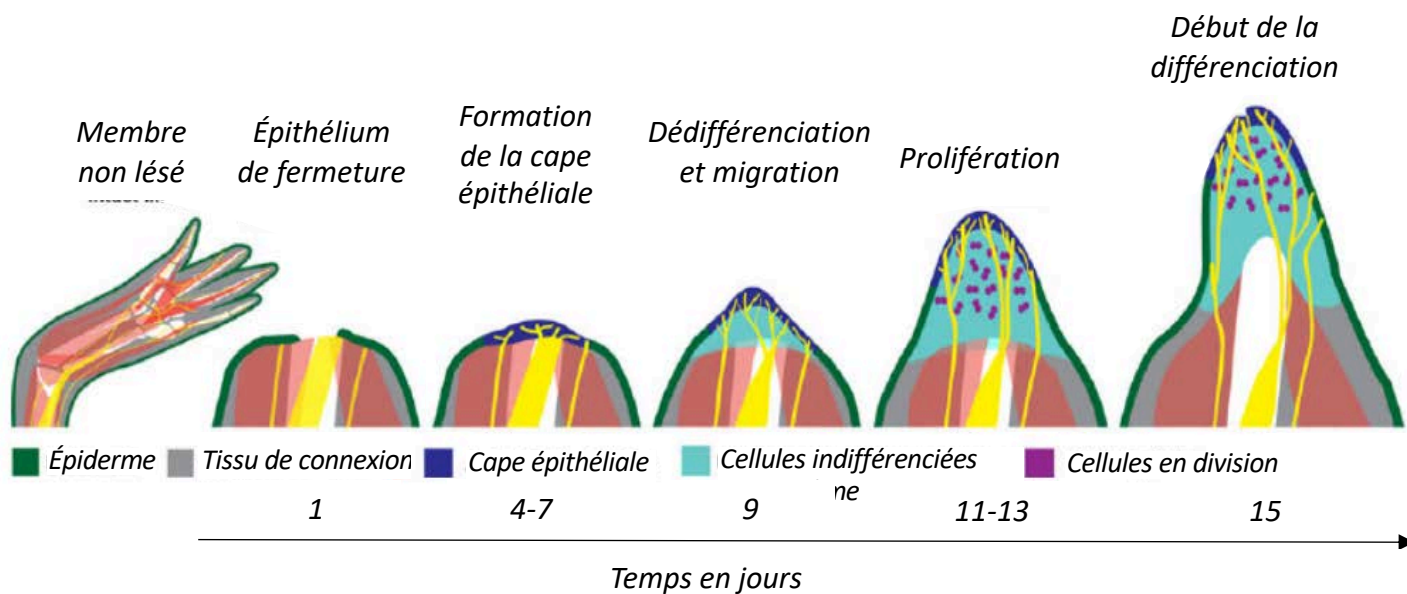


Figure 6. Étapes précoces de la régénération : formation de l'épithélium de fermeture, mise en place de la cape épithéliale et formation du blastème au cours des processus de régénération ; exemple du membre chez l'axolotl.

(Adapté de McCusker et coll. 2015)

montrent que si on empêche la formation de cet épithélium de fermeture en greffant un bout de peau saine sur la zone amputée, cela conduit à la cicatrisation de la patte, sans régénération de cette dernière⁴⁶. Cet épithélium de fermeture se transforme ensuite en plusieurs couches de cellules qui vont participer activement à la régénération. C'est grâce à l'activation, entre autres, de différentes voies de signalisation émanant de cet épithélium de fermeture, que la cape épithéliale va se mettre en place (Figure 6).

3 Mise en place de la cape épithéliale

Dans la plupart des cas, que ce soit après lésion du corps chez l'hydre ou le ver planaire, de la nageoire chez le poisson zèbre, ou encore de la patte chez la salamandre, une cape épithéliale se met en place rapidement et transitoirement, autour de la zone endommagée.

La mise en place de cette cape a été bien étudiée dans le cadre de la régénération de la patte chez la salamandre et l'axolotl⁴⁷. Elle dérive de l'épiderme de la peau. Les cellules de l'épithélium de fermeture vont proliférer pour former les trois couches cellulaires constituant la cape épithéliale^{48,49} : la couche cornée la plus externe, la couche basale la plus interne et une couche de cellules cuboïdes située entre les deux⁴⁹. L'absence de derme et de lame basale sous la cape épithéliale, rend le mésenchyme sous-jacent « permissif » pour la mise en place du blastème, dont nous parlerons dans le paragraphe suivant. Il a été mis en évidence chez l'axolotl, qu'après amputation d'un membre, les cellules constituant les trois couches cellulaires de la cape sont immuno-positives pour la laminine et le collagène de type IV suggérant une sécrétion abondante de ces facteurs par les cellules de la cape. Ce marquage est fortement diminué chez des mutants incapables de régénérer⁴⁸. Les raisons de cette corrélation entre la présence de ces deux facteurs de la MEC et la capacité à régénérer, reste encore à explorer.

Comme l'épithélium de fermeture, la formation de la cape épithéliale est indispensable à la régénération. Ceci est très probablement dû à sa capacité à envoyer des signaux de prolifération et de différenciation aux cellules environnantes situées dans le mésenchyme. Parmi ces signaux, on peut citer le FGF-10 qui a fait l'objet de plusieurs études^{50,51}. Les cellules de la cape sécrètent aussi des MMP qui vont permettre un remaniement de la MEC pour faciliter la mise en place du blastème⁵². Enfin, la cape va progressivement disparaître pour laisser place au blastème et toute intervention empêchant cette transition entraînera la mise en place d'une cicatrisation. Par exemple, l'inhibition pharmacologique des MMP empêche la formation du blastème et donc la régénération spontanée du membre⁵³.

4 Formation du blastème

Le blastème se forme sous la cape épithéliale. Il est constitué d'un amas de cellules multipotentes, capables de proliférer et de se différencier en plusieurs types cellulaires, aboutissant *in fine* à la régénération de la zone de l'organisme endommagée (Figure 6). Empêcher la formation de ce blastème, inhibe la régénération⁵⁴. Inversement, la transplantation d'un blastème à un endroit non lésé du corps de la salamandre, déclenche la formation d'un nouveau membre ectopique à l'endroit de la greffe^{55,56}. Enfin, si on prélève le blastème formé quelques jours après l'amputation d'un membre chez la salamandre, et qu'on le place dans une boîte de culture, celui-ci formera une patte « ex-vivo »⁵⁷. Les cellules qui composent ce blastème peuvent être i) des cellules souches déjà présentes dans le tissu (c'est le cas chez les invertébrés), ii) des cellules indifférenciées (cellules mésenchymateuses dermales et périsquelettiques) ou encore iii) des cellules issues de la dédifférenciation de cellules différenciées pré-existantes (c'est le cas chez les vertébrés). Les cellules du blastème prolifèrent puis se redifférencient majoritairement dans le lignage cellulaire dont elles sont issues. A noter que la position des cellules à l'intérieur du blastème est cruciale et conditionne la voie de différenciation dans laquelle elles vont s'engager. Cette régionalisation du blastème est sous le contrôle du gradient de concentration de l'acide rétinoïque et du gradient d'expression du gène de son récepteur *Prod1*⁵⁸.

Bien que différents gènes et voies de signalisation conservés au cours de l'évolution (Hox, acide rétinoïque, Hh, Wnt) aient été identifiés comme étant impliqués à la fois dans le développement et dans la régénération, ces éléments ne seront pas développés dans le reste du manuscrit. En effet, à côté de ces molécules étroitement associées aux processus développementaux et présentées succinctement dans les paragraphes précédents, d'autres acteurs cellulaires et moléculaires « plus généraux » sont impliqués dans la mise en place de l'épithélium de fermeture, de la cape épithéliale et la formation du blastème. Ces acteurs appartiennent au SN et au SI, qui feront chacun l'objet d'un chapitre spécifique (chapitres 2 et 3 respectivement).

En conclusion, la régénération permet de retourner à un état initial avec restauration de la forme et de la fonction de la partie lésée de l'organisme, ce qui est un avantage considérable. Cette capacité de régénérer reste hétérogène chez les invertébrés comme chez les vertébrés non mammaliens. Par exemple, alors que l'hydre et le ver planaire sont capables de régénérer la totalité de leur corps, les données de la littérature ne permettent pas de savoir si ces capacités régénératrices concernent tous les organes chez les poissons et les amphibiens. De plus, les amphibiens urodèles sont capables de régénérer à tous les stades développementaux, alors que les amphibiens anoures n'en sont capables qu'avant la métamorphose. La disparité de la capacité à régénérer se retrouve donc au sein du règne

Introduction

animal de manière générale, mais également au cours du développement et dépend peut-être de l'organe concerné pour un animal donné.

II De la perte de la capacité de régénération à la cicatrisation : cas du mammifère adulte

Chez le mammifère adulte, une partie de la littérature s'intéresse à la « régénération physiologique » de l'épithélium intestinal, pancréatique ou dermique. Ce n'est pas de cette régénération dont nous parlerons puisque nous avons défini la régénération comme étant la capacité après une lésion importante, de régénérer un tissu, un organe, un membre entier ou encore un organisme dans sa totalité.

A La régénération chez le mammifère

1 Régénération au stade fœtal et/ou néonatal

Des capacités de régénération semblables à celles retrouvées chez les invertébrés et vertébrés non mammaliens peuvent être observées in utero. On assiste notamment à la régénération des bourgeons des membres au stade fœtal⁵⁹ et plusieurs études ont mis en évidence qu'au stade post natal, le cœur est capable de régénérer chez la souris et ce, jusqu'au 7^{ème} jour après la naissance²⁸.

Il est également intéressant de noter que la MEC de la peau du fœtus et du nouveau-né, ressemble en de nombreux points à la MEC de la « souris » *Acomys* adulte capable de régénérer (et dont nous parlerons un peu plus loin). Il s'agit d'une MEC riche en collagène de type III, pauvre en collagène de type I et présentant une quantité de MMP9 supérieure à celle retrouvée dans une MEC de mammifères adultes^{60,61,62,63}. Ces données, en constante augmentation, ne font qu'appuyer le fait que la MEC soit un élément clef de la régénération tissulaire.

2 « Régénération » spontanée chez l'adulte

i Le foie

Il est souvent dit que le foie régénère : après hépatectomie, on observe des phénomènes d'hyperplasie et d'hypertrophie compensatoires par les hépatocytes des lobes hépatiques restants qui permettent de compenser la perte de volume et de récupérer la fonction du foie⁶⁴. Lorsque l'hépatectomie est massive (si elle concerne au moins 2 lobes), cette « régénération » du foie met en jeu, en plus des hépatocytes, des précurseurs ductulaires (issus des canaux de Hering) qui sont à l'origine de cellules ovales capables de se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires ; toutes ces cellules étant sous le contrôle de plusieurs signaux inflammatoires (notamment des cytokines pro-inflammatoires)⁶⁵. Même si le foie ne retrouve pas complètement sa morphologie d'avant l'ablation (tous les lobes ne sont pas reformés), cette compensation contribue à la récupération fonctionnelle du tissu.

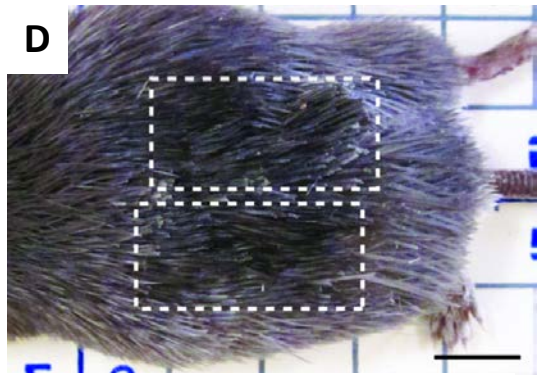
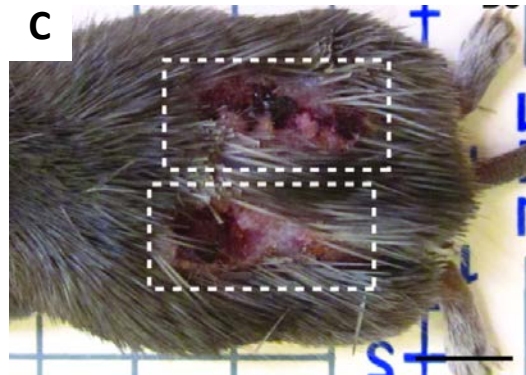
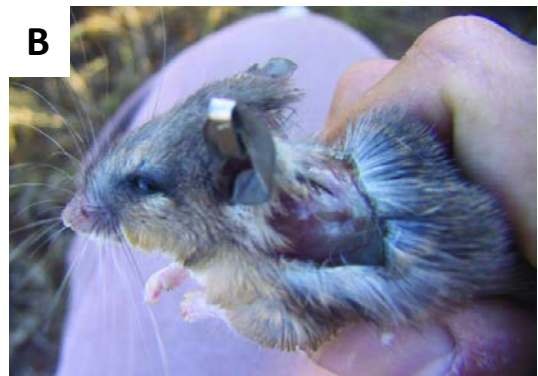
ii Le muscle

Le muscle fait également figure d'exception puisque des micros lésions (touchant quelques fibres musculaires) donne lieu à une régénération de ces dernières (c'est notamment ce qu'il se passe lors d'un effort physique intense, où les fibres endommagées sont remplacées). En revanche, l'ablation d'une partie du muscle ou une lésion massive de ce dernier, conduira, comme pour le reste des organes chez le mammifère adulte, à une cicatrisation de ce dernier par la création d'un tissu fibreux de comblement. Dans le cas de micro lésions, le muscle subit deux phases succinctes : une première phase de dégénérescence des fibres musculaires et une seconde, dite de régénération. Ces deux phases dépendent à la fois de la présence de cellules immunitaires (surtout la phase de dégénérescence) et de cellules souches musculaires ; les cellules satellites. S'opère également une phase de remodelage pour permettre la régénération, avec un rôle central de la MEC dans ce processus. Notons finalement, que dans ce modèle de régénération, le SI et le SN s'avèrent indispensables^{3,66}.

iii L'extrémité du doigt

Chez la souris ou le rat, on peut observer une régénération complète et rapide de l'extrémité du doigt après une amputation au niveau de la phalange terminale⁶⁷. Dans ce contexte lésionnel, Reginelli et coll. ont mis en évidence la mise en place d'un blastème et une augmentation significative de l'expression de différents gènes homéobox, dont *Msx1*, au niveau de celui-ci. *Msx1* est exprimé par les cellules mésenchymateuses et inhibe les processus de différenciation⁶⁸. Son rôle déterminant a été confirmé par des expériences d'invalidation qui se traduisent par l'inhibition de la régénération⁶⁹. L'utilisation de Noggin (un inhibiteur des BMPs (Bone Morphogenetic Protein) avant amputation, montre que l'effet du gène *Msx1* dans la régénération passe par le contrôle de l'expression du facteur de croissance BMP4⁶⁹. Notons que *Msx1* est aussi impliqué lors de la régénération de la queue de la larve de Xénope et du poisson zèbre^{70,71}.

Chez l'homme, une capacité de régénération du doigt et de l'ongle associé, est également observée lorsque l'amputation ne concerne que la phalange terminale et qu'elle se produit au cours des premiers jours après la naissance⁷². De nouveau, l'expression du gène homéobox *Msx1* est augmentée dans les phases précoces de régénération dans un modèle de culture ex vivo d'extrémités de doigts issus de fœtus humains⁷³.



3 jours post lésion cutané

30 jours post lésion cutané

E

Nombre de jours après perforation de l'oreille

1

9

20

33

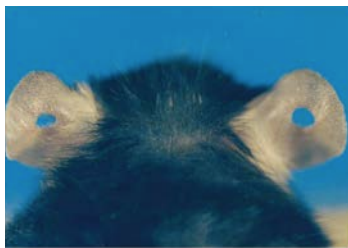


Figure 7. Mammifères adultes capables de régénérer.

(A) « Souris » *Acomys* intacte ou (B) après perte d'une partie de sa peau au niveau dorsal (mécanisme de défense). (C) Plaies dorsales 3 jours après lésion cutanée de toutes les couches de la peau. (D) Parfaite régénération de la peau et des follicule pileux 30 jours après lésion cutanée dorsale. (A-D: *Seifert et coll. 2012*). (E) Photos de la régénération après une perforation de l'oreille chez la souris C57BL/6 (haut, souris noire) et chez la souris MRL (bas, souris blanche) à différents temps post lésion (*Clark et coll. 1998*).

3 Les modèles exceptionnels de régénération chez l'adulte

Alors que la souris C57BL/6 classiquement utilisée en laboratoire est incapable de régénération au stade adulte, certains rongeurs font figure d'exceptions comme la « souris » *Acomys* ou la souris MRL (Murphy Large Roth).

i La « souris » *Acomys*

De récentes études menées depuis moins de 10 ans, s'intéressent à un rongeur appelé, à tort, souris *Acomys* ou souris épineuse du désert (*Acomys cahirinus*) ; il s'agit en fait d'un rongeur proche des gerbilles (Figure 7A), inféodé aux milieux désertiques et subdésertiques. Chez cet animal et contrairement à la souris *Mus musculus* classique (dont fait partie la C57BL/6), l'épiderme, le derme, le follicule pileux, les glandes sébacées ainsi que les muscles érecteurs des poils (c'est-à-dire toute l'épaisseur de la peau) sont capables de régénérer après une blessure profonde de la peau⁷⁴. Cette capacité de régénération a été initialement observée au niveau de la peau du dos. En effet, la « souris » *Acomys* présente la particularité, lorsqu'elle se fait attraper, de pouvoir abandonner jusqu'à 60% de sa fourrure à son prédateur afin de lui échapper : la peau du dos cède à une simple traction ; on parle d'autotomie évasive⁷⁵ (Figure 7B).

Les capacités exceptionnelles de régénération de la souris *Acomys* ont été principalement étudiées dans le cadre de lésions cutanées profondes (Figure 7C et 7D) et ont été initialement attribuées à des différences i) de réponse immunitaire post-lésionnelle, ii) de composition de la MEC et iii) d'enzymes de régulation de la synthèse et de la dégradation de la MEC, en comparaison avec une souris *Mus musculus* classique.

Concernant le SI, deux études montrent que les cellules immunitaires présentent des différences fonctionnelles avec celles d'une souris *Mus musculus*⁷⁶ et que la production d'espèces actives de l'oxygène (EAOs) par certaines de ces cellules (les macrophages), déjà décrite comme étant requise pour la régénération chez les invertébrés⁷⁷ et le poisson zèbre⁷⁸, est indispensable à la régénération chez la souris *Acomys*⁷⁹.

Concernant les caractéristiques de la MEC, il a été démontré que chez la « souris » *Acomys* en comparaison avec la souris *Mus musculus*, i) le dépôt post-lésionnel de MEC est plus lent à se mettre en place, ii) les fibres de collagène ne sont pas orientées parallèlement au derme, limitant ainsi sa rigidité, iii) la MEC est très riche en collagène de type 3 et pauvre en collagène de type 1 et iii) l'expression génique des métalloprotéases *Mmp2* et *Mmp9*, augmente significativement^{75,80}. Toutes ces caractéristiques ont pour conséquence de générer une MEC plus « souple », permettant un afflux accru de cellules immunitaires puis de progéniteurs qui joueront un rôle dans la régénération.

En conclusion, la réponse inflammatoire et la composition de la MEC diffèrent entre la « souris » *Acomys* capable de régénération spontanée et la souris *Mus musculus* mettant en place une cicatrisation après lésion.

ii La souris MRL

Historiquement, la MRL/MpJ-Fas^{lpr} (MRL, pour Murphy Roth Large) dont la souche parentale MRL/MpJ est issue du croisement de 5 fonds génétiques différents, est étudiée pour sa propension à développer spontanément un lupus érythémateux (maladie auto-immune). La MRL/MpJ-Fas^{lpr} est lymphoproliférative, c'est-à-dire qu'elle accumule une grande quantité de lymphocytes T produisant une très grande quantité d'auto-anticorps⁸¹. Ces problèmes immunitaires sont dus à une mutation du gène *Fas* ligand et de son récepteur, impliqués dans les processus d'apoptose⁸². Ce SI défaillant associé au développement du lupus érythémateux conduit à la mise en place de problèmes vasculaires, d'arthrose articulaire, de pathologies rénales, et a pour conséquence de causer la mort de la souris de façon prématurée⁸³. De plus, cette souris est aussi caractérisée par une organomégalie⁸⁴.

Les capacités de régénération de cette souris ont été découvertes de manière fortuite lorsqu'une perforation de l'oreille a été effectuée afin d'identifier les différents individus⁸⁵ (Figure 7E). La souris MRL/MpJ-Fas^{lpr} est effectivement capable de refermer intégralement le trou fait par l'expérimentateur, avec un tissu fonctionnel et semblable à celui d'origine (peau, muscle, fibres nerveuses etc...). Pour les études des mécanismes sous-jacents à la régénération, les différentes équipes scientifiques utilisent la souche parentale MRL/MpJ (MRL) qui, tout en conservant cette capacité à régénérer, ne présente que plus tardivement les problèmes liés à la mutation du gène *Fas* ; sa durée de vie est donc plus longue. Il a ainsi été montré que la souris MRL est capable de régénérer le cœur, le SN central (SNC), ou encore le cartilage après une lésion. Cette capacité de régénération des MRL est actuellement attribuée à une activité importante et précoce des MMPs⁸⁶. Par exemple après une lésion de l'oreille (perforation), une augmentation significative de l'activité des MMP2 et MMP9 a été rapporté chez les souris MRL en comparaison à une souris C5BL7/6 ne régénérant pas⁸⁷. La MEC serait ainsi, comme chez la « souris » *Acomys*, plus « permissive » à la migration cellulaire pour permettre la formation d'un blastème⁸⁶.

De plus, il a été montré que l'innervation est indispensable à la régénération de l'oreille chez cette souris. En effet, une dénervation chirurgicale préalable à la perforation de l'oreille, empêche la formation de la cape épithéliale et du blastème au niveau de la zone lésée^{88,89}, empêchant la régénération de se mettre en place.

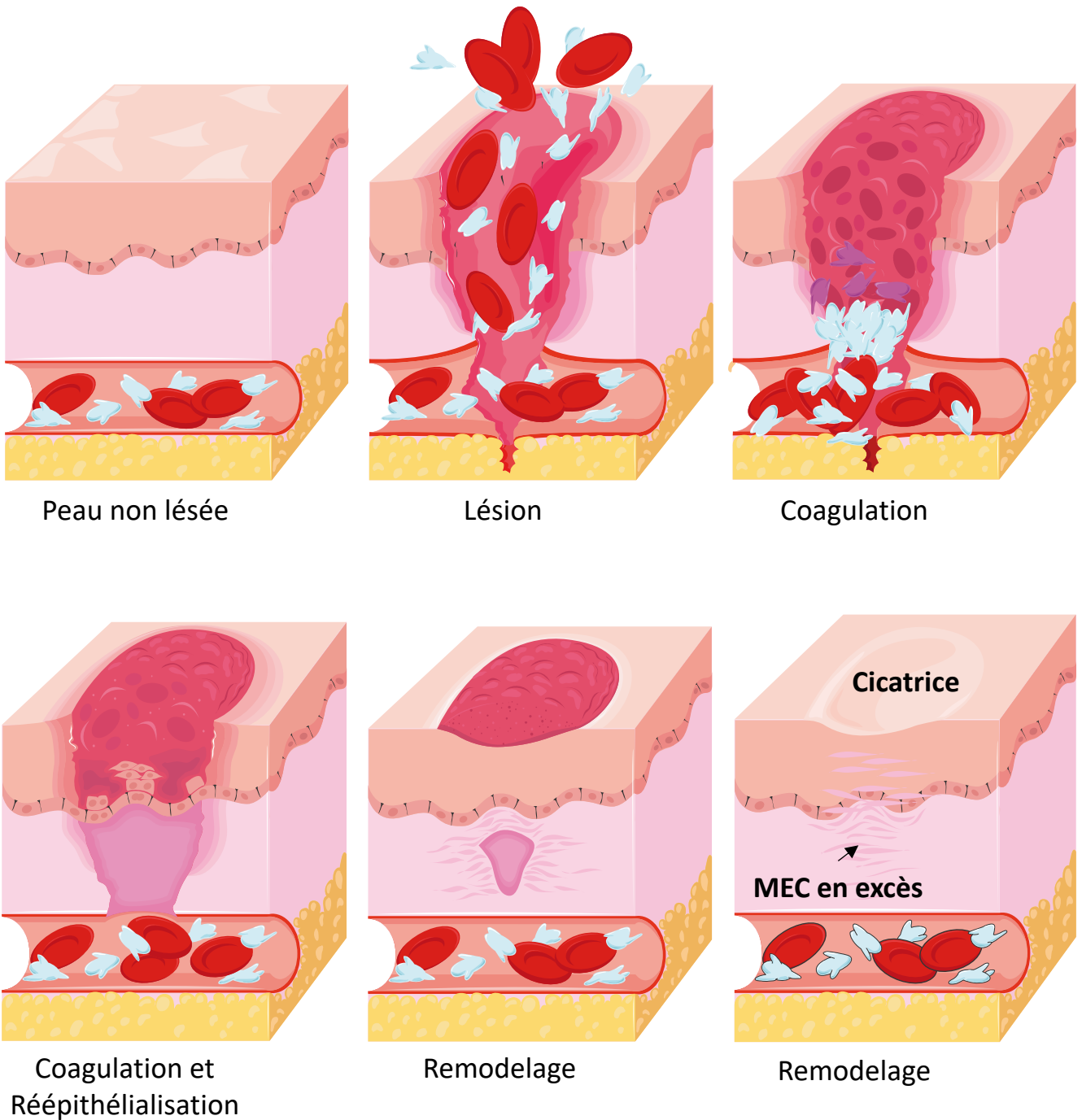


Figure 8. Cicatrisation : exemple de la peau.

La cicatrisation de la peau inclut différentes phases parmi lesquelles, l'hémostase (comprenant la phase de coagulation), la réépithélialisation et le remodelage tissulaire qui conduit à un dépôt de matrice extracellulaire excessif, dense et rigide et donc à la formation d'une cicatrice, ne permettant pas de revenir à l'état d'homéostasie tissulaire. MEC : Matrice Extracellulaire.

Pour l'heure, aucune étude ne s'est intéressée à la potentielle implication du SI au cours des processus de régénération de la souris MRL. En revanche, nous pouvons tout à fait imaginer que son SI particulier puisse avoir une part de responsabilité dans la capacité qu'a la souris MRL à régénérer.

En conclusion, l'utilisation de la souris MRL caractérisée par un SI particulier, dans l'étude des processus de régénération, confirme l'importance de la gestion du remodelage de la MEC post lésionnel, et pointe du doigt le rôle clef du SN au cours des processus de régénération.

B La cicatrisation

Hormis les exceptions présentées ci-dessus, la très grande majorité des organes chez le mammifère cicatrise après lésion. Cette cicatrisation conduit à la formation d'un tissu cicatriciel, riche en MEC, peu cellularisé et conduisant à la perte de la fonction du tissu, puisque les unités fonctionnelles de ce dernier ne sont pas remplacées (Figure 8). Il apparaît alors que les différentes étapes et facteurs associés à la mise en place de la régénération dont nous avons parlé dans ce chapitre soient globalement les mêmes en condition de cicatrisation, mais que i) les sous types de molécules, ii) leurs cinétiques d'implication, iii) leurs localisations au sein de la lésion, ainsi que iii) leur quantité, ne permettent pas d'autre issue que la cicatrisation.

Par exemple, La MEC est également impliquée dans les processus de cicatrisation, mais les différences de concentrations, de localisation et de nature des composants de la MEC (on trouve différents types de protéoglycanes, de glycoprotéines et de collagènes) ont un impact drastique sur l'issue de la réparation tissulaire aboutissant à la cicatrisation *versus* la régénération. Alors que les collagènes impliqués dans la régénération de la peau chez le fœtus font intervenir le collagène de type III, les fibroblastes retrouvés dans la peau des mammifères adultes, sécrètent principalement des fibres de collagène de type I, qui lui, confère un aspect rigide et moins permissif à la migration des cellules^{63,90}.

L'hypothèse actuelle qui prévaut pour expliquer la prédominance de la cicatrisation comme mécanisme de réparation tissulaire est son moindre "coût" par rapport à celui de la régénération : en effet, si la régénération permet de récupérer la forme et la fonction de l'organe lésé, c'est un processus très lent : il faut au minimum 70 jours pour la salamandre pour régénérer une patte, et jusqu'à 4 mois pour l'étoile de mer pour faire repousser un bras. Pendant le temps nécessaire à cette régénération, l'animal reste vulnérable vis-à-vis de ses prédateurs. Ce processus peut donc à terme, mettre en péril la survie de l'espèce. Ainsi, l'ensemble de la communauté scientifique s'accorde à dire qu'au cours de l'évolution, la régénération a laissé place à la cicatrisation qui, elle, offre l'avantage d'une fermeture rapide de la plaie mais est associée à la formation d'un « tissu de comblement » fibreux conduisant à

la perte de fonction du tissu préalablement lésé. Néanmoins d'autres hypothèses sont aussi avancées telles que la complexification du SI sur laquelle nous reviendrons dans le chapitre 3.

Points importants à retenir :

- En réponse à une agression, deux modes de réparation tissulaire peuvent se mettre en place : la cicatrisation ou la régénération.

- Même si elle permet un retour des tissus/organes/membres/organismes endommagés, à leur forme et à leur fonction initiale, la régénération n'a pas été sélectionnée au cours de l'évolution. Néanmoins, cette capacité n'est pas complètement perdue chez les mammifères.

- La présence de certains acteurs cellulaires ou moléculaires communs dans les phénomènes de régénération, des invertébrés les plus simples aux mammifères et ce jusqu'à l'homme, laisse penser qu'il est possible d'identifier et de lever les verrous mis en place au cours de l'évolution, dans le but d'orienter définitivement la réparation tissulaire vers une régénération, plutôt que vers une cicatrisation.

- **Bien que peu développée dans ce chapitre, l'étude de la régénération chez ces espèces modèles pointe du doigt l'importance probablement fondamentale des systèmes immunitaire et nerveux, qui fait l'objet des deux chapitres suivants.**

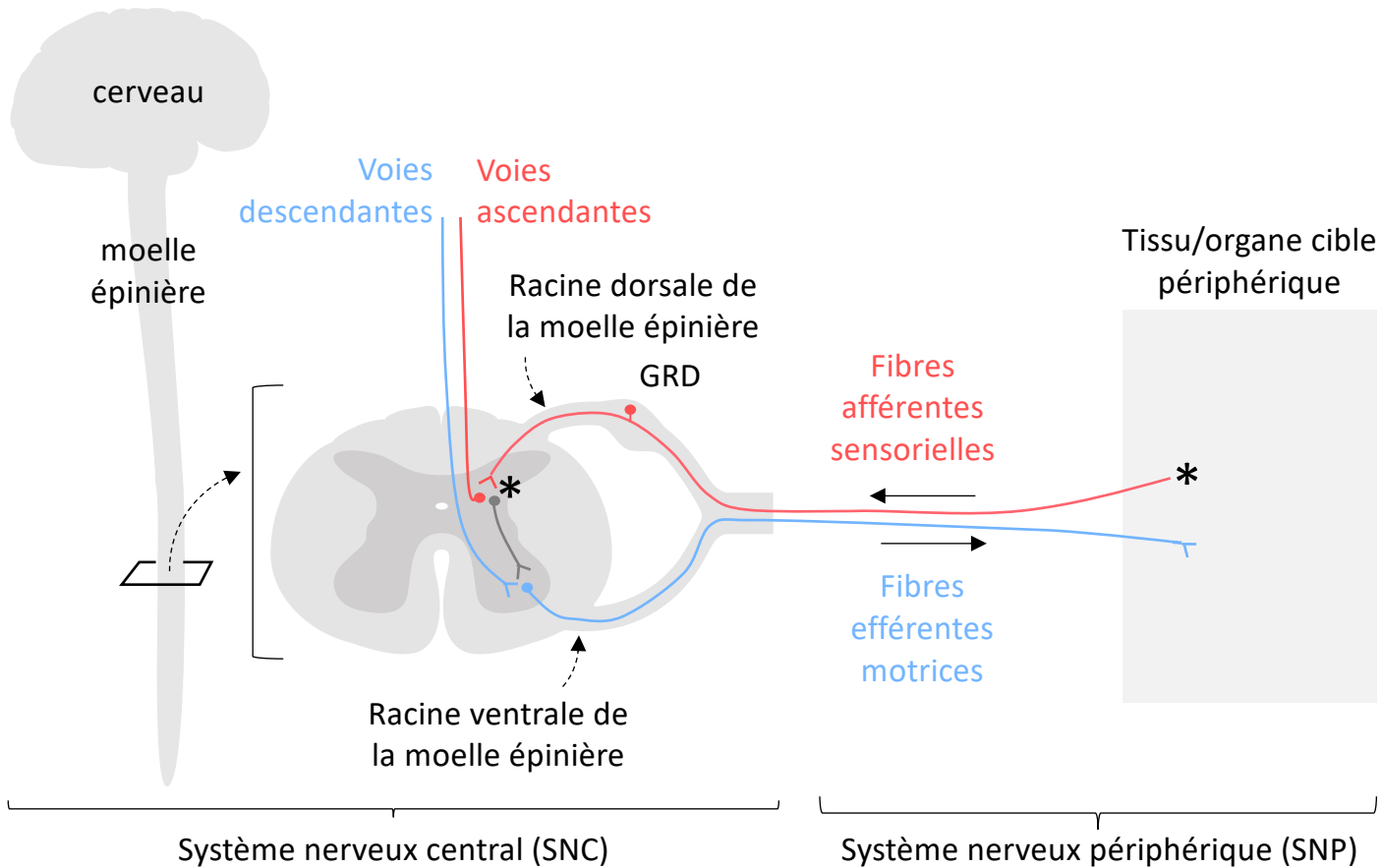


Figure 9. Organisation du système nerveux.

Système Nerveux Central (SNC) (cerveau et moelle épinière) et Système Nerveux Périphérique (SNP). Les fibres afférentes sensorielles acheminent les informations de la périphérie (tissu/organe cible) vers le SNC en passant principalement par la racine dorsale de la moelle épinière. Le neurone sensoriel étant bipolaire, il peut libérer des neurotransmetteurs au niveau du SNC et du SNP (indiqué par : *). Les fibres efférentes motrices acheminent l'information du SNC vers la périphérie (tissu/organe cible). GRD : ganglion de la racine dorsale.


Chapitre II. Innervation et Régénération

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre 1, la régénération d'un tissu, d'un organe, d'un membre ou encore d'un organisme entier après lésion, nécessite l'articulation d'éléments moléculaires et cellulaires. Parmi les éléments clefs, figure le système nerveux (SN). Il est un des premiers à détecter la blessure et initie les différentes phases de mise en place de la régénération. Nous allons dans cette partie présenter l'organisation de ce SN ainsi que les différentes études démontrant son implication dans les processus de régénération, chez les invertébrés jusqu'aux mammifères adultes.

I Organisation du système nerveux

Le SN est un système de communication extrêmement complexe impliqué de manière substantielle dans le contrôle des fonctions vitales de l'organisme. Il se développe à partir de régions spécialisées du neuro-ectoderme pendant la gastrulation. Les différentes structures anatomiques du SN sont classiquement subdivisées en deux, selon qu'elles appartiennent au SN central (SNC) ou au SN périphérique (SNP). Constitué du cerveau et de la moelle épinière, le SNC représente le lieu d'intégration des informations périphériques ; il permet ainsi leur analyse, leur interprétation et l'initiation de réponses (comportementales et/ou viscérales) adaptées. Le SNP comprend les parties du SN qui sont extérieures au cerveau et à la moelle épinière et inclut les nerfs crâniens et spinaux. Dans un environnement en perpétuel changement, ce SNP permet la perception d'informations internes et externes à l'organisme, grâce aux voies afférentes dites « sensorielles », permettant la remontée d'informations de la périphérie vers le SNC. D'autre part, les voies efférentes dites « motrices » acheminent les réponses du SNC vers les tissus cibles en périphérie⁹¹. La complémentarité entre le SNP afférent et efférent permet à l'organisme de s'adapter aux stimuli internes et externes et de fonctionner de façon optimale dans les nouvelles conditions (Figure 9).

Chez les animaux les plus simples, le SN est formé de quelques centaines de neurones plus ou moins spécialisés et répartis de manière assez diffuse dans la totalité de l'organisme. Au cours de l'évolution, le SN se complexifie fortement, avec des neurones en nombre de plus en plus important, qui s'organisent en plexus, ganglions, réseaux etc et assurent des fonctions de plus en plus spécialisées. Nous présenterons donc dans le paragraphe suivant, les grands traits de l'organisation du SN, en se basant sur celle des vertébrés.

A

 Fibres $A\alpha$ et $A\beta$

Myélinisées

Gros diamètre : 8 à 20 μm

Proprioception : lumière / toucher


 Fibres $A\delta$

Légèrement myélinisées

Diamètre moyen : 4 μm

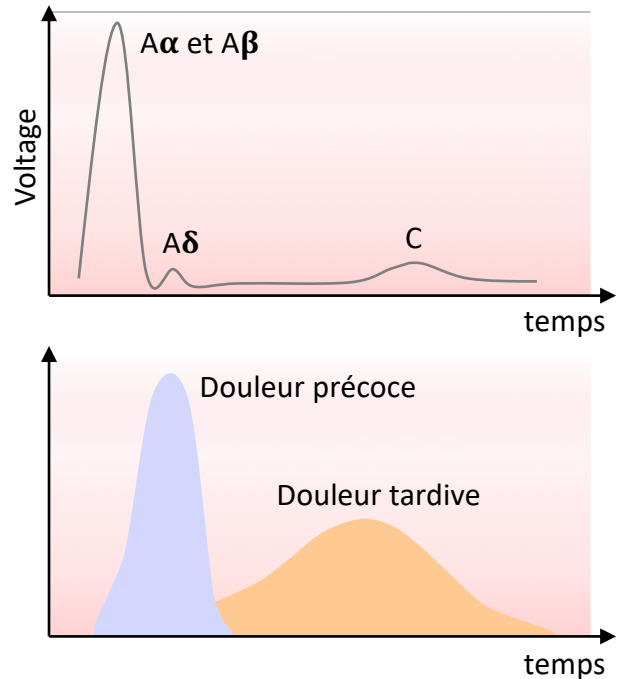
Nociception : mécanique / chimique / thermique


 Fibres C

Non myélinisées

Petit diamètre : 0,5 μm

Nociception : mécanique / chimique / thermique

B**Figure 10. Les fibres sensorielles afférentes.**

(A) Présentation des différents sous-types de fibres nerveuses sensorielles du système nerveux périphérique : $A\alpha$ et $A\beta$; $A\delta$ et C. (B) Vitesse de transmission de l'information par les différents sous-types de fibres sensorielles après un stimulus douloureux (haut), générant une perception douloureuse rapide ou plus tardive (bas). (Adapté de Julius et coll., 2001).

A Le système nerveux périphérique afférent ou sensoriel

1 Les neurones sensoriels

Les neurones sensoriels se mettent en place au cours du développement à partir des cellules des crêtes neurales. Celles-ci sont exposées à une multitude de signaux, de façon différentielle dans le temps et l'espace, ce qui génère entre autres, différents sous-types de fibres nerveuses sensorielles^{92,93}. Tous les neurones sensoriels sont bipolaires, ils comprennent deux axones se projetant respectivement vers le SNC d'un côté et vers l'organe/tissu cible en périphérie de l'autre côté (Figure 9). Ils peuvent donc libérer des neurotransmetteurs au niveau central (moelle épinière, cerveau) et au niveau périphérique (tissu cible).

Les neurones sensoriels permettent à l'organisme de percevoir les stimuli externes (lumière, sons, odeurs, goûts, pression et température) et internes (stimuli chimiques, thermiques, mécaniques)^{92,94}. Chaque sous-type de fibres nerveuses sensorielles possède des caractéristiques moléculaires propres, lui permettant de répondre à un ou plusieurs types de stimuli. Ces fibres sensorielles ont des vitesses de conduction de l'influx nerveux variables, cette vitesse étant dépendante du diamètre de l'axone et de la présence ou non de gaine de myéline.

On distingue ainsi des fibres de type C, A δ , A α et A β (Figure 10A). Les fibres C sont de petit diamètre (0,5 μ m) et majoritairement non myélinisées. Elles sont donc à conductance lente. Ces fibres C sont principalement sensibles aux stimuli intenses douloureux et sont appelées « nocicepteurs ». Dans une moindre mesure, certaines fibres C sont sensibles au toucher et à la lumière mais dans une gamme de stimuli dits « inoffensifs ». Les fibres A δ sont de diamètre moyen (4 μ m) et peu myélinisées. Étant sensibles aux stimuli intenses douloureux, ce sont aussi des nocicepteurs. Enfin, les fibres A α et A β sont des fibres de gros diamètre (8 à 20 μ m respectivement) et myélinisées. Ce sont donc les fibres qui conduisent les informations sensorielles le plus vite. Elles sont spécifiques d'un stimulus sensoriel donné (mécanique, thermique, lumineux...) et possèdent des seuils d'activation faibles.

Suite à une agression entraînant une rupture de l'intégrité tissulaire, les nocicepteurs sont très probablement en « première ligne », puisqu'impliqués dans la détection de divers stimuli générés localement et signalant un « danger ».

2 Les nocicepteurs

i Neuro-anatomie et différents sous types de nocicepteurs

La nociception est le processus par lequel une stimulation thermique, mécanique ou chimique intense est détectée par une sous-population de fibres nerveuses sensorielles spécialisées appelées nocicepteurs^{92,93,95}.

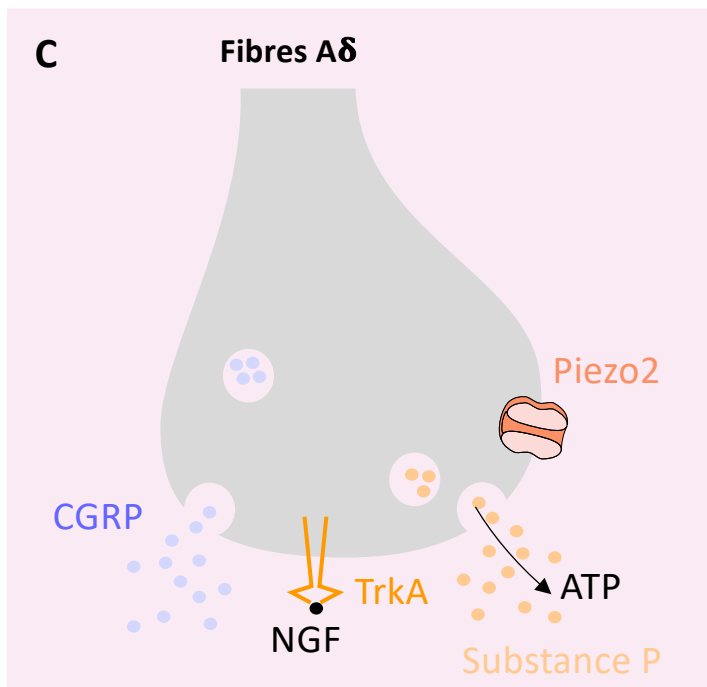
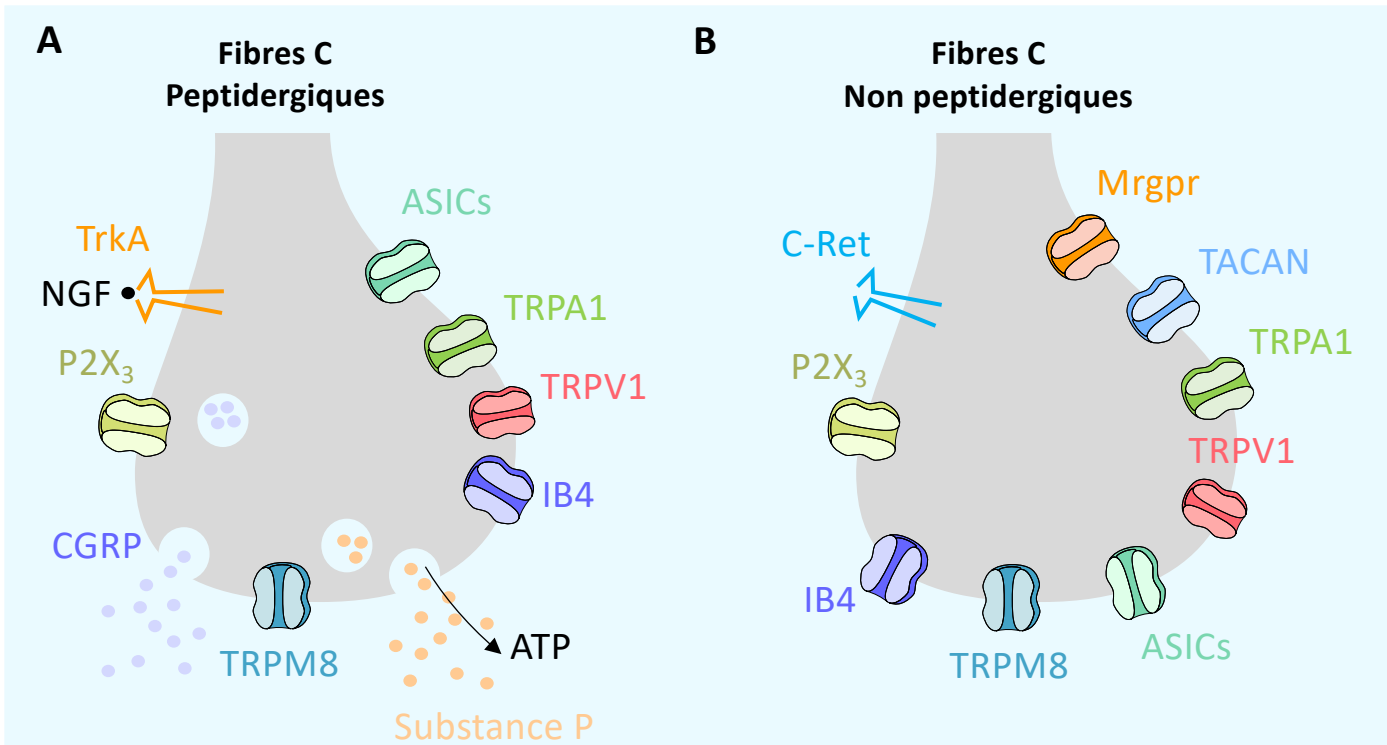


Figure 11. Signatures moléculaires des nocicepteurs.

(A) Les fibres C peptidergiques sécrètent de la substance P et du CGRP. Elles portent les récepteurs TrkA, P2X₃, TRPM8, IB4, TRPV1, TRPA1 et ASICs. (B) Les fibres C non peptidergiques portent les récepteurs c-Ret, P2X₃, IB4, TRPM8, ASICs, TRPV1, TRPA1, TACAN et Mrgpr. (C) Les fibres Aδ peuvent sécréter de la substance P et du CGRP et portent les récepteurs TrkA et Piezo2.

ASICs : acid sensing ion channels, CGRP : calcitonin gene related peptide, IB4 : isolectine B4, Mrgpr : Mas-related G-protein coupled receptor, NGF : neural growth factor, P2X₃ : purinergic receptor, TH ; tyrosine hydroxylase

TH ; tyrosine hydroxylase, TrkA : tyrosine receptor kinase A, Trpa1 : transient receptor potential cation channel subfamily A member 1, Trpm8 transient receptor potential cation channel subfamily M member 8, Trpv1 : transient receptor potential cation channel subfamily V member 1. (Adapté de Pichon et coll. 2014).

Comme énoncé dans le paragraphe ci-dessus, il existe deux classes majeures de nocicepteurs : les fibres C et les fibres A δ .

Les fibres de type C sont spécialisées dans le relais de douleurs diffuses, secondaires et plutôt lentes (Figure 10B). Elles sont hétérogènes et dites polymodales car elles répondent à différents types de stimuli^{95,96}. Certaines sont activées à la fois par des stimuli thermiques et mécaniques intenses, d'autres le sont uniquement par des stimuli mécaniques intenses⁹⁷ et d'autres encore, uniquement par des stimuli chimiques notamment produits lors d'une réponse inflammatoire (par exemple la bradykinine ou le médiateur lipidique pro-inflammatoire prostaglandine E2 ; PGE₂). Les fibres A δ , elles, relaient des informations nociceptives aiguës, très localisées et immédiates (Figure 10B). Parmi les fibres A δ nous retrouvons deux principales classes : les fibres de type I qui sont des nocicepteurs mécaniques et thermiques à seuil de détection élevé (elles détectent par exemple des températures supérieures à 53°C), et les fibres de type II qui ont un seuil de sensibilité plus bas.

Les axones « centraux » des fibres sensorielles nociceptives projettent de manière structurée dans la moelle épinière au niveau des « laminae ». Ces « laminae » sont des couches dans lesquelles on trouve les terminaisons synaptiques de populations spécifiques de neurones sensoriels. Au niveau des « laminae » I et V convergent les informations nociceptives véhiculées par les fibres A δ et certaines fibres C. Les neurones dont le corps cellulaire se trouve dans ces 2 régions constituent la voie majeure de remontée de ces informations vers le cerveau.

ii Signatures moléculaires des nocicepteurs

La caractérisation moléculaire des nocicepteurs révèle une très grande hétérogénéité en termes de neurotransmetteurs, de canaux membranaires ou encore de récepteurs membranaires à des facteurs de croissances et hormones⁹³.

Les fibres de type C sont majoritairement des fibres qui sécrètent des neuropeptides tels que le CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) et la substance P. Comme dans beaucoup de neurones, les vésicules synaptiques de ces nocicepteurs renferment de l'ATP, qui peut donc être aussi libéré par les fibres C, en plus des peptides. Ces fibres expriment notamment le récepteur TrkA, récepteur de forte affinité du NGF (Nerve Growth Factor) (Figure 11A). D'autres fibres de type C, « non peptidergiques » (immuno-négatives pour le CGRP et la Substance P), se distinguent des fibres de types C « peptidergiques » notamment par l'expression du récepteur c-Ret au GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor), des récepteurs couplés aux protéines G de la famille des Mrgpr⁹⁸ ainsi que du mécanorécepteur TACAN⁹⁹ (Figure 11B). Le/les neurotransmetteurs libérés par cette sous-population de fibres C n'est/ne sont pas encore identifié(s). Les nocicepteurs de manière générale peuvent également être distingués sur la base de l'expression différentielle de canaux ioniques qui leur confère

Système nerveux périphérique efférent

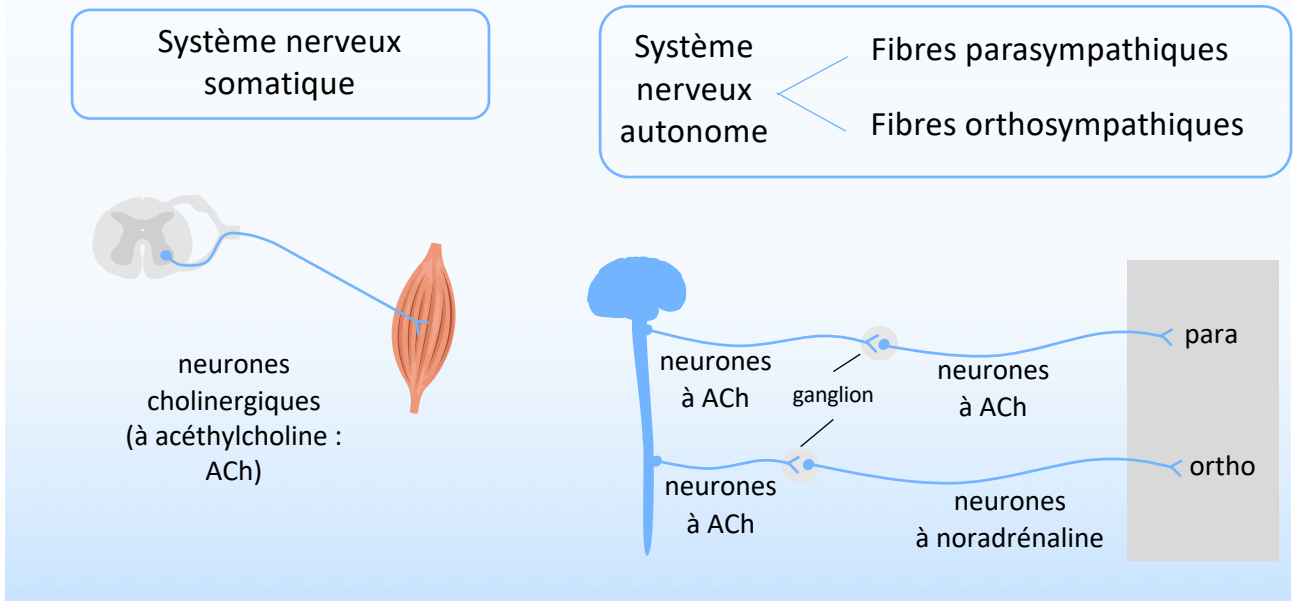


Figure 12. Système nerveux périphérique efférent.

Le SNP efférent est divisé en deux : le système nerveux somatique composé de neurones cholinergiques qui innervent les muscles squelettiques, et le système nerveux autonome composé de fibres orthosympathiques et parasympathiques qui innervent les viscères. Les neurones pré-ganglionnaires des fibres ortho- et parasympathiques sont cholinergiques. Les neurones post-ganglionnaires des fibres orthosympathiques sont noradrénergiques tandis que les neurones post-ganglionnaires des fibres parasympathiques sont cholinergiques. Ach : Acétylcholine, ortho : Orthosympathique, para : Parasympathique, SNP : Système Nerveux Périphérique.

une sensibilité spécifique à un stimulus : TRPV1 (chaleur), TRPM8 (froid), ASICs (acidité), TRPA1 (composé chimique, par exemple l'éthanal)¹⁰⁰.

Les fibres A δ sont des nocicepteurs sensibles à différents types de stimuli (thermiques, mécaniques) et peuvent être subdivisées en 2 sous-groupes selon leurs seuils d'activation, sur la base d'expériences d'électrophysiologie : Les fibres A δ à faible seuil d'activation (LTMs pour Low Threshold Mechanoreceptors) et les fibres A δ à seuil d'activation élevé (HTMs pour High Threshold Mechanoreceptors)¹⁰¹. Seules les fibres A δ -HTMs sont considérées comme des nocicepteurs¹⁰¹. 50% d'entre elles sécrètent de la Substance P et un peu plus de 40% d'entre elles sécrètent du CGRP. Jusqu'à présent, les études s'intéressant aux récepteurs portés par les nocicepteurs A δ , ont permis d'identifier entre autre le récepteur TrkA et le canal ionique sensible aux déformations mécaniques Piezo2¹⁰² (Figure 11C).

B Le système nerveux périphérique efférent ou moteur

Le SNP efférent ou « moteur » est subdivisé en deux : le SN somatique et le SN autonome (Figure 12).

1 Le système nerveux somatique

Le SN somatique innerve les muscles squelettiques et est responsable des mouvements conscients et volontaires, de nos jambes et bras par exemple. Il est formé de motoneurones cholinergiques dont le corps cellulaire est localisé dans la corne ventrale de la moelle épinière, principalement. L'acétylcholine (ACh) libérée au niveau des jonctions neuromusculaires, entraîne la contraction musculaire après sa fixation sur les récepteurs nicotiques (Figure 12). L'activation de ces motoneurones est sous le contrôle de voies nerveuses descendantes prenant naissance dans le cortex moteur primaire.

2 Le système nerveux autonome

Le SN autonome, contrairement au SN somatique, régule le fonctionnement des viscères permettant le maintien de l'homéostasie. Les fibres nerveuses qui le composent, sont constituées de deux neurones consécutifs : un neurone préganglionnaire et un neurone postganglionnaire ; le passage de l'information de l'un à l'autre se faisant au niveau d'un ganglion. Le SN autonome est sous-divisé en SN orthosympathique (aussi appelé sympathique) et le SN parasympathique, qui se distinguent notamment par les neurotransmetteurs libérés par le neurone post-ganglionnaire au niveau du tissu/organe cible (Figure 12). Les fibres orthosympathiques libèrent de la Noradrénaline (NA) alors que les fibres parasympathiques libèrent de l'Ach¹⁰³. A noter, que les neurones post-ganglionnaires du

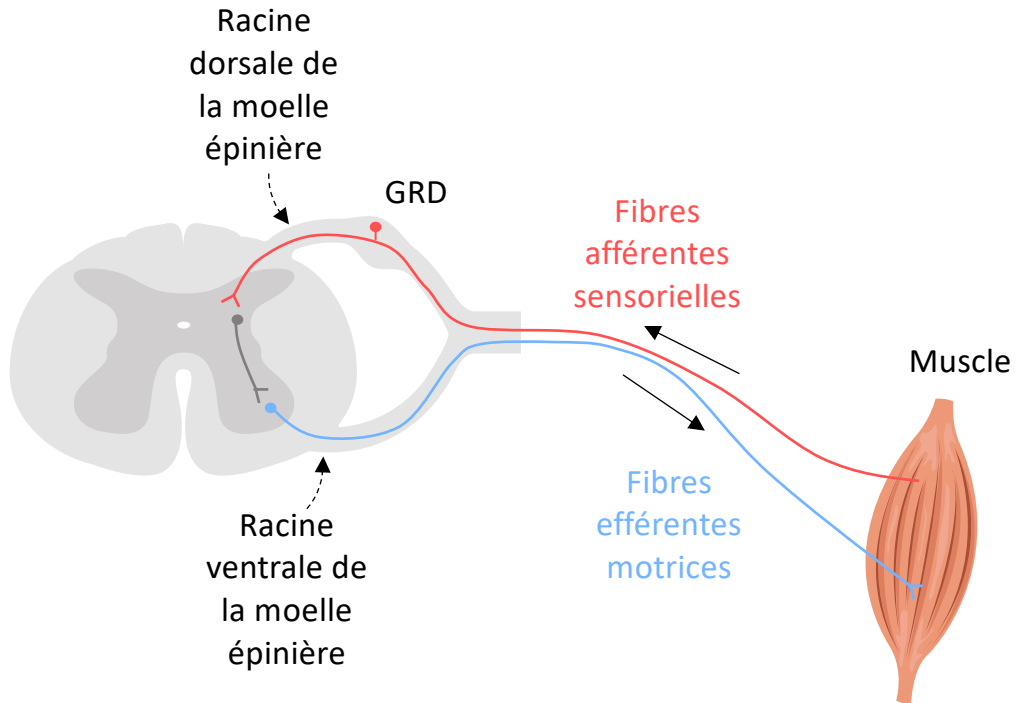


Figure 13. Arc réflexe polysynaptique.

Exemple d'un réflexe impliquant le muscle squelettique. L'arc réflexe fait intervenir une fibre afférente sensorielle sensible à l'étirement du muscle, qui rejoint la moelle épinière par la racine dorsale, et une fibre efférente motrice qui émerge de la moelle épinière par la racine ventrale et innerve le muscle cible. Dans le cas du réflexe polysynaptique, un ou plusieurs interneurons (ici en gris) font un relais entre la fibre afférente et la fibre efférente au niveau de la substance grise de la moelle épinière (gris). GRD : Ganglion de la Racine Dorsale.

SN orthosympathique peuvent également libérer des neuropeptides comme le neuropeptide Y ou la somatostatine alors que les fibres post-ganglionnaires du SN parasympathique peuvent sécréter du neuropeptide Y ou du CGRP¹⁰⁴. Dans les deux sous-divisions du SN autonome, le neurone pré-ganglionnaire est cholinergique.

C Les boucles sensori-motrices

L'activation d'une fibre nerveuse efférente (somatique ou autonome) résulte soit de la mise en jeu d'un arc réflexe local, soit de l'intégration d'une ou plusieurs informations sensorielles au niveau du cerveau.

L'arc réflexe permet un traitement de l'information « localement » (*i.e* ne passant pas par le cerveau) et met en jeu une communication entre un neurone sensoriel et un neurone moteur (Figure 13). Cette communication est alors extrêmement rapide et est automatique (elle échappe à la conscience). Le réflexe le plus simple ne fait intervenir qu'une seule synapse directement entre la fibre sensorielle et la fibre motrice ; on parle alors de réflexe monosynaptique comme dans le cas du réflexe conduisant à l'extension du genou¹⁰⁵. La fibre sensorielle rejoint la moelle épinière par la racine dorsale et fait synapse indirectement sur le neurone moteur dont l'axone sort de la moelle épinière par la racine ventrale. Il existe aussi des réflexes polysynaptiques, mettant en jeu plusieurs synapses en raison de la présence d'un ou plusieurs interneurons situés entre la fibre afférente sensorielle et la fibre efférente motrice (Figure 13).

A côté de ces réflexes mono- et polysynaptiques, de multiples informations sensorielles peuvent être intégrées au niveau cérébral après avoir emprunté des voies ascendantes distinctes et plus ou moins longues. De cette intégration découlent une ou plusieurs commandes motrices qui sont alors acheminées vers des neurones moteurs localisés à différents étages du SNC, par des voies descendantes souvent multiples et complexes, que nous ne développerons pas dans cette introduction.

Après avoir fait état des différents sous types de fibres composant le SNP, de leur anatomie, des facteurs sécrétés par ces dernières ainsi que de leurs fonctions associées, nous allons nous intéresser à l'implication du SNP au cours des processus de réparation tissulaire.

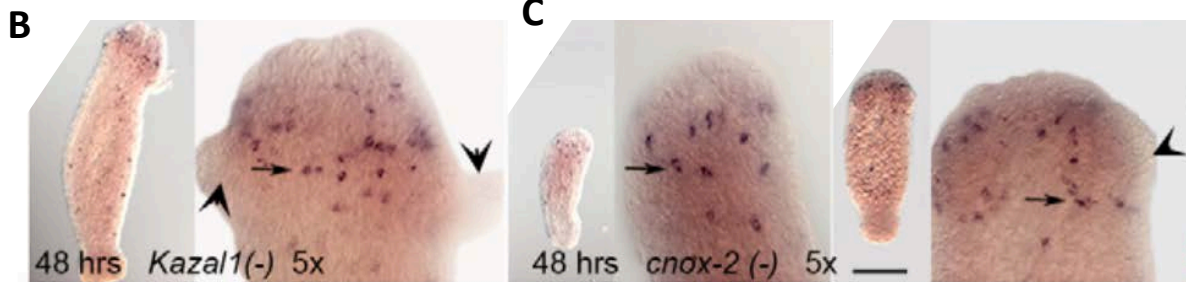
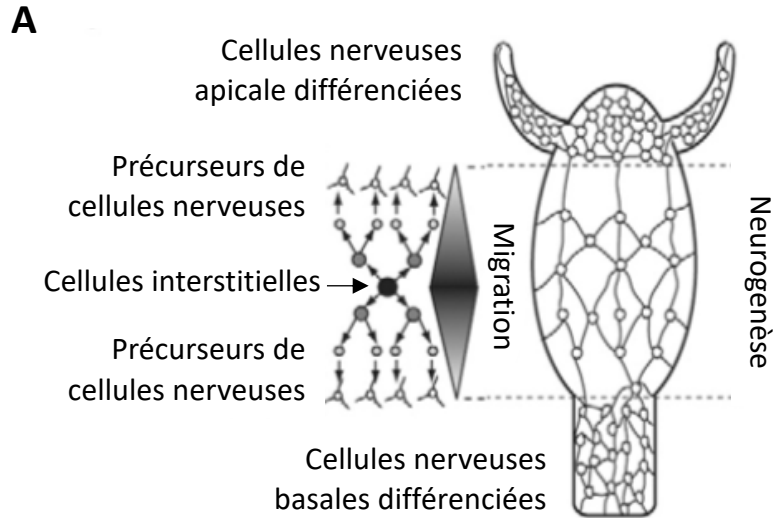
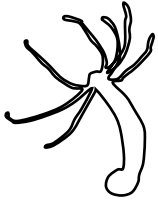


Figure 14. Système nerveux et régénération de l'hydre.

(A) Présentation du système nerveux de l'hydre. Au cours de la croissance de l'hydre, les cellules souches interstitielles se différencient en précurseurs de cellules nerveuses qui elles-mêmes se différencient en cellules neuronales qui se localisent au niveau de la tête et du pied. (B) Régénération de l'hydre après amputation en condition contrôlée (ARN interférant *Kazal1*) (Les têtes de flèches indiquent les zones en cours de régénération) (C) Absence de régénération de l'hydre après injection d'un ARN interférant dirigé contre *Cnox2* (C) (*Miljkovic et coll., 2007*).

II Le système nerveux contrôle la régénération chez les espèces non mammaliennes

A Ce que nous apprennent les invertébrés

1 L'hydre

L'hydre est le métazoaire le plus simple possédant un SN. Celui-ci est diffus et organisé sous forme d'un réseau dérivant des cellules interstitielles majoritairement d'origine ectodermique¹⁰⁶ (Figure 14A). Il contient deux types cellulaires distincts que sont les mécanorécepteurs sensoriels aussi appelés nématocytes et les neurones à synapse classique¹⁰⁷. Pour étudier l'importance de l'innervation au cours des processus de régénération, les deux modèles de lésion les plus communément utilisés chez l'hydre ont été i) la section transversale du corps de l'hydre au milieu de la partie gastrique (donc une section du corps) et ii) la section de la tête (partie haute du corps).

Des outils pharmacologiques comme la colchicine ou l'hydroxyurée permettent l'élimination des cellules interstitielles entraînant, entre autres, l'élimination du réseau nerveux. On obtient alors une hydre dite « épithéliale »¹⁰⁸. L'amputation de la tête ou du corps d'une hydre « épithéliale » (dépourvue de cellules nerveuses) entraîne un retard dans la régénération^{6,109}. Ce retard (et non l'absence totale) de régénération des hydres « épithéliales » est expliqué par une redondance cellulaire : selon ce modèle, les cellules épithéliales seraient capables de se transdifférencier en cellules interstitielles et de restaurer ainsi les capacités de régénération de la tête et du corps de l'Hydre^{110,111}. Plus récemment il a été montré que la régénération de l'hydre est orchestrée par *Cnox-2* (un gène homéobox), qui permet i) la différenciation des cellules interstitielles en cellules neurales et ii) la prolifération de ces cellules nerveuses lors des étapes précoces de la régénération de la tête¹⁰⁹. L'utilisation d'un ARN interférant codant pour *Cnox-2*, induit un retard de régénération de la tête après amputation, comme chez une hydre « épithéliale » (Figure 14B et 14C).

Ainsi, les travaux réalisés chez l'hydre suggèrent que les progéniteurs neuraux, les cellules neurales et les gènes homéobox jouent un rôle crucial au cours des processus de régénération.

2 Le ver planaire

Les planaires sont parmi les animaux les plus simples possédant un SNC et un SNP. Leur SNC est formé d'un cerveau antérieur (aussi appelé ganglion céphalique) et d'une paire de cordons nerveux en position ventrale innervant l'intégralité du vers le long de l'axe antéro-postérieur^{112,113} (Figure 15A). Les cellules nerveuses composant le SNC du vers planaire ont des morphologies très variables et peuvent être divisées en deux groupes distincts : les cellules nerveuses ganglionnaires, retrouvées au centre du ganglion céphalique et les cellules nerveuses à granules retrouvées en périphérie du ganglion

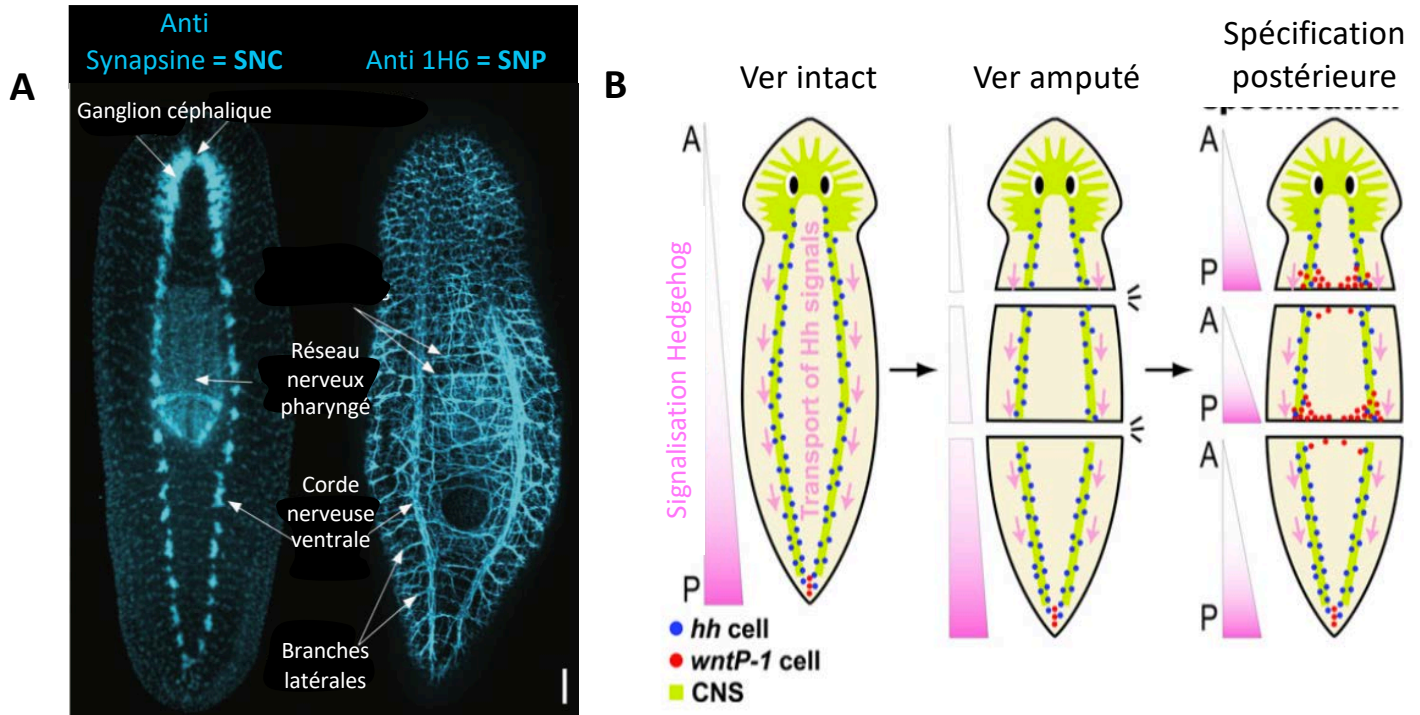


Figure 15. Système nerveux et régénération du ver planaire.
 (A) Les synapses des neurones sont marquées à l'aide de la synapsine, mettant en évidence les ganglions céphaliques du cerveau, les cordons nerveux ventraux, les branches latérales, et le réseau nerveux pharyngé. Le système nerveux périphérique y compris les axones, s'étendant à travers les cordons nerveux ventraux, sont marqués à l'aide de l'anticorps 1H6. Barre d'échelle= 200 μ m. (B) La corde nerveuse ventrale du ver planaire est une source majeure d'Hedgehog (Hh) nécessaire pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur au cours des processus de régénération (Yazawa *et coll.*, 2009).
 A : antérieur, CNS : système nerveux central, P : postérieur. SNC : système nerveux central, SNP : système nerveux périphérique.

céphalique¹¹⁴. En plus du SNC, des plexus nerveux constituant le SNP sont retrouvés autour du système digestif, des muscles, des organes reproducteurs ou encore du pharynx¹¹⁵. Ces plexus sont diffus et composés de fibres sensorielles et motrices.

L'une des caractéristiques du ver planaire est sa capacité à régénérer « à l'infini », quelle que soit la zone ou région d'amputation. Comme précisé dans le chapitre 1, ceci est majoritairement dû à la présence de morphogènes et de néoblastes, graduellement présents le long de l'axe antéro-postérieur qui permettent i) de maintenir cet axe et ii) d'orienter correctement la régénération du ver (par exemple, qu'une tête repousse à l'endroit où la tête se trouvait avant amputation)¹¹⁶.

De rares études expérimentales s'intéressent à l'importance et l'implication du SN au cours des processus de régénération du ver planaire. Oviedo et coll. ont pu montrer qu'après perturbation de la position des cordons nerveux, le ver planaire régénère de façon anormale, engendrant la formation de têtes ectopiques, de pharynx et protubérances anormales au niveau des différentes zones d'amputation le long de l'axe antéro-postérieur¹¹⁶. Il est intéressant de noter qu'ils obtiennent le même type de résultat lorsque la communication entre les cellules *via* les jonctions GAP communicantes est bloquée à l'aide d'un agent pharmacologique. Les auteurs en concluent que la présence de cordons nerveux en position ventrale et/ou la présence de jonctions communicantes sont nécessaires pour que le blastème reçoive des informations moléculaires lui permettant d'orienter la régénération dans l'espace.

Parmi les molécules impliquées dans le maintien de l'axe antéro-postérieur, Wnt et Hedgehog (Hh) ont fait l'objet de nombreuses études que ce soit sur le développement ou la régénération du ver planaire¹¹⁷. Yazawa et coll. ont ainsi démontré que les cordons nerveux ventraux sont une source majeure de production de Hh le long de l'axe antéro-postérieur (Figure 15B). Leurs résultats suggèrent que le rôle primordial du SN au cours des processus de régénération chez le ver planaire serait dépendant de l'activation des voies Wnt et Hh, bien qu'aucune étude à ce jour ne l'ait clairement mis en évidence.

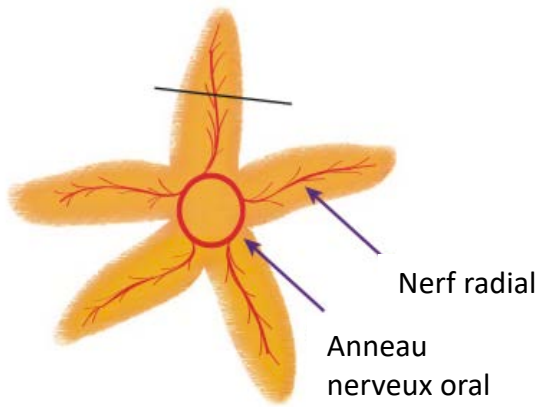
En conclusion, il apparaît que chez le ver planaire, comme chez l'hydre, un SN fonctionnel est requis pour permettre la régénération après amputation. Cette nécessité d'avoir un SN fonctionnel semble notamment dépendante du fait que les voies de signalisations Wnt et Hh, qui maintiennent l'axe antéro-postérieur, soient majoritairement exprimées au niveau des cordons nerveux en position ventrale.

3 L'étoile de mer

On peut diviser le SN de l'étoile de mer en deux parties. Un SN dit profond (ou hyponeural) de type moteur¹¹⁸, comprenant les nerfs de Lange et les nerfs latéraux, et un SN superficiel (oral), de type

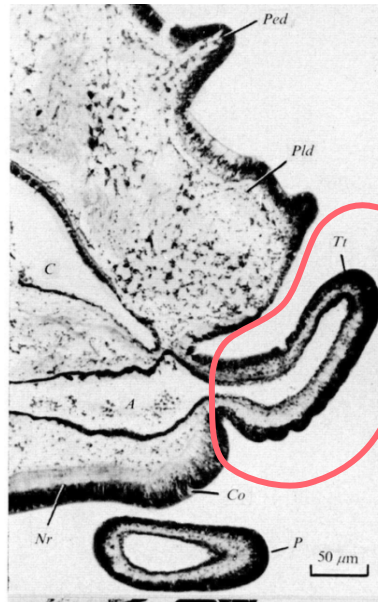


A



B

Non déervée



Déervée



Figure 16. Système nerveux et régénération de l'étoile de mer.

(A) Système nerveux sensoriel de l'étoile de mer incluant un anneau nerveux oral duquel émanent les 5 nerfs radiaux des bras. (Image : Kumar et coll., 2011). (B) La régénération des tentacules au niveau des bras (entourées en rouge) est inhibée après dénervation par irradiation du nerf radial (Huet 1975).

sensoriel¹¹⁹, comprenant un anneau nerveux autour de l'orifice oral d'où rayonnent cinq nerfs radiaux innervant chacun des 5 bras (Figure 16A). Il est important de noter que la plupart des expériences de dénervation chez l'étoile de mer concernent les nerfs radiaux (appartenant au système dit « sensoriel »).

Il a initialement été observé qu'après amputation d'un bras, la régénération de ce dernier se déroule de manière concomitante à la régénération du nerf radial innervant ce même bras. La suppression de ce nerf avant l'amputation du bras inhibe complètement la régénération¹²⁰ (Figure 16B). En effet, le nerf radial est indispensable à la différenciation des cellules de type mésenchymateux ainsi qu'à la croissance et au maintien du blastème. Bien que l'importance de la présence d'un SN fonctionnel lors de la régénération chez l'étoile de mer ait fait l'objet de nombreuses observations macroscopiques, les mécanismes moléculaires à l'origine de cette dépendance restent peu étudiés. Une étude rapporte que, comme pour l'hydre, l'expression d'un gène homéobox, *ArHox1*, est retrouvée au niveau du nerf radial en condition basale et est augmentée après une lésion du bras de l'étoile de mer. Les auteurs suggèrent que cette expression d'*ArHox1* permettrait d'induire les processus de dédifférenciation et de prolifération cellulaire durant la régénération du bras¹²¹.

De l'hydre à l'étoile de mer, les nombreuses études s'intéressant au rôle du SN nous permettent d'en apprécier le rôle au cours des processus de régénération. L'implication dans ces processus des progéniteurs neuraux et des voies de signalisation Wnt et Hh, semble être conservée au cours de l'évolution, de même que les gènes de la famille des homéobox. Cependant, le manque d'outils, conjugué à l'éloignement des rangs taxinomiques entre les invertébrés et les vertébrés limite le parallèle entre les connaissances acquises chez ces invertébrés et ce qu'il se passe chez les vertébrés non mammaliens ou les mammifères, quant au rôle de l'innervation au cours des processus de régénération.

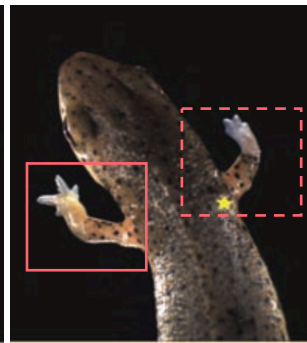
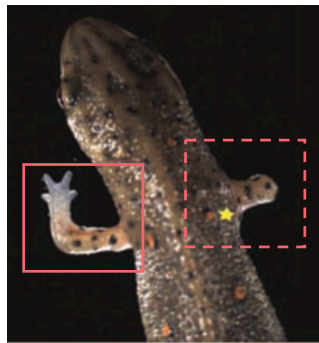
B Ce que nous apprennent les vertébrés non mammaliens.

Nous présenterons les données acquises à partir des modèles amphibiens avant celles acquises à partir du poisson zèbre. En effet, même si d'un point de vue phylogénique les amphibiens sont plus proches des mammifères que les poissons, ils constituent les modèles d'étude de la régénération par excellence avec le modèle de lésion de la patte chez la salamandre et ont été historiquement, étudiés plus tôt.



Sans apport de nAG
du côté du membre
dénervé

Avec apport exogène
de nAG du côté du
membre dénervé



Membre
amputé non
dénervé

Membre
amputé
dénervé

Figure 17. Système nerveux et régénération du membre chez la salamandre.

Régénération de la patte chez la salamandre 40 jours après amputation bilatérale, le membre de droite ayant été préalablement dénervé. Les animaux ont reçu (photo de droite) ou non (photo de gauche), une injection de nAG du côté du membre dénervé. L'étoile jaune indique l'emplacement de la dénervation chirurgicale (*Kumar et coll., 2007*).

1 Les Amphibiens

i Organisation et rôle du système nerveux au cours des processus de régénération

Chez les amphibiens, les structures nerveuses telles que le SNC et le SNP incluant les afférences sensorielles et les efférences motrices sont en beaucoup de points, similaires à celles retrouvées chez les mammifères (paragraphe A de ce chapitre). Chez les amphibiens, le modèle « classique » de lésion consiste en l'ablation du membre antérieur et plus exceptionnellement en l'ablation de la queue.

La nécessité de la présence de l'innervation pour permettre la régénération a été décrite pour la première fois grâce aux observations de Tweedy John Todd en 1823, chez la salamandre¹²². Il rapporte que suite à une dénervation chirurgicale du nerf sciatique, la salamandre perd sa capacité à régénérer son membre postérieur¹²². Il a fallu attendre presque un siècle, avec les travaux de Wolff et coll. en 1902, pour confirmer que la suppression des fibres nerveuses périphériques empêche la régénération du membre amputé chez le triton¹²³. Après ces travaux pionniers, il est désormais admis qu'un membre préalablement dénervé est incapable de régénérer après amputation, que ce soit chez la salamandre (Figure 17), l'axolotl ou le triton^{123,124,125,126,127,128,129}. Il existe néanmoins une situation exceptionnelle dans laquelle la régénération du membre ne nécessite pas la présence d'une innervation fonctionnelle : le membre aneurogénique¹³⁰. Au stade larvaire, le retrait d'une infime partie du tube neural de la salamandre conduit au développement d'un membre dépourvu de nerfs, dit « aneurogénique ». Dans ce cas-là, la régénération est indépendante du nerf.

ii Molécules clés de la régénération, d'origine nerveuse

Le newt anterior gradient (nAG) est un peptide identifié chez la salamandre, synthétisé et libéré par les fibres nerveuses. Il joue un rôle au cours du développement et est nécessaire à la régénération^{58,28}. Au cours du développement du membre, la mise en place des nerfs induit une diminution significative et progressive de la synthèse du nAG par les glandes dermales¹³¹. Une fois en place, les nerfs deviennent alors la source principale de nAG. La régénération du membre devient alors dépendante des nerfs. Dans le contexte du membre aneurogénique (membre dépourvu d'innervation), le nombre de glandes dermales exprimant le nAG reste élevé car non réprimé par la mise en place des nerfs, et permet ainsi une régénération indépendante des nerfs, grâce à la simple source de nAG par les glandes dermales. Après amputation d'un membre normal (non aneurogénique), une augmentation de l'expression du nAG est observée spécifiquement au niveau des cellules de Schwann entourant les axones des nerfs périphériques repoussant aux abords du moignon. L'électroporation d'un plasmide contenant la séquence d'ADN codante pour le nAG, au niveau du moignon préalablement dénervé, permet de restaurer l'expression du nAG au niveau de l'épithélium de fermeture (présenté dans le

chapitre 1) et d'induire à nouveau la régénération du membre (Figure 17). Le nAG réverse donc l'absence de régénération de la patte après dénervation. Le nAG agit entre autres, en se fixant sur Prod1 (qui est un acteur moléculaire clef de la mise en place du blastème, que nous avons présenté dans le chapitre 1)^{132,28}. Prod1, en activant la voie des MAPK, conduira à l'induction entre autres à l'activation de la MMP9, qui pourra alors dégrader la MEC pour la rendre plus permissive à la migration des cellules lors de la mise en place du blastème¹³³.

L'ensemble de ces données indique que l'expression de nAG par les nerfs est requise pour permettre l'expression du nAG par les glandes dermales de l'épithélium de fermeture et ainsi déclencher la régénération de la patte chez la salamandre. Au regard du rôle spectaculaire joué par nAG au cours des processus de régénération chez les amphibiens, la recherche d'une molécule équivalente chez les mammifères a mobilisé la communauté scientifique du domaine mais reste toujours d'actualité.

D'autres candidats moléculaires sécrétés par les fibres nerveuses parmi lesquels, la transferrine ou le Fibroblast Growth Factor (FGF), font également l'objet de quelques recherches.

La transferrine, protéine plasmatique permettant l'apport de fer aux cellules des vertébrés, est, elle aussi, nécessaire à la régénération du membre chez la salamandre et l'axolotl^{134,135}. Au cours des stades très précoces de régénération, une production de transferrine par les neurones vient compléter celle du foie qui diffuse à partir des capillaires au niveau du moignon. Ces deux sources fournissent une concentration de ce facteur suffisante pour maintenir la prolifération et la différenciation des cellules mésenchymateuses du blastème comme l'ont montré in vitro et in vivo Mescher et coll. en 1991¹³⁶. Lors d'une dénervation, l'apport vasculaire d'origine hépatique seul ne peut maintenir un niveau suffisant de transferrine et les cellules ne peuvent pas proliférer de manière adéquate pour former le blastème, rendant, d'une autre façon, la régénération dépendante des nerfs.

Une autre étude montre que le FGF produit par les nerfs chez l'axolotl est indispensable à l'activation du gène homéobox *Dlx-3*¹³⁷. Si le membre est dénervé avant amputation, la concentration de FGF détectée post-amputation s'effondre et donc l'activation de *Dlx-3* n'a pas lieu, ce qui entraîne l'absence de prolifération des cellules du blastème nécessaire à sa formation.

L'étude de la régénération chez les amphibiens a permis la découverte d'un nouveau facteur clef, le nAG, sécrété par les nerfs et indispensable à la régénération épimorphique du membre antérieur. D'autres acteurs moléculaires, aussi présents chez les mammifères, commencent à émerger chez ces espèces, comme la transferrine, le FGF, les gènes homéobox et il est très probable que d'autres molécules apparaissent encore dans le futur. Il reste évidemment, à hiérarchiser l'implication de ces molécules au cours de la régénération.

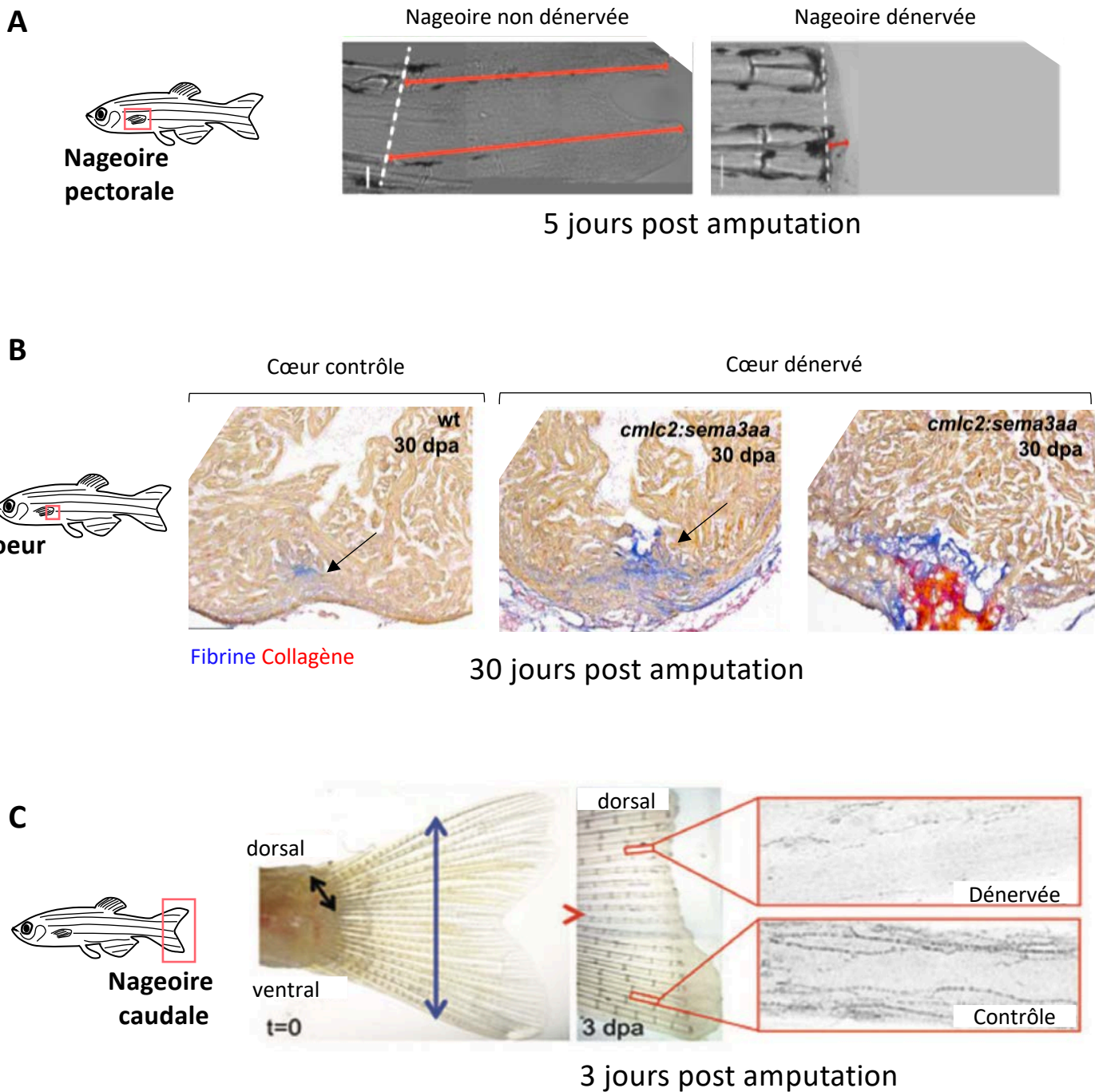


Figure 18. Système nerveux et régénération chez le poisson zèbre.

(A) Régénération de la nageoire pectorale du poisson zèbre 5 jours après amputation et dénervation ou non du plexus brachial innervant la nageoire (Simoes et coll., 2014). La partie régénérée est indiquée par les traits rouges. (B) Régénération de l'extrémité du cœur 30 jours après amputation chez des poissons zèbres contrôles ou transgéniques dont l'innervation cardiaque a été spécifiquement détruite (Animaux *cmlc2:sema3aa* : la sémaphorine3aa répulsive pour les nerfs, est surexprimée au niveau cardiaque) (Mahmoud et coll., 2015). (C) Régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre 3 jours après amputation et dénervation chirurgicale uniquement du côté dorsal (double flèche). dpa: jours post amputation. (Meda et coll., 2016).

2 Le poisson zèbre

Bien que le poisson zèbre soit plus éloigné des mammifères, leur utilisation dans le domaine de la régénération est croissante et commence à prendre le pas sur celle des modèles amphibiens. En effet, pour 1150 références publiées entre 1945 et 2020 sur la salamandre, on comptabilise 2200 références publiées entre 1991 et 2020 sur le poisson zèbre. Cette augmentation exponentielle des études sur Le poisson zèbre s'explique par la disponibilité d'un très large éventail d'outils moléculaires et cellulaires, faciles et rapides à mettre en œuvre.

En plus des similarités neuro-anatomiques avec les mammifères, bon nombre de facteurs de croissance et neurotransmetteurs libérés par le SN sont retrouvés chez le poisson zèbre^{138,139}. Comme beaucoup d'espèces capables de régénération spontanée, la régénération de la nageoire (caudale ou pectorale) ainsi que de l'extrémité du cœur est dépendante de l'innervation^{140,141,142}.

La dénervation chirurgicale du plexus brachial composé de fibres afférentes et efférentes, entraîne ainsi une inhibition de la régénération de la nageoire pectorale¹⁴³ (Figure 18A). Dans une autre étude s'intéressant à la régénération cardiaque, les auteurs ont utilisé un poisson zèbre transgénique, sur-exprimant la sémaphorine 3a au niveau cardiaque¹⁴¹. Cette surexpression inhibe la mise en place correcte du réseau nerveux cardiaque (le réseau résiduel représente environ 30% du réseau normal). Chez ces animaux, la régénération de l'extrémité du cœur est inhibée et laisse place à la formation d'un tissu cicatriciel caractérisé par la présence en grande quantité de fibrine et de collagène (Figure 18B). Dans cette même étude, les auteurs ont aussi procédé à une « dénervation » pharmacologique spécifique des fibres parasympathiques, en inhibant les récepteurs cholinergiques. Cette dénervation conduit à une diminution de la prolifération des cardiomyocytes, pouvant induire une inhibition de la régénération cardiaque, mais les auteurs n'ont pas poussé l'exploration jusque-là. Notons que ces auteurs observent également une diminution significative de l'expression des gènes de la réponse inflammatoire après suppression des fibres autonomes, ce qui pourrait aussi participer à une altération de la régénération cardiaque.

Enfin, l'équipe de Vríz et coll. montre que la dénervation chirurgicale de la nageoire caudale avant amputation entraîne la perte de régénération spontanée de cette dernière^{78,140} (Figure 18C). Le site d'amputation étant exclusivement innervé des fibres sensorielles, les auteurs suggèrent que seul ce type de fibres est nécessaire à la régénération de la nageoire caudale. Ils démontrent également qu'une production d'EAOs est indispensable à la régénération de la nageoire et que celle-ci est attribuée aux fibres sensorielles¹⁴⁰, plus précisément aux cellules de Schwann retrouvées autour des fibres sensorielles.

En conclusion chez le poisson zèbre, le SN apparaît de nouveau comme un élément indispensable à la régénération, notamment grâce à la sécrétion de différents facteurs. En revanche, seules deux études ont cherché à identifier le type de fibres nerveuses impliqués et arrivent à des conclusions différentes. Ces résultats suggèrent que la dépendance nerveuse des processus de régénération pourrait reposer sur un type de fibre différent selon la nature de l'organe/du tissu lésé. La nature des fibres requises pour permettre la régénération reste donc une question ouverte.

III Le système nerveux contrôle la réparation chez le mammifère

Les capacités de régénération tissulaire ayant été perdues au cours de l'évolution jusqu'à devenir quasiment nulle chez le mammifère adulte (chapitre 1), les modèles d'étude pour étudier le rôle de l'innervation au cours des processus de régénération chez ces vertébrés sont extrêmement limités ; les connaissances accumulées sur ce sujet le sont donc aussi. Ce n'est qu'à l'aide d'études portant sur les quelques espèces dotées de capacités de régénération spontanée et/ou sur les stades postnataux que des débuts de réponse, que nous développerons dans cette partie, peuvent être apportés. Les données relatives à l'implication des fibres nerveuses étant plus abondantes dans le cadre des processus de cicatrisation tissulaire chez le mammifère que dans le domaine de la régénération, nous nous intéresserons aussi à cet aspect-là.

A Le système nerveux contrôle la régénération au stade néonatal.

Une seule étude datant de 2015, permet d'apprécier le rôle de l'innervation au cours des processus de régénération cardiaque au stade post-natal chez la souris²⁸. En effet, dans cette étude (qui a aussi étudié le rôle de l'innervation chez le poisson zèbre et dont nous avons précédemment parlé), les auteurs montrent que la dénervation chirurgicale vagale du cœur ainsi que l'inhibition pharmacologique des récepteurs cholinergiques inhibent notamment la prolifération des cardiomyocytes¹⁴¹. Ces résultats suggèrent donc que l'innervation parasympathique *via* la libération d'acétylcholine est importante dans la régénération du cœur chez la souris au moins à un stage postnatal. Aucune autre étude connue à ce jour n'a confirmé ou infirmé ces résultats.

B Le système nerveux contrôle la régénération chez le mammifère adulte

1 Le foie

Les conséquences d'une dénervation sur la régénération compensatoire du foie à fait l'objet de plusieurs études¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Dans la plupart des cas, il s'agit d'une vagotomie (touchant le SN autonome)¹⁴⁴ et celle-ci inhibe la régénération du foie. Chez le rat, la dénervation par vagotomie bilatérale, préalablement à l'amputation partielle du foie, conduit à l'inhibition de la prolifération des

hépatocytes alors que la suppression de l'innervation splanchnique a l'effet inverse¹⁴⁶. Par ailleurs, une augmentation significative de la quantité de neuropeptide CGRP a été mesurée dans les jours qui suivent une hépatectomie¹⁴⁷, or les fibres sensorielles sont capables de libérer par leur extrémité périphérique, différents neuropeptides directement dans les tissus ; pourtant, aucune étude à l'heure actuelle, ne s'est intéressée à l'implication éventuelle de ces fibres sensorielles au cours des processus de régénération hépatique.

2 Le muscle

Les premières études s'intéressant à l'implication du SN au cours des processus de régénération musculaire remontent aux années 1960¹⁴⁸. Dans la série d'expériences menées par Mufti et coll. en 1977, la régénération du muscle gastrocnémien chez la souris a été évaluée après section des trois branches du nerf sciatique¹⁴⁹. Cette dénervation des fibres afférentes et efférentes innervant le muscle, n'affecte pas les phases précoces de la régénération de ce dernier. En revanche, les phases plus tardives de différenciation et de maturation des fibres musculaires sont complètement inhibées et la fonctionnalité du muscle n'est pas récupérée. Ainsi, l'absence d'innervation conduit à l'avortement du processus de régénération musculaire et conduit à la mise en place d'une fibrose caractérisée par une surexpression de TGF β 1 et à un dépôt excessif de collagène de type I^{150,151,152}. D'autres études s'intéressent au contrôle des cellules satellites (cellules souches musculaires) par les fibres nerveuses. Ces études montrent que la dénervation affecte la reconstruction tissulaire en diminuant drastiquement le pool de cellules satellites disponibles pour permettre la régénération¹⁵³. A ce jour, aucune cible moléculaire associée à l'innervation n'a été identifiée comme étant essentielle à la régénération musculaire chez le mammifère.

3 L'extrémité du doigt

La capacité de régénération de l'extrémité du doigt après amputation est le seul exemple de véritable régénération chez le rat et la souris adulte. Il permet d'apprécier le rôle crucial des nerfs périphériques puisqu'après dénervation, la régénération de cette partie du corps est retardée¹⁵⁴. Sur le plan mécanistique, les travaux de Takeo et coll. montrent une augmentation significative du facteur de croissance FGF2, trois semaines après une amputation de la phalange terminale de l'extrémité du doigt. Cette augmentation est inhibée chez les souris si le nerf sciatique a été retiré une semaine avant amputation. Par l'utilisation de plusieurs modèles de souris transgéniques, les auteurs proposent qu'après la lésion, la production de sémaphorine 5a par les cellules épithéliales de l'ongle stimule l'attraction et donc la repousse des nerfs. Cette ré-innervation déclencherait la surexpression de FGF2

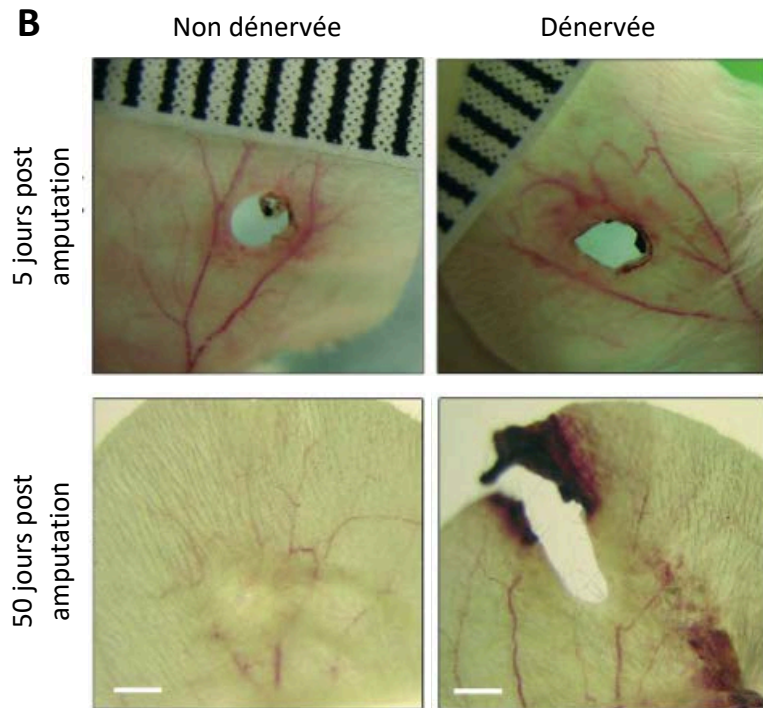
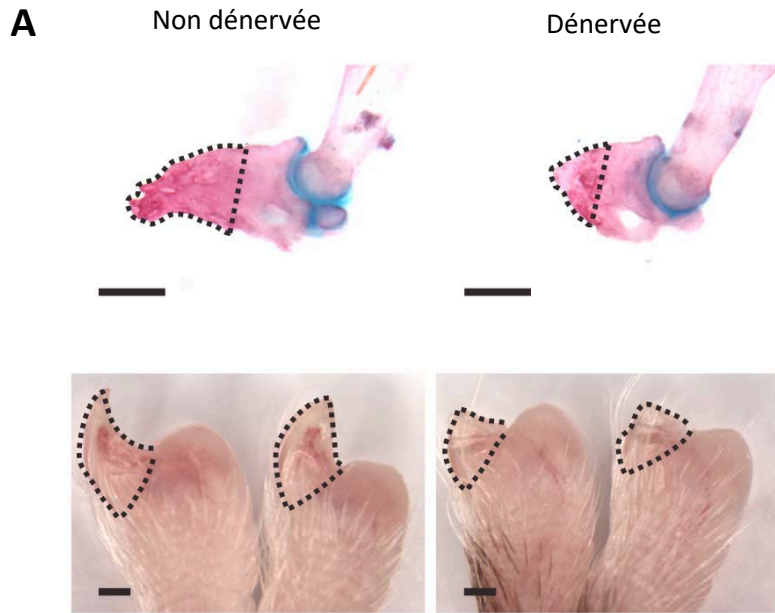


Figure 19. Système nerveux et régénération chez le mammifère adulte.

(A) Photos de la régénération de la phalange terminale du doigt, 4 semaines après amputation chez une souris préalablement dénervée ou non. Photos de l'os (images du haut) et de l'ongle (images du bas) (*Johnston et coll., 2016*). (B) Régénération de l'oreille chez la souris MRL/MpJ, 5 et 50 jours après amputation, et dénervation préalable ou non (*Buckley et coll., 2011*).

par les cellules épithéliales, et le FGF2, libéré, activerait la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en cellules osseuses $runx2^+$ ¹⁵⁵.

Johnston et coll. en 2016, ont mis en lumière un rôle des précurseurs de cellules de Schwann associées aux nerfs dans la régénération de l'extrémité du doigt chez la souris¹⁵⁶. Ils démontrent notamment, qu'après amputation, les précurseurs des cellules de Schwann immunopositifs pour Sox2 sécrètent du PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor-AA) et de l'oncostatine M (OSM) qui stimulent la prolifération des cellules souches mésenchymateuses formant le blastème. La dénervation chirurgicale ou l'élimination des précurseurs des cellules de Schwann à l'aide de souris transgéniques conduit au même résultat, à savoir l'absence de sécrétion de PDGF-AA et OSM par ces cellules et l'échec de la régénération de l'extrémité du doigt (Figure 19A). De manière intéressante, les auteurs suggèrent que la régénération ne soit finalement due qu'à la présence de cellules de Schwann autour des nerfs et à leur dédifférenciation.

Rappelons que ces mêmes cellules de Schwann sont à l'origine de la production i) de nAG, facteur indispensable à la régénération chez la salamandre⁵⁸ et ii) des EAOS indispensables à la régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre¹⁴⁰. C'est pourquoi l'implication des cellules de Schwann dans un contexte de régénération chez le mammifère mériterait de plus amples investigations.

4 La souris MRL

Seules deux études portant sur l'implication de l'innervation dans la régénération de l'oreille ont été menées chez la souris MRL à ce jour. Des travaux de 2012, basés sur des observations macroscopiques, montrent que la dénervation chirurgicale de l'oreille de la souris MRL empêche la formation d'une structure similaire à un blastème et inhibe la régénération⁸⁹ (Figure 19B). Les auteurs de cette étude suggèrent que la densité neuronale pourrait être un facteur déterminant pour permettre la régénération de l'oreille, la souris C57BL/6 incapable de régénération spontanée présentant significativement moins de nerfs aux abords de la lésion que la souris MRL⁸⁸. Néanmoins les auteurs de cette étude ne précisent pas les molécules potentiellement impliquées dans ces processus.

C Le système nerveux contrôle la cicatrisation chez le mammifère adulte

Comme présenté dans le chapitre 1, la cicatrisation se met en place aux dépens de la régénération chez le mammifère adulte après lésion d'un tissu ou d'un organe, ou ablation d'un membre. Cette réparation tissulaire fait l'objet de nombreuses études, et certaines se sont intéressées en particulier à l'impact d'une dénervation sur le « wound healing », c'est-à-dire sur la cicatrisation de la peau. Les tissus cutanés sont richement innervés, d'une part, par des fibres autonomes qui régulent le tonus vasculaire et l'activité des muscles pauciers, des adipocytes et des glandes (cutanées par exemple), et

d'autre part, par des fibres sensorielles (toucher, pression, température, somesthésie), parmi lesquelles des nocicepteurs^{157,158}.

Les premières observations permettant de mettre en lumière le rôle du SN au cours des processus de cicatrisation de la peau, font état d'un défaut de réparation cutanée chez des patients atteints de paraplégie ou quadriplégie après une compression de la moelle épinière¹⁵⁹. L'implication potentielle des fibres sensorielles nociceptives a particulièrement attiré l'attention de quelques équipes de recherche. Les premières expériences réalisées par Kjartansson et coll. en 1987 montrent que l'injection locale de CGRP après une lésion de la peau du dos chez le rat, entraîne une accélération significative de la fermeture de la plaie¹⁶⁰. Des résultats similaires ont été retrouvés en 1998 par l'équipe de d'Engin et coll. toujours chez le rat¹⁶¹. D'autres études rapportent que suite à une lésion cutanée, les fibres sensorielles activées engendrent la sécrétion de substance P et/ou de CGRP à l'origine d'une importante vasodilatation, qui pourrait prendre part aux processus de réparation post-lésionnel^{162,163}. Allant dans ce sens, les travaux de Carr et coll. montrent que la destruction des nerfs sciatique et saphène (nerf purement sensoriel) induit un retard dans la cicatrisation de la plaie indirectement *via* une atténuation des processus vasodilatateurs et inflammatoires¹⁶⁴. Il faut néanmoins attendre 2002 et les travaux de Peter G Smith et coll. pour apprécier les conséquences d'une destruction spécifique des fibres sensorielles nociceptives sur la réparation tissulaire. Cette dénervation sensorielle est réalisée à l'aide de la capsaïcine, molécule dérivée du piment et qui est un agoniste des canaux cationiques TRPV1 présents sur la plupart des nocicepteurs (Figure 11). Utilisée à forte dose, elle entraîne la mort des neurones TRPV1⁺ par excito-toxicité. Les auteurs montrent ainsi que la diminution significative du nombre de fibres CGRP⁺ entraîne un retard de réépithélialisation et donc de la fermeture de la plaie¹⁶⁵.

Plus récemment, une autre étude conduite avec un modèle assez similaire attribue le retard de fermeture de la plaie à une moindre sécrétion de substance P. L'administration de ce neuropeptide après dénervation permettant de restaurer une fermeture de la plaie semblable à celle observée chez des animaux non dénervés^{166, 167}.

Points à retenir :

Grâce aux nombreuses études chez les espèces non mammaliennes et aux quelques études menées chez les mammifères, nous pouvons retenir les points suivants :

- L'innervation est nécessaire à la régénération ; son absence entraîne un retard ou une absence de régénération du tissu/organe/membre ou organisme lésé.

- Plusieurs facteurs moléculaires d'origine nerveuse semblent jouer un rôle fondamental au cours des processus de réparation tissulaire, incluant la cicatrisation et la régénération. Parmi ceux-ci, on note des facteurs de croissances (nAG, PDGF-AA, oncostatine, FGF), des neuropeptides (substance P et CGRP), des gènes homéobox ou encore des molécules de signalisation telles que Wnt et SHh.

- Les approches de dénervation chirurgicale majoritairement utilisées, ne permettent pas, le plus souvent, de distinguer l'implication des fibres nerveuses efférentes de celle des fibres afférentes dans la régénération. Le sous type de fibres impliqué semble dépendre de la nature du tissu lésé et nécessite de plus amples études.

- Les cellules nerveuses dites « de soutien », comme les cellules de Schwann, jouent probablement un rôle important au cours des processus de régénération.

À noter que les mécanismes cellulaires étudiés dans ces études s'intéressent majoritairement à l'impact du SN sur le remodelage cellulaire, c'est-à-dire aux phases tardives de la régénération.

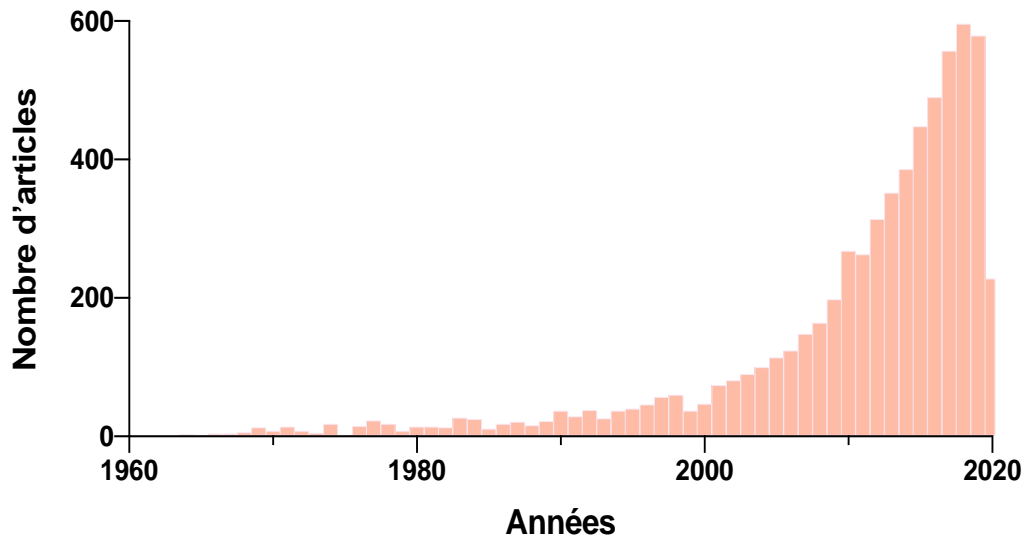


Figure 20. Publication d'articles scientifiques sur le thème « cellules immunitaires et régénération »
(Base bibliographique Pubmed, 1^{er} juillet 2020)

Chapitre III. Système immunitaire et Régénération

Les organismes vivants sont exposés tout au long de la vie à un large éventail de perturbations contre lesquelles ils doivent se défendre. Ils ont ainsi développé au cours de l'évolution, des systèmes spécialisés leur permettant de détecter les modifications de leur environnement et de s'y adapter. Parmi ces systèmes spécialisés, outre le SN présenté dans le chapitre 2, le système immunitaire (SI) assure un rôle prédominant. Il permet une surveillance permanente de l'organisme, et constitue la première ligne de défense suite à une agression qui peut être le fait d'un agent pathogène mais aussi d'une rupture de l'intégrité tissulaire. Il est donc logique de s'intéresser à lui dans un contexte de réparation tissulaire ; en témoigne le nombre grandissant d'études scientifiques sur son implication dans le domaine de la régénération (Figure 20).

Le SI est composé d'un large éventail de cellules appartenant à différents lignages et assurant des fonctions diverses. En réponse à une agression, le SI met en place, de manière quasi-immédiate une réponse inflammatoire qui va mobiliser différents types cellulaires sur une échelle de temps très variable. Certaines de ces cellules sont déjà sur le site de l'agression, d'autres vont devoir être recrutées et arriver par la circulation sanguine. En fonction des interactions qu'elles établissent avec les autres cellules qu'elles rencontrent, du SI ou du microenvironnement, la plupart de ces cellules ont la capacité de changer de phénotype (sécrétoire, métabolique, migratoire...), ce qui se traduit par des modifications de leurs marqueurs de surface. Une même cellule peut, ainsi, avoir des fonctions assez différentes voire opposées au cours de l'inflammation.

Dans une première partie, nous allons aborder l'organisation générale du SI et dans un second temps, nous présenterons les données de la littérature concernant son implication dans la réparation tissulaire.

I Organisation générale et rôles du système immunitaire

Le SI fonctionne comme un « tampon multi-organes ». En conditions physiologiques, il surveille l'organisme dans le but de maintenir l'homéostasie et à la suite d'une agression, il orchestre la mise en place d'une réponse inflammatoire appropriée dans le but de revenir à l'homéostasie. La détection de l'agression par le SI est possible grâce à la production de DAMPs (Damaged Associated Molecules Pattern) (pouvant être des protéines intracellulaires comme HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), des protéines de la MEC, de l'ATP ou encore de l'ADN), par les cellules lésées, et/ou de PAMPs (Pathogen Associated Molecules Pattern) par les pathogènes. Il s'agit de signaux d'alarme, aussi appelées « alarmines » qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques présents à la surface de quasiment toutes les cellules du SI (neutrophiles, monocytes, mastocytes, macrophages...). A la suite de cette

		Libération & Production	Marqueurs de surface	
Lignage Myéloïde	<i>Neutrophiles</i>	<i>EAOs, Collagénase, MMP9 Cathepsine, défense, Lactoferrine, lysozyme</i>	CD45 ⁺ /CD11b ⁺ /Ly6G ⁺ /C ⁺	
	<i>Éosinophiles</i>	<i>EPO (EAOs), Collagénase IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF Médiateurs lipidiques</i>	CD45 ⁺ /CD11b ⁺ /Ly6G ⁺ /FcεR1 ⁺	
	<i>Basophiles</i>	<i>Histamine Médiateurs lipidiques</i>	CD45 ⁺ /CD11b ⁺ /Ly6G ⁺ /FcεR1 ⁺ /C CR2 ⁺	
	<i>Mastocytes</i>	<i>Tryptase EAOs, IL-6, TNFα Médiateurs lipidiques</i>	CD45 ⁺ /CD11b ⁻ /Ly6G ⁺ /FcεR1 ⁺ /c-kit ⁺	
	<i>Monocytes</i>	<i>EAOs, IL-1β, IL-6, TNFα, IL-4, IL-10, IL-13</i>	CD45 ⁺ /CD11b ⁺ /F4/80 ⁺ /Ly6C ⁺	
	<i>Macrophages</i>			
		M1	<i>EAOs, IFNγ, IL-1β, IL-6, TNFα</i>	CD45 ⁺ /CD11b ⁺ /F4/80 ⁺ /CD86 ⁺ /TNFα ⁺ /IL-6 ⁺
		M2	<i>IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β</i>	CD45 ⁺ /CD11b ⁺ /F4/80 ⁺ /CD206 ⁺ /IDO ⁺
	<i>Cellules dendritiques</i>		<i>Présentation d'antigène aux lymphocytes</i>	CD45 ⁺ /CD11c ⁺ /CMHII ⁺ /CD80 ⁺
	<i>Cellules NK</i>		<i>IL-10, IFNγ, TNFα, Granzyme, Perforine</i>	CD45 ⁺ /CD11b ⁺ /CD16 ⁺ /CD94 ⁺ /CD122 ⁺ /CD161c ⁺

Figure 21. Acteurs cellulaires et moléculaires du système immunitaire inné.

détection de l'agression, le SI met en place une réponse inflammatoire comprenant une phase inflammatoire (aussi appelée inflammation) et une phase de résolution de cette inflammation. Dans le cas où l'agression conduit à une brèche vasculaire, la réponse inflammatoire débute par une phase d'hémostase que nous avons décrite dans le chapitre 1.

Les cellules du SI, caractérisées par l'expression du marqueur de surface CD45, appartiennent à deux lignages hématopoïétiques distincts : le lignage myéloïde, constituant principalement le SI inné et le lignage lymphoïde, constituant majoritairement le SI adaptatif. Lors de mes travaux de thèse, nous nous sommes exclusivement intéressés aux événements très précoces de la réponse inflammatoire. Ces derniers faisant intervenir le SI inné, nous ne développerons pas en détail dans ce chapitre les différents événements et éléments appartenant au SI adaptatif, bien que le rôle de ce dernier au cours des processus de réparation tissulaire (cicatrisation et/ou régénération) ne doive pas être écarté.

A Le système immunitaire inné

Le SI inné est, par définition, non spécifique de l'identité de l'agression/l'agresseur et a longtemps été cantonné à sa fonction de phagocytose découverte par le Prix Nobel de physiologie, Élie Metchnikoff¹⁶⁸. Ce mécanisme permet aux cellules qui en sont capables, d'internaliser et dégrader des agents pathogènes ou des débris cellulaires. Le SI inné détecte les signaux compromettant l'homéostasie tissulaire à l'aide de récepteurs spécialisés et y répond en cherchant à éliminer la source de l'agression par la production et la sécrétion de nombreuses molécules. Ce système est constitué de cellules nucléées (leucocytes) circulantes et/ou résidentes dans différents tissus de l'organisme.

1 Les différentes cellules

Le SI inné comprend les monocytes (cellules circulantes relativement immatures et se différenciant en macrophage une fois dans les tissus), les macrophages (cellules phagocytaires par excellence), les granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), les lymphocytes cytotoxiques NK (pour Natural Killer ; capables de tuer des cellules infectées ou des cellules tumorales et d'orienter les réponses du SI adaptatif), les mastocytes (impliqués dans les phénomènes d'allergies) et les cellules dendritiques (à la fois capables de phagocytose et de présentation d'antigènes). Toutes ces cellules peuvent être distinguées les unes des autres à l'aide i) d'une combinaison de marqueurs de surface et ii) de caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui leur sont spécifiques (Figure 21). Chacune de ces cellules n'intervient pas systématiquement dans tous les contextes inflammatoires (infection, allergie, agression tissulaire ...). Leur intervention au cours de la réponse inflammatoire se fait toujours de manière différentielle dans le temps et selon une cascade d'événements bien orchestrée¹⁶⁹.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux neutrophiles et aux monocytes/macrophages dans ce chapitre, puisque ces types cellulaires sont les plus représentés au sein du SI inné et jouent un rôle déterminant dans l'initiation et la résolution de l'inflammation dans un contexte de lésion tissulaire^{170,171,172,173}. De plus, ce sont, actuellement, les seules cellules faisant l'objet d'études dans le contexte de la régénération tel que défini dans le chapitre 1.

i Les neutrophiles

Les leucocytes polynucléaires neutrophiles ont un phénotype CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁺/Ly6G⁺ et sont générés en continu dans la moelle osseuse à partir des précurseurs myéloïdes. Alors qu'un faible pool de neutrophiles circule en conditions physiologiques, leur nombre augmente drastiquement suite à une agression/infection tissulaire, grâce à la mobilisation de leurs précurseurs présents dans la moelle osseuse. Ce sont les leucocytes les plus abondants au sein du SI et les premiers à arriver sur le site de lésion pour gérer l'agression par de multiples mécanismes¹⁷⁴. En effet, ils sont capables de phagocyter les agents pathogènes et de produire des EAOs notamment par la NADPH oxydase (NOX) ancrée à la membrane plasmique. Par ailleurs, ces cellules sécrètent des protéines aux rôles-clés dans la gestion des différentes agressions. Trois types de molécules sont séquestrées dans des granules sécrétoires cytoplasmiques différentes : i) la myéloperoxydase (MPO, responsable de la formation d'acide hypochloreux) ii) des protéines antibactériennes telles que la cathepsine, la défensine, la lactoferrine et le lysozyme (servant à détruire la paroi des bactéries Gram positives), iii) des MMP, dont la MMP9 qui a fait l'objet de nombreuses études¹⁷⁵. L'élimination des agents pathogènes par les neutrophiles est favorisée par la formation des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) qui servent à la fois d'ancrage aux différentes enzymes et protéines sécrétées et de « filet » pour piéger l'agent pathogène à éliminer. Notons que ces cellules jouent aussi un rôle d'amplificateurs de la réponse inflammatoire ; une fois dans le tissu et par le biais de la sécrétion de cytokines et/ou de chimiokines, elles activent les macrophages et mastocytes résidents et stimulent l'arrivée des monocytes sur le site de lésion ainsi que leur différenciation en macrophages. Enfin, une fois dans le tissu, le neutrophile a une durée de vie extrêmement courte (de l'ordre d'à peine quelques heures) puisque sa production d'EAOs est très intense et entraîne sa mort.

ii Les monocytes / macrophages

Les monocytes (identifiés par la combinaison de marqueurs de surface CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁺/Ly6G⁻ et les macrophages (de phénotype CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺/Ly6C⁻/Ly6G⁻) dérivent d'un progéniteur commun appelé « monoblaste » retrouvé dans la moelle osseuse. Le monoblaste se différencie en monocyte, qui quitte la moelle osseuse pour devenir circulant. Après une

lésion/infection, les monocytes circulants sont les premiers à être recrutés et à rejoindre le site de lésion/infection, dès la première heure. Par la suite, les monocytes de la moelle osseuse sont recrutés pour entretenir l'inflammation et deviennent les monocytes majoritairement présents à l'endroit du dommage dans les heures qui suivent la lésion/infection.

Le monocyte est le type cellulaire intermédiaire avant sa différenciation en macrophage dans le tissu cible (on parlera alors de macrophages dérivés des monocytes, provenant de l'hématopoïèse médullaire). Par ses sécrétions de cytokines pro-inflammatoires IL-6 (InterLeukine 6) et TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) et de chimiokines, il amplifie le recrutement des neutrophiles et active les macrophages résidents (ne provenant pas de monocytes circulants) déjà présents dans le tissu¹⁷⁶, notamment par sa production d'EAOs. Enfin, ces monocytes sont aussi capables de phagocytose.

Les macrophages, contrairement aux monocytes, ont une espérance de vie relativement longue pouvant aller de quelques jours à plusieurs semaines dans un contexte inflammatoire. Ces cellules constituent une population très hétérogène et peuvent avoir des origines distinctes. En effet, les macrophages sont décrits comme provenant de la différenciation des monocytes circulants produits par l'hématopoïèse adulte médullaire. Toutefois depuis quelques années, il est admis que les macrophages résidents dans les tissus proviennent de précurseurs embryonnaires présents dans le sac vitellin. Ces macrophages au contraire de ceux provenant de la moelle osseuse, sont capables de proliférer dans des conditions physiologiques^{177,178}. Ces macrophages résidents provenant de précurseurs embryonnaires ne colonisent pas tous les tissus de la même manière, et semblent être remplacées par des macrophages issus de monocytes circulants avec l'âge ou à la suite d'une agression tissulaire importante¹⁷⁹.

Les macrophages présentent différents phénotypes en fonction de leur activation. On a longtemps considéré que les macrophages étaient divisés en 2 classes, les M1 pro-inflammatoires et les M2 anti-inflammatoires, le M1 pouvant se transformer en M2 et *vice versa* en fonction des conditions physiopathologiques. Cette catégorisation simplifiée des macrophages a petit à petit été remise en cause. Aujourd'hui, on considère qu'il existe plutôt un continuum dans lequel le macrophage peut adopter graduellement différents phénotypes plus ou moins inflammatoires.

Une des fonctions principales des macrophages est la phagocytose, comme l'a décrit il y a plus d'un siècle Élie Metchnikoff¹⁶⁸. C'est d'ailleurs de là que prend naissance l'origine du mot macrophages ; en grec, macro veut dire « large » et phage « manger », donnant ainsi « cellules larges qui mangent »¹⁸⁰. Les macrophages phagocytent les débris issus des cellules endommagées et des pathogènes, ce qui permet de les éliminer. Lorsque les macrophages phagocytent des cellules apoptotiques, on parle d'efférocytose. Le macrophage reconnaît les débris à efférociter *via* différents récepteurs scavenger parmi lesquels le CD36 ou encore TIM-4 (ce processus d'efférocytose est détaillé plus loin dans le chapitre 3). L'efférocytose entraîne la transition du phénotype du macrophage d'un statut pro-

inflammatoire vers un statut anti-inflammatoire, pro-résolutif, dans le but d'amorcer la phase de résolution de l'inflammation.

Ainsi, il semblerait que les macrophages puissent avoir des phénotypes très différents selon leur origine, mais aussi selon le tissu dans lequel ils se trouvent, le type d'infection ou encore le moment de la réponse inflammatoire.

2 Les acteurs moléculaires

La réponse inflammatoire est orchestrée par de nombreux messagers qui sont sécrétés par les cellules du SI inné et du microenvironnement et sont capables d'agir sur ces mêmes cellules. Parmi ces molécules, nous retrouvons principalement des cytokines, des médiateurs lipidiques, et des EAOs. Ces messagers sont qualifiés de pro- ou anti-inflammatoires s'ils interviennent, respectivement, lors de la phase d'inflammation ou de sa résolution.

i Les cytokines

« Cytokines » est le terme général utilisé pour désigner les protéines sécrétées, ayant un rôle clef dans la communication entre cellules du SI¹⁸¹. Elles appartiennent majoritairement à 2 groupes distincts (cytokines de type I et II) sur la base de leur structure chimique et ont des récepteurs associés¹⁸². On retrouve ainsi 6 classes de récepteurs (récepteurs aux cytokines de type I, de type II, au TNF, à l'IL-1, des récepteurs à tyrosine kinase (RTK) et des récepteurs aux chimiokines)¹⁸³. Les cytokines initient leur cascade de signalisation par dimérisation ou oligomérisation de leurs différents récepteurs et déclenchent la plupart du temps l'activation de voie de signalisation impliquant la kinase Jak et des facteurs de transcription appartenant à la famille des facteurs STAT¹⁸².

Un très grand nombre de cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires, parmi lesquelles les macrophages, les monocytes ou encore les mastocytes. Ces cytokines peuvent également être produites par d'autres types cellulaires ne faisant pas partie du SI, comme les fibroblastes, les cellules endothéliales ou encore les adipocytes^{184,185}. Elles participent activement à la mise en place de l'inflammation, à son amplification et à son maintien sur une durée plus ou moins longue. Cette amplification est nécessaire pour neutraliser complètement la source de l'infection ou de l'agression. Les principales cytokines pro-inflammatoires sont l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le TNF α ou encore l'IFN γ (interféron gamma). Elles augmentent la perméabilité vasculaire et l'expression de protéines d'adhésion par les cellules endothéliales afin de faciliter le recrutement, sur le site de l'agression, les différents leucocytes circulants, notamment les neutrophiles. Elles entraînent aussi l'activation en

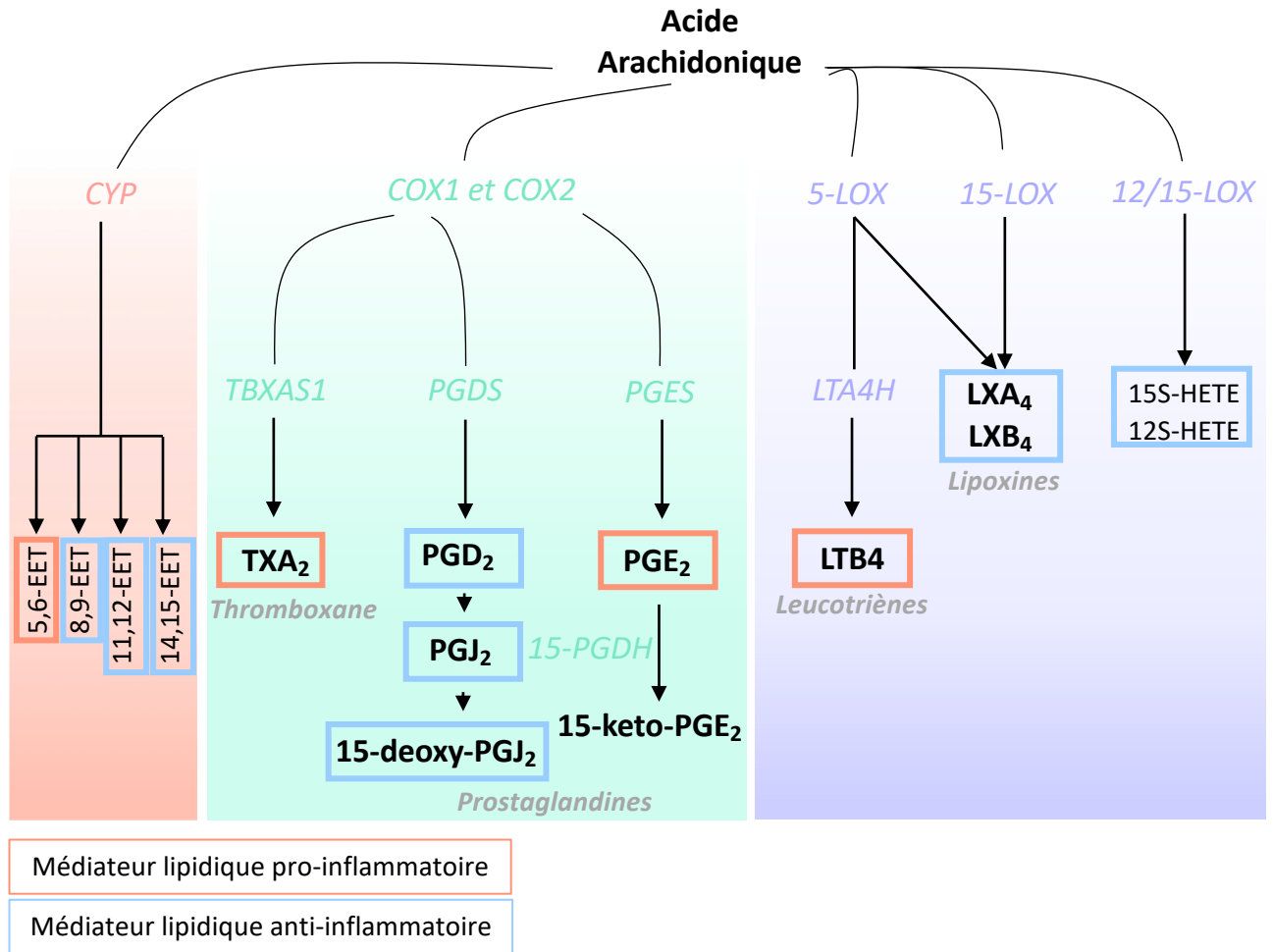


Figure 22. Médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique.

COX1 et 2 : Cyclooxygénases 1 et 2 / CYP : Cytochrome p450 époxygénases / PGD₂ : Prostaglandine D2 / PGDS : Prostaglandine D Synthase / PGE₂ : Prostaglandine E2 / PGES : Prostaglandine E Synthase / PGJ₂ : Prostaglandine J2 / LTA4H : Leucotriène A4 Hydrolase / LTB₄ : Leucotriène B4 / LXA/B4 : Lipoxine A4/B4 / TBXAS1 : Thromboxane synthase 1 / TXA₂ : Thromboxane A2 / 15-PGDH : 15-Hydroxyprostaglandine Déshydrogénase / 5, 15 et 12/15-LOX : Arachidonate 5, 15 ou 12/15-Lipoxygénase.

cascade d'autres cellules immunitaires, qui, à leur tour, sécrètent d'autres médiateurs de l'inflammation¹⁸⁶.

D'autres cytokines ont un effet anti-inflammatoire en limitant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires générées en amont. Les principales cytokines anti-inflammatoires sont l'IL-1ra (antagoniste du récepteur à l'interleukine 1), l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-11, l'IL-13 ou encore le TGF β . Par exemple, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13 inhibent la synthèse d'IL-1 β (pro-inflammatoire) et stimulent la synthèse d'IL-1ra qui conduit à l'inactivation de la voie de signalisation de l'IL-1 β . L'IL-4 permet d'inhiber la sécrétion par les monocytes, de l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 ou encore du TNF α ^{187,188}.

Finalement, toutes les cytokines présentent une certaine pléiotropie (activités biologiques multiples) et une certaine redondance (actions biologiques partagées avec plusieurs autres cytokines), rendant la distinction pro- vs anti-inflammatoire plus complexe que cela. En effet, de nombreux paramètres peuvent modifier les propriétés d'une même cytokine : la quantité et le moment auquel la cytokine est sécrétée, la nature de la cellule cible, la nature du signal qui entraîne sa sécrétion, ou encore le contexte inflammatoire étudié. C'est notamment le cas pour l'IL-6, le TNF α ou encore le TGF β qui peuvent être pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires en fonction du contexte cellulaire et moléculaire environnant¹⁸⁹.

ii Les médiateurs lipidiques

Comme les cytokines, les médiateurs lipidiques peuvent être pro-inflammatoires en participant à la mise en place et au maintien de l'inflammation, ou anti-inflammatoires, en participant activement à l'arrêt de la réponse inflammatoire et à sa résolution. Ces médiateurs, aussi appelés éicosanoïdes constituent une famille de dérivés d'acides gras polyinsaturés oxydés à 20 atomes de carbones dont fait partie l'acide arachidonique (AA), et au sein de laquelle on distingue trois sous-catégories : les prostanoides (dont font partie les prostaglandines, les thromboxanes et les prostacyclines), les leucotriènes-lipoxines-marésines et les acides époxyeicosatriénoïques.

L'AA est le précurseur principal des éicosanoïdes et est synthétisé à partir de l'acide linoléique ou libéré à partir des phospholipides membranaires grâce à l'action de la phospholipase A2. Une fois dans le cytosol, l'AA est métabolisé par trois voies distinctes : la voie des cyclooxygénases (COXs) qui conduit à la formation des prostanoides (eicosanoïdes cycliques), la voie des lipoxygénases (LOXs) permettant la synthèse des leucotriènes, lipoxines, marésines et la voie du cytochrome P450-époxygénase générant les acides époxyeicosatriénoïques¹⁹⁰ (Figure 22).

Il existe deux isoformes de cyclooxygénase : i) la COX1, qui est constitutive et majoritairement responsable de la production de thromboxane (TXA₂) et ii) la COX2, rapidement induite dans un contexte inflammatoire. Les COXs transforment l'AA en PGH₂ (prostaglandine H2), elle-même

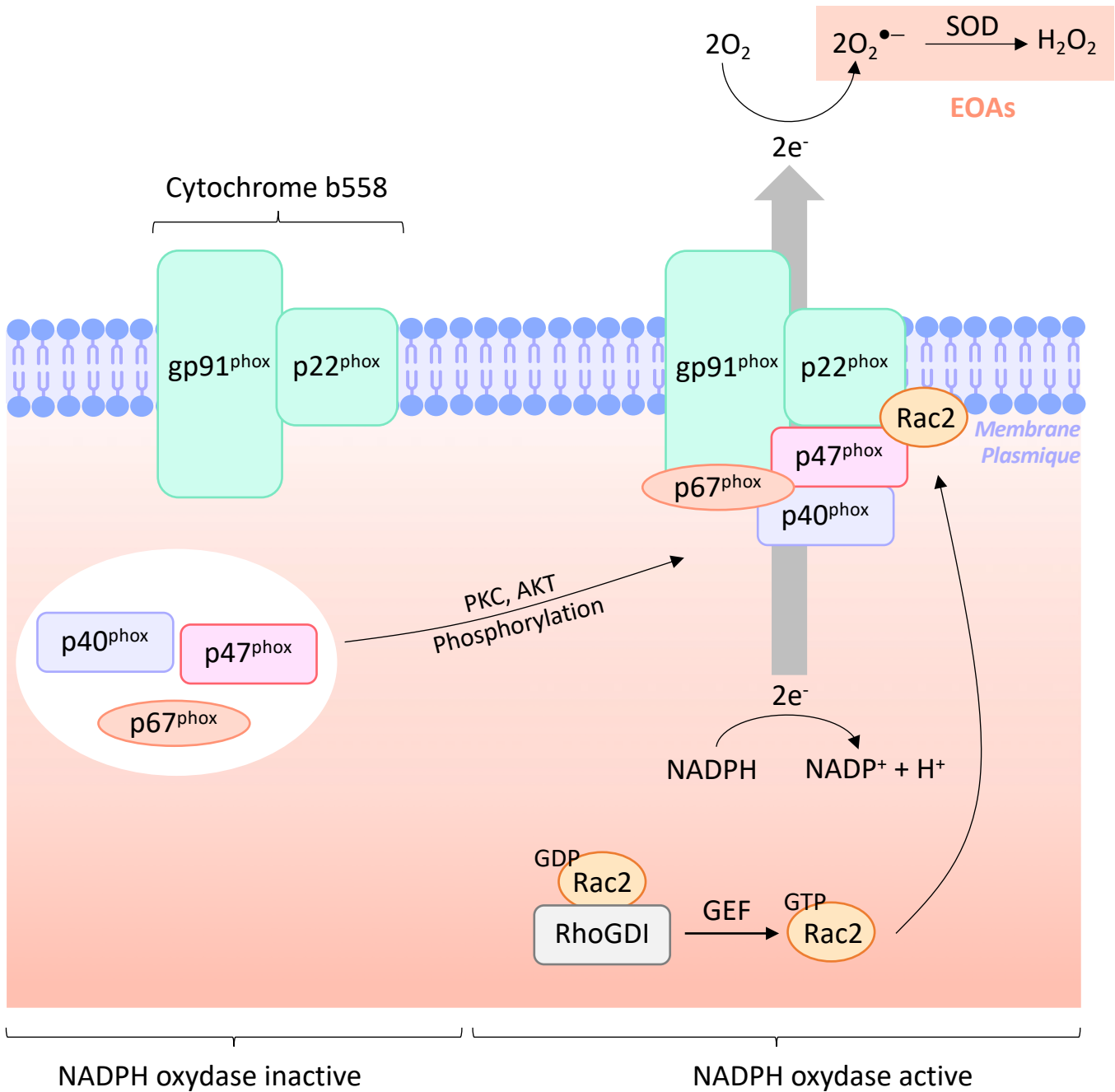


Figure 23. Activation et la production d'espèces actives de l'oxygène par la NADPH oxydase 2 membranaire.

précurseur de 5 autres prostanoides : PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂ (prostacycline) et TXA₂ (thromboxane). La PGE₂, majoritairement produite par les macrophages, est connue pour son puissant rôle pro-inflammatoire^{191,192}. Après fixation sur un de ses récepteurs membranaires de la famille EP (il existe 4 isoformes, EP1 à EP4) elle permet l'induction de l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires¹⁹³. De manière générale, elle intervient dans tous les processus classiques conduisant à l'inflammation : la rougeur, le gonflement et la douleur. En effet, elle augmente la perméabilité vasculaire pour permettre le recrutement des leucocytes (neutrophiles et monocytes) sur le site de lésion tissulaire et augmente la perception douloureuse en agissant sur les neurones nociceptifs présent aux abords du site inflammatoire^{194,195,196}. La PGD₂, elle, est une prostaglandine aux propriétés anti-inflammatoires impliquée dans la résolution de l'inflammation. Après fixation sur son récepteur membranaire DP1 ou sa liaison (après transformation ou non en 15-dPGJ₂) au facteur nucléaire PPAR γ , elle peut en effet, stimuler la synthèse et la sécrétion d'IL-10, interleukine anti-inflammatoire et pro-résolutive¹⁹⁷.

D'un autre côté, un des premiers médiateurs lipidiques produit lors d'une infection ou d'une lésion est le leucotriène B₄ (LTB₄). Il est issu de la métabolisation successive de l'AA en LTA₄ par la 5-LOX puis en LTB₄ par la LTA₄ hydrolase. Ce LTB₄ est un puissant facteur chémoattractant qui attire les neutrophiles sur le site d'infection/lésion *via* sa fixation sur l'un de ses deux récepteurs (BLT1) portés par les neutrophiles. Le LBT₄ peut également stimuler la production d'EOs et la phagocytose par les neutrophiles¹⁹⁸ et dans une moindre mesure, activer les monocytes et les macrophages, lors de la phase d'inflammation.

iii Les espèces actives de l'oxygène (EOs)

Les EOs sont soit des radicaux libres hautement réactifs, soit des molécules. Alors qu'ils ont longtemps été considérés comme toxiques et délétères pour les cellules, il est maintenant clairement admis que ces EOs sont des molécules à haut potentiel de diffusion à travers les membranes et les divers compartiments intracellulaires, faisant d'eux de réels seconds messagers.

Les EOs les plus connus sont l'anion superoxide (O₂⁻), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et le radical hydroxyle (*OH)¹⁹⁹. Les sources de d'EOs sont multiples tant par leur localisation subcellulaire (membrane plasmique, réticulum endoplasmique, peroxysomes, cytoplasme et mitochondries) que par leur mécanisme de production : en effet, les EOs sont produites par des enzymes telles que la NADPH oxydase (NOX), les cytochromes P450, la myéloperoxydase ou la xanthine oxydase, ou par des réactions d'oxydo-réduction (cycle redox des xénobiotiques, oxydo-réduction du fer, chaîne mitochondriale de transport des électrons). Les NOXs constituent une famille regroupant 7 isoformes différentes (les NOX 1 à 5 et DUOX 1 et 2). L'enzyme responsable de la production de la majorité des

EAOs par les cellules immunitaires (et particulièrement les neutrophiles et les macrophages) est la NOX2²⁰⁰. Cette dernière est constituée de plusieurs sous-unités localisées, en condition basale, au niveau de la membrane plasmique (gp91^{phox} et p22^{phox}, constituant le cytochrome *b558*) et du cytosol (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}). Après stimulation, les sous-unités cytosoliques migrent à la membrane où elles s'associent au cytochrome *b558* pour former une NOX2 active par l'intermédiaire de la petite GTPase Rac, et produisant de l'O₂^{•-} en grande quantité (Figure 23).

Quelle que soit son origine, l'O₂^{•-} est rapidement dismuté en H₂O₂ et oxygène par la superoxyde dismutase (SOD). L'H₂O₂ ainsi généré est beaucoup plus stable et présente une bien plus grande capacité de diffusion dans les milieux aqueux et lipidiques que l'anion superoxyde. Par réduction monoélectronique, l'H₂O₂ donne alors naissance à un des radicaux les plus réactifs : le radical hydroxyle [•]OH, permettant aux cellules qui le produisent de tuer les pathogènes présents lors d'une infection.

A moindre dose, ces EAOs jouent aussi un rôle de second messenger, et sont ainsi capables d'activer et de moduler l'activité des différentes cellules immunitaires présentes ou arrivant sur le site de lésion/infection^{201,202}. Leur implication dans des voies de signalisation passe par i) l'oxydation des résidus cystéines des protéines, ii) la régulation redox de l'activité de protéines kinases et phosphatases et iii) la régulation redox de facteurs de transcription. Il a ainsi été montré que les EAOs, principalement l'H₂O₂, stimulent une entrée de calcium IP₃-dépendante dans les cellules immunitaires conduisant à leur différenciation, prolifération et/ou activation¹⁹⁹. Enfin, ces EAOs ont également un rôle clef dans les processus de chimiotaxie, en permettant une mobilité et une attraction des neutrophiles plus élevée au site de lésion/infection par exemple²⁰³.

3 Autres molécules de signalisation du système immunitaire inné

i HMGB1

Parmi les autres molécules qui jouent des rôles importants au cours des processus d'inflammation, nous trouvons HMGB1 (High-Mobility Group Box 1), originalement identifiée comme une protéine nucléaire ayant un rôle architectural dans la chromatine. Elle facilite l'accessibilité et la liaison de facteurs de transcription et des nucléosomes à l'ADN. Elle peut aussi diffuser de manière passive dans le milieu extracellulaire après la mort de la cellule par nécrose, ou encore être sécrétée de manière active²⁰⁴. Au cours de la réponse inflammatoire, elle peut ainsi agir i) comme une alarmine et déclencher la réponse inflammatoire, ii) de manière similaire à une cytokine, en modulant l'activité de différentes cellules immunitaires, ou, enfin, iii) comme une chimiokine, en attirant certaines cellules (comme les monocytes et les neutrophiles) sur le site de lésion/infection^{205,206}.

Dans le noyau, HMGB1 est sous forme réduite. Dans le milieu extracellulaire, et d'autant plus dans le cadre d'une inflammation, HMGB1 est principalement sous forme oxydée par la formation d'un pont

disulfure. Une fois dans le milieu extracellulaire, HMGB1 peut, en fonction de son statut redox (plus ou moins réduit ou oxydé), agir en tant que molécule pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en se fixant à différents récepteurs. La forme réduite d'HMGB1 peut se lier au CXCL12 (chimiokine de type CXC, aussi appelée SDF-1) et faire office de chimiokine²⁰⁷. La forme oxydée, elle, peut se lier au TLR4 (Toll Like Receptor 4), récepteur clef de l'inflammation, ainsi qu'au récepteur RAGE et activer la voie Nf-κB ainsi que la transcription de nombreux facteurs pro-inflammatoires^{204,208}.

Suite à une lésion tissulaire, HMGB1 peut recruter les neutrophiles et monocytes circulants sur le site de lésion et activer ces derniers pour leur permettre de sécréter des facteurs pro-inflammatoires ou pro-angiogéniques (comme le VEGF)²⁰⁹. Toutes ces caractéristiques confèrent à HMGB1 un rôle probablement déterminant dans la mise en place de l'inflammation après une lésion tissulaire²⁰⁶. Enfin, certaines études commencent à s'intéresser à son rôle anti-inflammatoire au cours de la résolution de l'inflammation^{210,211}.

Notons que les activités chémoattractantes d'HMGB1 ne se limitent pas aux seules cellules du SI. HMGB1 est, en effet, capable de recruter des cellules musculaires lisses, des cellules souches endothéliales, diverses cellules d'origine fibroblastique ainsi que des cellules souches mésenchymateuses, suggérant qu'HMGB1 pourrait jouer un véritable rôle d'alarmine lors d'une lésion tissulaire, mais également prendre une part active à la reconstitution des tissus lésés²⁰⁵.

ii PPAR γ

Les peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) sont une famille de récepteurs nucléaires constitués de trois isoformes, PPAR α , PPAR β et PPAR γ . PPAR γ participe à des fonctions multiples, telles que la régulation de la synthèse des acides gras, le stockage et le métabolisme du glucose, l'activation de l'adipogenèse ou encore l'inhibition de l'inflammation par l'inhibition de NF-κB. PPAR γ est exprimé par de nombreux types cellulaires dont les cellules du SI parmi lesquelles, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques ou encore les lymphocytes.

La plus grande partie de son activité anti-inflammatoire est due à son expression par les monocytes/macrophages. Un grand nombre de ligands de PPAR γ a été identifié, parmi lesquels les thiazolidinediones (à action anti-diabétique), la PGD₂ ainsi que son métabolite, le 15d-PGJ₂ et d'autres eicosanoïdes. PPAR γ régule l'expression de multiples gènes en se fixant soit sur des séquences PPRE (PPAR γ response elements) quand il est sous la forme d'un hétérodimère avec RXR α (Retinoid X Receptor α), soit sur des séquences cibles de NF-κB quand il est associé à ce dernier. Dans les neutrophiles, la fixation de PGD₂ à PPAR γ entraîne une diminution i) de l'expression du TNF α et ii) de la production d'EOs *via* l'inhibition de la synthèse de la myéloperoxydase (MPO) ce qui conduit à l'arrêt de l'inflammation et à sa résolution¹⁹⁷.

Il a aussi été rapporté à plusieurs reprises que PPAR γ joue un rôle prépondérant dans la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages, notamment en augmentant l'expression du récepteur scavenger CD36 à la membrane plasmique des macrophages²¹².

Enfin, PPAR γ permet la conversion des macrophages d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire, caractérisé par la sécrétion de différentes cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou l'IL-13, ou par l'expression de marqueurs de surface caractéristiques comme le CD206 ou l'arginase 1¹⁹⁷.

B Le système immunitaire adaptatif

Contrairement au SI inné, le SI adaptatif élabore une réponse plus lente à se mettre en place (5 à 6 jours) mais qui est spécifique en raison de la présence, à la membrane des cellules, de récepteurs spécifiques de l'antigène cible. Le précurseur cellulaire commun du lignage lymphoïde peut se différencier en lymphocytes B (LB), lymphocytes T (LT), cellules NK et en cellules NK-T. Comme pour le SI inné, on distingue les cellules du SI adaptatif les unes des autres par un certain nombre de marqueurs de surface. Après leur maturation dans les organes lymphoïdes primaires que sont la moelle osseuse (pour les LB) et le thymus (pour les LT), ils circulent jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires (rate et les ganglions lymphatiques).

La réponse immunitaire adaptative se déroule en trois phases. La première consiste en la reconnaissance et la présentation des antigènes aux LT par les cellules présentatrices d'antigène, principalement les cellules dendritiques (mais aussi les macrophages). La deuxième phase correspond à l'activation des LT. Enfin, lors de la troisième phase, les LB sont activés. C'est principalement grâce aux cellules du SI inné capables de phagocyter les agents pathogènes, que la réponse immunitaire adaptative est amorcée. Lors de la phagocytose, les cellules présentatrices d'antigènes vont accumuler, après digestion enzymatique, des antigènes microbiens ou des fragments peptidiques de l'agent pathogène et les présenter aux LT. Par ailleurs, les fragments d'agents microbiens circulants dans le sang pourront aussi rentrer directement en contact avec les LB et LT situés dans les organes lymphoïdes secondaires *via* la circulation sanguine et le système lymphatique. La présentation de l'antigène induit alors l'activation des LT qui vont se multiplier de manière clonale (les LT produits sont strictement identiques et spécifiques de l'antigène présenté) sous l'influence de l'IL-2 et se différencier. De manière simplifiée, les LT peuvent se différencier i) en LT Th1 caractérisés par la production d'IFN γ pro-inflammatoire et ayant un rôle clef dans l'activation des macrophages, ii) en LT Th2 caractérisés par la production d'IL-4 anti-inflammatoire, iii) en LT Th17 caractérisés par la production d'IL-17 ou encore iv) en lymphocytes Treg, exprimant le facteur de transcription Foxp3 et

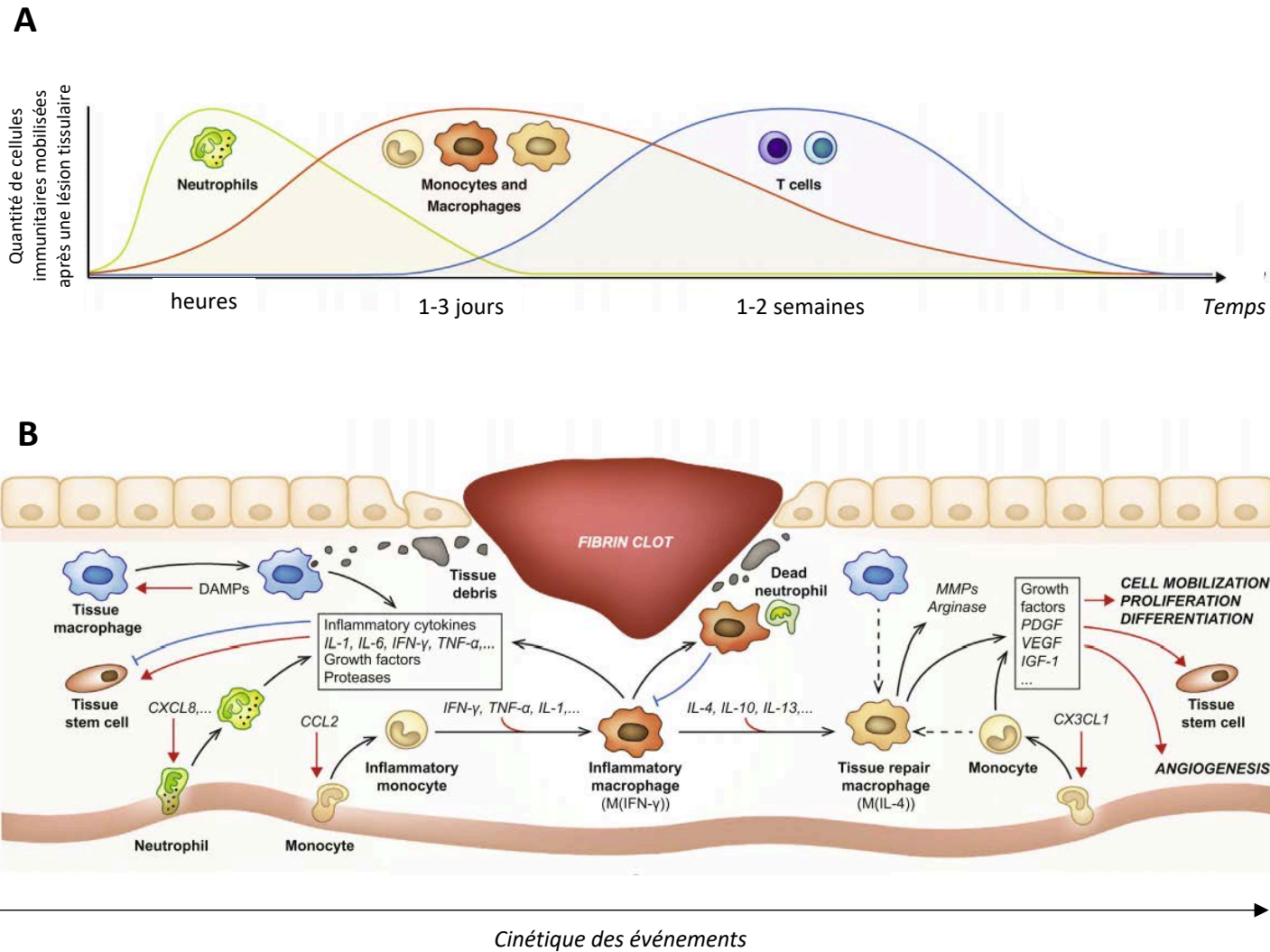


Figure 24. La réponse inflammatoire suite à une lésion tissulaire.

(A) Cinétique de mobilisation des différentes cellules immunitaires appartenant au SI inné et SI adaptatif au cours du temps, après une lésion tissulaire. (B) Vue d'ensemble de la réponse inflammatoire précoce après une lésion tissulaire. Brièvement, les neutrophiles sont parmi les premiers à être recrutés sur le site lésionnel avec les monocytes. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui participent à l'activation des macrophages. La présence de débris cellulaires dus à la lésion, et la gestion de ces débris par les macrophages via le processus d'efférocytose conduit à leur transition phénotypique. Ils passent alors d'un statut pro-inflammatoire à un statut anti-inflammatoire et produisent des cytokines anti-inflammatoires (Julier et coll. 2017).

participant à l'arrêt de la réponse immunitaire adaptative. Lors de la troisième étape de la réponse adaptative, les LB naïfs (n'ayant jamais rencontré d'antigène) sont activés par les LT et se mettent à produire des anticorps spécifiques de l'agent pathogène dans le but de l'éliminer. Finalement, une partie des LB et LT activés lors de cette réponse immunitaire deviennent des lymphocytes mémoires, qui sont sollicités rapidement lors de rencontres ultérieures avec l'agent pathogène.

Si la réponse adaptative est très spécifique et gagne en efficacité à chaque nouvelle exposition, il ne faut pas croire qu'elle est plus importante ou qu'elle peut agir indépendamment du SI inné. Le développement d'une réponse adaptative complète et efficace est, en effet, étroitement dépendant des réponses précoces du SI inné. Il existe ainsi, une véritable collaboration entre ces deux systèmes, secondée par un recouvrement considérable de cellules et mécanismes impliqués à la fois dans l'immunité innée et dans l'immunité adaptative.

C Les différentes phases de la réponse inflammatoire au cours des processus de réparation

Suite à une rupture de l'intégrité tissulaire, une réponse inflammatoire aiguë est orchestrée par différents types cellulaires et engendre la sécrétion de divers facteurs dont nous venons de faire brièvement l'exposé dans les parties précédentes. Ces derniers vont intervenir au cours des trois phases que sont l'hémostase (que nous avons présenté dans le chapitre 1), l'inflammation et la résolution de l'inflammation que nous allons présenter dans cette partie et qui est illustré sur les Figures 24 et 25.

1 Inflammation

La réaction inflammatoire est nécessaire pour combattre l'infection par un agent pathogène et/ou pour éliminer les nombreux débris cellulaires générés par une lésion tissulaire (Figure 24A). L'initiation de l'inflammation est associée à la perméabilisation des vaisseaux, notamment grâce à la sécrétion de bradykinine, d'histamine, de certains médiateurs lipidiques ou encore de la substance P par les mastocytes et macrophages résidents ainsi que par l'endothélium lui-même.

La mobilisation des neutrophiles depuis la moelle osseuse est due à la sécrétion du facteur chémoattractant hématopoïétique, le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) par les macrophages résidents et à la suppression des mécanismes de rétention (axe SDF-1/CXCR4) de ces cellules au niveau médullaire²¹³. Une fois dans la circulation sanguine, les neutrophiles sont attirés vers le site de lésion par la combinaison de 3 molécules produites par les cellules immunitaires résidentes (mastocytes, macrophages) : le LTB₄, l'IL-1 β et la chimiokine CXCL1.

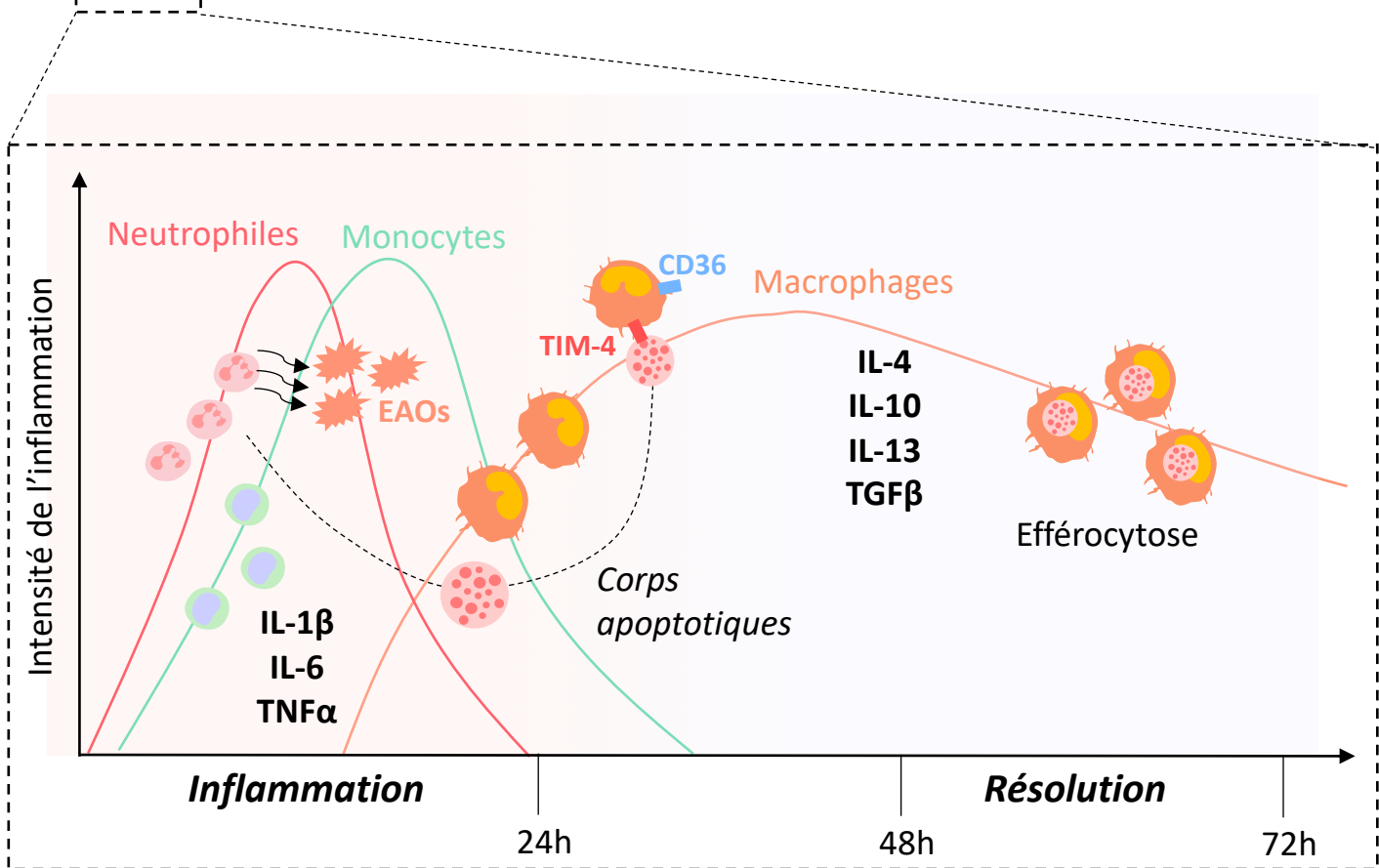
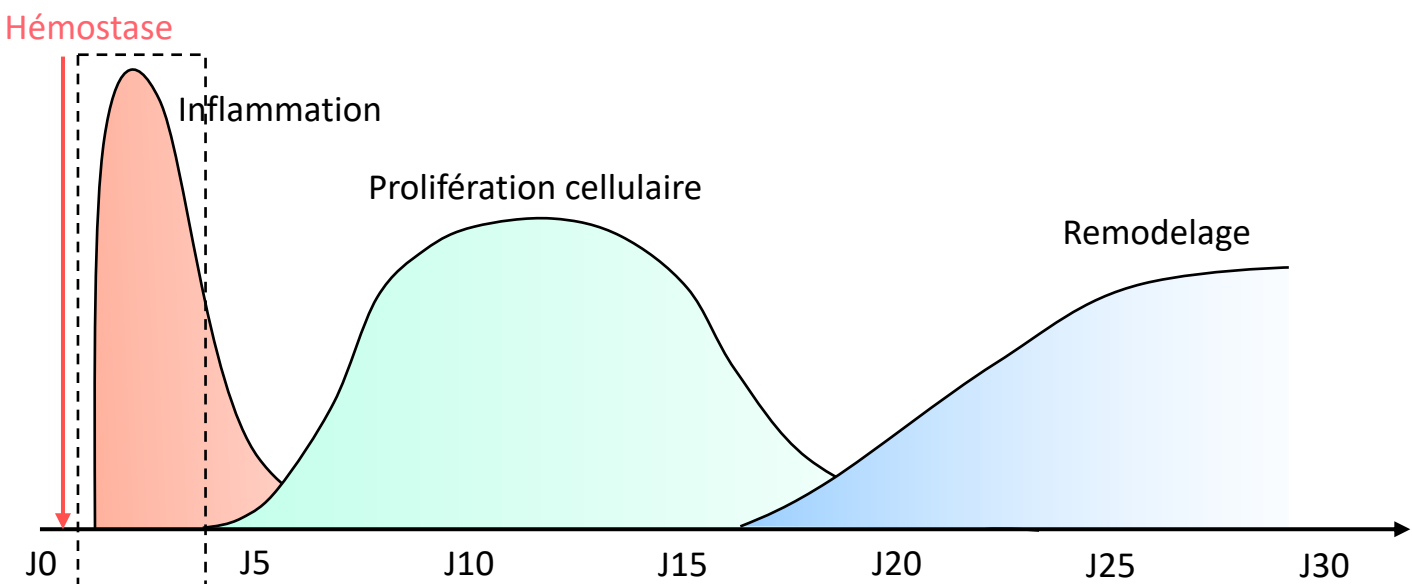


Figure 25. Acteurs cellulaires et moléculaires de la réponse inflammatoire : phase d'inflammation et de résolution de l'inflammation.
 Étapes successives de la réparation tissulaire incluant l'hémostase, l'inflammation (précoce faisant intervenir le système immunitaire inné et tardive faisant intervenir le système immunitaire adaptatif), une phase de prolifération cellulaire puis de remodelage. Zoom sur les étapes successives de la réponse inflammatoire précoce orchestrée par le système immunitaire inné, comprenant une phase d'inflammation et une phase de résolution de l'inflammation.

Le passage des neutrophiles du compartiment sanguin au site même de lésion nécessite 3 étapes successives : i) une étape du « rolling » au cours de laquelle les neutrophiles roulent sur l'endothélium et s'y accrochent *via* des sélectines exprimées à la membrane des cellules endothéliales, ii) une étape d'adhésion *via* les intégrines retrouvées à la membrane des neutrophiles et enfin iii) une étape de transmigration des neutrophiles entre les cellules endothéliales vers le tissu cible grâce à PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1)¹⁷⁴.

Une fois dans le tissu, ces derniers produisent des EAOs et phagocytent les débris cellulaires générés par la lésion et la mort cellulaire induite par ce burst oxydatif (Figure 25). D'autre part, les neutrophiles participent activement au recrutement des monocytes circulants en induisant la sécrétion de la chimiokine CCL2 (aussi appelé MCP-1) par les cellules endothéliales.

Une fois arrivés dans le tissu cible, les monocytes se différencient en macrophages pro-inflammatoires qui phagocytent, à leur tour, les débris cellulaires et sécrètent de très grandes quantités de cytokines et prostaglandines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α , TGF β , PGE₂) qui vont constituer une véritable « soupe inflammatoire ». Ils sécrètent aussi du M-CSF (Macrophages Colony Stimulating Factor) capable d'augmenter la différenciation et la survie des monocytes/macrophages ainsi que leur activité phagocytaire. Finalement, pour pouvoir assurer toutes ces activités (sécrétoire, phagocytaire) sur un temps court, ces cellules utilisent un métabolisme glycolytique leur permettant de générer de l'ATP le plus rapidement possible. Les macrophages M1 amplifient donc l'inflammation générée initialement par les cellules résidentes (mastocytes, macrophages résidents) et les neutrophiles. Cette amplification de la réponse inflammatoire par les macrophages M1 est d'autant plus importante qu'ils entretiennent le recrutement des neutrophiles et augmentent un peu leur survie (Figure 24B).

2 Résolution de l'inflammation

Si l'inflammation permet d'éliminer les cellules lésées et ainsi de nettoyer la zone, elle ne doit en aucun cas perdurer sous peine de conduire à une inflammation chronique pouvant avoir des conséquences dramatiques sur le tissu lésé (ulcères, cicatrices hypertrophiques). La résolution de l'inflammation est classiquement caractérisée par i) la clairance des facteurs inducteurs d'inflammation (majoritairement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires), ii) l'arrêt des signaux intracellulaires pro-inflammatoires, iii) l'apoptose des neutrophiles iv) leur efférocytose par les macrophages, v) le switch phénotypique des macrophages induit par cette efférocytose et vi) la contribution des macrophages à la réparation tissulaire (Figure 25).

Un des types cellulaires clefs de cette étape de résolution de l'inflammation est une fois encore le macrophage. Durant la phase d'inflammation, la mort des cellules environnantes (principalement celle des neutrophiles suite à leur burst oxydatif) va générer des corps apoptotiques. La libération de

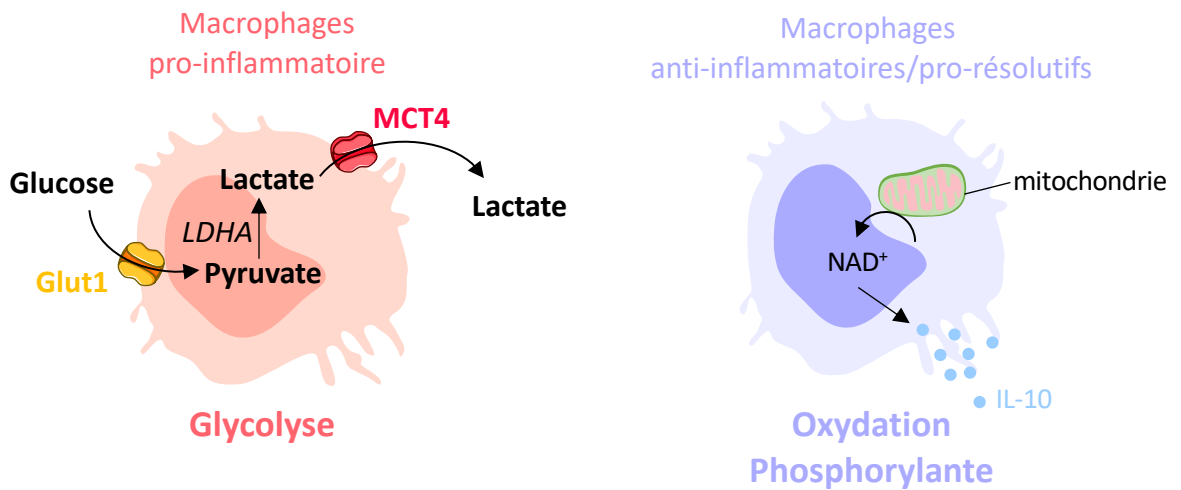


Figure 26. Schéma simplifié de la signature métabolique des macrophages pro- et anti-inflammatoires. Les macrophages pro-inflammatoires sont glycolytiques alors que les macrophages pro-résolutifs/anti-inflammatoires ont un métabolisme oxydatif.

signaux « find me » (par exemple la Sphingosine 1 phosphate ; S1P) et la présence à la surface des corps apoptotiques de signaux « eat me » (phosphatidylsérine) permettent leur reconnaissance par les macrophages à l'aide de récepteurs spécialisés parmi lesquels CD36 ou TIM-4^{214,215} et leur phagocytose *via* l'efférocytose²¹⁶. D'autres récepteurs tel que MARCO reconnaissent des composés bactériens²¹⁷. L'activation des voies en aval de ces récepteurs scavenger est en partie responsable de la transition phénotypique des macrophages, d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire. Au cours de cette transition phénotypique, les macrophages opèrent un switch métabolique, ils passent alors d'un statut glycolytique à oxydatif (Figure 26)²¹⁸.

Lors de l'efférocytose proprement dite, les macrophages opèrent un changement phénotypique et deviennent anti-inflammatoires/pro-résolutifs. Ils expriment alors des molécules de surface différentes parmi lesquelles le CD206, sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 ou le TGF β dont la fonction principale est l'arrêt de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires^{219,220}. Le macrophage anti-inflammatoire sécrète des médiateurs dits anti-inflammatoires comme les lipoxines ou les marésines, qui empêchent notamment le recrutement de neutrophiles supplémentaires sur le site de lésion¹⁹⁷.

De plus, au cours de cette phase de résolution de l'inflammation, les macrophages sont capables de sécréter des molécules chémoattractantes (CCL5, CXCL13) pour attirer les LB et LT sur le site de lésion²²¹. Suite à la résolution de l'inflammation et après que la réponse adaptative se soit mise en place (à partir de 5 à 7 jours après le début de l'inflammation), une longue étape d'intense remodelage tissulaire se met alors en place et aboutit soit à la cicatrisation, soit à la régénération.

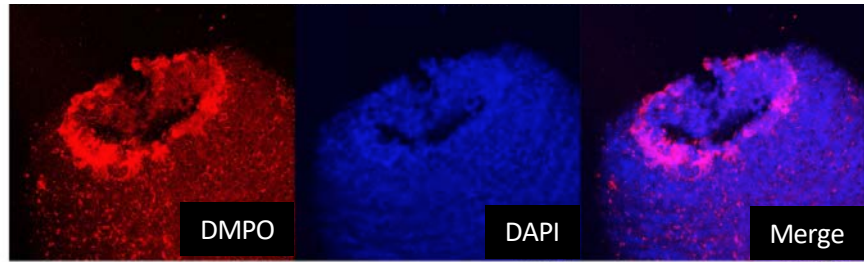
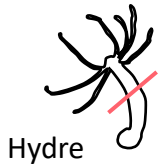
D Implication du système immunitaire au cours de la réparation

1 Rôle clef du système immunitaire dans la régénération

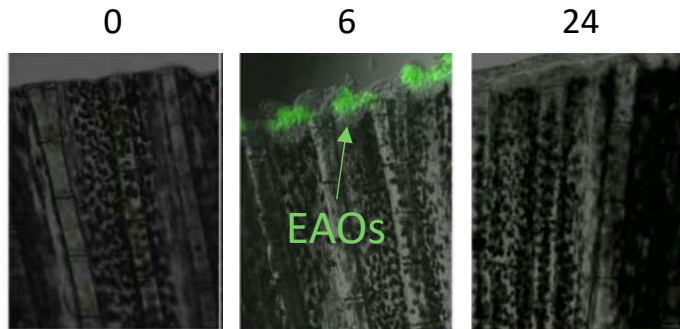
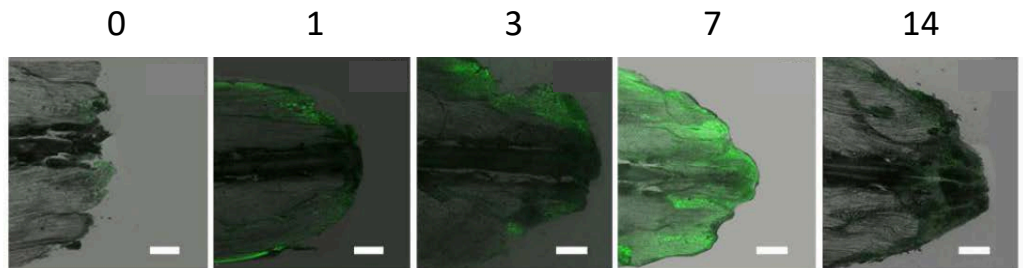
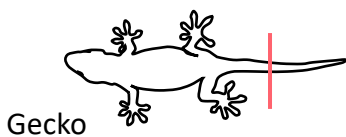
Dans cette partie, nous passerons en revue les données de la littérature sur le/les rôle(s) joué(s) par des cellules et/ou des acteurs moléculaires du SI dans la régénération. Ces études utilisent des modèles animaux « relativement simples » tels que les invertébrés ou les vertébrés non mammaliens et se sont logiquement focalisées sur l'immunité innée car cette dernière est présente chez tous les organismes et est extrêmement rapide à mettre en place après une lésion tissulaire aiguë (section, ablation...).

i Les espèces actives de l'oxygène (EAOs) et la régénération

Il a été rapporté à la fois chez la drosophile après une lésion de l'intestin, chez l'hydre après une section au niveau gastrique (Figure 27A), chez le planaire après fragmentation, chez le poisson zèbre après lésion de la nageoire (Figure 27B) ou encore chez le gecko après amputation de la queue (Figure 27C),

A

45min post amputation de l'hydre

BHeures post amputation
de la nageoire caudale**C**

Jours post amputation de la queue du gecko

Figure 27. La production d'EAOs est indispensable aux processus de régénération.

(A) Production d'EAOs après amputation de la tête de l'hydre, détectée par fluorescence (DMPO : rouge) (Vriz et coll. 2014). (B) Production d'EAOs aux abords du site d'amputation détectée par la sonde fluorescente H_2DCFDA (verte) à 0, 6 et 24h post amputation de la nageoire caudale chez le poisson zèbre (Gauron et coll. 2013). (C) Production d'EAOs aux abords du site d'amputation détectée par la sonde fluorescente H_2DCFDA (verte), 0, 1, 3, 7 et 14 jours post amputation de la queue chez le gecko (Zhang et coll. 2016).

qu'une production massive d'EOs dans les premières heures suivant la lésion, est indispensable à la régénération^{77,222,223}.

Au laboratoire, nous avons montré, à l'aide d'une approche pharmacologique (utilisation d'apocynine, inhibiteur de la translocation des sous-unités cytosoliques de NOX2 à la membrane), que la production d'EOs est indispensable à la régénération du tissu adipeux sous-cutané inguinal chez la souris C57BL/6, la production maximale étant observée 6 à 8h après la lésion²²⁴. Enfin, chez la « souris » *Acomys*, capable de régénération spontanée, une production significativement augmentée d'EOs a été mise en évidence au cours de la régénération de l'oreille⁷⁹. Dans ces deux études chez le mammifère, une origine immunitaire des EOs produites est avancée bien que non encore démontrée de manière irréfutable. Notons qu'en 2019, les travaux de Yang et coll. font état de la nécessité d'une production d'EOs par les neutrophiles pour permettre la réparation du foie chez la souris²²⁵. Même si dans le cas du foie, il ne s'agit pas de régénération au sens propre comme nous l'avons présenté dans le chapitre 1, mais plutôt d'une réparation compensatoire, ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus au laboratoire et par l'équipe de Simkin et coll^{224,79}.

Chez le poisson zèbre, c'est l'enzyme DUOX1, une autre isoforme de la NADPH oxydase, qui est responsable de la production d'EOs observée au cours de la régénération de la nageoire caudale²²². Cependant, contrairement aux études chez le mammifère, la très grande rapidité de production des EOs dans ce modèle (à peine 15 minutes), laisse suggérer une origine plutôt épithéliale et non leucocytaire²²². Sur ce même modèle expérimental, une autre étude montre une production d'H₂O₂ par les cellules de Schwann¹⁴⁰.

Pour évaluer le rôle des EOs dans la régénération, on peut s'appuyer sur les études sur la régénération d'un épithélium (pancréas) et la régénération compensatoire observée après lésion du foie. La réparation tissulaire de l'épithélium de l'intestin, n'est pas comparable à un cas de régénération après une ablation massive d'un organe/tissu/membre, puisque dans ce cas, seule la régénération d'une couche cellulaire est évaluée. Il est cependant intéressant de noter que dans le contexte de lésion mécanique des deux couches les plus superficielles de l'épithélium intestinal, l'utilisation d'une souris dont les neutrophiles ont été déplétés à l'aide d'un anticorps bloquant contre Ly6G, entraîne la perte d'expression de protéines d'adhésion comme FAK et p-Cas au niveau de l'épithélium²²⁶. Ces protéines sont sensibles au statut redox intracellulaire et l'utilisation d'une souris transgénique incapable de produire des EOs conduit au même résultat que la déplétion de cellules Ly6G⁺. Les auteurs suggèrent donc que les neutrophiles sont à l'origine de la production d'EOs permettant la phosphorylation des protéines FAK ou p-Cas. En revanche, les auteurs n'expliquent pas en quoi ces protéines FAK et p-Cas sont importantes pour la régénération de l'épithélium. Une autre étude s'intéressant à la réparation compensatoire du foie, montre que la production d'EOs NOX2-dépendante par les neutrophiles permet la transition phénotypique des macrophages d'un statut pro-inflammatoire à un phénotype

anti-inflammatoire/pro-résolutif et conditionne la réparation du foie après hépatectomie au profit d'une régénération compensatoire plutôt que d'une fibrose²²⁵.

Si l'ensemble de ces données montre des divergences sur les cellules et/ou les systèmes enzymatiques capables de produire des EAOs, il n'en reste pas moins qu'une production rapide, importante et transitoire d'EAOs est indispensable pour permettre la régénération. Il reste à identifier précisément, la ou les enzymes ainsi que les cellules responsables de cette production chez le mammifère pour pouvoir envisager d'orienter l'issue de la réparation tissulaire vers une régénération plutôt qu'une cicatrisation.

ii Les neutrophiles et macrophages et la régénération

• *Les neutrophiles*

Alors que le rôle des neutrophiles au cours des processus de cicatrisation fait l'objet de nombreuses études, leur implication au cours des processus de régénération reste peu étudiée.

Chez le poisson zèbre à l'état larvaire, Niethammer et coll. mettent en évidence un recrutement précoce de neutrophiles sur le site de lésion de la nageoire caudale²²⁷. Ils démontrent que ce recrutement est déclenché par la production d'H₂O₂ puisqu'une inhibition pharmacologique de la production d'EAOs entraîne l'absence de neutrophiles sur le site de lésion et l'absence de régénération. Notons que ce modèle a été récemment utilisé dans le but de cribler de nouvelles molécules capables de favoriser la résolution de l'inflammation en essayant de diminuer le temps de présence des neutrophiles au niveau lésionnel, non pas en induisant leur mort mais en stimulant leur retour vers la circulation sanguine, aussi appelée migration inverse²²⁸. Aucune de ces deux études n'établit néanmoins de lien direct entre la présence des neutrophiles et la régénération.

Une seule étude sur le mammifère parue en 2019, a comparé la population de neutrophiles de la « souris » *Acomys* capable de régénérer à celui de la souris Swiss non compétente pour la régénération⁷⁶. Il est important de noter que cette comparaison a été menée en condition physiologique, hors d'un contexte lésionnel. La quantité de neutrophiles est identique chez ces deux mammifères, de même que la quantité d'EAOs produites par cellule. En revanche, les neutrophiles issus de la « souris » *Acomys* présentent une capacité de phagocytose supérieure à celle des neutrophiles de la souris Swiss. Dans un contexte lésionnel suite à une perforation de l'oreille, il a été montré que le nombre de neutrophiles est supérieur chez la souris classique (*Mus Musculus*) en condition de cicatrisation par rapport aux souris *Acomys* capables de régénérer spontanément²²⁹. Cependant, cette différence est mesurée 1 jour post perforation de l'oreille, alors que les neutrophiles

sont recrutés dans les minutes suivant la lésion. Cette étude ne permet donc pas d'établir de façon définitive le rôle des neutrophiles dans les phases précoces du processus de réparation tissulaire. A côté de leur implication dans l'initiation de la réponse inflammatoire, les neutrophiles peuvent exercer d'autres effets favorables à la régénération d'un tissu lésé, notamment *via* une action sur la MEC. Les neutrophiles sont, en effet, présentés comme une source très importante de MMP9, une métalloprotéase spécialisée dans la dégradation de la MEC¹⁷⁵. Les travaux de Lebert et coll. montrent l'importance de la production de MMP9 par les neutrophiles dans la régénération de la nageoire caudale chez la larve de poisson zèbre²³⁰. Or, de nombreuses études s'intéressent de plus en plus à la rigidité de la MEC au cours des processus de régénération^{171,231} et montrent que la composition de la MEC oriente la réparation tissulaire vers une cicatrisation plutôt que vers une régénération. Ainsi, on peut imaginer que les neutrophiles favorisent la régénération *via* la dégradation de la MEC par la production de métalloprotéases comme MMP9, facilitant la migration des cellules mésenchymateuses.

En conclusion, à ce jour, les données dont nous disposons sont les suivantes : i) Chez le poisson zèbre, les neutrophiles sont recrutés en réponse à une première production d'EAOs par les cellules épithéliales et produisent à leur tour des EAOs indispensables à la régénération ; ii) chez la souris, les neutrophiles sont indispensables à la réparation de l'épithélium intestinal et du foie *via* leur capacité à activer les macrophages^{226,225} ; mais rien n'a été démontré dans un contexte de régénération ; iii) deux études réalisées chez la « souris » *Acomys* suggèrent que la capacité de phagocytose des neutrophiles est déterminante pour la régénération, et que le nombre de neutrophiles est moins important 24h post-lésion chez une souris qui régénère que chez une souris qui cicatrise.

Il est donc important de déterminer précisément les processus cellulaires et moléculaires à l'origine du recrutement des neutrophiles, les mécanismes moléculaires par lesquels ils contrôlent l'initiation et le maintien de l'inflammation notamment leurs rôles dans la polarisation des macrophages et le déclenchement de l'efférocytose, au cours des processus de régénération chez les mammifères.

- *Les macrophages*

De nombreuses études menées chez le poisson zèbre, la salamandre, l'axolotl, la souris au stade post-natal ou encore la « souris » *Acomys* démontrent que les macrophages sont des cellules indispensables à la régénération. En effet, la déplétion de cette population cellulaire à l'aide de liposomes de clodronate, inhibe la régénération spontanée^{232,233,234}.

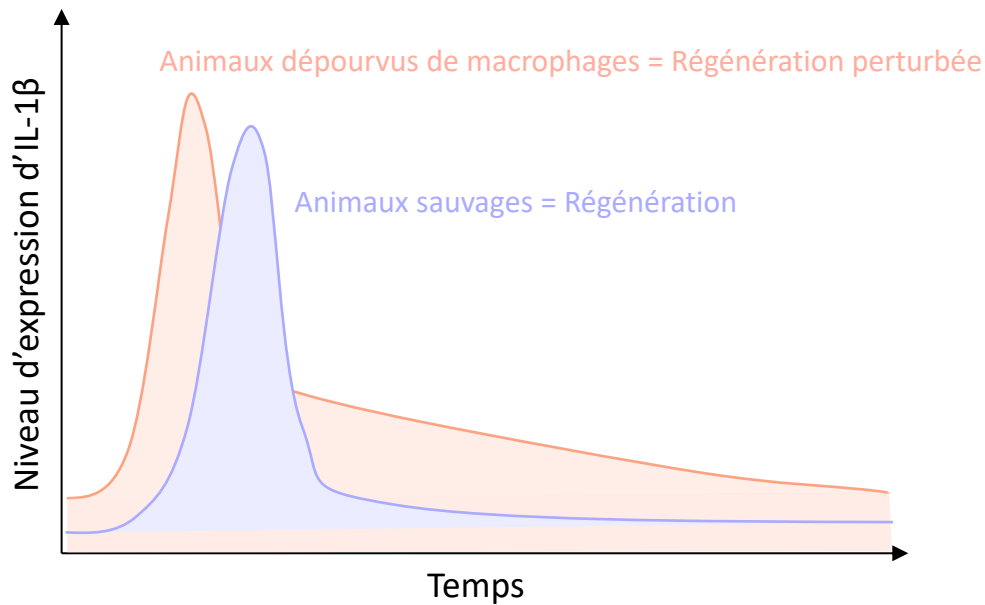


Figure 28. Expression d'IL1 β au cours de la régénération de la moelle épinière chez le poisson zèbre. Représentation schématique des résultats obtenus dans l'étude de Tsarouchas et coll. suggérant qu'une expression intense, transitoire et au moment adéquat, d'IL1 β , permet la régénération de la moelle épinière chez le poisson zèbre. Une expression plus précoce d'IL1 β et/ou prolongée dans le temps altère cette régénération. (Adapté de Tsarouchas et coll. 2018).

Bien que la présence de ces macrophages soit indispensable à la régénération, leur mécanisme d'action demeure encore mal compris. Chez le Xénope au stade larvaire, il est montré que ces cellules permettent la régénération en contrôlant le remodelage de la MEC et le recrutement et l'apoptose d'une population cellulaire particulière, les cellules ROCs (Regeneration Organizing Cells) ; Identifiées en 2019, elles sont naturellement présentes à l'état basal au niveau de l'épiderme de la queue du Xénope et s'activent pour former l'épithélium de fermeture, étape clef de la formation du blastème, comme nous l'avons présenté dans le chapitre 1^{37,235}.

En comparant la souris « Acomys » à la souris Swiss, les travaux de Simkin et coll. montrent i) que le nombre total de macrophages est similaire quel que soit le type de réparation, ii) que ces macrophages persistent durant toute la période de régénération comme de cicatrisation, iii) que la souris Swiss présente au niveau de la lésion une forte augmentation du nombre de macrophages de type pro-inflammatoire, trois jours après la lésion par rapport à la souris Acomys , et iv) que ces macrophages sont répartis dans toute l'oreille chez la souris Swiss, alors qu'ils se concentrent autour du blastème chez la « souris » Acomys⁷⁹. Cependant, cette étude descriptive ne permet pas de définir le rôle des macrophages au cours de la régénération.

L'importance des macrophages a également été décrite chez la souris C57BL/6, dans un modèle de lésion de l'extrémité du doigt (qui pour rappel, régénère spontanément). La déplétion des macrophages entraîne une inhibition de la réépithélialisation de l'extrémité du doigt, empêchant la mise en place du blastème et la régénération. Dans cette étude, il est également intéressant de noter que l'augmentation du nombre de monocytes/macrophages sur le site de lésion suite à l'administration de la chimiokine MCP1, ne modifie pas l'issue de la réparation, suggérant que le nombre de macrophages n'est pas un élément déterminant²²⁹.

Par ailleurs l'idée générale selon laquelle la réponse inflammatoire doit être contrôlée dans le temps pour éviter qu'elle ne cause des dommages tissulaires supplémentaires, est de plus en plus présente dans les discussions d'articles sans qu'elle ne soit réellement appuyée par des expériences précises dans un contexte de régénération. Une seule étude menée chez le poisson zèbre au stade larvaire s'est attaquée à cette problématique²³⁶. L'utilisation de mutants confirme que l'absence de macrophages diminue fortement la régénération de la moelle épinière après section (la repousse neuronale reste partielle et ne permet pas au poisson de récupérer une capacité de nage optimale). Chez ces mutants, la cinétique d'expression des cytokines pro- et anti-inflammatoires est fortement perturbée. A l'aide d'un jeu subtil d'outils pharmacologiques et d'approches moléculaires, combiné à l'utilisation d'animaux transgéniques, les auteurs démontrent que le contrôle par les macrophages de l'intensité, de la cinétique et de la durée du pic d'expression d'IL-1 β par les neutrophiles conditionne la régénération (Figure 28).

En conclusion, même si ces données restent encore très descriptives, il ne fait aucun doute que les macrophages sont nécessaires à la régénération chez les vertébrés, bien que les mécanismes n'aient pas encore été décrits.

- *La collaboration entre neutrophiles et macrophages*

Bien qu'elle soit fortement suggérée dans différents travaux expérimentaux, une seule étude s'est réellement intéressée à la collaboration entre les neutrophiles et les macrophages au cours des processus de régénération. La collaboration la plus connue entre ces cellules au cours de l'inflammation est la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages, aussi appelé phénomène d'efférocytose, dont nous avons parlé un peu plus haut dans ce chapitre. En 2016, Horckmans et coll., ont suggéré que cette efférocytose pouvait intervenir lors de la régénération cardiaque que l'on peut observer chez la souris quelques jours après la naissance¹⁷⁰. Dans cette étude, la déplétion de la population des neutrophiles inhibe i) le recrutement des monocytes sur la zone lésée, ii) la prolifération des cardiomyocytes et iii) *in fine*, la réparation cardiaque qui se traduit par la mise en place d'une fibrose altérant fortement les capacités fonctionnelles de l'organe. In vitro, le traitement des macrophages murins avec du surnageant issu de cultures de neutrophiles murins et humains augmente les capacités d'efférocytose des macrophages. Des expériences complémentaires in vivo et in vitro sont nécessaires pour mieux décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette collaboration et pouvoir éventuellement les cibler pour permettre la régénération après une lésion chez le mammifère adulte.

iii Les médiateurs lipidiques et la régénération

Etant donné l'importance des médiateurs lipidiques dans la mise en place de l'inflammation et sa résolution, il est intéressant d'évoquer les travaux récemment publiés par FitzSimons et coll. en 2020 sur la régénération cardiaque chez le poisson zèbre²⁹. Une augmentation significative de la quantité de PGE2 72h après lésion est nécessaire à la régénération cardiaque. En effet, l'inhibition pharmacologique de la COX2 qui se traduit par une diminution de la quantité de PGE2 produite, entraîne l'inhibition de la prolifération des cardiomyocytes. L'effet bénéfique de cette prostaglandine est aussi rapportée lors de la régénération de la queue chez le Gecko ainsi que lors des processus de réparation du colon, du rein et du foie chez la souris²³⁷. Cibler sa synthèse et/ou sa dégradation pourrait donc se révéler une piste intéressante pour améliorer l'issue de la réparation d'un tissu ou organe.

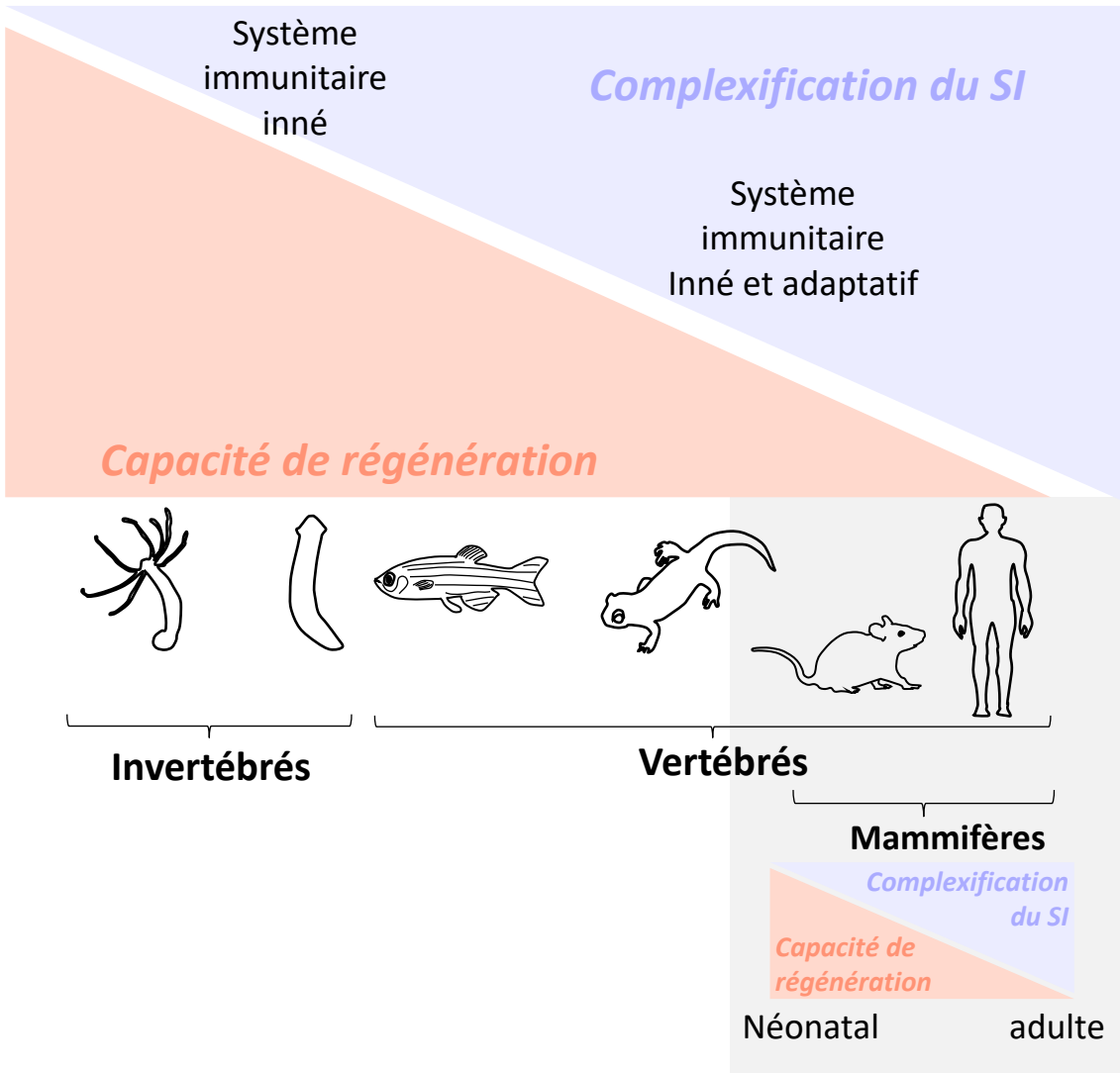


Figure 29. Corrélation entre l'évolution du système immunitaire et les capacités de régénération.
 SI: système immunitaire.

2 Rôle clef du système immunitaire dans la cicatrisation

Les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués lors des processus de cicatrisation sont fondamentalement les mêmes que ceux qui sont impliqués dans les processus de régénération.

Cependant, comme évoqué précédemment, quelques hypothèses commencent à émerger dans le but d'expliquer pourquoi la réaction inflammatoire qui met en jeu les mêmes molécules/cellules peut aboutir à une cicatrisation ou à une régénération. La cinétique des événements et leur intensité pourraient être des éléments déterminants.

De plus, depuis plusieurs années il est proposé que la perte de la capacité à régénérer soit concomitante à la complexification du SI, tant à l'échelle du règne animal où à celle de la vie d'un organisme (Figure 29). Cette complexification confère au SI une performance incroyable, mais également une certaine redondance qui participe à « verrouiller » son fonctionnement, dans le but de réparer rapidement et efficacement tout dommage tissulaire, ce qui correspond à la cicatrisation.

En conclusion, suite à une lésion tissulaire, une réponse inflammatoire se met en place quelle que soit l'issue de la réparation. La plupart des études suggère que les acteurs moléculaires et cellulaires impliqués au cours de la réponse inflammatoire (de sa mise en place à sa résolution) sont les mêmes dans les deux types de réparation tissulaire (cicatrisation, régénération). Ainsi, si l'implication de nombreux éléments cellulaires et/ou moléculaires de la réponse inflammatoire a été étudiée de manière indépendante, il devient désormais absolument nécessaire de les étudier de manière beaucoup plus intégrée. Par ailleurs, chez le mammifère, il est nécessaire de prendre en compte la présence d'un SI adaptatif et son interaction avec le SI inné, dans l'orientation de la réparation tissulaire vers la régénération.

E Dialogue entre système nerveux et système immunitaire

Brièvement dans cette dernière partie, il apparaît important de souligner le fait que le SN et le SI soient quasiment indissociables, notamment au regard de leur constante communication bidirectionnelle, aussi bien dans des conditions d'homéostasie, que lors d'une inflammation²³⁸. Le SN et le SI sont de véritables « senseurs » des changements.

1 Du système nerveux vers le système immunitaire

Les organes lymphoïdes et la moelle osseuse, siège de production et de maturation de nombreuses cellules immunitaires, sont innervés par des fibres sympathiques adrénérgiques. Cette innervation régule les processus d'hématopoïèse, comme la production et éventuellement la libération de cellules progénitrices dans la circulation.

Dans le cadre d'une lésion, et donc de la mise en place d'une réponse inflammatoire, il est clairement décrit que les neuropeptides sécrétés en périphérie par les fibres sensorielles nociceptives, majoritairement la substance P et le CGRP, qui, en agissant sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, ont un effet vasodilatateur et permettent le recrutement de cellules immunitaires au site de lésion^{162,239}. Ces neuropeptides peuvent également moduler directement l'activité des cellules immunitaires. En effet, le CGRP a un effet immunosuppresseur, puisqu'après fixation de ce dernier sur son récepteur CGRPRL associé à son co-récepteur Ramp1, il entraîne l'inhibition de la sécrétion de TNF α et l'activation e la sécrétion d'IL-10 par les macrophages²⁴⁰.

2 Du système immunitaire vers le système nerveux

L'exemple le plus parlant est celui de la « soupe inflammatoire », générée par la production de diverses molécules pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (que nous avons décrites plus haut dans ce chapitre) par les cellules du SI, au niveau du site de lésion. Ces molécules se fixent sur leurs récepteurs présents notamment sur les terminaisons périphériques des fibres sensorielles. Cet aspect sera développé plus loin dans le chapitre 4 : « La « soupe inflammatoire » générée lors d'une inflammation module l'activité des nocicepteurs ».

Il est donc important, lorsque nous focalisons notre attention sur l'inflammation mise en place au cours des processus de régénération, de garder en tête son interaction avec la composante nerveuse, et plus particulièrement avec les nocicepteurs. Inversement, il est important lorsque l'on considère le rôle du SN au cours des processus de régénération, de prendre en compte l'impact des cellules immunitaires sur son activité.

Points à retenir :

- En réponse à une agression tissulaire, trois phases se succèdent : une phase d'hémostase, une phase inflammatoire, une phase de résolution de l'inflammation. Ces étapes font intervenir de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires finement régulés et coordonnés dans le temps et dans l'espace.
- L'ensemble de cette réponse inflammatoire repose sur le SI inné et est déterminante dans l'issue de la réparation (cicatrisation *versus* régénération).
- Parmi les acteurs de la réponse inflammatoire, l'identification de plusieurs éléments-clefs impliqués à la fois dans les processus de régénération et de cicatrisation permet d'envisager de manipuler ces « cibles » chez les espèces incapables de régénérer, afin de promouvoir la régénération.

À noter que la complexification du SI au cours de la vie d'un individu ou au cours de l'évolution au sens large est corrélée avec une perte de capacité de régénération, en faveur d'une cicatrisation.

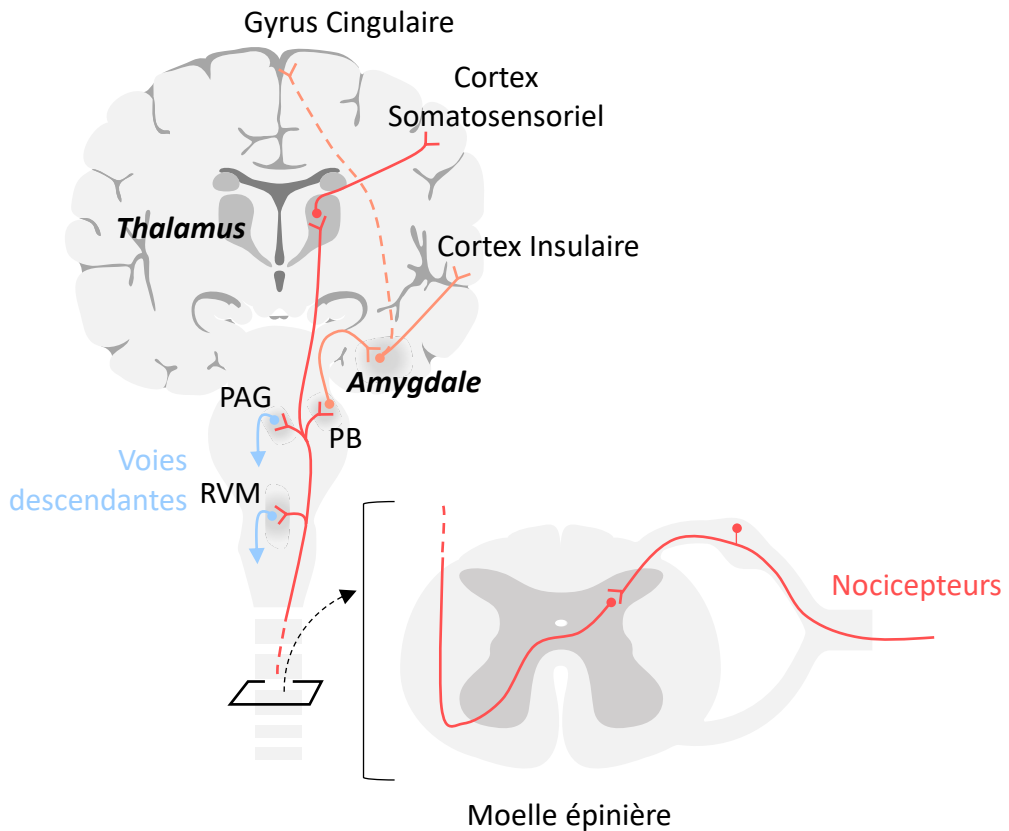


Figure 30. Voies centrales (supra spinales) de la douleur.

Les nocicepteurs acheminent l'information nociceptive jusqu'à la moelle épinière. Une sous-population de neurones présente dans la moelle épinière relaie cette information jusqu'au cortex somatosensoriel via le thalamus. D'autres projections stimulent des neurones qui projettent vers le gyrus cingulaire et le cortex insulaire *via* le noyau parabrachial (PB) et l'amygdale, impliqués dans la composante affective/émotionnelle de la douleur (Fibres oranges). Les voies descendantes émanent de la substance grise périaqueducale (PAG) et du rostral ventro medulla (RVM) (Adapté de Scherrer *et coll.* 2009)

Chapitre IV. opioïdes

Suite à un dommage plus ou moins important de l'organisme, la prise en charge de la douleur qui y est associée est un enjeu majeur. Parmi les molécules disponibles pour le corps médical, une famille s'avère très efficace et largement utilisée ; celle des opioïdes dont la molécule la plus connue est la morphine^{241,242,94}. Les personnels soignants y ont en effet recours dans le monde entier pour minimiser la douleur, qu'elle soit aiguë, chronique ou post-opératoire. Cependant, malgré l'administration quasi-systématique des opioïdes, leur impact sur la réparation tissulaire après une lésion ou une ablation n'a fait l'objet que de très peu d'études. Dans ce chapitre, nous aborderons dans les grandes lignes i) les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors de la perception douloureuse, ii) le mode d'action des opioïdes lors de la prise en charge de la douleur, et iii) les quelques études traitant de l'effet des opioïdes sur les processus de réparation tissulaire.

I Nociception et douleur

La nociception correspond à l'encodage de l'ensemble des signaux qui menacent l'intégrité du corps et à leur transmission pour analyse, vers le cerveau. La détection de ces signaux d'alarme par les nocicepteurs déclenche des réponses réflexes et comportementales (réflexes défensifs, réflexes d'échappement afin de soustraire l'organisme au stimulus nocif, réflexes viscéraux) qui permettent la sauvegarde de l'intégrité de l'organisme et qui sont généralement associées à la perception d'une douleur.

Lors d'une agression tissulaire importante, il est donc logique d'envisager qu'un ou plusieurs messages nociceptifs soient générés au niveau de la lésion et acheminés, par des voies nerveuses ascendantes, jusqu'au cortex somatosensoriel du cerveau où ils sont traduits en perception douloureuse. Certaines des projections émanant des nocicepteurs engagent d'autres régions cérébrales, parmi lesquelles le noyau parabrachial, l'amygdale, l'hypothalamus ou encore le thalamus, toutes impliquées dans la composante émotionnelle de la douleur (Figure 30). Des voies nerveuses descendantes inhibitrices issues du cerveau (émanant de la substance grise périaqueducule et du rostral ventro medulla : Figure 30), peuvent moduler localement la transmission des informations nociceptives au niveau médullaire (Figure 31).

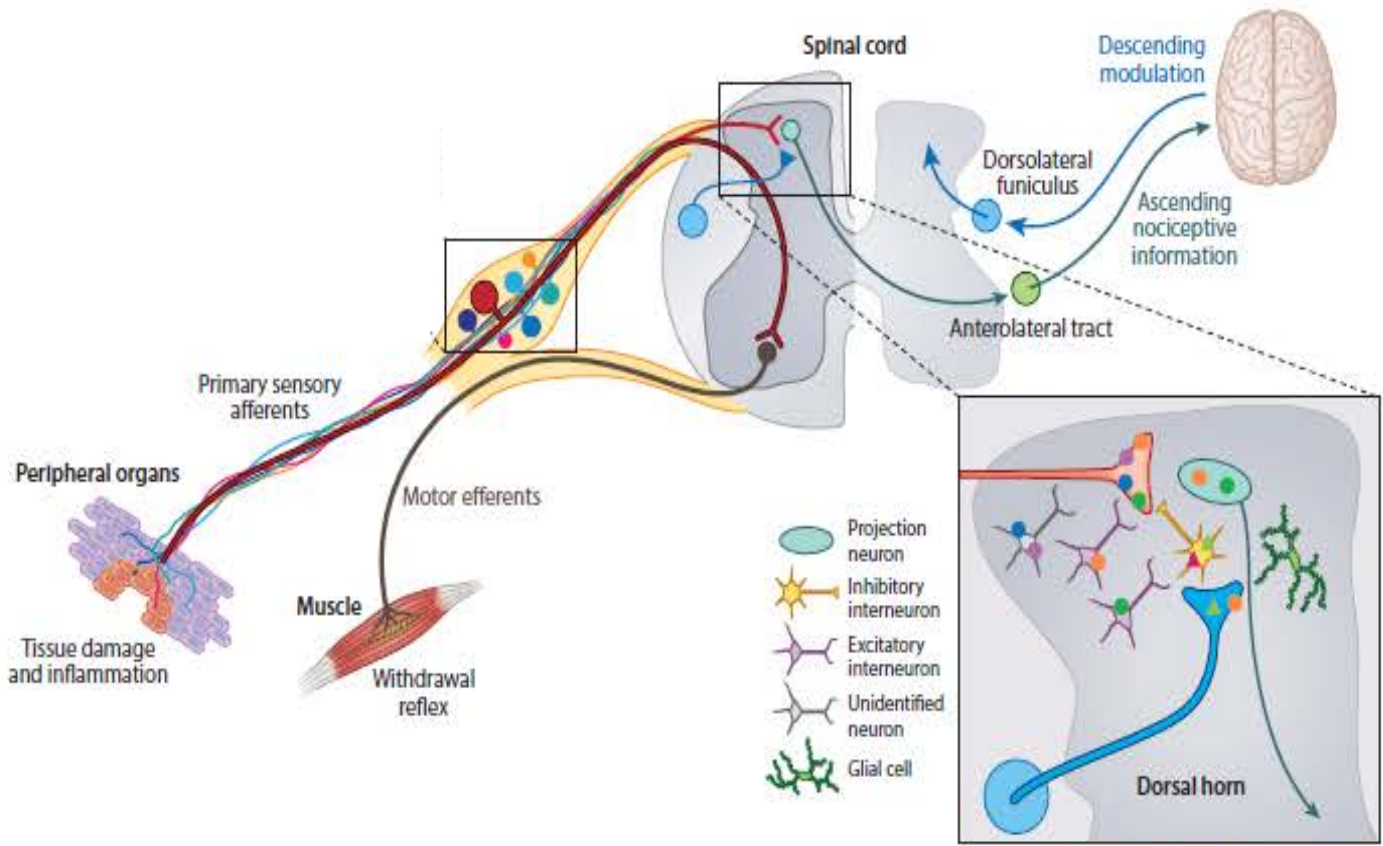


Figure 31. Voies ascendantes et descendantes impliquées dans la sensibilité nociceptive.

CGRP, calcitonin gene-related peptide; DRG, dorsal root ganglion; DOPR, delta opioid receptor; DYN, dynorphin; END, β -endorphin; ENK, enkephalin; KOPR, kappa opioid receptor; MOPR, mu opioid receptor; MrgD, Mas-related G protein-coupled receptor member D; NF, neurofilament; NOC, nociceptin/orphanin FQ; NOPR, nociceptin opioid receptor; Ret, Ret proto-oncogene; TrkC, tropomyosin receptor kinase C; TRPV1, transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (Scherrer et coll. 2018).

A Mécanismes moléculaires à l'origine de la nociception

1 Genèse d'un message nociceptif au niveau des nocicepteurs

Pour rappel, les nocicepteurs sont des fibres afférentes de type A δ ou C répondant à différents stimuli mécaniques, thermiques ou chimiques, avec des seuils de sensibilité variables mais élevés. Les nocicepteurs A δ sont spécialisés dans la détection d'un seul stimulus alors que les fibres C sont, elles, polymodales. La détection des différents stimuli nocifs est assurée par des canaux ioniques, nombreux et variés, présents au niveau des terminaisons des nocicepteurs. Ces canaux sont en général des canaux cationiques, appartenant à différentes familles telles que les canaux TRPV, TRPM, TRPA, TREK, ASICs etc (Figure 32)²⁴³⁻²⁴⁵.

Malgré toute cette hétérogénéité, les mécanismes moléculaires à l'origine de la création d'un message nociceptif sont les mêmes. L'activation de ces canaux conduit à leur ouverture et à une entrée de cations ayant pour conséquence la dépolarisation de la membrane et la génération d'un potentiel de récepteur. On a longtemps pensé que ces canaux ioniques étaient spécifiques d'un stimulus. En réalité, ils sont très souvent capables de détecter plusieurs stimuli (notamment les stimuli chimiques) et peuvent être activés par des ligands endogènes « non nocifs » (tels que la N-acyl-Taurine ou l'acide arachidonique...)^{246,247}. Enfin, ces canaux ont la capacité i) de s'hétéromériser et ii) d'interagir avec des récepteurs couplés à des protéines G, interaction qui peut conduire à l'activation du canal en absence du stimulus nocif, ou du moins en quantité inférieure au seuil ; ce type d'interaction joue un rôle fondamental lors de l'inflammation à laquelle est associée la douleur inflammatoire.

Si l'amplitude du potentiel de récepteur généré est suffisante, elle entraîne par la suite l'ouverture de canaux sodiques et potassiques voltage-dépendants aboutissant à la génération d'un potentiel d'action et à la remontée de l'information nociceptive le long de l'axone du nocicepteur jusqu'à la moelle épinière (Figure 32B)^{245,92}. Parmi les nombreux canaux sodiques voltage-dépendants présents dans les neurones sensoriels, les canaux Nav1.8 et Nav1.7 jouent un rôle important dans la genèse de messages nociceptifs. En effet, en raison de mutations dans le gène codant pour le canal Nav1.7, certaines personnes sont insensibles à la douleur^{248,249} ; ce phénotype a été retrouvé chez la souris après invalidation de ce canal. De la même façon, des souris invalidées pour le canal Nav1.8 présentent une réponse extrêmement atténuée à une stimulation mécanique intense^{250,251}.

A Canal Stimulus

TRPV1	<ul style="list-style-type: none"> • Thermique : Chaleur > 43°C et froid : < 15°C • Chimique irritant : capsaïcine (piment) et piperine (poivre noir), molécules de la soupe inflammatoire (médiateurs lipidiques, cytokines, EAOs)
TRPV2	<ul style="list-style-type: none"> • Thermique : Chaleur > 52°
TRPA1	<ul style="list-style-type: none"> • Thermique : froid < 17°C
TRPM8	<ul style="list-style-type: none"> • Thermique : froid < 25°C
TRPV4	<ul style="list-style-type: none"> • Mécanique : Pression/étirement
TREK	<ul style="list-style-type: none"> • Mécanique : Pression/étirement
ASIC	<ul style="list-style-type: none"> • Chimique irritant : molécule de la soupe inflammatoire (médiateurs lipidiques, cytokines, EAOs)

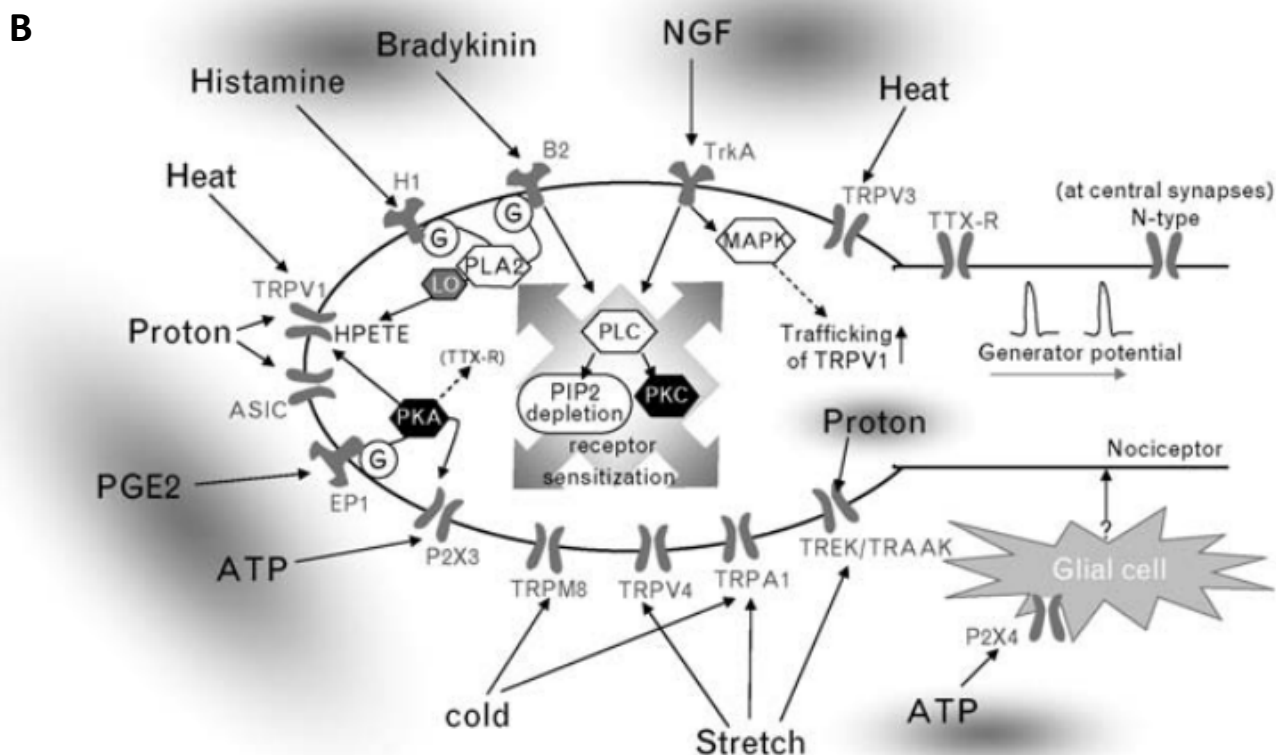


Figure 32. Canaux ioniques et activation des nocicepteurs.

(A) Tableau récapitulatif des différents canaux ioniques et leur sensibilité aux différents types de stimuli nociceptifs (températures extrêmes, pressions intenses, produits chimiques irritants). (B) Activation des voies de signalisation en aval des différents canaux ioniques, générant un potentiel de récepteur, puis un potentiel d'action après activation de canaux voltages dépendants (*Hwang et coll. 2007*).

2 La « soupe inflammatoire » générée lors d'une inflammation module l'activité des nocicepteurs

Suite à une agression tissulaire, la courbe de l'intensité inflammatoire se superpose à celle de la perception douloureuse. Les cellules lésées et les cellules immunitaires à l'origine de la réponse inflammatoire génèrent en effet de nombreuses molécules qui peuvent agir sur les terminaisons nerveuses périphériques des nocicepteurs. L'ensemble de ces molécules constitue ce qu'on appelle communément la « soupe inflammatoire » (Figure 33) qui comprend les PAMPs et les DAMPs, les EAOs, l'histamine, la bradykinine, les médiateurs lipidiques tels que la PGE₂ ou le LTB₄, des cytokines (TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6...), l'adénosine, l'ATP, les protons ou encore le NGF²⁴⁵.

De manière générale, les molécules de cette « soupe inflammatoire » entraînent une diminution du seuil d'activation des canaux sensibles aux stimuli nocifs et donc, *in fine*, augmentent la sensibilité du nocicepteur. Ces nocicepteurs portent entre autres, le récepteur EP1-4 à la PGE₂, le récepteur gp130 à l'IL-6, ou encore le récepteur IL-1R à l'IL-1 β . Par exemple, l'IL-6, en se fixant sur son récepteur gp130 induit l'augmentation de l'expression des canaux TRPA1 et TRPV1^{252,253}. L'activation de l'IL-1R par l'IL-1 β , entraîne, elle, la phosphorylation de la voie p38 MAPK en aval des canaux sodium Nav1.8, induisant une augmentation du nombre de potentiels d'action, et cette activité neuronale intense génère une hyperalgésie mécanique et thermique²⁵⁴. Aussi, notons que leurs seuils de sensibilité à ces différents stimuli peuvent être plus faible, si l'exposition est prolongée.

La sensibilisation des nocicepteurs par ces molécules peut se faire de différentes façons : Les EAOs, les protons et les lipides sont capables d'interagir directement avec les canaux sensibles aux stimuli nocifs et modifier leur fonctionnement. Ainsi, la production d'EAOs ou la libération de médiateurs lipidiques active les canaux ASICs et TRPV1. D'autres molécules agissent sur les nocicepteurs en se liant à leurs récepteurs membranaires présents sur les terminaisons nerveuses. Une interaction directe entre le récepteur membranaire activé et un canal sensible aux stimuli nocifs peut être aussi possible (par exemple, entre le récepteur B2 à la bradykinine et le canal TRPA1)²⁵⁵.

B Méthodes d'évaluation de la douleur

Beaucoup d'outils ont été développés pour évaluer la perception douloureuse chez l'animal. Parmi ceux-ci, la méthode la plus classique est le test de Von Frey. Celui-ci consiste en l'application avec une force constante, d'un filament de diamètre croissant au niveau de la patte d'une souris préalablement placée sur une grille (Figure 34A). Chaque retrait de la patte par la souris lorsque le filament est appliqué, est comptabilisé, et donne accès à un score de douleur. Plus la souris est sensible à la douleur, plus le nombre de retraits est important.

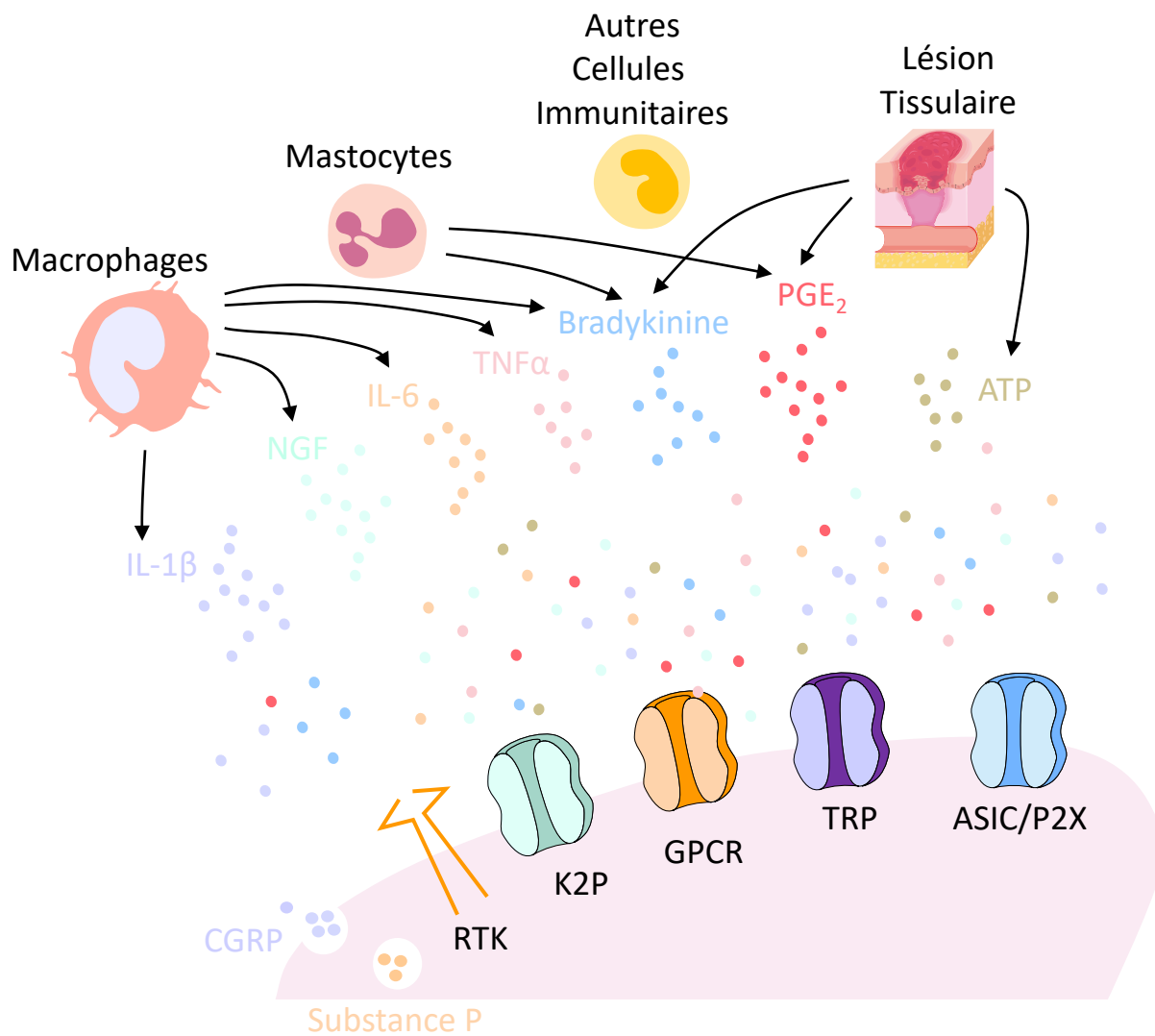


Figure 33. Action des médiateurs périphériques de l'inflammation sur les terminaisons des nocicepteurs. Une lésion tissulaire conduit à la sécrétion de différents médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs se fixent sur leurs récepteurs spécialisés, localisés sur les terminaisons nerveuses périphériques des nocicepteurs. Ils modulent l'activité des nocicepteurs, ce qui peut conduire à l'induction d'un message nociceptif (Adapté de Scherrer et coll. 2009).

Il est également possible de se baser sur l'expression faciale des souris pour évaluer leur perception douloureuse (Grimace Scale)²⁵⁶. Pour cela, les animaux sont généralement placés dans des cubes équipés d'une caméra qui enregistre leurs expressions faciales. Des logiciels de reconnaissance faciale permettent une analyse non biaisée de l'image, prenant en compte différents paramètres tels que la fermeture des yeux, le renflement du nez, le renflement des joues, la position des oreilles et le changement de position des moustaches. Cette analyse permet de calculer un score, allant de 0 à 2 ; le score de 0 correspond à une expression faciale inchangée, reflétant une absence de douleur, le score de 1 correspond à une modification limitée de l'expression faciale, reflétant une douleur modérée et enfin le score de 2 correspond à une modification importante de l'expression faciale, reflétant une perception douloureuse intense (Figure 34B).

D'autres tests peuvent être utilisés en complément pour évaluer la douleur, comme la plaque chauffante ou l'open field. Dans le test de la plaque chauffante, deux paramètres sont mesurés : la latence avec laquelle la souris se lèche pour la première fois et la latence avec laquelle la souris essaie de sauter de la plaque pour échapper au stimulus douloureux. Plus la douleur est intense, plus les temps de latence pour ces deux comportements sont courts. Dans le test de l'open field, des détecteurs de mouvement évaluent sur une durée donnée, la locomotion de la souris ainsi que le nombre de fois où elle se lèche (ce comportement reflète la douleur ressentie par la souris). Ainsi, plus la douleur est intense, plus le nombre de léchages de la souris est élevé et moins sa locomotion est active.

Chez l'homme, la douleur est évaluée à l'aide d'une échelle scorée, sur laquelle le patient positionne sa douleur. Il existe aussi des méthodes qui permettent de s'affranchir de la subjectivité du patient en utilisant les réflexes physiologiques mis en jeu lors d'une perception douloureuse. C'est le cas de la pupillométrie qui consiste à prendre en photo, à l'aide d'une caméra infrarouge, la pupille de l'œil et d'en calculer le diamètre (Figure 34C) ; le changement du diamètre pupillaire étant sous le contrôle du SNP autonome. Plus la douleur est intense, plus la pupille du patient est dilatée (mydriase), et inversement, une absence de douleur est reflétée par une pupille rétractée (myosis) (Figure 34D). Ce dispositif est notamment utilisé pour ajuster les doses de morphine en période post-opératoire. Il permet de prendre en compte la variabilité interindividuelle de sensibilité aux molécules de la famille des opioïdes ; il évite ainsi leur surdosage et *in fine*, limite les phénomènes d'accoutumance à ces produits. Notons que cette méthode peut également être utilisée chez la souris chez qui la douleur entraîne à l'inverse de l'homme, une rétractation de la pupille, tandis qu'une analgésie provoque une dilatation de la pupille (Figure 34D).

La prise en charge de la douleur après une lésion tissulaire ou ablation d'un organe est assurée, depuis des décennies, par des molécules de la famille des opioïdes. Nous allons succinctement

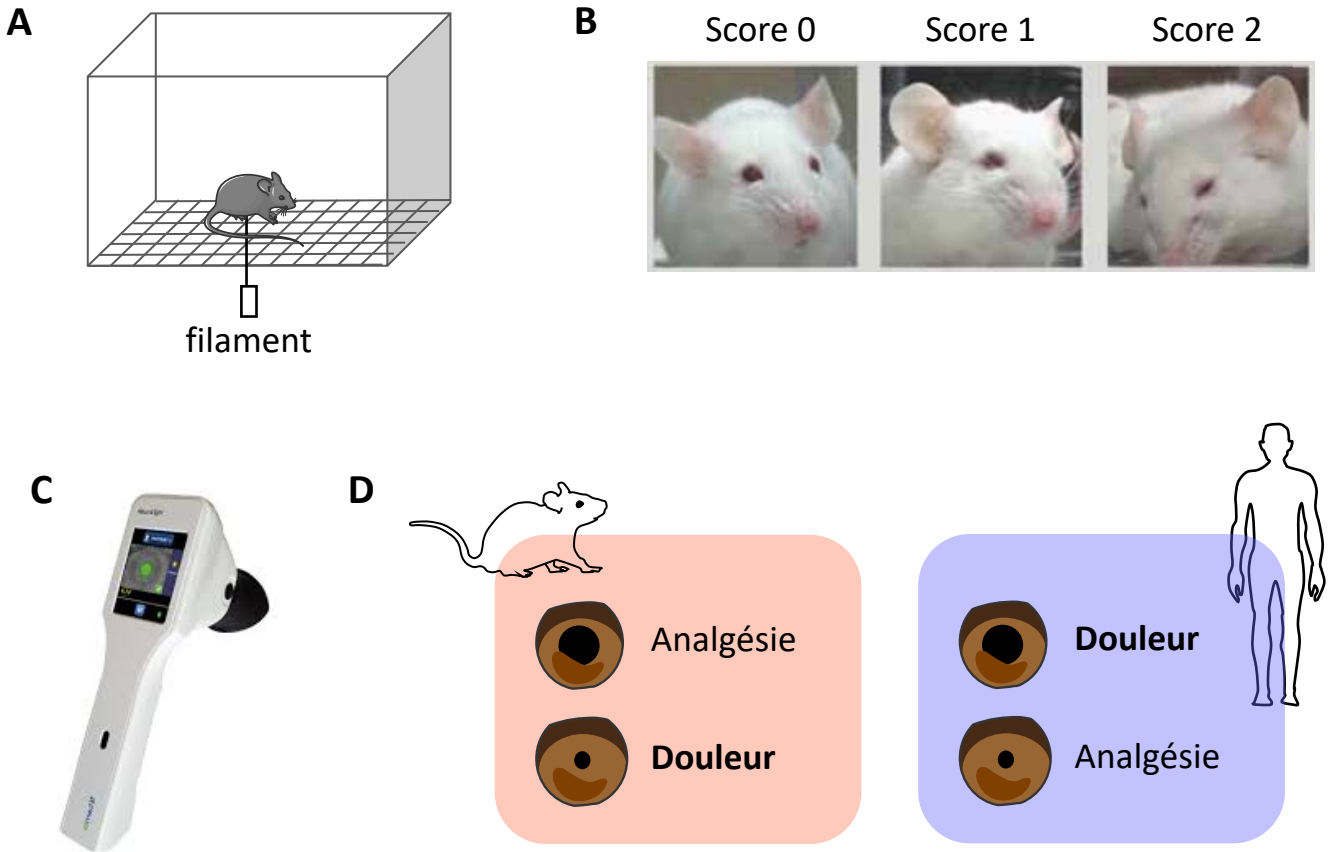


Figure 34. Méthode d'évaluation de la sensibilité nociceptive.

(A) Dispositif du test de von Frey. (B) Échelle d'évaluation de l'expression faciale chez la souris. Score 0: expression faciale inchangée = absence de douleur, score 1: modification de l'expression faciale limitée = douleur modérée, score 2: modification importante de l'expression faciale = douleur intense (*Matsumiya et coll. 2012*). (C) Dispositif Neurolight (IDMED) permettant de mesurer la pupillométrie. (D) Illustration de la variation de la taille de la pupille chez la souris et chez l'homme.

présenter ce système, en évoquant les différents ligands, les récepteurs et les voies de signalisation moléculaire associées.

II Les opioïdes

A Opiïdes endogènes et exogènes

Il existe 4 familles d'opioïdes endogènes : les endorphines, les enképhalines, les dynorphines et les nociceptines/orphanines^{242,257}. Dans tous les cas, il s'agit de peptides plus ou moins longs, principalement synthétisés et libérés par des populations neuronales bien identifiées au niveau du SNC²⁵⁷. A côté de cette production neuronale, les cellules immunitaires, notamment dans un contexte inflammatoire, peuvent synthétiser des opioïdes et les libérer dans le milieu extracellulaire²⁵⁸. En effet, lors d'une inflammation, les neutrophiles qui arrivent les premiers sur le site de lésion constituent la première source d'opioïdes endogènes²⁵⁹. Par la suite, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes T et B peuvent également sécréter des opioïdes²⁵⁹. Par leur fixation à des récepteurs présents sur les terminaisons périphériques des nocicepteurs, ces opioïdes endogènes exercent un effet analgésique dans un contexte inflammatoire^{260,259}. La déplétion spécifique de la population de granulocytes ou de monocytes/macrophages dans un contexte d'inflammation^{260,259}, entraîne une diminution significative de l'analgésie post-inflammatoire, alors que l'injection locale de ces cellules permet de restaurer l'effet analgésique²⁶¹. Cette sécrétion d'opioïdes par les cellules immunitaires souligne leur caractère ambivalent car ce sont elles qui produisent les molécules de la soupe inflammatoire « pro-analgésique ».

Les opioïdes endogènes sont tous issus de pro-peptides, clivés par des enzymes spécifiques pour générer les 4 formes actives différentes d'opioïdes endogènes connus. Toutes ces molécules contiennent la séquence pentapeptidique opioïde Tyr-Gly-Gly-Phe-X en position N terminale responsable de leur activité analgésique.

1 Les endorphines

Les endorphines sont générées à partir d'un grand précurseur peptidique de 267 acides aminés, la POMC (pro-opiomélanocortine). Le gène codant pour la POMC est exprimé par deux populations neuronales localisées dans le noyau arqué (hypothalamus) et dans le noyau du tractus solitaire (tronc cérébral), ainsi que par les cellules hypophysaires corticotropes et mélanotropes et certaines cellules du SI (parmi lesquelles les neutrophiles, les monocytes et les macrophages)²⁵⁹. La POMC est clivée en plusieurs peptides, dont la β -endorphine (1–31), l' α -endorphine (β -endorphine 1–16), et la γ -endorphine (β -endorphine 1–17). Ces peptides ont des séquences peptidiques très proches et contiennent tous la séquence pentapeptidique opioïde avec un résidu méthionine en position 5. La β -

endorphine est l'endorphine la plus stable et présente le plus fort pouvoir analgésique. Elle se fixe préférentiellement sur les récepteurs μ (aussi appelé MOR pour mu opioid receptor), et dans une moindre mesure aux récepteurs δ (aussi appelé DOR pour delta opioid receptor) et κ (aussi appelé KOR pour kappa opioid receptor)²⁶².

2 Les enképhalines

Les enképhalines sont issues de la pro-enképhaline synthétisée dans plusieurs régions du SNC (comme l'hypothalamus, l'amygdale et la moelle épinière), mais également au niveau du SNP, (par exemple dans le tractus digestif), ou au niveau du système endocrinien, ou encore des cellules du SI (notamment par les neutrophiles, monocytes et macrophages)^{263,259}. Le clivage de la pro-enképhaline génère différents peptides tous de petite taille (5 à 8 acides aminés) : la Met-enképhaline, la Leu-enképhaline, l'octapeptide et l'heptapeptide. Ces enképhalines exercent leurs effets principalement *via* les récepteurs δ et μ (avec un peu moins d'affinité) et ont une très faible affinité pour les récepteurs κ ²⁶³. En plus de leurs effets analgésiques, ces enképhalines présentent de nombreuses autres propriétés. En effet, elles peuvent intervenir au cours des processus d'angiogenèse, de régulation de la pression artérielle, de l'appétit, de l'hypoxie, de l'inflammation ou encore de la réparation tissulaire^{264,224,265}. Notons que la met-enképhaline (contenant 5 acides aminés) peut également jouer le rôle de facteur de croissance : on l'appelle alors OGF (Opioid Growth Factor)²⁶⁶.

3 Les dynorphines

Les dynorphines sont issues du clivage de la pro-dynorphine synthétisée quasi-exclusivement dans le cerveau. On distingue la dynorphine-A, la dynorphine-B et l' α -néoendorphine qui diffèrent des endorphines et de la [Met]-enképhaline par un résidu leucine en position 5 de la séquence pentapeptidique opioïde. Les dynorphines se lient préférentiellement aux récepteurs κ ²⁶⁷.

4 La nociceptine

La nociceptine, aussi appelée orphanine FQ, est dérivée de la pré-pro-nociceptine synthétisée par les neurones du SNC, mais aussi par les cellules du SI (au moins par les neutrophiles)^{268, 269}. Ce peptide a été identifié en 1995, comme étant le ligand endogène du dernier récepteur aux opioïdes découvert, le récepteur ORL1 (pour opioid receptor like 1). Ce dernier est présent dans différentes régions du cerveau et de la moelle épinière, ainsi qu'au niveau des cellules musculaires lisses et des cellules immunitaires (parmi lesquels, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages)²⁷⁰. La séquence pentapeptidique N-terminale de la nociceptine est la même que celle des autres opioïdes mais contient un résidu thréonine en position 5. Notons que si la nociceptine est très affine pour le récepteur

ORL1²⁷¹, elle peut aussi se fixer sur les récepteurs μ , δ et κ avec, néanmoins, une affinité plus faible que les autres opioïdes endogènes.

5 Les opioïdes exogènes

L'opioïde exogène le plus connu, la morphine, a été isolé pour la première fois en 1805 par Serturmer²⁷². La morphine est un alcaloïde dérivé de l'opium, utilisé depuis des décennies dans le cadre de la prise en charge de douleurs aiguës, chroniques et péri-opératoires. L'action de la morphine est complexe ; cette molécule agit à la fois sur les terminaisons nerveuses des nocicepteurs au niveau du SNP ainsi que dans le SNC au niveau de la moelle épinière, du tronc cérébral et du cerveau. Son action principale passe par les récepteurs μ , bien qu'elle soit également capable de se fixer aussi sur les récepteurs δ et κ . Alors que son administration est quasi systématique pour la prise en charge de la douleur chez l'homme, la morphine présente une liste conséquente d'effets secondaires. En effet, elle peut entraîner des dépressions respiratoires, des troubles digestifs (nausées, constipation), ou encore de l'hypotension^{273,241}. De plus, il est rapporté une forte désensibilisation à cette molécule qui conduit à la diminution de son effet analgésique pour une même dose donnée, et donc à la nécessité d'augmenter les doses administrées²⁷⁴. Au-delà de tous ces effets, l'effet secondaire majeur lié à la prise de morphine, est la dépendance. Celle-ci nécessite la mise en place d'un sevrage bien encadré afin d'éviter l'apparition de troubles physiques et psychiques associés à l'arrêt de l'administration de morphine. Enfin, la morphine peut agir sur les cellules immunitaires dotées de récepteurs aux opioïdes (c'est-à-dire quasiment toutes les cellules immunitaires) et avoir un effet immunosuppresseur²⁷⁵.

B Récepteurs aux opioïdes et signalisation intracellulaire

1 Historique et présentation des récepteurs aux opioïdes

Alors que la présence de récepteurs aux opioïdes a été suspectée dès les années 1950, seules des expériences de liaison de ligands radioactifs sur des homogénats de cerveaux de rongeurs réalisées par Snyder et coll en 1973 ont véritablement démontré leur existence²⁷⁶. Les récepteurs aux opioïdes appartiennent tous à la super famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, aussi appelés récepteurs couplés à une protéine G (RCPG). Il en existe 4 isoformes codées par des gènes localisés sur des chromosomes différents : le récepteur μ codé par le gène *Oprm1*, le récepteur δ codé par le gène *Oprd1*, le récepteur κ codé par le gène *Oprk1* et le récepteur ORL1 codé par le gène *Oprl1*. Ces récepteurs restent très conservés au cours de l'évolution²⁷⁷. La similarité structurale entre les récepteurs μ , δ et κ est significativement plus importante chez les invertébrés que chez les vertébrés, suggérant que ces récepteurs sont devenus plus sélectifs d'un ligand donné au cours de l'évolution.

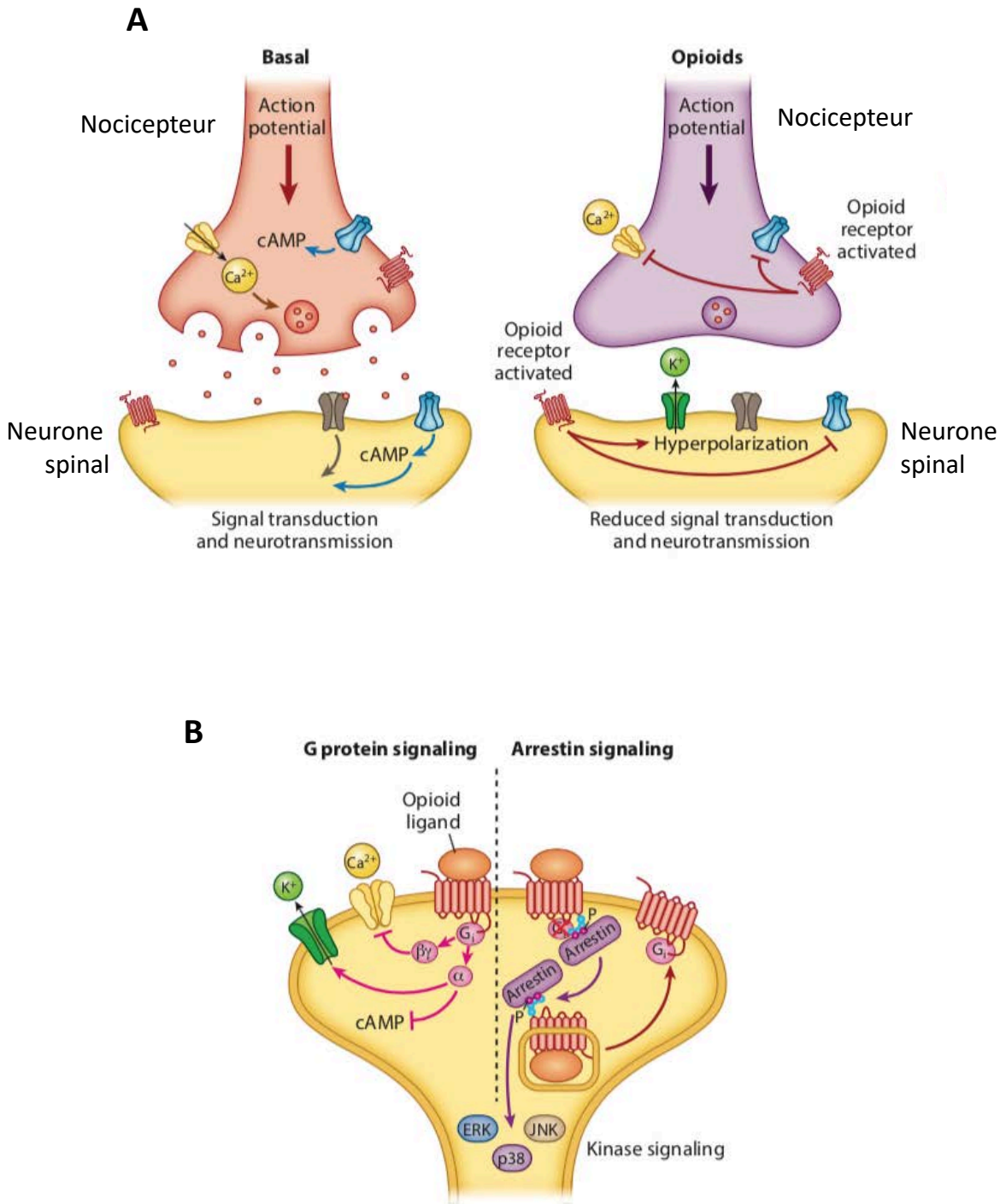


Figure 35. Signalisation moléculaire de la nociception.

(A) Effets pré- et post-synaptiques des opioïdes lors de la transmission de l'information nociceptive. À Gauche, le stimulus nociceptif déclenche un potentiel d'action le long du nocicepteurs du ganglion dorso rachidien entraînant le relargage de neurotransmetteurs vers le neurone spinal. À droite, l'activation des récepteurs aux opioïdes au niveau du nocicepteur inhibe le relargage de neurotransmetteurs et entraine une hyperpolarisation de la membrane du neurone spinal. (B) Signalisation et internalisation du récepteur aux opioïdes via la voie des β -arrestines (Scherrer et coll. 2018).

Au-delà de ces similarités, il existe de nombreux variants d'épissage de ces 4 récepteurs. Chez la souris par exemple, plus d'une vingtaine de variants différents a été identifiée pour le récepteur $\mu^{262, 278}$.

Les gènes codant pour ces récepteurs sont exprimés en grande majorité par des neurones localisés dans le SNC, notamment dans le noyau accumbens et la moelle épinière, et dans le SNP. Les nocicepteurs sont ainsi pourvus de ces récepteurs au niveau des terminaisons axonales spinales et périphériques. En plus de cette localisation dans le SN, il est maintenant bien décrit que les cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes, macrophages ou encore lymphocytes) ou encore des cellules mésenchymateuses, sont porteuses des récepteurs aux opioïdes^{279, 280}.

2 Cascades de signalisation mises en jeu après activation des récepteurs aux opioïdes.

i Généralités

L'activation des récepteurs aux opioïdes que ce soit au niveau périphérique ou central, a pour conséquences d'inhiber la perception douloureuse (Figure 35A). Les trois types de récepteurs aux opioïdes sont majoritairement couplés à des protéines G de type α_i ou α_o . Leur activation entraîne donc une inhibition de l'adénylate cyclase, empêchant ainsi i) la génération d'AMPc intracellulaire et ii) l'activation de la protéine kinase A (PKA). Les récepteurs aux opioïdes peuvent également engager la voie de signalisation des MAPK après activation de la phospholipase C²⁸¹. Enfin, l'activation de la protéine kinase B (Akt) et de ses effecteurs, dont fait partie ERK, conduit également à la modulation de la signalisation opioïdes en aval des récepteurs aux opioïdes²⁸².

Par ailleurs, les RCPGs de manière générale sont connus pour se désensibiliser très rapidement, en réponse à une action prolongée ou répétée de l'agoniste sur son récepteur. Cette désensibilisation se traduit par l'internalisation du récepteur et sa dégradation ou son ré-adressage à la membrane plasmique. Les récepteurs aux opioïdes ne dérogent pas à cette règle *via* des mécanismes ubiquitaires tels que la phosphorylation par une GRK (G protein-coupled Receptors Kinase) et l'association avec une β -arrestine²⁸³. La fixation de cette dernière au récepteur provoque un découplage récepteur/protéine G associée, et l'internalisation du récepteur dans des vésicules, après recrutement de la clathrine ou encore du complexe AP-2. Les récepteurs séquestrés dans les vésicules sont ensuite dirigés vers les lysosomes pour être dégradés ou vers des endosomes pour être recyclés (Figure 35B).

ii Conséquences cellulaires sur le nocicepteur

La fixation des opioïdes sur leurs récepteurs conduisant à l'inhibition de la voie AMPc/PKA (voie principale), elle modifie par conséquent la régulation (ouverture/fermeture) des canaux calciques et donc l'activité du nocicepteur. À terme, cela engendre une inhibition de l'ouverture de canaux

calciques voltage-dépendants et/ou une augmentation de l'ouverture de canaux potassiques GIRK (G protein-regulated Inward Rectifying K⁺ channels), conduisant dans les deux cas à l'hyperpolarisation de la cellule²⁸⁴. Pour le nocicepteur, cela se traduit par une diminution voire l'arrêt de la transmission de l'information douloureuse au niveau spinal et une inhibition du relargage de neuropeptides (substance P et/ou CGRP) au niveau des terminaisons neuronales périphériques²⁸⁵ (présenté dans le chapitre 2). Chez le chat par exemple, l'administration intraveineuse de morphine après stimulation des nerfs de la pulpe dentaire (au niveau du SNP), inhibe la libération de substance P par la terminaison nerveuse périphérique des nocicepteurs²⁸⁶. Par ailleurs, il a été proposé que l'inhibition du relargage du CGRP, soit liée à l'inhibition de la voie de la PGE₂ (pro-inflammatoire) par la morphine, étant donné que le traitement de ganglions rachidiens dorsaux *in vitro* avec de la morphine, inhibe à la fois la voie de signalisation du récepteur à la PGE₂ et le relargage de CGRP²⁸⁷.

Les cellules immunitaires, et notamment les macrophages²⁸⁸, peuvent elles aussi sécréter de la substance P et du CGRP. En effet, Ma et coll. montrent que le traitement *in vitro* des macrophages avec du LPS (Lipopolysaccharide), qui les oriente vers un profil pro-inflammatoire, stimule la sécrétion de CGRP²⁸⁸. Il a également été démontré que les cytokines pro-inflammatoires de manière générale (par exemple IL-1 β , IL-6) peuvent induire la sécrétion de ces neuropeptides par les macrophages¹⁸¹. Ces derniers portant aussi des récepteurs aux opioïdes, ceux-ci peuvent donc moduler la sécrétion de neuropeptides par les macrophages de la même façon que sur les nocicepteurs.

Ainsi, après une lésion, l'administration d'opioïdes exogènes (morphine) doit modifier la quantité de neuropeptides libérés en périphérie par les nocicepteurs et/ou les cellules immunitaires.

Après cette revue succincte des différents opioïdes, de leurs récepteurs ainsi que de leurs modes d'actions, nous allons nous intéresser à leurs interactions avec le SI dans un contexte inflammatoire post-lésionnel.

C Effets des opioïdes sur la réponse inflammatoire

En 1979, Wybran et coll, font état, pour la première fois, d'un effet immunosuppresseur des opioïdes, en montrant que l'administration de morphine inhibe la formation de « rosettes immunes » (association entre des lymphocytes T humains et des globules rouges de moutons préalablement incubés avec des antigènes), reflétant l'incapacité des lymphocytes à produire des anticorps^{289,290}. Cette inhibition disparaît avec l'administration de Naloxone, un inhibiteur pharmacologique des récepteurs aux opioïdes. Depuis cette première étude, la liste des effets immunosuppresseurs des opioïdes s'est allongée, incluant des effets inhibiteurs sur le recrutement des cellules du SI inné, sur la

production d'EAOs, et une stimulation de la polarisation des macrophages vers un profil anti-inflammatoire^{291,292}.

1 Effet sur le recrutement de cellules immunitaires

L'une des actions principales des opioïdes sur la réponse inflammatoire consiste en l'inhibition du recrutement des cellules immunitaires au site de lésion. En effet, dans un modèle de lésion dorsale cutanée chez la souris, un traitement prolongé avec de la morphine inhibe le recrutement de neutrophiles et par conséquent entraîne une diminution du nombre de macrophages dérivés des monocytes circulants, au site de lésion²⁹³. Plus précisément, certaines études révèlent que l'utilisation d'agonistes spécifiques des récepteurs aux opioïdes δ et/ou μ , portés par les cellules immunitaires entraîne l'inhibition du recrutement des neutrophiles, monocytes et macrophages humains et murins, par une inhibition des voies de signalisation chimiotactique^{294,295}. La morphine entraîne ainsi l'inhibition de l'expression de différents facteurs chémoattractants sécrétés par les cellules immunitaires résidentes aux abords du site de lésion, nécessaires au recrutement des neutrophiles et les monocytes²⁹⁶.

2 Effet sur la production d'espèces actives de l'oxygène (EAOs)

Les neutrophiles, qui sont les producteurs majoritaires d'EAOs lors de l'inflammation, expriment les trois sous-types de récepteurs aux opioïdes, μ , δ et κ , chez l'homme comme chez la souris. Le traitement in vitro de neutrophiles humains avec des fragments d'E.Coli entraîne une forte production d'EAOs qui peut être inhibée par de la Morphine²⁹⁷. Même si les mécanismes moléculaires précis ne sont pas décrits, il est envisageable que la signalisation en aval du récepteur aux opioïdes puisse moduler directement l'adressage de la NOX à la membrane plasmique. En effet, des facteurs moléculaires sont communs aux voies de signalisation des récepteurs aux opioïdes et de la NOX (PKB, Akt/ERK). Nous pouvons donc imaginer que l'inhibition de la voie Akt/ERK induite par la fixation des opioïdes sur leurs récepteurs puisse être à l'origine de l'inhibition de l'adressage des sous unités de la NOX2 séquestrées dans le cytoplasme à l'état inactif (normalement adressées à la membrane notamment par cette voie Akt/ERK). Appliqué à un contexte de régénération, même si cela ne montre pas un effet direct des opioïdes sur les cellules immunitaires, nous avons été les premiers à montrer qu'un agoniste des récepteurs aux opioïdes, le Tramadol, est capable d'inhiber la production d'EAOs post-lésionnelle in vivo tandis que l'administration post-lésionnelle d'un antagoniste des récepteurs aux opioïdes, la Naloxone-Méthiodide, induit une production massive d'EAOs, et ceci chez la souris adulte²²⁴.

3 Effet sur la phagocytose

Il a été montré, in vitro et in vivo, que les opioïdes (morphine, leu-enképhaline et met-enképhaline) peuvent inhiber l'activité de phagocytose des macrophages et que cet effet est réversé par la naltrexone, un antagoniste non spécifique des récepteurs aux opioïdes²⁹⁸⁻³⁰⁰. Plus précisément, des expériences réalisées in vitro, révèlent que la fixation de la morphine sur les récepteurs μ et γ portés par les macrophages, bloque l'activité du récepteur $Fc\gamma$ qui est directement impliqué dans l'internalisation des pathogènes extracellulaire³⁰¹. Une autre étude a confirmé l'implication du récepteur μ dans le contrôle des processus de phagocytose, puisque contrairement à des macrophages classiques, des macrophages invalidés pour le récepteur μ sont capables de phagocytose lorsqu'ils sont traités à la morphine in vitro³⁰⁰.

III Implication des opioïdes au cours des processus de réparation tissulaire

La plupart des études relatives à l'effet des traitements opioïdes sur la réparation tissulaire a été réalisée dans des modèles de cicatrisation de la peau. Seules trois études s'intéressent à l'effet des opioïdes sur les processus de régénération. Deux d'entre elles concernent la régénération de l'épithélium pancréatique dans le cas d'une pancréatite induite chez la souris³⁰² et dans ces deux études, la morphine empêche la régénération. La troisième étude, qui date de 1973, montre qu'un traitement avec la Naloxone (antagoniste des récepteurs aux opioïdes) chez la salamandre accélère la régénération de la patte à la suite d'une amputation, suggérant un effet délétère des opioïdes endogènes sur la régénération. A ce jour, aucune autre étude ne s'est intéressée à l'impact des opioïdes sur la régénération, que ce soit chez la salamandre ou chez d'autres espèces capables de régénération spontanée.

Dans un modèle murin de lésion cutanée (donc de cicatrisation de la peau), une étude, parue en 2010, montre que l'administration chronique de Morphine entraîne un retard dans la fermeture de la plaie. Les auteurs suggèrent que cet effet soit dû à une inhibition du recrutement des cellules immunitaires sur le site de lésion, notamment de la migration des neutrophiles, suite à l'activation du récepteur μ porté par les cellules immunitaires²⁹³. En effet, un traitement à la morphine inhibe la migration des neutrophiles in vitro, tandis qu'il n'entrave pas les processus de cicatrisation chez une souris invalidée pour le récepteur μ .

Toujours dans le contexte de lésion cutanée, quelques études se sont intéressées à l'impact d'un traitement à la morphine chez la souris en considérant un acteur supplémentaire : les neuropeptides sécrétés par les fibres sensorielles afférentes^{166,303,304}. Par exemple, après une lésion cutanée dorsale

chez le rat, l'administration topique de morphine retarde significativement la fermeture de la plaie³⁰³ alors que l'ajout de substance P dans le gel d'application permet de récupérer une vitesse de fermeture semblable à celles des souris contrôles non traitées. Le même groupe a aussi montré que i) la destruction des nocicepteurs TRPV1⁺ par un traitement à la capsaïcine entraîne un retard de cicatrisation, ii) l'ajout de morphine ne potentialise pas l'effet de cette dénervation, suggérant que l'effet de la morphine sur la cicatrisation cutanée est dépendant des nocicepteurs, iii) la morphine inhibe l'expression des récepteurs à la substance P par les cellules immunitaires, qui sont indispensables à la régénération (présenté dans le chapitre 3)³⁰⁴.

Enfin, une étude visant à évaluer l'impact des traitements opioïdes sur la vitesse de guérison de plaies chroniques, a été réalisée sur 450 patients en 2017²⁶⁴. Il est apparu que les patients traités avec une dose de morphine supérieure à 10mg/kg, ont une cicatrisation des plaies cutanées significativement retardée²⁶⁴, comme cela avait été observé dans les différents modèles animaux²⁶⁴.

De nouveau, il est important de rappeler que la fermeture d'une plaie cutanée ne peut être considérée comme une régénération à proprement parler, ni les poils ni les glandes dermales n'étant reconstitués.

Points à retenir :

Lors d'une agression tissulaire, le tissu ou l'organe lésé subit une stimulation sensorielle intense. Cette stimulation, couplée à la sécrétion des facteurs liés à la réponse inflammatoire, active les nocicepteurs du SNP, qui initient un message nociceptif à l'origine de la perception douloureuse au niveau du SNC. Cette douleur est communément prise en charge par l'administration de morphine qui présente un pouvoir analgésique très puissant. Cet opioïde agit principalement sur :

- **Les nocicepteurs.** La morphine, en induisant leur hyperpolarisation, bloque la transmission du signal nociceptif au niveau spinal et inhibe la sécrétion périphérique de neuropeptides tels que la substance P et le CGRP qui participent normalement à la mise en place de la réponse inflammatoire.

- **Les cellules immunitaires.** La morphine a un effet immunosuppresseur, elle inhibe i) le recrutement des cellules immunitaires sur le site de lésion/infection, ii) la production d'EOs responsable de la mort des neutrophiles et iii) et l'efférocytose des neutrophiles par les macrophages.

- **La cicatrisation.** Un nombre limité d'études indique que la morphine, administrée localement ou en systémique, retarde la fermeture des plaies cutanées.

Considérant le rôle primordial de l'innervation et des cellules immunitaires au cours des processus de régénération (chapitre 2 et 3 respectivement), nous avons voulu évaluer dans quelle mesure les opioïdes agissent sur ces deux systèmes, pour inhiber les processus de régénération chez le mammifère.

Etude expérimentale

OBJECTIFS DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

L'identification des mécanismes inhibiteurs de la régénération représente un enjeu majeur dans le domaine de la médecine réparatrice. Alors que l'utilisation des opioïdes faisait déjà l'objet de nombreuses critiques dues à leurs nombreux effets secondaires^{305,273}, nous avons récemment publié des résultats novateurs révélant leurs effets inhibiteurs sur la régénération tissulaire et ce, quelle que soit leur origine, endogène ou exogène²²⁴. En effet, nos travaux montrent que la régénération tissulaire spontanée observée chez la souris MRL est inhibée lorsque les animaux sont traités avec du Tramadol, un agoniste des récepteurs μ aux opioïdes. A l'inverse, chez la souris C57BL/6 incapable de régénération spontanée, l'administration de Naloxone Méthiodide (NalM), un antagoniste non spécifique des récepteurs aux opioïdes, permet de déclencher la régénération. Dans ce modèle de régénération induite (souris C57BL/6 traitée à la NalM), nous montrons qu'une production importante d'EOs a lieu dès les premières heures après la lésion et que celle-ci est indispensable à la régénération, comme c'est le cas chez l'hydre et le poisson zèbre^{77,78}. Ces résultats ont été obtenus dans un modèle d'ablation massive du tissu adipeux sous-cutané chez la souris adulte et retrouvés dans le modèle caractéristique de lésion de la nageoire caudale du poisson zèbre, suggérant donc très fortement l'universalité de l'effet inhibiteur des opioïdes sur la production post-lésionnelle, précoce, intense et brève d'EOs, indispensable à la régénération tissulaire.

Historiquement, les opioïdes sont connus pour leurs puissants effets analgésiques. Outre cet effet, de plus en plus d'études montrent que les récepteurs aux opioïdes sont présents à la membrane de nombreuses cellules immunitaires, modulant ainsi l'activité de celles-ci²⁷⁹. Les opioïdes exercent alors un effet immunosuppresseur, inhibant notamment le recrutement des cellules immunitaires sur le site de lésion dans un contexte de cicatrisation cutanée²⁹³, ou encore la production de cytokines pro-inflammatoires par des cellules immunitaires^{279,292,296}. Or, comme nous l'avons présenté dans le chapitre 3 de l'introduction, la participation active du système immunitaire est absolument essentielle à la mise en place des processus de régénération après une lésion/ablation. **C'est pourquoi nous avons émis une première hypothèse selon laquelle les opioïdes seraient un frein à la mise en place d'une réponse inflammatoire adéquate pour permettre la régénération chez le mammifère adulte.**

Par ailleurs, au niveau du système nerveux périphérique, l'activation des récepteurs aux opioïdes situés sur les terminaisons nerveuses des nocicepteurs, conduit notamment à l'inhibition de l'activité

de ces dernières (chapitre 4 de l'introduction). Cette inhibition affecte la libération des neurotransmetteurs peptidiques (substance P et CGRP) i) au niveau médullaire, empêchant ainsi la remontée du message nociceptif vers les centres supérieurs et ii) au niveau périphérique directement dans le tissu lésé. Considérant que les opioïdes inhibent d'une part la régénération tissulaire et d'autre part l'activité des nocicepteurs, **nous avons émis une seconde hypothèse selon laquelle les nocicepteurs seraient essentiels pour permettre la régénération.**

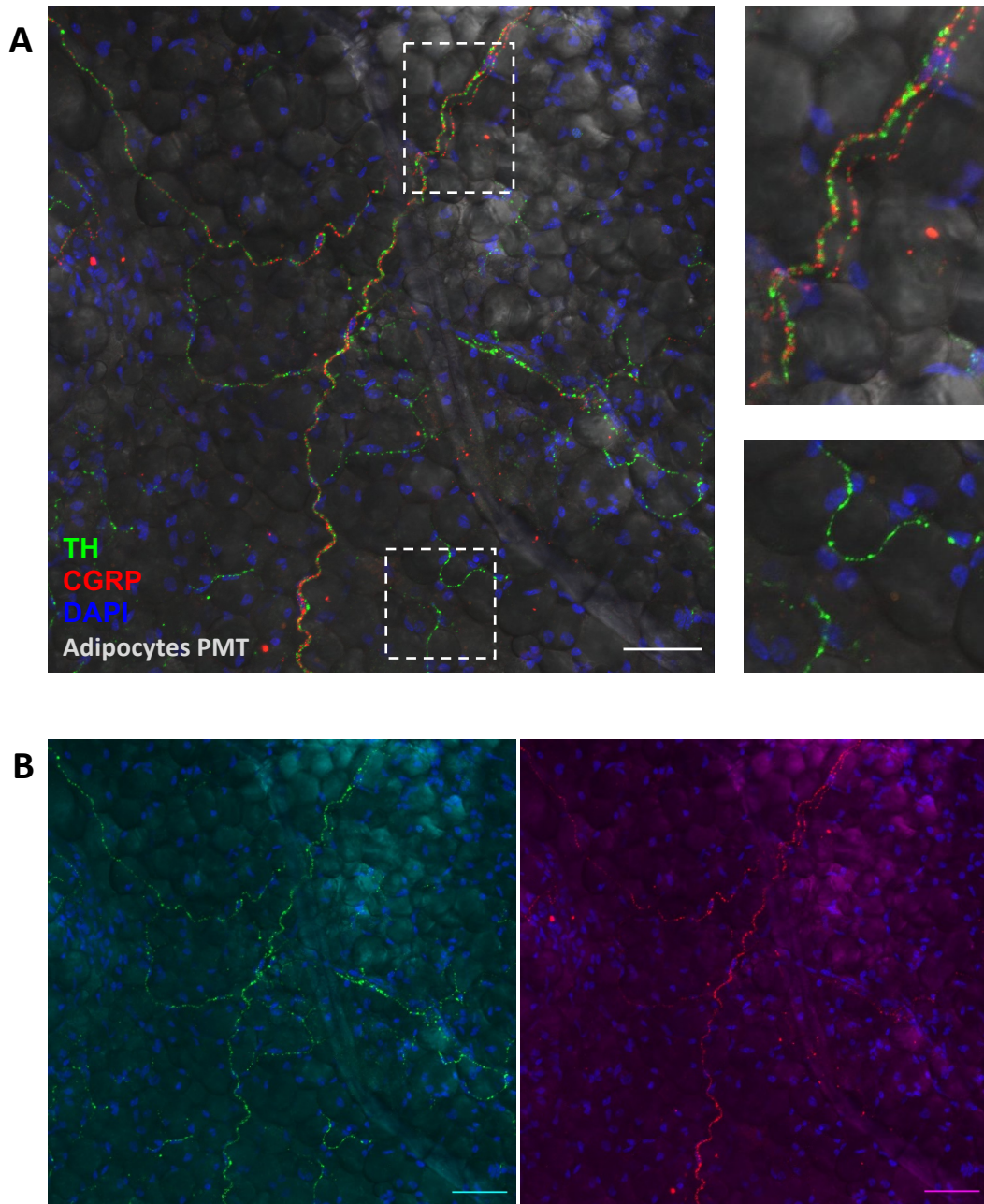


Figure 36. Innervation efférente et afférente du TAsc.

(A) Visualisation de fibres afférentes sensorielles (immunopositives pour le CGRP, rouge) et de fibres efférentes autonomes sympathiques (immunopositives pour la TH, vert) sur une coupe épaisse de TAsc murin. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Les images de droite correspondent à l'agrandissement des zones indiquées en pointillé. (B) Séparation des canaux rouge (CGRP) et vert (TH). Barre d'échelle : 50 μ m. CGRP : Calcitonin-Gené Related Peptide, TH : Tyrosine Hydroxylase.

I Modèle d'étude des processus de cicatrisation et de régénération chez le mammifère adulte : le tissu adipeux inguinal sous cutané (TAsc) murin.

Comme développé dans l'introduction, les études des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à la régénération ont été réalisées majoritairement sur des organismes modèles capables de régénération spontanée de leur organisme en entier ou bien d'une partie de celui-ci (hydre, planaire, étoile de mer, poisson zèbre, salamandre...). Les données de la littérature sur les mammifères suggèrent qu'au cours du développement postnatal, des mécanismes inhibiteurs de la régénération se sont mis en place au profit de la cicatrisation. L'espoir d'identifier un jour ces verrous afin de les lever et ainsi permettre la régénération d'un tissu voire d'un organe après une lésion, nécessitait la mise en place d'un modèle d'étude chez le mammifère adulte. Dans ce contexte, le laboratoire STROMALab a développé un modèle de lésion du tissu adipeux chez la souris adulte.

Le choix du tissu adipeux comme modèle d'étude des mécanismes sous-jacents à la régénération tissulaire peut paraître, à priori, surprenant. Néanmoins, au-delà de son rôle primordial dans la gestion et le maintien de l'homéostasie énergétique, le tissu adipeux sous-cutané (TAsc) possède des caractéristiques qui font de ce tissu, un modèle d'étude intéressant et facilement manipulable pour étudier les processus de réparation post-lésionnelle.

Le TAsc, qui est un dépôt adipeux dit « blanc », est majoritairement composé d'adipocytes blancs capables i) de stocker l'énergie sous forme de triglycérides, ii) de libérer cette énergie sous forme d'acide gras libres et de glycérol lorsque les dépenses énergétiques sont supérieures aux apports et iii) de participer à la thermogenèse de non-frisson grâce à leur capacité à se convertir en adipocytes dits « beiges », immuno-positifs pour la protéine découplante, UCP1 (UnCoupling Protein 1), qui est normalement caractéristique des adipocytes bruns³⁰⁶. UCP1 est un canal à proton dont la présence au niveau de la membrane interne mitochondriale permet de découpler l'activité de l'ATP synthase de celle de la chaîne de phosphorylations oxydatives, et ainsi de produire de la chaleur.

A Innervation du TAsc

Comme la majorité des organes, Le TAsc reçoit une double innervation à la fois efférente et afférente³⁰⁷, respectivement, une innervation autonome relativement dense ainsi qu'une innervation sensorielle moins dense (Figure 36). L'innervation autonome sympathique, révélée par un immunomarquage dirigé contre la Tyrosine Hydroxylase (enzyme de synthèse de la noradrénaline), est retrouvée chez toutes les espèces étudiées (lapins, chat, rats, souris,

hamster, homme...). Elle est abondante et se localise à la fois entre les adipocytes blancs et beiges et autour des vaisseaux sanguins. La présence de fibres parasympathique reste encore controversée car démontrée par une seule équipe et uniquement chez la souris³⁰⁸. L'innervation sensorielle, beaucoup moins étudiée, est constituée de fibres immuno-positives pour le CGRP et la substance P³⁰⁹ et se localise principalement autour des vaisseaux.

Les fibres sympathiques assurent plusieurs rôles dans le TA : par leurs effets vasoconstricteurs, elles contrôlent le tonus vasculaire et ainsi l'apport en nutriments et oxygène dans le tissu. Au niveau des adipocytes, la noradrénaline stimule la lipolyse (hydrolyse des triglycérides via l'activation de la lipase hormono-sensible), participe à l'apparition d'adipocytes beiges au sein du TAsc (en induisant notamment l'expression d'UCP1) et inhibe l'expansion du dépôt adipeux en contrôlant à la fois la prolifération de progéniteurs adipocytaires et leur différenciation. Notons que, comme dans d'autres tissus, ces fibres peuvent sécréter d'autres neurotransmetteurs tels que le neuropeptide Y ou l'ATP, qui modulent aussi la biologie du TA³⁰⁷.

Mises en évidence dans le TA les fibres sensorielles CGRP⁺ sont des fibres non myélinisées de type C³¹⁰. Elles constituent donc probablement aussi des nocicepteurs (cf chapitre 2) dans le TA, bien que cette fonction de « détecteur de signaux dangereux » n'ait jamais été étudiée dans ce tissu. La seule information dont nous disposons dans ce domaine est le qualificatif de « douloureux » qui est associé à l'acte de liposuction (discussion personnelle avec des chirurgiens plasticien du CHU de Toulouse). A notre connaissance, la présence d'autres types de fibres A α , A β et A δ n'a pas été recherchée et ne doit donc pas être écartée. D'un point de vue neuro-anatomique et grâce à des expériences de marquages rétrograde et antérograde, l'équipe de Bartness montre que ces fibres sensorielles projettent à différents niveaux du SNC (moelle épinière, bulbe rachidien ou encore hypothalamus) et peuvent moduler directement l'activité des voies efférentes sympathiques³¹¹⁻³¹³. Les fibres sensorielles du TA sont décrites comme faisant remonter des informations sur le statut métabolique/énergétique du dépôt de TA jusqu'au SNC. En effet, l'activité électrique de ces fibres sensorielles est modulée par l'application de leptine ou de produits de la lipolyse tels que du glycérol, ou des acides gras tels que des prostaglandines. Même si aucune étude sur le TA n'est disponible sur ce sujet, il est possible d'envisager, comme cela est rapporté dans d'autres tissus, que ces fibres sensorielles modulent le flux sanguin et/ou contrôlent les populations de cellules immunitaires présentes ou arrivant dans ce tissu, via la libération locale de substance P et/ou de CGRP^{314,315}.

B TAsc et cellules immunitaires

Le TAsc héberge une population importante de cellules immunitaires CD45⁺, myéloïdes et lymphoïdes, les cellules myéloïdes étant majoritaires. Ces cellules immunitaires se localisent de manière dispersée entre les adipocytes ou regroupée en clusters plus ou moins gros, comme les figures de Crohn (regroupements de macrophages autour d'un adipocyte nécrotique dans le TA d'un animal ou d'une personne obèse), ou les FALCs (Fat-Associated Lymphoid Cluster) riches en cellules ILC2 (Innate Lymphoid Cells type 2). Ces dernières sont des cellules de type lymphoïde appartenant au système immunitaire inné³¹⁶.

Le rôle des cellules immunitaires du TA a été largement décrit dans des contextes tant physiologiques que physiopathologiques. Par exemple, en condition physiologique, le SI peut moduler la sécrétion de noradrénaline par les fibres sympathiques³¹⁷ et participer à l'émergence d'adipocytes beiges au sein du dépôt adipeux lors de la mise au froid³¹⁸. Comme dans d'autres tissus, il est très probable qu'une part importante des molécules libérées par les cellules immunitaires (médiateurs lipidiques, cytokines, ...) puissent moduler l'activité des fibres sensorielles entraînant l'apparition d'un message nerveux à destination du SNC et une libération périphérique de CGRP et/ou de substance P. L'implication du SI dans des conditions physiopathologiques telles que l'obésité, fait aussi l'objet de nombreuses études. Celles-ci cherchent à mieux comprendre le rôle des cellules immunitaires dans la mise en place et le maintien de l'inflammation « à bas bruit » caractéristique des maladies métaboliques dites de surcharge. Il est notamment décrit que, dans ce contexte, les cellules immunitaires ont un phénotype plutôt pro-inflammatoire et participent à la mise en place de l'insulino-résistance des adipocytes conduisant à l'apparition du diabète de type II bien souvent associé à l'obésité³¹⁹.

Par ailleurs, et de façon inattendue, le laboratoire STROMALab a démontré la présence de véritables cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans les TA chez la souris comme chez l'homme, ces CSH étant à l'origine d'une production endogène de cellules immunitaires³²⁰. Cette hématopoïèse endogène produit majoritairement des cellules du lignage myéloïde, appartenant au système immunitaire inné, telles que des monocytes/macrophages et des mastocytes. Le TA renferme donc une population de cellules immunitaires hétérogènes sur le plan de leur origine (médullaire et adipeuse).

C Les cellules souches/stromales mésenchymateuses du TAsc

Le parenchyme des différents dépôts adipeux est constitué d'adipocytes, qui assurent les fonctions principales de ce tissu, notamment ses fonctions métaboliques. Le renouvellement de ces adipocytes à hauteur de 5 à 10% par an est possible grâce à la présence dans les TA de progéniteurs, initialement appelés pré-adipocytes. Il est maintenant admis que ces progéniteurs sont des cellules souches

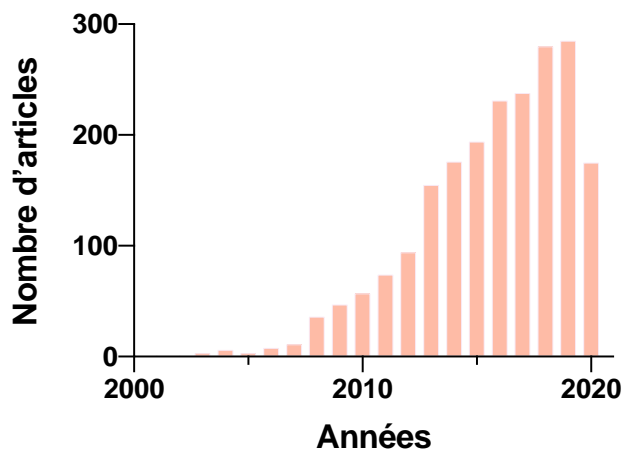


Figure 37. Nombre de publications scientifiques sur le thème « Cellules mésenchymateuses du TA et médecine régénérative» (Base bibliographique Pubmed, 1^{er} juillet 2020)

mésenchymateuses (CSMs) au même titre que les CSMs classiquement étudiées et retrouvées dans la moelle osseuse. En effet, elles sont dotées de multipotence, sont capables de soutenir l'hématopoïèse et ont des capacités d'immuno-modulation^{321,322,323}. Du fait de leur localisation dans le TA, ces progéniteurs sont désormais appelés ASCs (pour Adipose-derived Stem/Stromal Cells). Les ASCs bien que très hétérogènes dans leur ensemble, sont classiquement caractérisées par l'immuno-phénotype CD45⁻/CD31⁻/CD34⁺. Ces ASCs ont pour fonction principale de permettre le renouvellement et/ou la formation d'adipocytes via un phénomène d'hyperplasie en cas de surcharge métabolique et grâce à leur haut potentiel de différenciation en adipocytes blancs. Par ailleurs, le sécrétome très riche des ASCs a fait l'objet de nombreuses études. Celui-ci contient notamment des cytokines qui régulent l'activité des cellules immunitaires, et assurent notamment le rôle immuno-modulateur des ASCs³²³.

D ASCs et médecine régénératrice

Le TA est un tissu de premier choix comme source de CSM pour leur utilisation en médecine régénératrice. En effet, le TA est présent en grande quantité dans l'organisme (l'ensemble des dépôts peut représenter jusqu'à 40% du poids corporel), il est facile d'accès (au moins au niveau sous-cutané) et il contient un grand nombre d'ASCs. Ces dernières représentent en effet 10% des cellules totales du TA alors qu'au niveau de la moelle osseuse, les CSMs ne représentent que 0,001 à 0,01% des cellules nucléées totales de la moelle osseuse³²⁴. Ces ASCs font l'objet d'un nombre exponentiel d'études et d'essais clinique associés, y compris dans le laboratoire STROMALab (Figure 37). Elles sont notamment utilisées, après amplification, dans le cadre de pathologies inflammatoires et/ou articulaires, ou suite à des ischémies³²⁵. En effet, l'injection locale d'ASCs est notamment associée à des effets bénéfiques tels que i) une immuno-modulation bénéfique dans le cadre de pathologies inflammatoires, ii) une meilleure récupération/réparation tissulaire et iii) une diminution de la douleur perçue par les patients bien qu'on n'en connaisse pas actuellement la raison^{326,323,327}.

Comprendre la régénération du TA peut s'avérer intéressant dans le domaine de la médecine reconstructrice. En effet, la transplantation de TA autologue est devenue de plus en plus populaire ces dernières années, non seulement pour redonner des volumes, mais également pour améliorer la qualité des tissus, tant en chirurgie plastique reconstructrice qu'esthétique³²⁸. En effet, l'utilisation du TA comme un matériau de remplissage naturel pour réaliser des modifications structurelles est aujourd'hui considérée comme une procédure sûre et bien tolérée et est utilisée dans un grand nombre de cas, notamment l'augmentation mammaire primaire, le remodelage des seins, le rajeunissement du visage ou le traitement des cicatrices³²⁹. Toutefois, le succès clinique de la greffe de TA est limité par le taux de survie des cellules greffées variable et imprévisible, et ceci quelle que

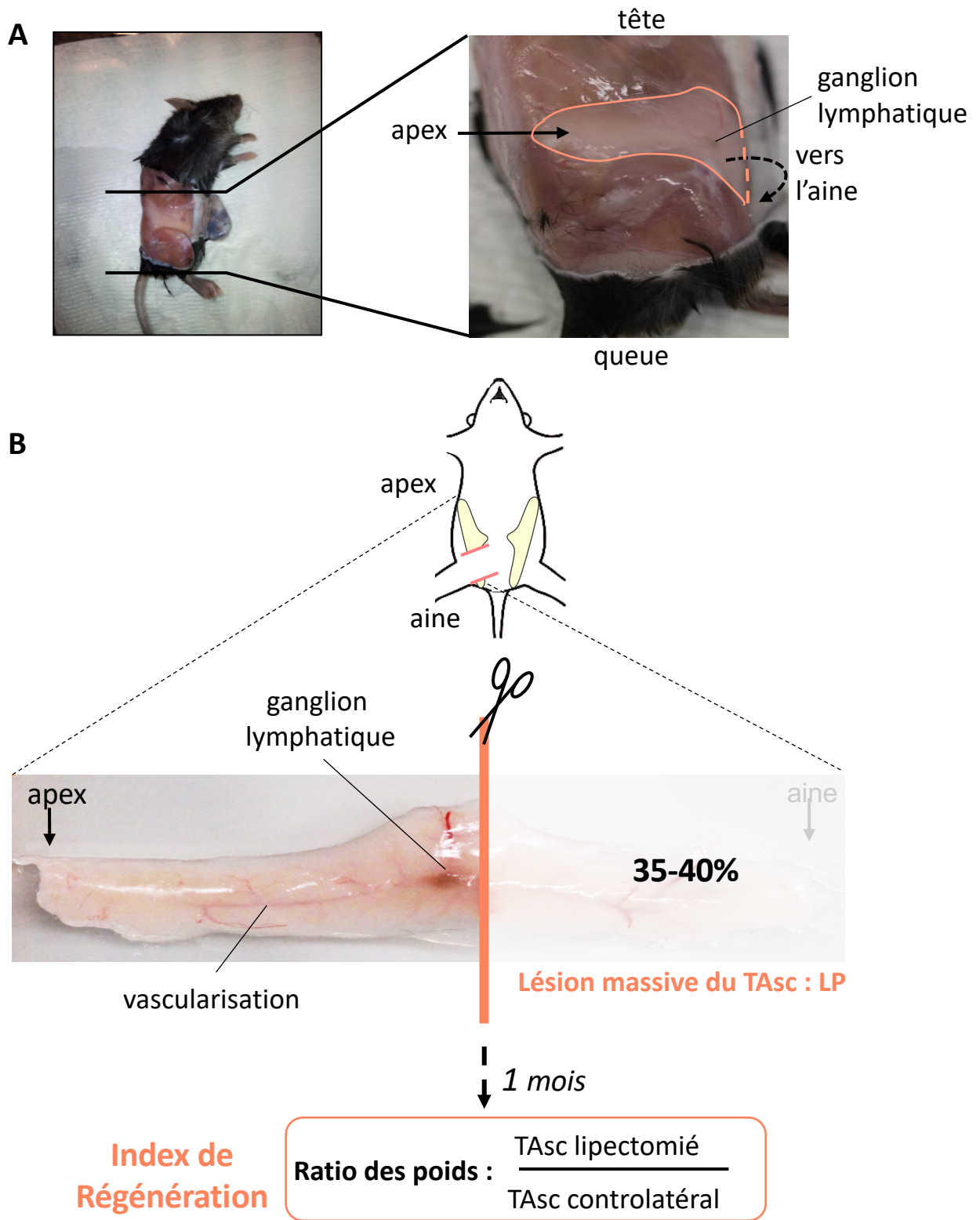


Figure 38. Présentation du tissu adipeux sous-cutané et de la lipectomie.

(A) Localisation du TAsc chez la souris. (B) LP (35-40%) effectuée sur le TAsc droit. L'index de régénération est calculé 1 mois après LP et permet de quantifier la régénération. LP : Lipectomie, TAsc : Tissu adipeux sous-cutané

soit sa localisation et sa quantité, ce qui entraîne la nécessité de multiples injections et, dans certains cas, un résultat esthétique médiocre. Parallèlement, l'ingénierie tissulaire qui offre une technique alternative pour produire de nouveaux tissus autologues, ne génère pas un volume suffisant pour réparer de grands volumes. L'amélioration de la reconstruction tissulaire est donc un véritable défi pour les médecins. Le potentiel régénérateur du (TA) pourrait être une alternative efficace pour surmonter la morbidité du site donneur et l'imperfection esthétique du site receveur observées après une greffe de TA.

En conclusion, le TAsc renferme une innervation fonctionnelle dense et complexe, ainsi qu'une population importante et hétérogène de cellules immunitaires. En plus de cette complexité et hétérogénéité cellulaire marquée, ce tissu constitue un véritable réservoir de cellules « souches » mésenchymateuses, au potentiel « reconstructeur » indéniable. Chacun de ces trois éléments, que ce soient les nerfs, les cellules immunitaires ou les cellules stromales mésenchymateuses, est connu et décrit comme étant indispensable à la régénération (cf introduction de ce manuscrit). Il apparaît donc que le TAsc constitue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes permettant la régénération chez le mammifère adulte. Par ailleurs, les trois éléments mentionnés ci-dessus étant également présents dans la plupart des tissus/organes, les résultats obtenus avec le modèle de lésion du TAsc pourraient donc être tout à fait transposables à d'autres organes. Rappelons que les résultats publiés par Labit et coll. vont dans ce sens, puisque les mécanismes contrôlant la régénération et identifiés dans le modèle murin de lésion du TA (production d'EOs et inhibition par les opioïdes) ont été retrouvés dans le modèle de lésion de la nageoire chez le poisson zèbre²²⁴.

Le modèle de lésion développé au laboratoire STROMALab consiste ainsi en une ablation massive du tissu adipeux inguinal sous cutané (TAsc), appelé lipectomie (LP), chez la souris adulte. Il s'agit ainsi d'une ablation partielle unilatérale (35% d'un des deux dépôts adipeux est ainsi retiré) réalisée en condition stérile (Figure 38). Grâce aux repères anatomiques que sont la vascularisation en forme de « T » et le ganglion lymphatique (Figure 38), la résection est bien reproductible (Figure 39A). Après avoir vérifié que les résultats obtenus étaient identiques quel que soit le côté opéré et que le dépôt contro-latéral n'évoluait pas au cours du temps après la chirurgie (données non montrées, Thèse Elodie Labit), les lipectomies ont été systématiquement réalisées à droite. La présence ou pas de régénération du TAsc est évaluée à la fois par observation macroscopique et par un index de régénération (IR) calculé en faisant le rapport du poids du TAsc lipectomié sur le poids du TAsc contro-latéral (Figure 39). Ainsi, chez une souris non opérée, ce ratio est égal à 1 alors qu'immédiatement après LP (à t0), le ratio est de 0,65. Nous considérons que le TAsc lipectomié régénère lorsque, 1 mois après la LP, l'IR est de l'ordre de 0,85 à 0,90 et que l'observation macroscopique du tissu montre une

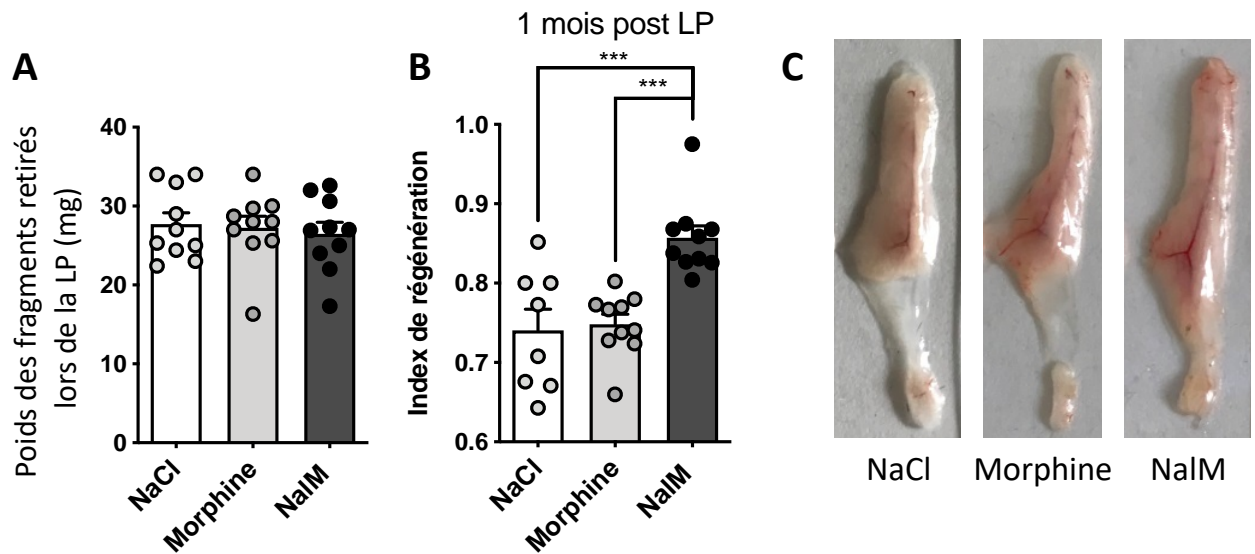


Figure 39. Modèle de régénération induite du TAsc.

(A) poids des fragments de TAsc qui ont été retirés le jour de la LP. (B) Mesure de l'index de régénération 1 mois après LP. (C) Photos représentatives du TAsc lipectomié de souris C57BL/6 traitées au NaCl, à la Morphine ou à la NaIM, 1 mois post-LP. Toutes les données sont présentées en \pm écart standard à la moyenne (ESM). *** $p < 0,001$. LP : Lipectomie, NaIM : Naloxone Méthiodide, TAsc : Tissu adipeux sous cutané.

repousse au niveau de la LP similaire à la morphologie initiale (tissu avec un certain volume, vascularisé et rempli d'adipocytes donnant cette couleur nacré). Inversement, un TAsc qui cicatrise, présente un IR aux alentours de 0,70-0,75 et l'espace laissé par la lipectomie est rempli par une enveloppe transparente entièrement dépourvue d'adipocytes. L'augmentation de l'IR dans les TAsc cicatriciels par rapport au ratio mesuré à t0, est due à la mise en place d'un tissu conjonctif fibreux, dense, au niveau du front de lésion.

Étant donné que les opioïdes sont au centre de notre hypothèse de travail, nous avons mis en place un protocole d'expérimentation animale, validé par le comité d'éthique, dans lequel les animaux n'ont pas d'antalgique en traitement post-opératoire. Les animaux lipectomiés reçoivent une injection sous-cutanée de NaCl, ou de NalM, 1 fois par jour pendant 4 jours. Dans les études sur l'implication des fibres nociceptives, le NaCl sera remplacé par de la morphine. La figure 39B montre qu'après un mois, le TAsc de souris traitées avec de la NalM pèse plus de 85% du poids du dépôt control-latéral alors que les animaux traités qui ont reçu du NaCl ou de la morphine ont un IR de l'ordre de 0,75. Macroscopiquement, le TAsc souris traitées avec de la NalM montre une régénération alors que celui des souris « contrôles » (NaCl ou morphine) cicatrise (Figure 39C).

Avec ce modèle, nous avons donc évalué i) si les opioïdes s'opposaient à la mise en place d'une réponse inflammatoire adéquate pour permettre la régénération et ii) si les fibres sensorielles nociceptives étaient essentielles à la régénération. La présentation des résultats obtenus se fera donc en deux grandes parties.

II Effet(s) des opioïdes sur la réponse inflammatoire aiguë au cours des processus de régénération tissulaire.

A Contexte scientifique

De plus en plus d'études font état du rôle substantiel du système immunitaire dans l'issue de la réparation tissulaire suite à une lésion comme nous l'avons présenté dans le chapitre 3 de l'introduction. Plus particulièrement, les neutrophiles et les macrophages sont décrits comme étant des acteurs clefs de la régénération ; cependant leurs modes d'action respectifs dans ce processus restent peu documentés.

Alors que l'effet immunosuppresseur des opioïdes a fait l'objet de nombreuses études²⁷⁹, les travaux précédents du laboratoire ont montré leur effet délétère sur la régénération chez la souris adulte. Cet effet anti-régénérant passe par une inhibition de la production massive d'EOs, production indispensable pour permettre la régénération mais dont l'origine reste à déterminer.

De plus, et comme nous l'avons aussi présenté dans le Chapitre 3 de l'introduction, les cellules immunitaires d'un tissu peuvent provenir des cellules circulantes dérivées de la moelle osseuse ou être résidentes. Des travaux publiés par le laboratoire STROMALab montrent que les cellules myéloïdes du TAsc proviennent principalement d'une hématopoïèse endogène³²⁰. Ces cellules ont une fonction différente de celle des cellules myéloïdes dérivées de l'hématopoïèse classique médullaire dans un contexte de diabète de type II induit par l'alimentation³³⁰. En effet, un régime riche en lipides entraîne la production, par l'hématopoïèse du TAsc de macrophages pro-inflammatoires participant activement à la mise en place du diabète de type II chez la souris. Par ailleurs, dans un contexte d'infarctus du myocarde chez la souris, des mastocytes issus de l'hématopoïèse du TA et retrouvés au niveau du cœur, et améliorent significativement le remodelage cardiaque post infarctus³³¹.

Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle chez le mammifère adulte, les opioïdes endogènes inhiberaient la mise en place d'une réponse inflammatoire adéquate à la régénération tissulaire, c'est-à-dire une réponse inflammatoire intense mais brève, se traduisant par un pic important et transitoire d'EOs. Dans ce contexte, les EOs seraient produits par les neutrophiles dont l'élimination efficace par les macrophages permettrait ce pic d'EOs d'être transitoire ; Le contrôle de l'issue de la réparation tissulaire par les opioïdes passerait ainsi par un contrôle des capacités d'efférocytose des macrophages. Finalement, concernant l'origine des cellules immunitaires orchestrant la réponse inflammatoire requise pour permettre la régénération, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les cellules résidentes dérivées de l'hématopoïèse du TAsc seraient bénéfiques à la régénération.

Pour aborder ces questions, nous avons i) déterminé les fonctions spécifiques des neutrophiles et des macrophages au cours de la réponse inflammatoire qui a lieu lors de la régénération du TAsc, ii) étudié

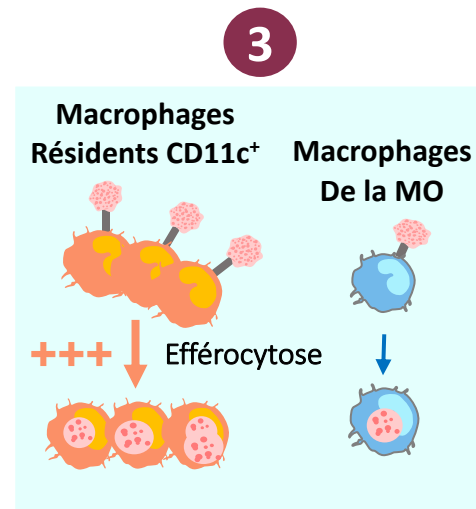
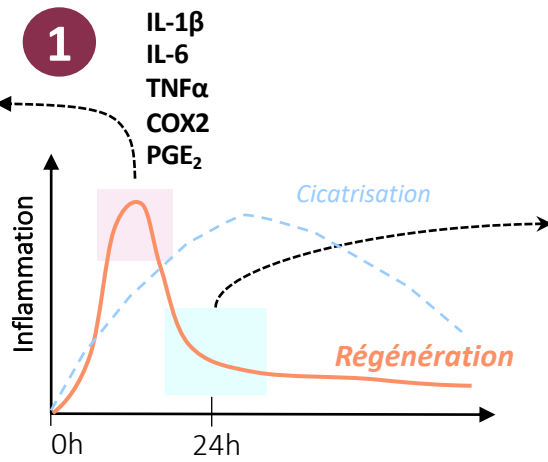
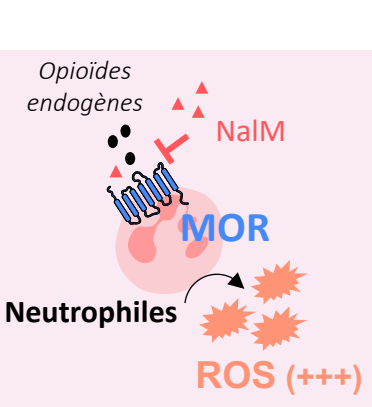


Figure 40. Résumé Graphique des résultats de l'article 1.

(1) Signature cellulaire et moléculaire des phases précoces de l'inflammation post-lésionnelle. (2) Les neutrophiles produisent les EAOs nécessaires à la régénération. (3) Les macrophages classiques dérivés de l'hématopoïèse médullaire favorisent la cicatrisation et les macrophages dérivés de l'hématopoïèse endogène du TA permettent la régénération via leur potentiel d'efférocytose.

EAOs : Espèces Actives de l'Oxygène, LP : Lipectomie, MO : Moelle osseuse, MOR : Mu Opioid Receptor.

dans quelle mesure l'origine des macrophages peut influencer l'issue de la réparation tissulaire après lésion.

B Démarche expérimentale

Dans un premier temps, nous avons comparé les phases précoces de la réponse inflammatoire post-lésionnelle en condition de régénération et de cicatrisation (c'est-à-dire après traitement ou pas, 1 fois par jour pendant 4 jours, avec de la NalM). Nous avons évalué la présence de différentes populations cellulaires immunitaires classiquement impliquées dans la réponse inflammatoire (neutrophiles, monocytes et macrophages) à différents temps post-lésion par cytométrie en flux. L'identification des molécules pro- et anti-inflammatoires exprimées et sécrétées au cours des 72 premières heures après la LP a été réalisée par RT-qPCR (sur le front de lésion) et cytométrie de flux. L'importance des neutrophiles et des macrophages pro-inflammatoires sur la capacité du TAsc à régénérer a été déterminée grâce à des expériences de déplétion de ces populations cellulaires et la fonction des macrophages a été évaluée par des tests d'efférocytose *in vivo*. L'inhibition de l'efférocytose grâce à l'utilisation d'anticorps bloquants *in vivo* a également permis de déterminer l'importance de ce processus dans l'issue de la réparation tissulaire. Enfin, l'origine (médullaire ou adipeuse) des macrophages efférocytiques a été explorée à l'aide de chimères hématopoïétiques.

L'ensemble des résultats obtenus fait l'objet d'un article actuellement soumis à PLoS Biology ([Article 1](#), ci-après). Je présenterai ces résultats ainsi que quelques résultats complémentaires à la suite de l'article.

C Résultats et Interprétations

Les résultats obtenus et présentés dans l'article 1, mettent en évidence pour la première fois chez la souris, i) que la signature cellulaire et moléculaire des phases précoces de l'inflammation post-lésionnelle permet de prédire l'issue de la réparation tissulaire (cicatrisation *versus* régénération), ii) que les neutrophiles constituent la population cellulaire produisant les espèces actives de l'oxygène (EAOs) nécessaires à la régénération et iii) que, contrairement aux macrophages classiques dérivés de l'hématopoïèse médullaire qui favorisent une réparation de type cicatricielle, les macrophages dérivés de l'hématopoïèse endogène du TA permettent au tissu de régénérer grâce à leur haut potentiel d'élimination des neutrophiles (aussi appelé efférocytose) ([Article 1](#), Résumé graphique, Figure 40).

Resident macrophages drive tissue regeneration through efficient neutrophil efferocytosis in adult mice

Lise Rabiller^{1,6}, Virginie Robert^{1,6}, Elodie Labit^{1,3}, Adèle Arlat¹, Marie Salon², Agnès Coste², Léa Da Costa-Fernandes¹, Paul Monsarrat¹, Bruno Ségui⁴, Mireille André¹, Christophe Guissard¹, Marie-Laure Renoud¹, Marine Silva⁵, Gilles Mithieux⁵, Isabelle Raymond-Letron¹, Luc Pénicaud^{1,7}, Anne Lorsignol^{1,7}, Louis Casteilla^{1,7}, Cécile Dromard Berthézène^{1,7}, Béatrice Cousin^{1,7*}

¹ STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France

² UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, Toulouse, France.

³ actual address : Department of Comparative Biology and Experimental Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada

⁴ UMR 1037, Centre de recherche en cancérologie de Toulouse (CRCT), Université de Toulouse, INSERM, UPS, Toulouse, France.

⁵ Inserm U1213, Université Lyon 1, Villeurbanne, France.

⁶ These authors contributed equally

⁷ Senior author

*Correspondence : beatrice.cousin@inserm.fr

Running title: Efferocytosis drives tissue regeneration

Key Words: regeneration; macrophages, neutrophils, efferocytosis, adipose tissue

Final character count : 38321

ABSTRACT

Tissue repair after lesion usually leads to scar healing and thus loss of function in adult mammals. In contrast, other adult vertebrates such as amphibians have the ability to regenerate and restore tissue homeostasis after lesion. Understanding of the control of the repair outcome is thus a concerning challenge for regenerative medicine. We recently developed a model of induced tissue regeneration in adult mice allowing the comparison of the early steps of regenerative and scar healing

processes. By using studies of gain and loss of function, specific cell depletion approaches, and hematopoietic chimeras we demonstrate here that that tissue regeneration in adult mammals depends on an early and transient inflammatory phase, and requires a tight collaboration between granulocyte producing reactive oxygen species and highly phagocytic resident macrophages. These findings highlight key and early cellular pathways that can drive tissue repair towards regeneration in adult mammals.

INTRODUCTION

Repair processes following tissue injury results either in regeneration or in scar formation. Whereas scar healing commonly leads to the loss of functional tissue and fibrous scar development, regeneration completely recapitulates the original tissue architecture and function. The understanding of the control of the repair outcome is therefore a concerning challenge for regenerative medicine (Gurtner et al, 2008).

Regeneration has mostly been studied in lower vertebrates and in newborn mammals, since adult mammals do not regenerate, and instead heal tissue damages with a scar except in specific strains such as the spiny mouse (Seifert et al, 2012) or the MRL mouse that bears a defective immune system (Steinberg, 1994). Most of the studies dealing with tissue repair in adult mammals thus recapitulate healing process and not regeneration. In a recently developed model of tissue lesion, relying on massive resection of subcutaneous fat pad, we have been able to induce adipose tissue (AT) regeneration in adult mice. By using this model to compare the regenerative and scar healing processes, we demonstrated that regeneration is controlled through the generation of an early, large and transient peak of reactive oxygen species (ROS) (Labit et al, 2018). Because ROS act as both signaling molecules and mediators of inflammation (Mittal et al, 2014), our findings suggested a potential role of the inflammatory process in tissue regeneration in adult mammals as it has been demonstrated in lower vertebrates (Mescher et al, 2017).

At a cellular scale, granulocytic neutrophils and macrophages are the key players of the inflammatory process. In both lower vertebrates and mammals, no studies have yet demonstrated the role of neutrophils in regeneration. In contrast, macrophages have been involved in regeneration in salamander (Godwin et al, 2013), neonatal mice in a myocardial infarction model (Aurora et al, 2014), as well as in adults in a digitip amputation context or in *Acomys* mice (Simkin et al, 2017). Importantly, *in vivo* cooperation between neutrophils and macrophages has not been established in the context of tissue regeneration in adult mammals. In physiological conditions, the phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages via a process called efferocytosis, is one of the main

mechanisms that contribute to the resolution of inflammation in physiological situations (Soehnlein & Lindbom, 2010). This overall process is partly orchestrated by pro- and anti-inflammatory cytokines as well as eicosanoids such as prostaglandins and leukotrienes that therefore contribute to control tissue repair (Serhan et al, 2008).

Recent studies have highlighted the complexity of the macrophage population, by identifying the roles of functionally distinct macrophage subsets in tissue homeostasis and tissue repair (Duffield et al, 2005; Lech & Anders, 2013; Munoz-Canoves & Serrano, 2015; Murray & Wynn, 2011). Indeed, bone marrow (BM) derived monocytes recruited after tissue lesion are pro-inflammatory and exhibit tissue-destructive activity, whereas tissue resident populations are pro-resolutive and drive tissue repair (Wynn & Vannella, 2016). Like other adult tissues, the AT hosts distinct populations of macrophages that display unique tissue distributions, transcriptional profiles, and functions and have distinct origins (Hassnain Waqas et al, 2017; Schulz et al, 2012). Among the origins, we have demonstrated that in adult mice, AT-macrophages belong to a specific and quantitatively significant hematopoietic process, relying on the presence of peculiar hematopoietic stem cells inside the AT (Poglio et al, 2010; Poglio et al, 2012). Interestingly, disruption of endogenous AT hematopoiesis leads to the production of inflammatory macrophages that specifically contribute to chronic inflammation and AT dysfunction in contrast to macrophages derived from the BM (Luche et al, 2017). These results suggest that in the AT, macrophages may exhibit beneficial or detrimental effects on tissue homeostasis depending on their local or medullar origin.

We thus hypothesized here that the early inflammatory phase following injury is crucial in the tissue repair outcome and we thus investigated the precise role of granulocytes and macrophages in tissue regeneration in adult mammals with a focus on macrophage origin. By using *in vivo* gain or loss of function studies, we show here that a rapid and transient peak of ROS-producing-granulocytes is required for regeneration. In addition, macrophages derived from AT-hematopoiesis direct repair process towards regeneration due to their efficient efferocytosis, in contrast to medullar macrophages that nurture inflammation and thus promote scar healing.

RESULTS

Regenerative healing is characterized by an early and transient inflammation. To analyze the role of the inflammatory response in the outcome of tissue lesion, we used the previously validated model of subcutaneous AT (scAT) resection (Labit et al, 2018). Massive resection of scAT followed by treatment with NaCl or Naloxone Methiodide (NaIM), an antagonist of opioid receptors, resulted respectively in scar healing or regeneration one month post-resection as previously described (Labit

et al, 2018). Indeed, compared to NaCl (control) mice that exhibit scar healing, NaIM treatment induced macroscopic scAT regeneration (Fig. 1A) associated with an increased weight ratio between the resected scAT and its contralateral uninjured counterpart (Fig. 1B).

We first determined the temporal and dynamic inflammatory response to surgical tissue resection in both scar (NaCl) and regenerative (NaIM) healing conditions. Compared to scar healing, regenerative condition was characterized by a significant and transient increase in the expression of pro-inflammatory cytokines such as interleukins (Il)1 β , 6 and tumor necrosis factor alpha (Tnf α) as well as anti-inflammatory cytokines such as transforming growth factor beta (Tgf β) and Il10, 6 hours post-resection, in the resection plane (Fig. 1C). This upregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines was associated with a significant increase in expression of enzymes involved in the production of pro-inflammatory lipid mediators (Cox-2, pge2 synthase), and to a lesser extent in pgd2 synthase but not in the expression of enzymes involved in the leukotriene production (Alox5, Lta4h) (Fig. 1D). The induction of Cox-2 and Pge2 synthase expression was reflected by an increased ratio between prostaglandins (PG) E2 and D2 12 hours post-resection (Fig. 1E). We then used heatmap visualization (Fig. 1F) and principal component analysis (PCA) (Fig. 1G-I) to determine whether regenerative and scar healing conditions can be characterized by a global gene signature. When looking at the heatmap of the expression of 12 genes (cytokines and lipid mediator synthesis enzymes) 6 hours post-resection (Fig. 1F), an expression pattern emerges between regenerative and scar healing conditions. PCA was then used to reduce the dimensionality of the dataset while retaining most of its original variability. Consequently, we reduced a set of correlated variables (the gene expressions) into fewer uncorrelated variables (the dimensions). The projection of the data into this new set of dimensions revealed a clear clustering between the two groups on the first and second dimensions 2 and 6 hours post-resection (Fig. 1G, 1H), although the discrimination is clearer at 6 hours than at 2 hours post-resection between regenerative and scar healing conditions, as revealed by the principal components that account for 67% of the variability of the data at 2 hours post-resection while it accounts for 75% at 6 hours post-resection (Fig. 1G, 1H). Interestingly this clustering completely disappears 12 hours post-resection (Fig. 1I). We thus demonstrated here that an early but transient inflammation is associated with regeneration, and that a specific pattern of gene expression 6 hours post-resection may be predictive of the regenerative outcome.

Regenerative healing depends on ROS production by neutrophils. The early inflammation was associated with an infiltration of the resection plane by small round leukocytes, of typical granulocytic neutrophil morphology (segmented or ringform nucleus with condensed chromatin and pale cytoplasm) (Fig. 2A, zoom). The granulocytic infiltration was observed both in the connective tissue and in the scAT (mainly as intravascular leukostasis and perivascular cuffings) in the resection

plane (Fig. 2A), as demonstrated by histological evaluation. The nature of infiltrating leukocytes was confirmed by flow cytometry. Both neutrophils and monocytes were identified as CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6G⁺/Ly6C⁻ and CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6G⁻/Ly6C⁺ respectively (Fig. 2B). Neutrophils, but not monocytes, increased in the resection plane 6 hours post-resection in regenerative compared to scar healing conditions (Fig. 2A, 2B). Moreover the expression of Cxcl1, a chemokine that in parallel to TNF α induces the infiltration of neutrophils (Souza-Almeida et al, 2018), was significantly and transiently increased in the injured scAT during regeneration (Fig. 2C).

To unravel the role of granulocytes in the NaIM-induced regeneration process, their specific depletion was undertaken in vivo using anti-Gr1 blocking antibody. We first verified that anti-Gr-1 injection induced a drastic and specific depletion in granulocyte (Ly6GC⁺) population in the scAT in vivo from 24 to at least 72 hours after injection (Appendix Fig. S1A, S1B). ScAT resection was thus performed 24 hours after anti-Gr1 injection. In these conditions, ROS production quantified 6 hours post-resection was significantly decreased in the injured scAT (Fig. 2D, 2E) and was associated to an inhibition of regeneration quantified 4 weeks post-resection (Fig. 2F). Indeed, the weight ratio between resected and contralateral scAT returned to values observed in scar healing conditions (Fig. 2G). These data demonstrate for the first time that ROS required for regeneration are produced by granulocytes. In addition, ROS production was quantified in vivo by using luminol that enables bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity (Gross et al, 2009) suggesting that ROS production post-resection depend mainly from neutrophils.

In parallel, ROS production was quantified in vitro in scAT-Gr1⁺ and Gr1⁻ sorted from mice treated or not with NaIM, 6 hours post-resection. In contrast to scAT-Gr1⁻ cells (data not shown), scAT-Gr1⁺ cells were able to produce ROS (Fig. 2H). In addition, when sorted from NaIM treated mice, scAT-Gr1⁺ cells exhibited a significantly higher ROS production than scAT-Gr1⁺ cells sorted from NaCl treated mice (Fig. 2H) thus confirming the results obtained in vivo. NaIM being an antagonist of μ opioid receptors, Gr1⁺ cells were treated with DAMGO (a selective μ opioid receptor agonist). In this condition, the ROS production by Gr1⁺ cells sorted from NaIM mice was inhibited (Fig. 2H) suggesting a direct effect of opioids on granulocytes through μ opioid receptors. These data suggest that in control mice, endogenous opioids inhibit ROS production by granulocytes through μ receptors, and that NaIM reverses this effect. To confirm this result, mice knock out for the μ opioid receptor (μ KO mice), and therefore unable to respond to endogenous opioids through activation of this receptor subtype, were subjected to scAT resection before Gr1⁺ cell sorting from resection plane 6 hours post-resection. ROS production was significantly higher in scAT-Gr1⁺ cells sorted from μ KO mice compared to NaCl treated mice and similar to the production quantified in scAT-Gr1⁺ cells sorted from NaIM treated mice (Fig. 2H). Interestingly, this ROS production is associated with a spontaneous scAT-

regeneration after resection in μ KO mice (Fig. 2I), the weight ratio between resected and contralateral scAT being similar in μ KO and NaIM treated mice and significantly higher than in NaCl-treated mice (Fig. 2J). Altogether, these results demonstrate that through a direct effect on μ opioid receptors, NaIM-induced ROS production by granulocytes determines tissue repair outcome.

Efficient efferocytosis of neutrophils by CD11c⁺ macrophages is required for regeneration. One of the mechanisms by which granulocytes (neutrophils and monocytes) are involved in tissue repair is their transition to apoptosis followed by their clearance by macrophages (Soehnlein & Lindbom, 2010). We thus focused on the resolution phase of inflammation following scAT resection with or without NaIM treatment, and performed a time-course study of the inflammatory cell populations during 72 hours following resection, focusing on neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺) and monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁺/Ly6G⁻). The resection led to an early peak (6 hours) of neutrophils followed by a rapid return to basal values in the resection plane in regenerative condition, whereas the increase in neutrophils number was delayed (24 hours) and persisted for 72 hours post-resection in scar healing condition (Fig. 3A). The monocyte number remained low in regenerative conditions while it increased in scar healing mice 24 hours post-resection and returned to basal values thereafter (Fig. 3A). The difference in neutrophil and monocyte numbers 24 hours post-resection between regenerative and scar healing conditions suggests a divergence in the handling of granulocyte population based on the tissue repair outcome. Granulocyte clearance may result from apoptosis and/or phagocytosis (efferocytosis) by macrophages (Soehnlein & Lindbom, 2010). Thus, apoptosis was quantified in neutrophil and monocyte populations by flow cytometry using Annexin V and DAPI staining. No significant difference in the percentage of apoptotic cells was observed 24 hours post-resection between regenerative and scar healing conditions (Fig. 3B), indicating that the difference in granulocyte numbers between scar healing and regenerative conditions 24 hours post-resection was not due to an enhanced apoptosis. We thus characterized the macrophage population 24 hours post-resection in regenerative and healing conditions. We observed no significant difference in the total macrophage number (identified as CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺) between the two conditions (Fig. 3C, 3D). Focusing on their phenotype, we observed that a significant proportion of macrophages in the resection plane express the pro-inflammatory cell surface marker CD11c and a small proportion of express the anti-inflammatory CD206 marker, although no difference in these proportions was observed between regenerative and scar healing conditions (Fig. 3E, 3F). Consistent with this phenotype, most of the macrophages in the resection plane 24 hours post-resection were producing IL-6 (Fig. 3G, 3H), and a smaller proportion was producing TNF α and IL-10 (Fig. 3G, 3H). The percentage of IL-6 producing macrophages was significantly lower in regenerative than in scar healing condition, while the opposite was observed for

TNF α producing macrophages (Fig. 3H). To uncover the role of CD11c⁺ macrophages in tissue repair, we used CD11c-DTR mice, in which, CD11c⁺ cells can selectively be depleted by injection of diphtheria toxin (DT) as previously described (Patsouris et al, 2008). The toxin was injected at 24 hours before surgery, and regeneration was analyzed 4 weeks later. As controls, we used CD11c-DTR mice injected with DT. As expected, DT treatment efficiently decreased the number of CD11c⁺ macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺) present in the resection plane 24 hours post-resection (Appendix Fig. S2A, S2B) and this resulted in a significant accumulation of neutrophils (Fig. 3I, 3J), suggesting an altered efferocytosis. Depletion of CD11c⁺ macrophages also prevented NaIM-induced tissue regeneration (Fig. 3K), and decreased the weight ratio between resected and contralateral scAT to values obtained in scar healing (NaCl) condition (Fig. 3L). To confirm the importance of efferocytic process in the control of tissue repair outcome, macrophage efferocytosis capacity was assessed in vivo in regenerative or scar healing condition. To this end, isolated and CMTMR-labeled neutrophils were injected in vivo 3 hours before resection. Macrophages having or not engulfed neutrophils were then visualized (Fig. 3M) and quantified in the resection plane 17 hours post-resection, a time-point corresponding to the progressive decrease in neutrophil number (Fig. 3A). As expected, the percentage of efferocytic macrophages was significantly higher in regenerative than in scar healing condition (Fig. 3N). To test whether efficient efferocytosis was required for regeneration, inhibition of efferocytosis was performed in regenerative condition by using anti-TIM4 blocking antibody that disrupts the interaction between apoptotic cells and macrophages (Nishi et al, 2014). Treatment with anti-TIM4 antibody in regenerative condition induced a drastic decrease in the percentage of efferocytic macrophages that returned to basal values (Fig. 3N), suggesting that efferocytosis was mainly mediated through TIM4 receptor in these conditions. This disruption of TIM4 mediated efferocytosis prevented NaIM-induced regenerative healing, as demonstrated by both macroscopic observations (Fig. 3O) and scAT weight ratio that returned to values obtained in scar healing (NaCl) conditions (Fig. 3P). We also investigated the expression of CD36, another major receptor involved in efferocytosis. Neither the percentage of macrophages expressing CD36, nor the expression of CD36 in sorted macrophages differed between scar and regenerative healing conditions, 24 hours post-resection (Appendix Fig. S3A, S3B, S3C), suggesting that this receptor was not involved in the differential efferocytic activity. Altogether, these data demonstrate for the first time that an efficient TIM4-mediated efferocytosis of apoptotic neutrophils by CD11c⁺ macrophages is a crucial mechanism required for tissue regeneration.

AT resident macrophages but not classical BM derived macrophages are required for tissue regeneration. We previously demonstrated that scAT myeloid populations mainly originate from AT hematopoiesis rather than BM hematopoiesis in physiological conditions (Poglio et al, 2012). We thus

investigated the origin of the macrophages involved in regeneration. Chimeric mice were generated by using standard repopulation assays as previously described (Poglio et al, 2012) by injecting 2.10^3 scAT-LSK or BM-LSK sorted from tdTomato mice mixed with 2.10^5 BM cells isolated from C57Bl/6 mice (Fig. 4A). Injection of BM cells ensured the survival of the recipient, as previously described (Miller et al, 2008). Chimeric mice were then subjected to surgery 6 weeks after transplantation once the reconstitution was complete. The total chimerism and the origin of macrophages were determined by flow cytometry 24 hours post-resection. Total chimerism in the AT of chimeric mice reached 50 to 70%, and all the macrophages present in the resection plane derived from the BM in BM-chimeric mice or from the scAT in AT-chimeric mice (Fig. 4B).

In order to compare BM and scAT-macrophage function, efferocytosis was assessed by in vivo efferocytosis assays. Interestingly, flow cytometry analysis demonstrated a significant increase in phagocytic macrophages in the resection plane 24 hours post-resection in AT- compared to BM-chimeric mice in regenerative conditions (Fig. 4C, 4D) associated with a significant decrease number of neutrophils (Fig. 4E). On the contrary, in BM-chimeric mice there was no difference in the percentage of phagocytosing macrophages in vivo or in neutrophil numbers between scar and regenerative healing conditions (Fig. 4C-4E). Then, to demonstrate that these differences in efferocytosis capacity drive tissue repair outcomes towards regeneration or scar healing, regeneration was assessed 4 weeks later. Macroscopic observations showed that AT-chimeric mice were able to regenerate but not BM-chimeric mice that instead displayed scar healing (Fig. 4F). In addition, we observed a significant difference in the weight ratio between resected and contralateral scAT in NaIM versus NaCl treated AT-chimeric mice, while no difference was observed in BM-chimeric mice (Fig. 4G). These results suggest that macrophages play distinct role in healing process according to their origin. Altogether, these results show that macrophages originating from both the BM and the AT contribute to scar healing. However, in contrast to BM macrophages, scAT macrophages are the only ones able to exhibit efficient efferocytosis and rapid clearance of neutrophils and thus to drive tissue regeneration.

DISCUSSION

In this study, we compared the early cellular mechanisms that drive tissue healing or regeneration in adult mammals. By using a newly developed model of tissue regeneration in a commonly used strain of mice (Labit et al, 2018), we demonstrate that a transient and early peak of neutrophils and their ROS production, as well as their rapid elimination by resident macrophages through an efficient efferocytosis are required for regeneration in adult mice.

Tissue injury classically leads to an early pro-inflammatory step, characterized by the production of pro-inflammatory mediators (Eming et al, 2017). Here, the increase in pro-inflammatory cytokines in regenerative conditions shortly after scAT resection is consistent with the role of acute inflammation in proper restorative response. Indeed, cytokines such as IL-6 and TNF α have been shown to control tissue regeneration in mammals and zebrafish (Karin & Clevers, 2016; Nguyen-Chi et al, 2017). In addition, our results showing an early and transient upregulation of IL-10 and TGF β in regenerative conditions are in line with the anti-inflammatory/pro-repair activities of these cytokines (Wynn & Vannella, 2016). Among the other signaling molecules released during inflammation are the prostaglandins. PGE2 and D2 are indeed produced in a time-dependent fashion, and actively contribute to tissue repair (Esser-von Bieren, 2019; FitzSimons et al, 2020). In agreement with our data, the inhibition of PGE2-degrading enzyme, thus leading to an increase in PGE2 levels, has been shown to promote tissue repair in a mouse model of liver injury (Zhang et al, 2015). When analyzed together through PCA, our results show that the global gene expression discriminates between regenerative and scar healing conditions, but only very early after tissue lesion, suggesting that temporal cues are critical for the tissue repair outcome. This is in agreement with a previous work showing that cytokines such as IL-6 are protective and limit host damage in the short term, but can also be pathogenic when chronically elevated (Fontes et al, 2015). It has to be noted however, that unlike our work, most of the studies on tissue regeneration do not focus on the earliest steps of tissue repair.

The early pro-inflammatory stage following tissue injury is dominated by innate immune cells such as neutrophils and macrophages. The accumulation of granulocytes and especially neutrophils immediately after tissue damage has been largely documented (Kolaczowska & Kubes, 2013), and is supported by the upregulation of Cxcl1, a chemokine that contributes to attract neutrophils on the lesion site (Souza-Almeida et al, 2018). Neutrophils have been described as critical players in injury and repair although, it was unclear whether they have beneficial or detrimental healing functions (Peiseler & Kubes, 2019). In addition, ROS production was shown to either directly induce tissue damages (Mittal et al, 2014) or to be involved in regeneration process in diverse species including mammalian ones (Labit et al, 2018; Rampon et al, 2018). Here, our data clearly identify granulocytes as responsible for ROS production required for regeneration in mammals. Moreover, we demonstrated that through a direct effect on μ opioid receptor, NalM, an antagonist of this receptor induces production of ROS by granulocytes. The μ opioid receptor has already been described on granulocytes, and in agreement with our results, it is suggested that its activation inhibits the inflammatory response (Eisenstein, 2019).

Our results highlight the involvement of macrophages in regeneration. This is in agreement with previous studies performed in different vertebrates among which *Acomys* or newborn mice and showing that macrophage depletion inhibits regeneration (Aurora et al, 2014; Godwin et al, 2017; Petrie et al, 2014; Simkin et al, 2017; Yang et al, 2019). However, how macrophages initiate this pro-regenerative response remains unclear. Gain and loss of efferocytic function have shown that the timely clearance of apoptotic cells is required to induce healing in various mammal tissues (Arnold et al, 2007; Perdiguero et al, 2011; Yang et al, 2019). Here, we propose that this mechanism is required for regeneration. In addition, efferocytosis is mediated through TIM4, a receptor shown to be expressed in various resident macrophages including peritoneal macrophages, and required for their efferocytic activity (Nagata, 2018). Moreover, we identified CD11c⁺ macrophages as crucial actors in this context. In the AT, CD11c⁺ macrophages have been identified as pro-inflammatory and involved in the clearance of senescent cells (Lumeng et al, 2008; Vianello et al, 2016). The expression of CD11c has also been associated with both tissue resident macrophages that play a central role in non-inflammatory apoptotic cells clearance required for the maintenance of tissue homeostasis (Baratin et al, 2017; Soroosh et al, 2013) and monocyte-derived macrophages involved in tissue repair (Yrlid et al, 2019).

Finally, one of our most striking results reveals that AT-resident macrophages derived from AT-endogenous hematopoiesis, but not BM-derived macrophages, are necessary for enabling regeneration. Indeed, using chimeric mice, we demonstrated that pro-regenerative efferocytotic macrophages originated from AT. This result emphasizes the beneficial role of myeloid cells deriving from endogenous AT hematopoiesis in tissue repair in contrast to medullar-originating cells, as already proposed in the context of cardiac remodeling after infarction (Ngkelo et al, 2016). In addition, these data are in line with the concept that the contribution of macrophages to tissue regeneration following injury depends on their lineage and/or developmental origin. Indeed, evidences in liver suggest that monocyte-derived macrophages can accelerate resolution of fibrosis (Ramachandran et al, 2012) while a more recent study showed that resident dermal macrophages contribute to axon regeneration after nerve injury (Kolter et al, 2019). In the heart, resident macrophages derived from primitive yolk sac and fetal progenitors are involved in tissue remodeling and cardiac regeneration while macrophages originating from definitive hematopoietic progenitors participate in the initiation of inflammation (Lavine et al, 2014; Leid et al, 2016).

Altogether, our findings indicate that an early and transient recruitment of granulocytes producing ROS concomitant with an early inflammation is required for tissue regeneration in adult mice. Also, we elucidated the main role of CD11c⁺ resident macrophages in the clearance of neutrophils to promote regeneration. This work highlights a cellular pathway that can drive tissue repair towards

regeneration in adult mammals, and highlights potential targets that could be manipulated to induce regeneration in the context of tissue injury. Further studies characterizing the intrinsic phenotype of pro-resolutive resident macrophages will advance our understanding of their precise roles in driving tissue repair towards regeneration rather than scar formation.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Experiments were performed on 5 to 7 weeks-old male C57BL/6 mice (Envigo) and congenic male B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo}/J (also known as mTmG mice; (Jackson Laboratories). Animals were group-housed in a controlled environment (12-hour light/dark cycles at 21°C) with unrestricted access to water and a standard chow diet in a pathogen-free animal facility. Granulocytes depletion was achieved by i.p. injection of 200µg of anti-mouse Gr-1 blocking antibody (clone RB6-8C5, BioXCell, West Lebanon, NH, USA) 24 hours before surgical AT resection. For CD11c⁺ cell depletion, transgenic CD11c-DTR mice were injected i.p. with 20ng/kg of diphtheria toxin the day before tissue resection as previously described (Luche et al, 2017).

Before tissue removal, mice were killed by cervical dislocation. All experiments were carried out in compliance with European Community Guidelines (2010/63/UE) and approved by the French ethics committee (protocol reference: 10691-201802091153445-v1).

Sub-cutaneous AT (scAT) resection: Animals were anesthetized by inhalation of isoflurane (2.5%), and subjected to a single incision on the abdomen to access and resect 35 to 40% of the right scAT between lymph node and groin. The skin was then closed with three suture points. Mice were then injected subcutaneously at the surgery site, once a day from d0 to d3 post-resection with Naloxone Methiodide (NaIM) (17mg/kg, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) or NaCl 0,9% to induce respectively regenerative or scar healing, as previously described (Labit et al, 2018). ScAT regeneration was assessed by morphological observations and calculating the weight ratio between the right (resected) and the left (contralateral) fat pads.

In vivo ROS imaging: Mice were briefly anesthetized by inhalation of isoflurane (2.5%) and injected i.p. with 5mg of luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-Phtalazinedione, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). In vivo bioluminescence was imaged using an IVIS Spectrum 200 (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA) during 2 min exposure at different times after luminol injection. Image analyses were performed using Living Image 3.0 Software (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA). The color intensity of the pictures was calibrated from 30 (min) to 330 (max). For each animal, the sham surgery area signal was subtracted to resected area photon flux.

Isolation of bone marrow and adipose derived stromal vascular cell fraction (SVF): At necropsy, bone marrow cells (BM) were immediately flushed from the sampled femurs with α -MEM medium (Life Technologies). Resection planes were carefully dissected, mechanically dissociated and digested at 37°C with collagenase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 30 minutes. Cells from the scAT SVF were collected by centrifugation after elimination of undigested fragments by filtration as previously described (Poglio et al, 2012). Red blood cells were removed by incubation in hemolysis buffer (140mM NH₄Cl and 20mM Tris, pH 7.6). Cells were then counted and used for flow cytometry, cell sorting in vitro ROS quantification or Real-Time PCR.

Competitive repopulation assays: Competitive repopulation assays were conducted as described previously (Poglio et al, 2012). Briefly, $2 \cdot 10^3$ Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺ (LSK) cells sorted from the scAT or the BM of donor mice were mixed with $2 \cdot 10^5$ competitor BM total cells. Donor mice were mT/mG mice expressing Tomato ubiquitously. In all the experiments, control and experimental LSK cells were sorted from animals of equal age. The mixed population was injected i.v. into lethally irradiated (10Gy, ¹³⁷Cs source) recipient mice of equal age. Mice reconstituted with AT- or BM-LSK (AT-or BM-mice) were then allowed to recover during 6 weeks. Chimerism was assessed by quantifying Tomato⁺ (dT⁺) cells among total CD45⁺ cells in the SVF.

RNA Extraction and Real-Time PCR: Total RNA was isolated from SVF by RLT:ethanol 100% extraction and purified using Microprep kit (Zymo). 250ng of total RNA was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies/Applied Biosystem), SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies/Applied Biosystem), and 300 nmol/L primers (Appendix Table S1) on an Applied Biosystem StepOne instrument. All relative gene expression was determined using the $\Delta\Delta$ CT method and normalized to 36B4 level.

ELISA cytokines titration: At necropsy, exudates were collected at the resection plane 6 and 12 hours post-resection (400 μ L). The release of PGD₂ and PGE₂ was determined with a commercially available OptiEIA kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions.

Flow cytometry analysis and cell sorting: Freshly isolated SVF cells were stained in PBS containing FcR-blocking reagent for 30 minutes on ice with fluorochrome-conjugated antibodies. Phenotyping was performed by immunostaining with conjugated rat anti-mouse Abs and compared with isotype-matched control Abs (Appendix Table S2). Cell apoptosis was assessed by AnnexinV (eBioscience) and DAPI staining according to the manufacturer's instructions. Cells were then analyzed on a Fortessa

flow cytometer (BD). Data acquisition and analysis were performed using Diva (Becton Dickinson) and Kalusa version 1.2 (Beckman Coulter) softwares respectively.

For LSK cell-sorting experiments, SVF cells were stained with Ly-6A/E (Sca-1), CD117 (c-Kit) antibodies, and Lineage Panel (Lin). Cells negative for lineage markers were gated, and Sca-1 and CD117 double-positive cells were sorted. Enrichment of the LSK was determined by flow cytometry and varied between 92% and 97%. A similar strategy was used to sort macrophage on the basis of CD45, CD11b and F4/80 expression (Appendix Table S2).

In vivo efferocytosis assay: Neutrophils from C57Bl/6 mice were isolated from the BM using neutrophil isolation kit according to the manufacturer's instructions (Miltenyi). Neutrophils were then stained with 2.5 μ M of CellTrace CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester (CFSE; Molecular Probe) or 5 μ M of chloromethyl-benzoyl-aminotetramethyl-rhodamine (CMTMR; Molecular Probe). Three hours before scAT resection, 2.5.10⁶ neutrophils were injected i.v. into wild-type, AT- or BM-chimeric mice. The resection plane was removed 17 hours after resection and the proportion of macrophages CFSE⁺ or CMTMR⁺ was visualized and quantified by Image flow cytometry and flow cytometry respectively, as described previously (Morioka et al, 2018).

Efferocytosis inhibition was achieved by 3 successive i.v. injections of anti-mouse TIM4 blocking antibody (TIM4 Ab; 0.5mg/mice/injection) (BioXCell, West Lebanon, NH, USA) 12 hours before and 3 hours and 24 hours after surgery.

Image Flow Cytometry: Individual cell images were acquired using IDEAS software (Amnis Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) on a 3-laser 6-channel imaging flow cytometer (Image Stream X Mark II, Amnis Merck Millipore) with 40 \times magnification. For each data file, at least 50 000 single cells were acquired - debris and doublets were excluded based on their area and aspect ratio. Single-stain controls were acquired (all channels on, no brightfield and no side scatter image), a compensation matrix was calculated and then applied to the data files using IDEAS software (Amnis Merck Millipore). Briefly, focus cells were identified using gradient RMS feature of the brightfield channel (Ch04). Single cells were then identified from debris and cell clusters using a plot of aspect ratio vs. area of the brightfield channel. Finally we analyzed single cells with plot based on intensity of CMTMR and F4/80 staining (Ch03 and CH06 respectively).

Histological evaluation: 3 hours after surgical resection, resection planes were sampled at necropsy, fixed in 10% neutral buffered formalin and paraffin-embedded. Three μ m thick paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin, and microscopically evaluated by a pathologist.

In vitro ROS quantification: The oxygen-dependent respiratory production was measured by chemiluminescence in the presence of luminol (66 μ M, Sigma-Aldrich) using a thermostatically monitored luminometer (37°C) (210410A EnVision Multilabel Reader) on 14x10⁴ Gr1⁻ or Gr1⁺ cells sorted from SVF. DAMGO ([D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-Enkephalin acetate salt, Sigma Aldrich) was added 5 minutes before luminescence measure. The luminol detects both reactive oxygen and nitrogen intermediates (O₂·-, ONOO-, OH·). Chemiluminescence was continuously monitored for 1 hour. The ROS level was quantified and compared between different conditions using the area under the curve.

Statistical analyses: The number of animals used in each study is indicated in the figure legends. Studies were not randomized and investigators were blinded to analyses. All results are given as means \pm SEM. Variance between groups was compared. Data were analyzed using an ANOVA test (when there were more than 2 groups) and variance between groups was compared. Statistical differences were measured using an unpaired two-sided Student's t-test, or a nonparametric test (Mann–Whitney) when data did not pass the normality test, or when variances between groups were different. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5.0 software and a two-tailed *P* value with 95% confidence interval was acquired. *p*<0.05 was considered as significant. The following symbols for statistical significance were used throughout the manuscript: **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001.

For gene expression at 6 and 12 hours, a principal component analysis (PCA) was also performed as an unsupervised dimension reduction method. R software 3.6.3 with the “factoextra” 1.0.6 and “FactoMineR” 2.3 packages were used.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Sharif-Naeini, J. Biernaskie, M. Ousset and C. Sengenès for insightful discussions and manuscript proofreading. The authors also thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Toulouse, France) and specifically the zootechnical core facility for animal care. Our research was supported by the French ANR Project «WAT-HEART» (ANR 16-CE14-0006-01). Lise Rabiller was a fellow of the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, FDT201904008033). Virginie Robert is recipient of grant from French ANR Project «WAT-HEART».

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Methodology; L.R., V.R., E.L., A.C., L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Investigation, L.R., V.R., E.L., A.A., M.S., L.D.C.F., M.A., C.G., M-L.R., I.R.L.; Resources, B.S., M.S., G.M., P.M.; Writing – Original Draft, L.R., V.R., C.D.B., B.C.; Writing - Review and Editing, G.M., L.P., A.L., L.C., C.D.B., B.C.; Funding acquisition, L.C., B.C.; Supervision, A.L., C.D.B., L.C., B.C.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, Gherardi RK, Chazaud B (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine* **204**: 1057-1069

Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA, Olson EN (2014) Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *The Journal of clinical investigation* **124**: 1382-1392

Baratin M, Simon L, Jorquera A, Ghigo C, Dembele D, Nowak J, Gentek R, Wienert S, Klauschen F, Malissen B, Dalod M, Bajenoff M (2017) T Cell Zone Resident Macrophages Silently Dispose of Apoptotic Cells in the Lymph Node. *Immunity* **47**: 349-362 e345

Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP (2005) Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *The Journal of clinical investigation* **115**: 56-65

Eisenstein TK (2019) The Role of Opioid Receptors in Immune System Function. *Frontiers in immunology* **10**: 2904

Eming SA, Wynn TA, Martin P (2017) Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* **356**: 1026-1030

Esser-von Bieren J (2019) Eicosanoids in tissue repair. *Immunology and cell biology* **97**: 279-288

FitzSimons M, Beauchemin M, Smith AM, Stroh EG, Kelsch DJ, Lamb MC, Tootle TL, Yin VP (2020) Cardiac injury modulates critical components of prostaglandin E2 signaling during zebrafish heart regeneration. *Scientific reports* **10**: 3095

Fontes JA, Rose NR, Cihakova D (2015) The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* **74**: 62-68

Godwin JW, Debuque R, Salimova E, Rosenthal NA (2017) Heart regeneration in the salamander relies on macrophage-mediated control of fibroblast activation and the extracellular landscape. *NPJ Regenerative medicine* **2**

Godwin JW, Pinto AR, Rosenthal NA (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

Gross S, Gammon ST, Moss BL, Rauch D, Harding J, Heinecke JW, Ratner L, Piwnica-Worms D (2009) Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nature medicine* **15**: 455-461

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* **453**: 314-321

Hassnain Waqas SF, Noble A, Hoang AC, Ampem G, Popp M, Strauss S, Guille M, Roszer T (2017) Adipose tissue macrophages develop from bone marrow-independent progenitors in *Xenopus laevis* and mouse. *Journal of leukocyte biology* **102**: 845-855

Karin M, Clevers H (2016) Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* **529**: 307-315

Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology* **13**: 159-175

Kolter J, Feuerstein R, Zeis P, Hagemeyer N, Paterson N, d'Errico P, Baasch S, Amann L, Masuda T, Losslein A, Gharun K, Meyer-Luehmann M, Waskow C, Franzke CW, Grun D, Lammermann T, Prinz M, Henneke P (2019) A Subset of Skin Macrophages Contributes to the Surveillance and Regeneration of Local Nerves. *Immunity* **50**: 1482-1497 e1487

Labit E, Rabiller L, Rampon C, Guissard C, Andre M, Barreau C, Cousin B, Carriere A, Eddine MA, Pipy B, Penicaud L, Lorsignol A, Vríz S, Dromard C, Casteilla L (2018) Opioids prevent regeneration in adult mammals through inhibition of ROS production. *Scientific reports* **8**: 12170

Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, Weber KJ, Nichols CG, Schilling JD, Ornitz DM, Randolph GJ, Mann DL (2014) Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 16029-16034

Lech M, Anders HJ (2013) Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et biophysica acta* **1832**: 989-997

Leid J, Carrelha J, Boukarabila H, Epelman S, Jacobsen SE, Lavine KJ (2016) Primitive Embryonic Macrophages are Required for Coronary Development and Maturation. *Circulation research* **118**: 1498-1511

Luche E, Robert V, Cuminetti V, Pomie C, Sastourne-Arrey Q, Waget A, Arnaud E, Varin A, Labit E, Laharrague P, Burcelin R, Casteilla L, Cousin B (2017) Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease. *eLife* **6**

Lumeng CN, DelProposto JB, Westcott DJ, Saltiel AR (2008) Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* **57**: 3239-3246

Mescher AL, Neff AW, King MW (2017) Inflammation and immunity in organ regeneration. *Developmental and comparative immunology* **66**: 98-110

Miller CL, Dykstra B, Eaves CJ (2008) Characterization of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *Current protocols in immunology* **Chapter 22**: Unit 22B 22

Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling* **20**: 1126-1167

Morioka S, Perry JSA, Raymond MH, Medina CB, Zhu Y, Zhao L, Serbulea V, Onengut-Gumuscu S, Leitinger N, Kucenas S, Rathmell JC, Makowski L, Ravichandran KS (2018) Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release. *Nature* **563**: 714-718

Munoz-Canoves P, Serrano AL (2015) Macrophages decide between regeneration and fibrosis in muscle. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **26**: 449-450

Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews Immunology* **11**: 723-737

Nagata S (2018) Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual review of immunology* **36**: 489-517

Ngkelo A, Richart A, Kirk JA, Bonnin P, Vilar J, Lemitre M, Marck P, Branchereau M, Le Gall S, Renault N, Guerin C, Ranek MJ, Kervadec A, Danelli L, Gautier G, Blank U, Launay P, Camerer E, Bruneval P, Menasche P, Heymes C, Luche E, Casteilla L, Cousin B, Rodewald HR, Kass DA, Silvestre JS (2016) Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *The Journal of experimental medicine* **213**: 1353-1374

Nguyen-Chi M, Laplace-Builhe B, Travnickova J, Luz-Crawford P, Tejedor G, Lutfalla G, Kissa K, Jorgensen C, Djouad F (2017) TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. *Cell death & disease* **8**: e2979

Nishi C, Toda S, Segawa K, Nagata S (2014) Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. *Molecular and cellular biology* **34**: 1512-1520

Patsouris D, Li PP, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG (2008) Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. *Cell metabolism* **8**: 301-309

Peiseler M, Kubes P (2019) More friend than foe: the emerging role of neutrophils in tissue repair. *The Journal of clinical investigation* **129**: 2629-2639

Perdiguerro E, Sousa-Victor P, Ruiz-Bonilla V, Jardi M, Caelles C, Serrano AL, Munoz-Canoves P (2011) p38/MKP-1-regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *The Journal of cell biology* **195**: 307-322

Petrie TA, Strand NS, Yang CT, Rabinowitz JS, Moon RT (2014) Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* **141**: 2581-2591

Poglio S, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, Cousin B (2010) Adipose tissue as a dedicated reservoir of functional mast cell progenitors. *Stem cells* **28**: 2065-2072

Poglio S, De Toni F, Lewandowski D, Minot A, Arnaud E, Barroca V, Laharrague P, Casteilla L, Cousin B (2012) In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* **120**: 4952-4962

Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, Hartland SN, Snowdon VK, Cappon A, Gordon-Walker TT, Williams MJ, Dunbar DR, Manning JR, van Rooijen N, Fallowfield JA, Forbes SJ, Iredale JP (2012) Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E3186-3195

Rampon C, Volovitch M, Joliot A, Vriza S (2018) Hydrogen Peroxide and Redox Regulation of Developments. *Antioxidants* **7**

Schulz C, Gomez Perdiguerro E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**: 86-90

Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR, Palmer TM, Maden M (2012) Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature* **489**: 561-565

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature reviews Immunology* **8**: 349-361

Simkin J, Gawriluk TR, Gensel JC, Seifert AW (2017) Macrophages are necessary for epimorphic regeneration in African spiny mice. *eLife* **6**

Soehnlein O, Lindbom L (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews Immunology* **10**: 427-439

Soroosh P, Doherty TA, Duan W, Mehta AK, Choi H, Adams YF, Mikulski Z, Khorram N, Rosenthal P, Broide DH, Croft M (2013) Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *The Journal of experimental medicine* **210**: 775-788

Souza-Almeida G, D'Avila H, Almeida PE, Luna-Gomes T, Liechocki S, Walzog B, Hepper I, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Bandeira-Melo C, Maya-Monteiro CM (2018) Leptin Mediates In Vivo Neutrophil Migration: Involvement of Tumor Necrosis Factor-Alpha and CXCL1. *Frontiers in immunology* **9**: 111

Steinberg AD (1994) MRL-lpr/lpr disease: theories meet Fas. *Seminars in immunology* **6**: 55-69

Vianello E, Dozio E, Arnaboldi F, Marazzi MG, Martinelli C, Lamont J, Tacchini L, Sigruner A, Schmitz G, Corsi Romanelli MM (2016) Epicardial adipocyte hypertrophy: Association with M1-polarization and toll-like receptor pathways in coronary artery disease patients. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* **26**: 246-253

Wynn TA, Vannella KM (2016) Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**: 450-462

Yang W, Tao Y, Wu Y, Zhao X, Ye W, Zhao D, Fu L, Tian C, Yang J, He F, Tang L (2019) Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nature communications* **10**: 1076

Yrlid U, Holm M, Levin M, Alsen S, Lindbom M, Glise L, Bergh N, Boren J, Fogelstrand P (2019) Endothelial repair is dependent on CD11c(+) leukocytes to establish regrowing endothelial sheets with high cellular density. *Journal of leukocyte biology* **105**: 195-202

Zhang Y, Desai A, Yang SY, Bae KB, Antczak MI, Fink SP, Tiwari S, Willis JE, Williams NS, Dawson DM, Wald D, Chen WD, Wang Z, Kasturi L, Larusch GA, He L, Cominelli F, Di Martino L, Djuric Z, Milne GL, Chance M, Sanabria J, Dealwis C, Mikkola D, Naidoo J, Wei S, Tai HH, Gerson SL, Ready JM, Posner B, Willson JK, Markowitz SD (2015) TISSUE REGENERATION. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science* **348**: aaa2340

FIGURE TITLES AND LEGENDS

Fig. 1: Regenerative healing is characterized by an early and transient inflammation.

(A) Representative pictures of scAT 1 month post-resection and NaCl (scar healing condition) or NaIM (regenerative condition) treatment (Scale bar: 0.5cm). **(B)** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in NaCl or NaIM treated mice (n=5-10 per group). Quantification by RTqPCR at 2h, 6h, and 12h post-resection of mRNA encoding cytokines (Interleukin 1 β , 6 (*Il1b*, *Il6*), Tumor Necrosis Factor α (*Tnfa*), Transforming Growth Factor β (*Tgf β*) and interleukin 10 (*Il10*)) **(C)** and enzymes involved in lipid mediator synthesis (Cyclooxygenase 2 (*cox2*), Prostaglandin E2 synthase (*Pge2 synthase*), Prostaglandin D2 synthase (*Pgd2 synthase*), Arachidonate 5-lipoxygenase (*Alox5*) and Leukotriene A4 Hydrolase (*Lta4h*)) **(D)** in SVF isolated from the injured scAT of NaCl or NaIM treated mice (n=4-6 per group). **(E)** Quantification of PGD₂ and PGE₂ metabolites in the exudate of the resection plane of NaCl or NaIM treated mice, 6h and 12h post-resection. Results are expressed as a ratio between PGD₂ and PGE₂ metabolites (n=5-7 per group). **(F)** Heatmap performed on 14 standardized gene expressions, 6 hours post-resection. The dendrogram performed according to the Ward method was able to cluster between scar and regenerative healing conditions. Principal component analysis performed at 2 hours **(G)** 6 hours **(H)** and 12 hours **(I)** post-resection on standardized gene expression. Individuals with scar healing and regenerative healing signatures were colored in red and green, respectively. Data are represented as mean \pm SEM. (*p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 between scar and regenerative healing conditions). NaIM: Naloxone Methiodide, scAT: subcutaneous Adipose Tissue, SVF: Stromal Vascular Fraction, wt: weight.

Fig. 2: Neutrophils depletion impairs ROS production and inhibits scAT regeneration in NaIM treated mice.

(A) Representative comparative microscopic aspects of the resection plane of scAT 8h post-surgery in NaCl and NaIM treated mice. The microscopic analysis highlights on the one side the slight diffuse granulocytic infiltration of scAT (left, NaCl or scar healing condition) and in the opposite side (right, NaIM or regenerative healing condition), the severe granulocytic infiltration of both the peri-adipose conjunctival lining and the scAT parenchyma (neutrophilic leucostasis and perivascular cuffing) (Hemalun & eosin staining). **(B)** Representative histograms and dot plot analyses of SVF cells isolated from NaCl (red curve) or NaIM (green curve) treated mice 6h post-resection, showing the percentage of CD45⁺ cells and granulocytes (neutrophils: CD45⁺/Ly6G⁺/ Ly6C⁻/CD11b⁺ and monocytes CD45⁺/Ly6G⁻/Ly6C⁺/CD11b⁺) in the resection plane. **(C)** Gene expression quantification by RT-qPCR of the chemokine *Cxcl1* in SVF isolated from the resection plane of NaCl or NaIM treated mice 2, 6 and 12h post-resection, (n=4 per group). **(D)** Representative in vivo imaging of ROS production 6 hours post-resection in NaIM treated mice, treated or not with anti-Gr1 blocking antibody (Ab α -Gr1). **(E)** Quantification of ROS production in vivo from 0 to 72 hours post-resection in NaIM treated mice,

treated or not with Ab α -Gr1 (n=5 per group). **(F)** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in NaIM treated mice treated or not with Ab α -Gr1 (Scale bar: 0.5cm). **(G)** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in NaIM treated mice, treated or not with Ab α -Gr1 (n=5 per group). The dotted line show values obtained in scar healing (NaCl) conditions **(H)** In vitro quantification of ROS production by Gr1⁺ populations sorted from scAT of NaCl, NaIM mice treated or not with the selective μ -opioid receptor agonist DAMGO, or μ KO mice 6h post-resection (n=3-6 per group). **(I)** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in NaCl or NaIM treated mice and in NaCl treated mice knock out for the μ opioid receptor (μ KO) (Scale bar: 0.5cm). **(J)** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post resection in in NaCl, NaIM-treated and μ KO mice (n=9-16 per group). Data are represented as mean \pm SEM. (*p < 0.05, *** p < 0.001 between scar and regenerative healing conditions). AT: Adipose Tissue, A.U: Arbitrary Units, DAMGO: [D-Ala 2, N-MePhe 4, Gly-ol]-enkephalin, NaIM: Naloxone Methiodide, scAT: subcutaneous Adipose Tissue, SVF: Stromal Vascular Fraction, ROS: Reactive Oxygen Species, wt: weight.

Fig. 3: Efficient efferocytosis of apoptotic neutrophils by CD11c⁺ macrophages is required for regeneration.

(A) Time course study of the number of neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺) and monocytes (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁺/Ly6G⁻) assessed by flow cytometry in the scAT of NaCl and NaIM treated mice (n=5-13 per group). **(B)** Percentage of apoptotic neutrophils and monocytes assessed by flow cytometry with Annexin V and DAPI staining 24h post-resection (n=5 per group). **(C)** Representative dot plots of flow cytometry analyses showing macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁺) 24h post-resection in scAT of NaCl or NaIM treated mice. **(D)** Quantification of macrophages in NaCl and NaIM treated mice 24h post-resection, (n=10-13 per group). Percentage of macrophages CD11c⁺ **(E)** and CD206⁺ **(F)** assessed by flow cytometry in NaCl and NaIM treated mice 24h post-resection (n=5 per group). **(G)** Representative histogram of IL-6, TNF α and IL-10 staining (grey histogram) or isotype (white histogram) on macrophages in resection planes 24h post-resection. **(H)** Percentage of IL-6, TNF α and IL-10 producing macrophages in NaCl or NaIM treated mice 24h post-resection (n=5 per group). **(I)** Representative dot plots of flow cytometry analyses showing neutrophils (CD45⁺/CD11b⁺/F4/80⁻/Ly6C⁻/Ly6G⁺) 24h post resection in scAT of CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and diphtheria toxin (DT). **(J)** Quantification of neutrophils 24h post-resection in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with DT and NaIM. **(K)** Representative pictures of scAT 1 month post-resection in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and DT (Scale bar: 0.5cm). **(L)** Weight ratio between resected and contralateral scAT in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with NaIM and DT (n=4). The dotted line shows values obtained in scar healing (NaCl)

conditions. **(M)** Examples of the imaging flow cytometry channels of macrophages stained with F4/80 (pink) and having engulfed (lower panels) or not (upper panels) CMTMR stained apoptotic neutrophils (yellow) in scAT of NaCl-treated mice 17h post-resection. **(N)** Quantification of efferocytic macrophages by flow cytometry in the scAT of NaCl and NaIM treated mice with or without TIM4 blocking antibody. **(O)** Representative pictures of of scAT 1 month post-resection, in mice treated with NaIM and with or without blocking TIM4 antibody (Scale bar: 0.5cm). **(P)** Weight ratio between resected and contralateral scAT 1 month post-resection in mice treated with NaIM and with or without blocking TIM4 antibody (n=7) The dotted line show values obtained in scar healing (NaCl) conditions. Data are represented as mean \pm SEM. (*p < 0.05, **p < 0.01 between scar and regenerative healing conditions). Ab: Antibody, NaIM: Naloxone Methiodide, CMTMR: 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine, scAT: subcutaneous Adipose Tissue, wt: weight.

Fig. 4: AT Resident macrophages but not classical BM derived macrophages are required for tissue regeneration.

(A) Hematopoietic chimera strategy: 2.10^3 LSK cells sorted from the scAT or the bone marrow (BM) of mTmG mice were co-injected with 2.10^5 total BM cells of C57Bl6 into lethally irradiated C57Bl6 recipients. Two months after hematopoietic reconstitution, scAT resection was performed and chimeric mice were treated with NaCl or NaIM. **(B)** Representative histograms showing chimerism (tdTomato staining) in total immune cells (CD45⁺) and macrophages (CD45⁺/CD11b⁺/Ly6G⁻/F4/80⁺) in NaIM treated AT- and BM-chimeric mice, 24h post-resection. **(C)** Representative histograms of CFSE staining in macrophages 24h post-resection in NaCl and NaIM treated chimeric mice, corresponding to the percentage of macrophages having engulfed CFSE⁺ neutrophils. **(D)** Quantification of efferocytic macrophages 24h post-resection in NaCl and NaIM treated chimeric mice (n=6). **(E)** Quantification of neutrophil number by flow cytometry 24h post-resection, in NaCl or NaIM treated mice (n=7-9 per group). **(F)** Representative pictures of scAT 1 month post-resection, in BM- and AT-chimeric mice treated or not with NaIM (Scale bar: 0.5cm). **(G)** Weight ratio between resected and contralateral scAT in AT- and BM-chimeric mice 1 month post-resection (n=5-8 per group). Data are represented as mean \pm SEM. (*p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 between scar and regenerative healing conditions). AT: Adipose Tissue, BM: Bone Marrow, LSK: Lin⁻/c-Kit⁺/Sca-1⁺ cells, NaIM: Naloxone Methiodide, scAT: subcutaneous Adipose Tissue, wt: weight.

FIGURE 1

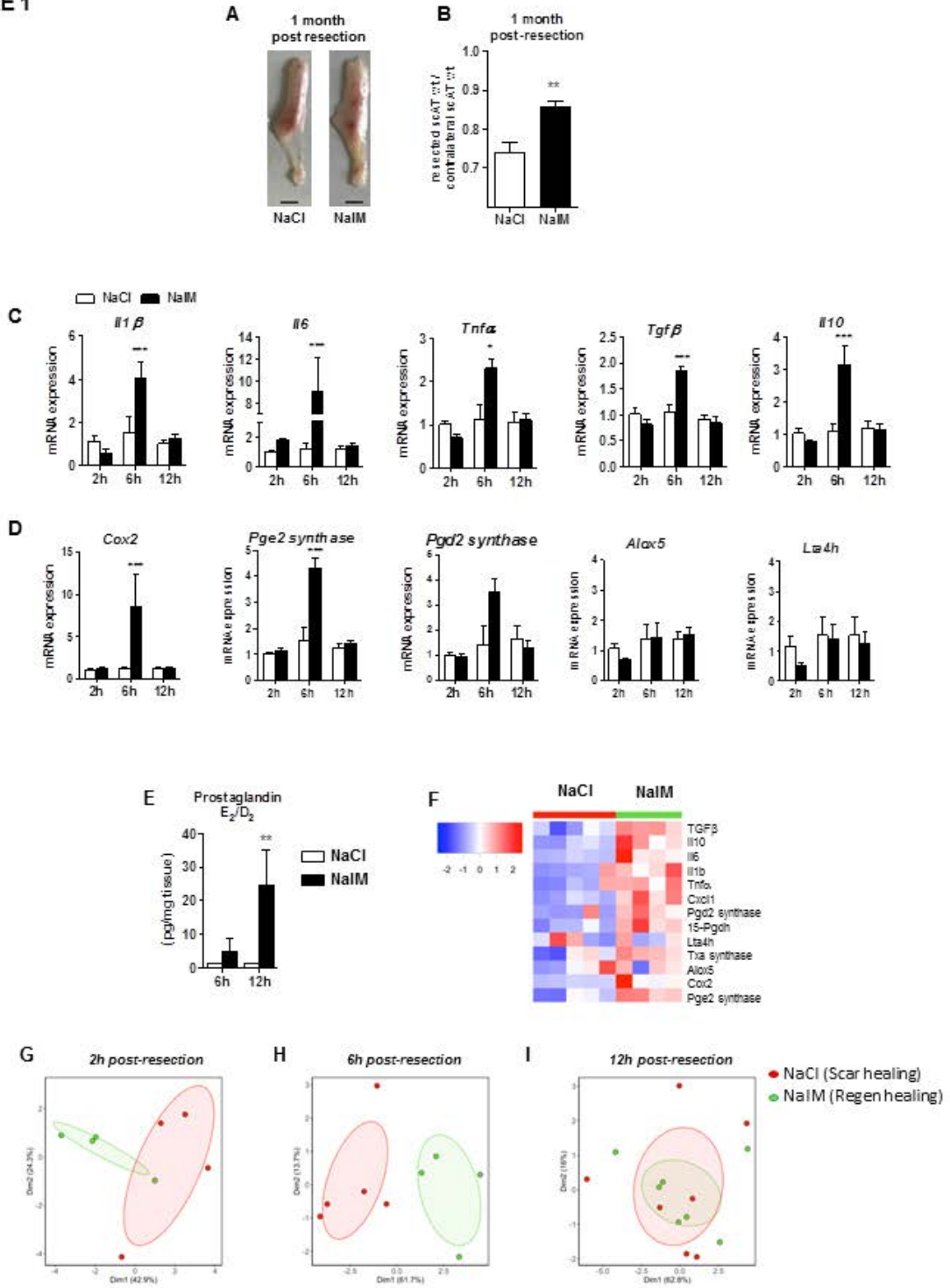


FIGURE 2

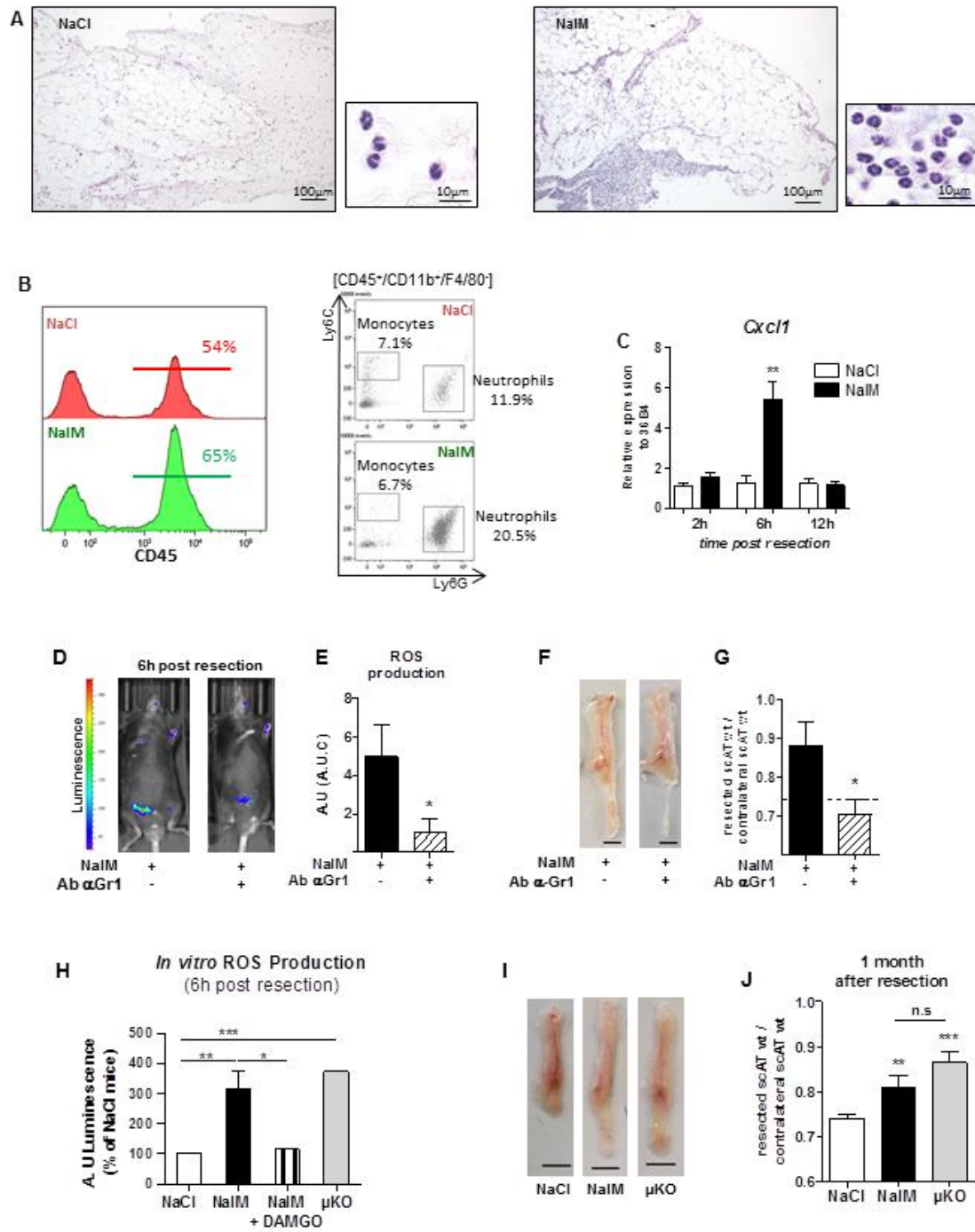


FIGURE 3

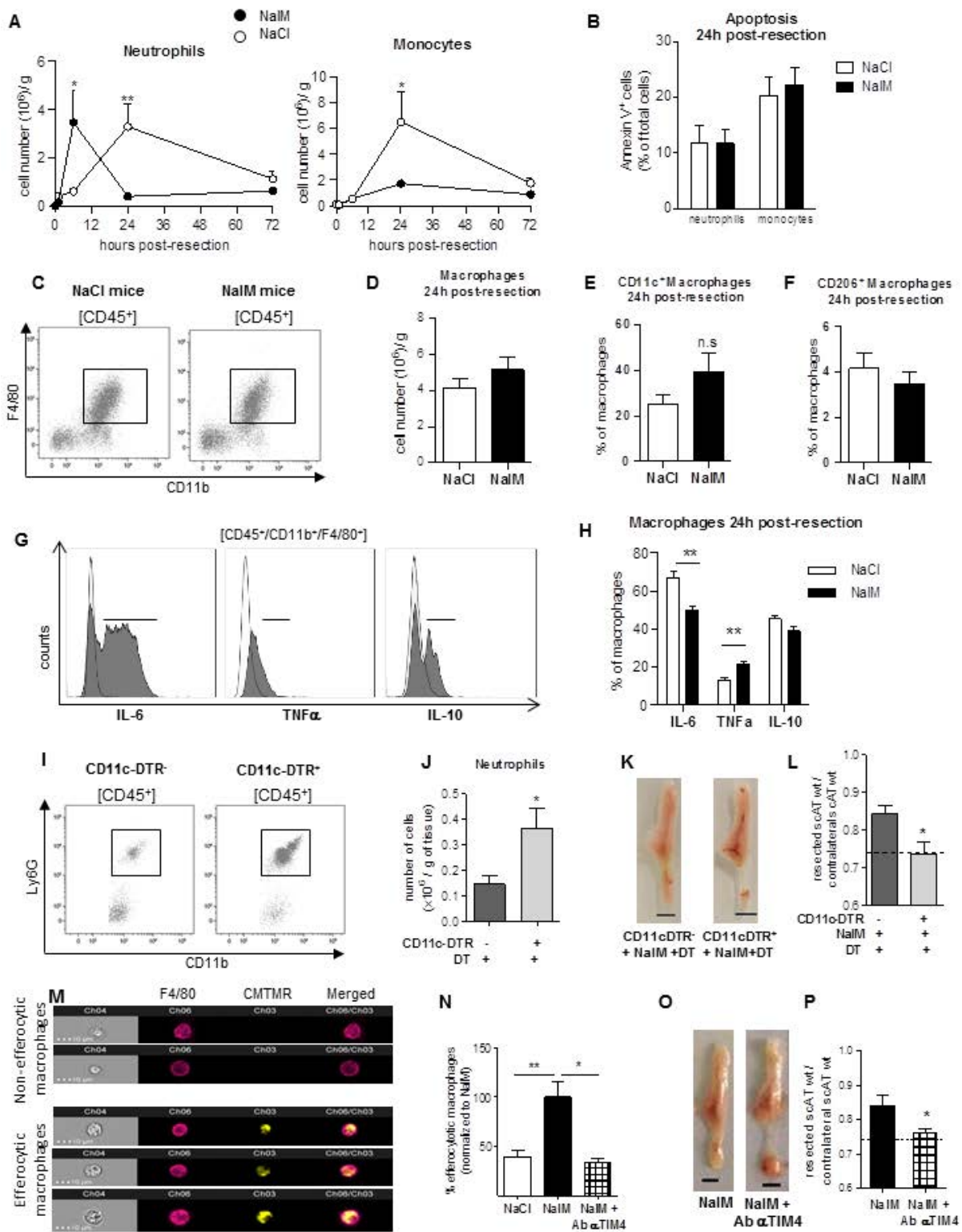
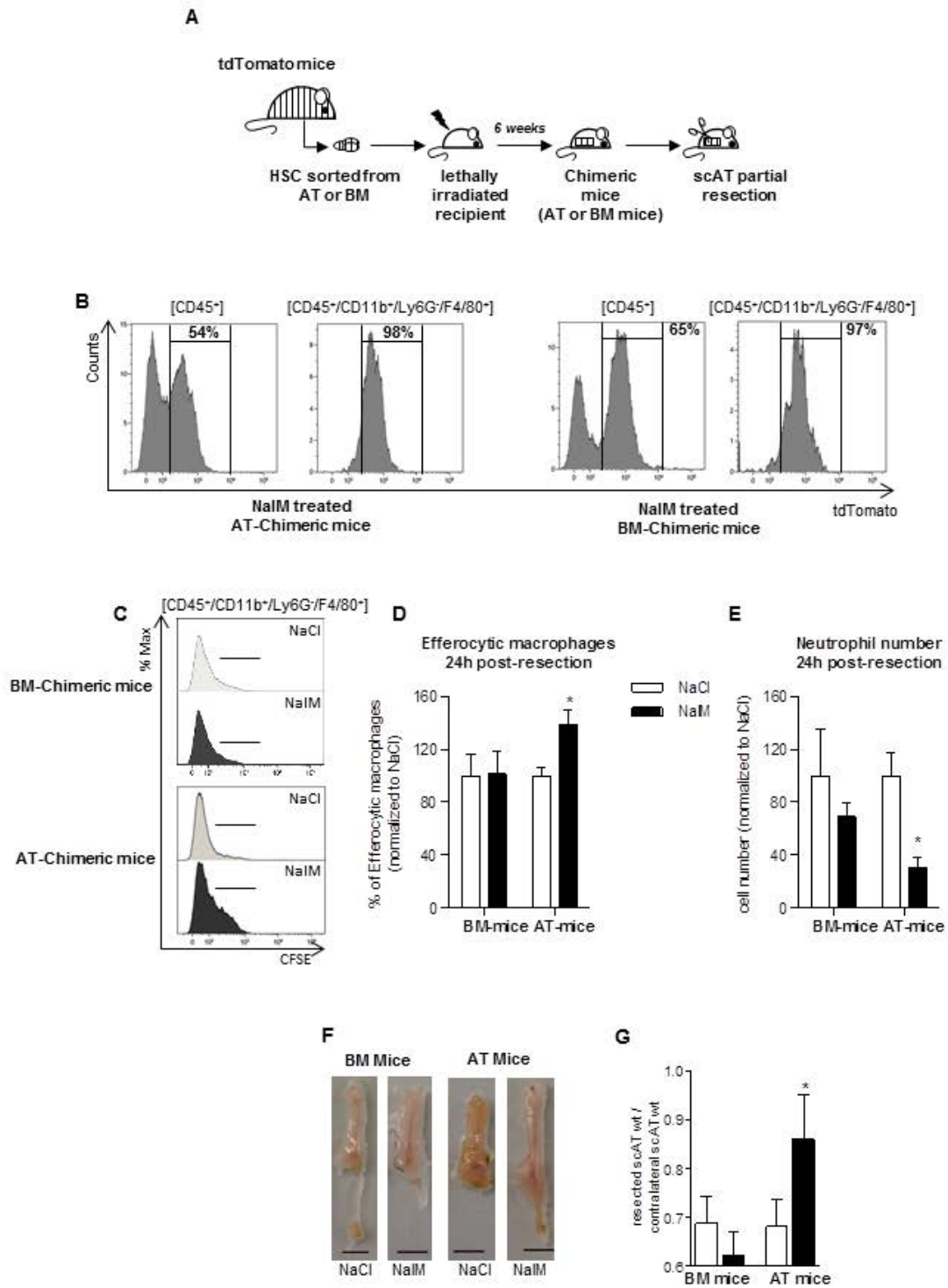


FIGURE 4



SUPPLEMENTAL INFORMATION TITLES AND LEGENDS

Supplemental Figure S1: In vivo treatment with anti-Gr-1 antibody depletes neutrophil population.

(A) Representative cytometry overlay of SVF cells isolated from NaIM (grey histogram) or NaIM + anti-Gr1 blocking antibody (Ab α -Gr1) (hatched histogram) treated mice 72h post-injection, showing Gr1⁺ cells gated in CD45⁺/CD11b⁺ population in the front lesion area. **(B)** Quantification of CD45⁺/Gr1⁺ cells in scAT 24, 48 and 72h after treatment with or without Ab α -Gr1 in NaIM treated mice (n=3). Data are represented as mean \pm SEM. (*p < 0.05). Ab: Antibody, NaIM: Naloxone Methiodide, SVF: Stromal Vascular Fraction.

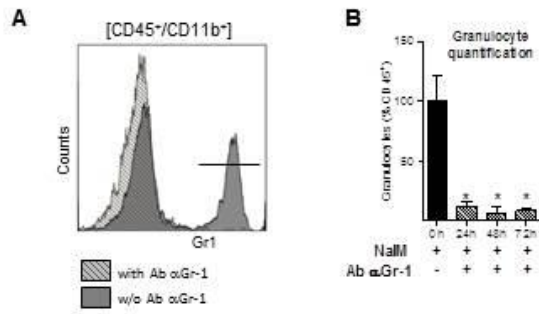
Supplemental Figure S2: In vivo treatment with diphtheria toxin depletes CD11c⁺ macrophages in scAT.

(A) Representative histogram of flow cytometry analysis showing CD11c⁺ macrophages in scAT 24h post-resection in CD11c-DTR⁺ (light grey) or CD11c-DTR⁻ (dark grey) mice under regenerative condition (NaIM) and DT treatment. **(B)** Quantification of CD11c⁺ macrophages 24h post-resection in CD11c-DTR⁺ and CD11c-DTR⁻ mice treated with DT and NaIM. Data are represented as mean \pm SEM. DT: Diphtheria Toxin, NaIM: Naloxone Methiodide, scAT: subcutaneous Adipose Tissue.

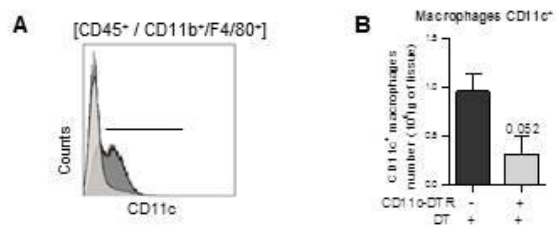
Supplemental Figure S3: Macrophage CD36 expression is similar in scar and regenerative healing conditions

(A) Representative dot plots of CD36 staining on macrophages 24h post-resection in scar (NaCl) and regenerative (NaIM) healing conditions. **(B)** Quantification of CD36⁺ macrophages 24h post-resection in scar (NaCl) and regenerative (NaIM) healing conditions (n=7-8 per group). **(C)** Quantification by RT-qPCR at 24h post-resection of mRNA encoding cd36 in macrophages sorted from the resection plane of scar (NaCl) or regenerative (NaIM) conditions (n=5 per group). Data are represented as mean \pm SEM. NaIM: Naloxone Methiodide, scAT: subcutaneous Adipose Tissue.

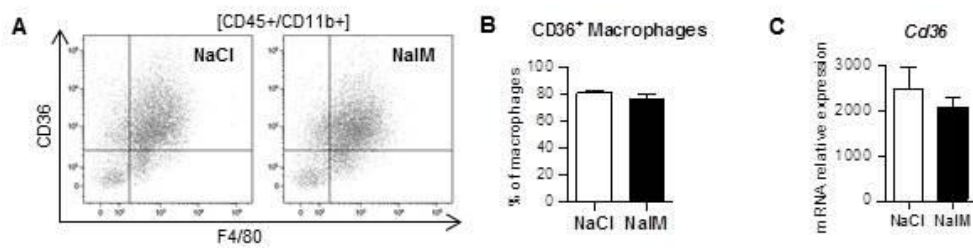
Supplemental FIGURE S1



Supplemental FIGURE S2



Supplemental FIGURE S3



Supplemental Table 1: Murine primer sequences used in qPCR analyses

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>36b4</i>	AGTCGGAGGAATCAGATGAGGAT	GGCTGACTTGGTTGCTTTGG
<i>Pge2 synthase</i>	ATGAGGCTGCGGAAGAAGG	GCCGAGGAAGAGGAAAGGATAG
<i>Cox2</i>	AACCGAGTCGTTCTGCCAAT	CTAGGGAGGGGACTGCTCAT
<i>Alox5</i>	GTGCTGCTTGAGGATGTGAA	CTACGATGTCACCGTGGATG
<i>Pgd2 synthase</i>	TGGGAAGACAGCGTTGGAG	AGGCGAGGTGCTTGATGTG
<i>Lta4h</i>	CGTGCCCTTAGTTCACATT	GTTGACAGCTGAACCCAGT
<i>Il6</i>	TTCCTCTCTGCAAGAGACTTC	CTGCAAGTGCATCATCGTTGT
<i>Il1β</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	TTGGAAGCAGCCCTTCATCTT
<i>Tnfa</i>	GGCGGTGCCTATGTCTCA	CGATCACCCCGAAGTTCAGTA
<i>Tgfβ</i>	TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT	CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA
<i>Il10</i>	CGGGAAGACAATAACTGCACCC	CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
<i>Cxcl1</i>	CCGAAGTCATAGCCACTCA	CTCCGTTACTTGGGGACACC
<i>cd36</i>	GATGTGGAACCCATAACTGGATTAC	GGTCCCAGTCTCATTAGCCACAGTA

Supplemental Table 2: Anti-mouse antibodies used in flow cytometry analyses

Antibody	Clone	Manufacturer
CD45	30F11	BD Bioscience
CD117	2B8	BD Bioscience
CD11b	M1/70	BD Bioscience
CD11c	N418	eBiosciences
CD206	MR6F3	eBiosciences
F4/80	BM8	eBiosciences
Lin	145-2C11	BD Bioscience
Ly6G	1A8	BD Bioscience
Ly6C	AL-21	BD Biosciences
Gr-1	RB6-8C5	BD Biosciences
Sca1	D7	eBiosciences
IL6	MP5-20F3	BD Biosciences
IL10	JES5-16E3	BD Biosciences

1 La régénération est caractérisée par une inflammation intense associée à un recrutement précoce et transitoire de neutrophiles producteurs d'EAOs.

Suite à une lésion massive du TAsc, la régénération tissulaire (avec le traitement à la NaIM ; [Article 1](#), Figures 1A et B) est associée à une inflammation intense et transitoire. En effet, l'expression génique des cytokines classiquement décrites comme pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α et anti-inflammatoires comme le TGF β et l'IL-10 est significativement plus importante dans la condition de régénération que dans celle de cicatrisation, 6 heures après la lipectomie (LP) ([Article 1](#), Figure 1C). De la même façon, l'expression des gènes codant pour la cyclo-oxygénase 2 (*Cox2*) et l'enzyme de synthèse de la PGE₂ (*Pge2s*) est stimulée 6h post-lésion après traitement avec la NaIM, conduisant à une augmentation de la quantité de PGE₂ sécrétée par rapport à celle de la PGD₂, prostaglandine plutôt anti-inflammatoire ([Article 1](#), Figures 1D et E). En revanche, aucune modification concernant la voie de synthèse des leucotriènes n'est observée au cours du temps et entre les conditions cicatrisation *versus* régénération ([Article 1](#), Figure 1D). L'analyse en composante principale permet de séparer nos deux conditions expérimentales (cicatrisation *versus* régénération) au temps 2 et 6 heures post-LP, avec une plus forte probabilité à 6h ([Article 1](#), Figures 1F et I). L'absence de « clusterisation » à 12h renforce l'idée selon laquelle l'issue de la réparation du TAsc après lésion est dictée par une signature inflammatoire précoce et transitoire ([Article 1](#), Figures 1F et I).

Nous nous sommes alors intéressés à l'identification des populations cellulaires pouvant être responsables de cette réponse inflammatoire précoce et intense. La coloration hématoxyline de coupes de TAsc quelques heures post-LP suggère une infiltration du front de lésion par des leucocytes granulocytaires de type neutrophile, plus importante dans les conditions de régénération *versus* cicatrisation ([Article 1](#), Figure 2A). Cette observation a été quantifiée par cytométrie de flux et montre que, 6 heures post-LP, les neutrophiles représentent 20.5% de la population de cellules CD45⁺ après traitement à la NaIM alors qu'en condition cicatrisante, ils ne représentent que 12% au même temps ([Article 1](#), Figure 2B). Cette quantité de neutrophiles au niveau du site de lésion, plus importante en condition de régénération, s'accompagne d'une augmentation significative de l'expression de la chimiokine CXCL1, connue pour favoriser le recrutement de neutrophiles³³² ([Article 1](#), Figure 2C). Contrairement aux neutrophiles, la population de monocytes est présente en proportions similaires dans les deux conditions expérimentales, 6h après la lésion ([Article 1](#), Figure 2B).

Afin de déterminer le rôle de ce recrutement significatif de neutrophiles dans la production massive d'EAOs et la régénération, nous avons éliminé spécifiquement la population granulocytaire (majoritairement composée de neutrophiles) à l'aide de l'anticorps bloquant Anti-Gr1, 24 heures avant

la LP. Dans ces conditions, la production massive d'EAOs ainsi que la régénération du TAsc sont abolies (Article 1, Figures 2D-G). En accord avec ces résultats, la production d'EAOs par la population de cellules Gr1⁺ isolée 6h post-LP, et mesurée extemporanément, est significativement plus importante lorsque les cellules sont issues de souris traitées à la NaIM par rapport à des souris contrôles (Article 1, Figure 2H).

La NaIM étant un antagoniste non spécifique mais plus affin pour les récepteurs μ aux opioïdes³³³, nous avons vérifié que la production d'EAOs par la population de cellules Gr1⁺, mesurée in vitro, était abolie en présence de DAMGO, agoniste spécifique des récepteurs μ (Article 1, Figure 2H). Enfin, l'utilisation de souris transgéniques invalidées pour le récepteur μ , révèle que la production d'EAOs par les cellules Gr1⁺, 6 heures post-LP, et la capacité de régénération sont similaires à celles mesurées après traitement à la NaIM (Article 1, Figures 2H-J), confirmant ainsi que la régénération observée en condition « NaIM » est majoritairement due à un effet direct sur les récepteurs μ .

L'ensemble de ces résultats montre que, 6h après la lésion, les deux conditions « cicatrisation » et « régénération » sont très divergentes en termes de réponse inflammatoire. Une inflammation intense, accompagnée d'une production massive d'EAOs par les neutrophiles est ainsi observée en condition de régénération, alors que la condition de cicatrisation semble être associée à une inflammation plus tardive. Les données sur le profil d'expression de gènes caractéristiques de l'inflammation (présentées dans l'article 1) ainsi que celles sur la production d'EAOs acquises précédemment²²⁴, pointent du doigt la nécessité d'un aspect transitoire de cette divergence.

2 Les macrophages CD11c⁺ dérivés de l'hématopoïèse endogène du TA permettent, grâce à leur capacité d'efférocytose, une résolution de l'inflammation plus rapide et permissive pour la régénération.

La résolution de l'inflammation est due à l'activation de macrophages qui vont i) phagocytiser les corps apoptotiques générés par la mort des cellules environnantes, notamment les neutrophiles et les monocytes (phénomène d'efférocytose), et ii) progressivement passer d'un état pro-inflammatoire à un état anti-inflammatoire (Chapitre 3 de l'introduction). Puisque, contrairement aux souris contrôles, les souris traitées à la NaIM (qui régénèrent) se caractérisent par une réponse inflammatoire intense mais transitoire due à une production massive d'EAOs par des granulocytes (Article 1, Figures 1 et 2), nous nous sommes donc intéressés à l'évolution au cours du temps des populations de neutrophiles et de monocytes. L'analyse en cytométrie de flux sur la base des marqueurs de surface CD45, CD11b, F4/80, Ly6C et Ly6G montre qu'en condition de régénération, le nombre de neutrophiles, après une importante augmentation à 6h post-LP, revient à un niveau proche de celui avant la lésion, dès 24h

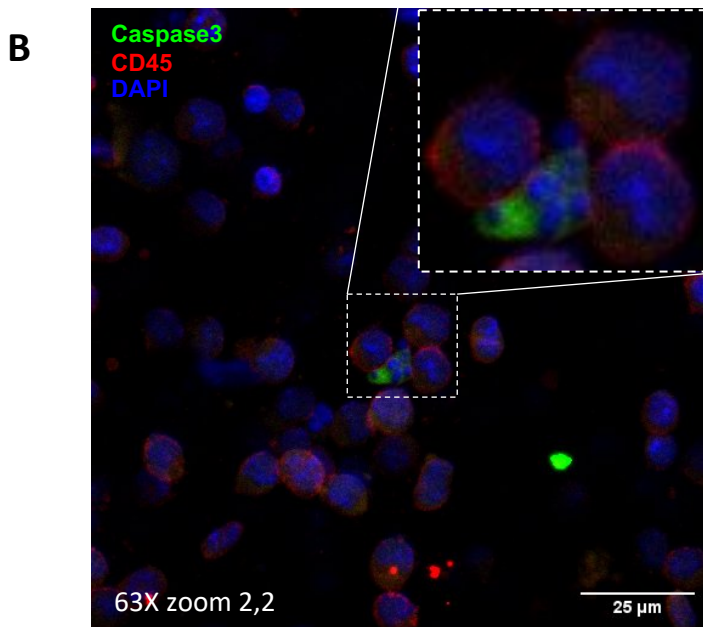
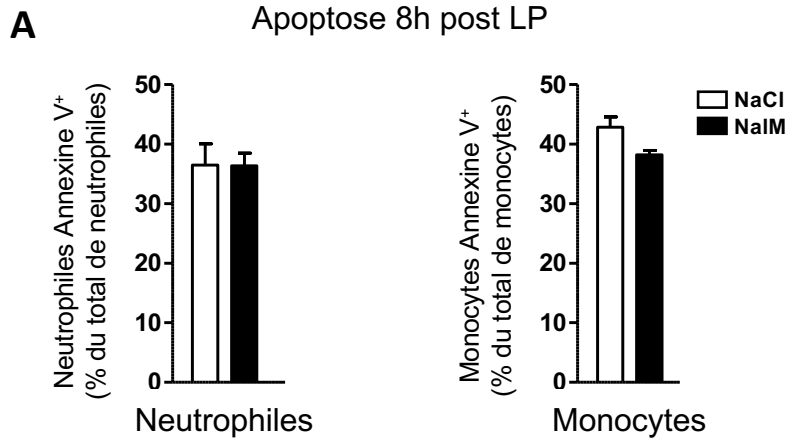


Figure 41. Apoptose cellulaire post LP en condition de cicatrisation (NaCl) ou de régénération (NaIM).

(A) Proportion de cellules Annexin V⁺ (neutrophiles à gauche et monocytes à droite) quantifiée par cytométrie de flux 8h post LP. (B) Immunohistochimie représentant une cellule apoptotique caspase 3⁺ (vert) entourée de cellules immunitaires CD45⁺ (rouge) de type macrophage (8μm de diamètre) 24h post LP sur le front de lésion de souris en condition de régénération (NaIM).

post-LP. Cette cinétique s'accompagne d'une faible augmentation du nombre de monocytes. En revanche en condition de cicatrisation, alors que 6h après la lésion, très peu de neutrophiles et/ou de monocytes sont retrouvés au niveau du front de lésion, ces deux populations augmentent de manière très importante à 24h. Même si elles ont tendance à décroître, 72h après la lésion, le front de lésion reste encore infiltré par ces deux types cellulaires (Article 1, Figure 3A). Le faible nombre de neutrophiles et dans une moindre mesure, de monocytes, observé 24h après la lésion chez les souris traitées à la NaIM suggère un processus efficace d'élimination de ces cellules entre 6 et 24h et qui ne serait pas présent chez les souris contrôles. Le marquage à l'Annexine V (marqueur d'apoptose), évalué en cytométrie de flux révèle qu'il n'y a pas de différence dans la proportion de neutrophiles et monocytes apoptotiques entre les deux conditions expérimentales, 8h (Figure 41A) et 24h post-LP (Article 1, Figure 3B). Des expériences d'immunohistochimie montrent que des cellules apoptotiques immuno-positives pour la Caspase3 sont systématiquement entourées de cellules CD45⁺ avec une morphologie de macrophage (Figure 41B) suggérant une efférocytose des cellules apoptotiques par des macrophages. La diminution brutale du nombre de neutrophiles 24h après la lésion n'est donc pas due à une apoptose augmentée mais pourrait résulter d'un efférocytose plus efficace par les macrophages en condition de régénération. Nous avons alors recherché si la population de macrophages était différente ou pas, entre les deux conditions, régénération versus cicatrisation. Les figures 3C et D de l'article 1 montrent qu'il n'y a pas de différence, 24h après la lésion, dans le nombre total de macrophages. Environ un tiers de ces macrophages sont pro-inflammatoires caractérisés par le marqueur de surface CD11c (Article 1, Figure 3E) alors que très peu présentent un phénotype anti-inflammatoire basé sur la présence du CD206 (Article 1, Figure 3F). Lorsque l'on s'intéresse aux cytokines produites par ces macrophages, on observe qu'en condition de régénération, le nombre de macrophages produisant de l'IL-6 24h post-LP est plus faible qu'en condition de cicatrisation (Article 1, Figures 3G et H). Le résultat inverse est obtenu pour les macrophages produisant du TNF α , suggérant que les populations de macrophages sont distinctes entre les deux conditions expérimentales.

Afin de déterminer le rôle des macrophages CD11c⁺ dans le processus de régénération, nous avons utilisé des souris CD11c-DTR. Dans ce modèle, les cellules CD11c⁺ sont spécifiquement éliminées 24h après injection de toxine diphtérique (Article 1, Figure Supplémentaire 2). L'élimination des cellules CD11c⁺ avant la LP s'accompagne d'une part, d'une accumulation de neutrophiles sur le front de lésion 24h post-LP, suggérant une mauvaise élimination de ces derniers, et d'autre part, d'une inhibition de la régénération tissulaire, malgré un traitement à la NaIM (Article 1, Figure 3I-L).

Nous avons donc mesuré in vivo la capacité d'efférocytose des macrophages 24h post LP, en injectant dans la circulation sanguine des souris des neutrophiles préalablement marqués avec une sonde

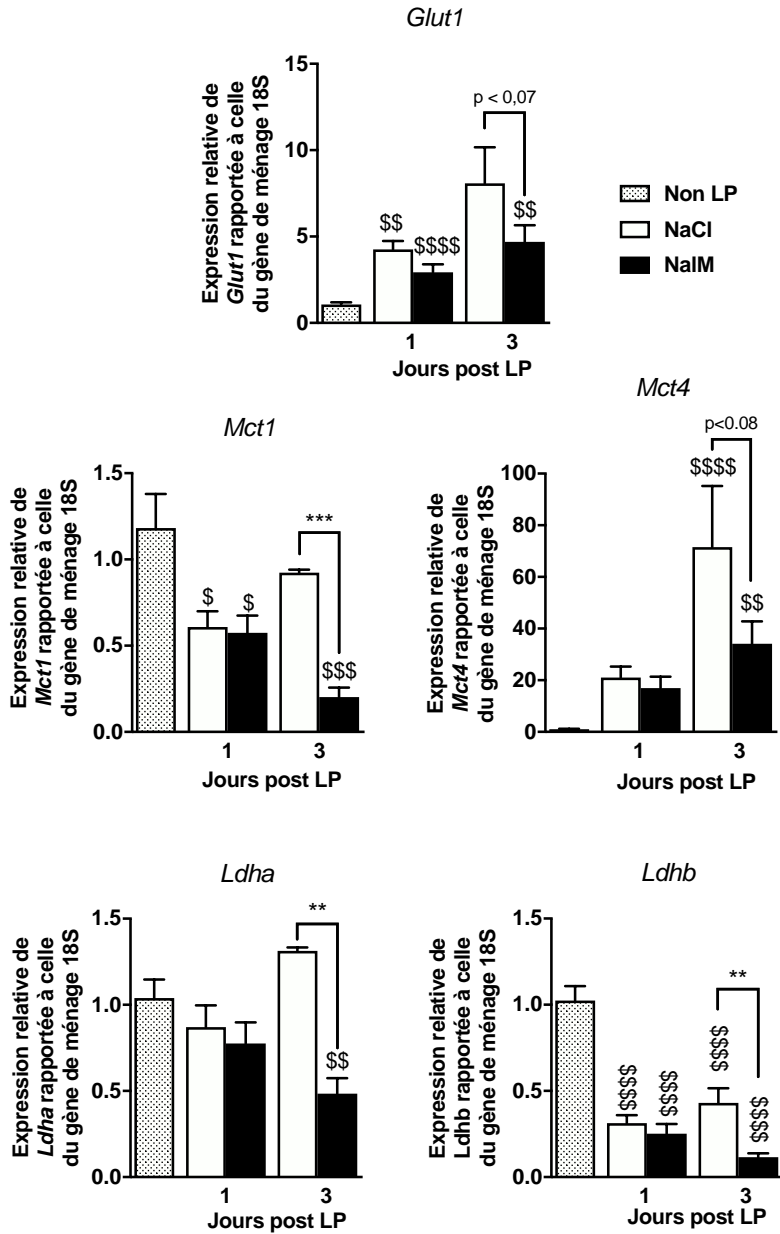


Figure 42. La NaIM modifie le profil métabolique des cellules du front de lésion 3 jours après la lipectomie.

Mesure du niveau d'expression des gènes *Glut1*, *Mct1*, *Mct4*, *Ldha* et *Ldhb* au niveau du front de lésion 1 et 3 jours post-LP chez des souris traitées ou non avec de la NaIM. (n=3-8 animaux par groupe). tous les résultats sont présentés sous la forme : moyenne \pm erreur standard à la moyenne (\pm ESM) * p 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. \$: versus non LP. LP, Lipectomie ; NaIM, Naloxone Méthiodide.

cellulaire. L'utilisation d'un imageur en flux permet de visualiser des macrophages F4/80⁺, et positifs pour la sonde (Article 1, Figure 3M). Il apparaît que 24h post LP, la population de macrophages en condition de régénération effectue une efférocytose significativement plus efficace que la population de macrophages en condition de cicatrisation (Article 1, Figure 3N).

Les macrophages reconnaissent les corps apoptotiques à l'aide de récepteurs membranaires tels que le CD36 ou TIM-4^{334,214}. L'expression de CD36 et le nombre de macrophages CD36⁺ ne variant pas entre les deux conditions (Article 1, Figure supplémentaire 3), nous avons utilisé un anticorps bloquant dirigé contre TIM-4 pour bloquer l'efférocytose par les macrophages (Article 1, Figures 3M et N). Cette élimination des macrophages efférocytiques a été associée à la perte de la capacité à régénérer (Article 1, Figures O et P).

L'ensemble de ces résultats montre donc qu'une élimination efficace des neutrophiles par les macrophages CD11c, 24h après la lésion, est nécessaire pour permettre la régénération.

Compte tenu des résultats originaux du laboratoire démontrant l'existence d'une hématopoïèse endogène au TAsc générant principalement des cellules myéloïdes, et au regard de nos résultats révélant des populations de macrophages différentes entre les conditions de régénération et de cicatrisation, nous avons cherché à savoir si ces populations avaient des origines tissulaires différentes. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les macrophages provenant de l'hématopoïèse endogène du TA auraient une capacité d'efférocytose différente de celle des macrophages dérivant des monocytes d'origine médullaire. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le modèle de chimère hématopoïétique développé dans l'équipe dans lequel des souris receveuses, irradiées léthalement, sont transplantées avec des cellules souches hématopoïétiques de TAsc ou de moelle osseuse (MO). Ainsi, dans les chimères obtenues (8 semaines après la greffe), le compartiment myéloïde du TAsc contient soit une majorité de macrophages dérivés du TA (souris TAMO) soit une majorité de macrophages dérivés de la MO (souris MOMO) (Article 1, Figures 4A et B). Des souris TAMO et MOMO ont alors subi une LP et ont été placées en condition de cicatrisation (NaCl) ou de régénération (NaIM). La quantification du nombre de macrophages efférocytiques 24h post-LP, montre une augmentation de cette population cellulaire uniquement chez les souris TAMO traitées avec la NaIM (Article 1, Figures 4C et D). Cette augmentation de l'efférocytose s'accompagne d'une diminution du nombre de neutrophiles sur le front de lésion (Article 1, Figure 4E), suggérant une meilleure élimination de ces derniers. De plus, seules les souris TAMO traitées à la NaIM sont capables de régénérer tandis que les souris MOMO cicatrisent (Article 1, Figure 4F et G). Ces résultats indiquent que seuls les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA peuvent assurer une efférocytose efficace permettant la régénération du TA, en réponse à un traitement à la NaIM.

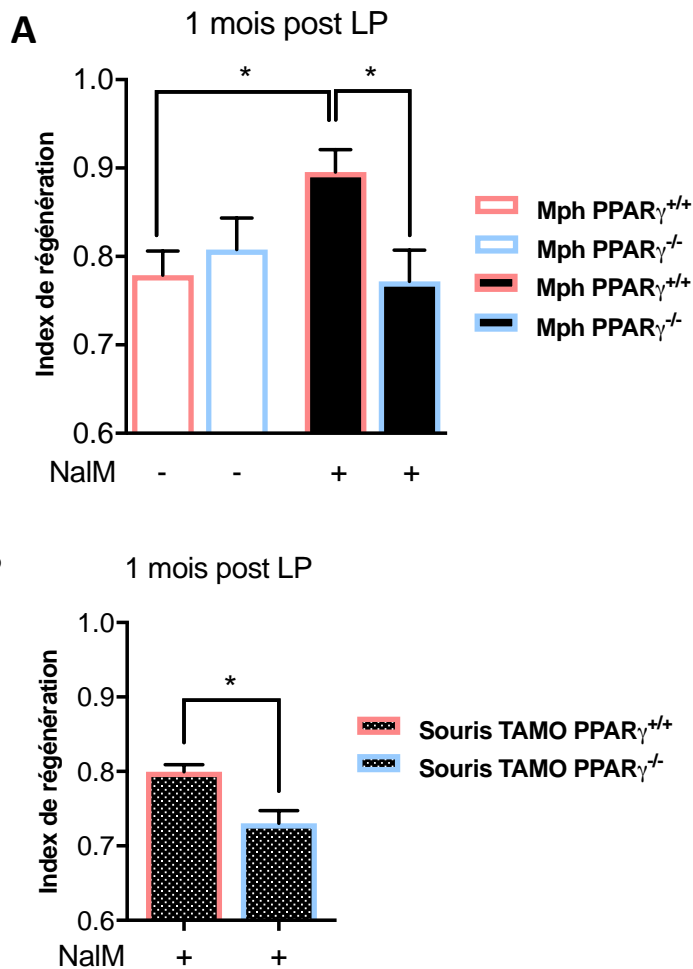


Figure 43. Implication de PPAR γ au cours de la régénération du TAsc.

(A) Quantification de la régénération du TAsc de souris dans lesquelles le gène PPAR γ a été spécifiquement invalidé dans les macrophages (Mph PPAR $\gamma^{-/-}$) par rapport aux souris contrôles (Mph PPAR $\gamma^{+/+}$), 1 mois post LP (n=3-6 par groupe). (B) Quantification de la régénération du TAsc de souris chimères reconstituées à l'aide de cellules souches dérivées du TA de souris KO ou non pour PPAR γ (souris TAMO PPAR $\gamma^{-/-}$ et souris TAMO PPAR $\gamma^{+/+}$), en condition de régénération (NaIM), 1 mois post LP (n=4-5 par groupe). Toutes les données sont représentées sous la forme : moyenne \pm ESM (écart standard à la moyenne). * p < 0,05. LP, Lipectomie ; Mph, Macrophages ; NaIM, Naloxone Méthiodide.

Dans cette étude, nous identifions pour la première fois les acteurs cellulaires et moléculaires capables d'orienter l'issue de la réparation tissulaire vers la régénération chez le mammifère adulte. Nous mettons ainsi en évidence i) la nécessité de la mise en place d'une inflammation précoce, intense et maîtrisée dans le temps, ii) une coopération entre neutrophiles et macrophages pour permettre la résolution de l'inflammation et iii) un rôle distinct entre les macrophages résidents issus de l'hématopoïèse endogène du TA et ceux issus de l'hématopoïèse classique médullaire (**Article 1**, Résumé Graphique, Figure 40).

D Résultats complémentaires.

Dans cette partie, nous allons présenter quelques données expérimentales qui complètent cette étude mais qui n'apparaissent pas dans l'article soumis pour publication.

1 Résolution de l'inflammation et PPAR γ

Comme nous l'avons montré dans l'article 1, la régénération tissulaire est dépendante de la cinétique de la réponse inflammatoire, orchestrée notamment par l'activité des macrophages. Leur transition phénotypique, d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire est, en effet, fondamentale pour permettre la résolution rapide de l'inflammation²¹⁵ et s'accompagne d'un switch métabolique au cours duquel les macrophages passent d'un métabolisme glycolytique à un métabolisme oxydatif²¹⁸ (Figure 26).

Nous avons donc étudié le profil métabolique des macrophages dans notre modèle, en mesurant sur le front de lésion, le niveau d'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les voies métaboliques. Il apparaît que l'expression des gènes codant pour les transporteurs *Glut1* et *Mct4* (Monocarboxylate transporter 4) est fortement augmentée 1 jour après la lipectomie par rapport aux animaux contrôles non opérés (Figure 42), ce qui suggère une augmentation de l'import de glucose (*Glut1*) et de l'export de lactate (*Mct4*), reflétant un métabolisme glycolytique. A ce temps, aucune différence d'expression n'a été mesurée entre les souris lipectomiées et placées en condition de cicatrisation (NaCl) ou de régénération (NaIM). En revanche, 3 jours après la lésion, l'expression des gènes codant pour le lactate déshydrogénases (*Ldha* et *Ldhb*) et le transporteur *Mct1* (Monocarboxylate transporter 1) est significativement diminuée chez les souris traitées à la NaIM. Une tendance similaire est observée pour les gènes codant pour *Glut1* et *MCT4* (Figure 42). Ces résultats suggèrent une transition des cellules du front de lésion vers un métabolisme oxydatif 3 jours après LP chez les animaux traités à la NaIM, qui pourrait refléter la résolution de l'inflammation plus rapide observée chez ces animaux (**Article 1**, Figure 3). Il est néanmoins nécessaire de reproduire ces expériences sur des macrophages triés.

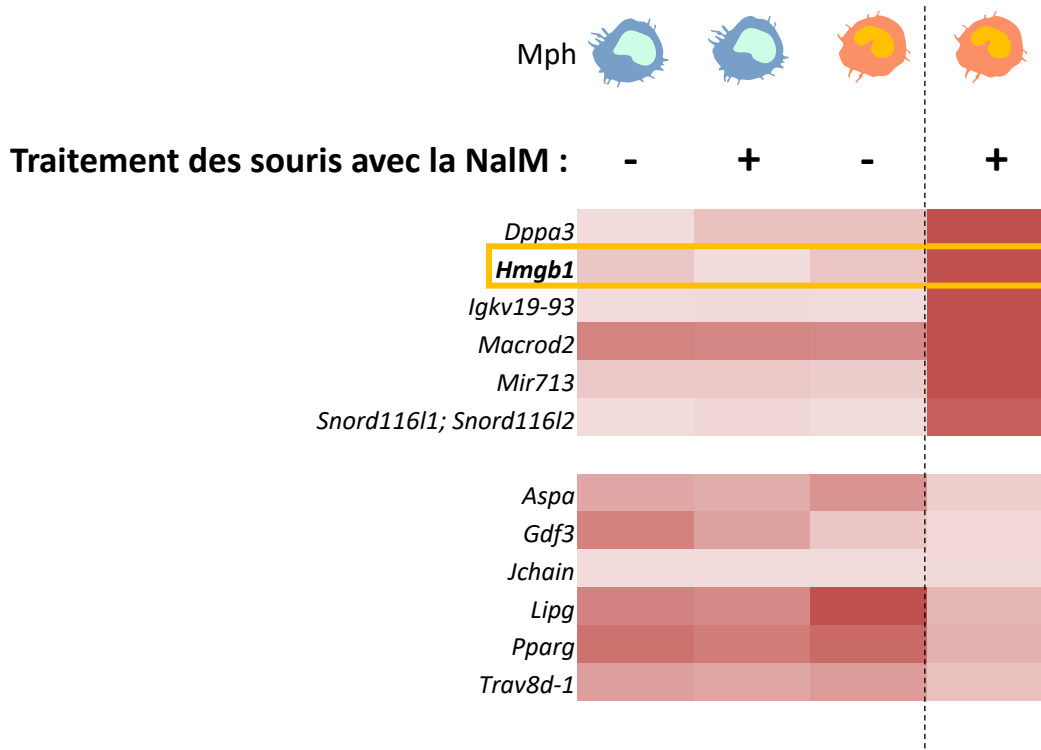


Figure 44. Étude à grande échelle de l'expression génique des macrophages dans différentes conditions de réparation tissulaire.

Aperçu du profil d'expression génique de macrophages issus de l'hématopoïèse médullaire (macrophages bleus) ou adipeuse (macrophages oranges), triés à partir du du TAsc, 24h post LP, après traitement ou non des souris à la NalM. Plus l'expression génique est élevée, plus la couleur est intense. Mph : Macrophages, LP : Lipectomie, NalM : Naloxone Méthiodide, TAsc : Tissu adipeux sous-cutané.

Parmi les nombreuses molécules impliquées dans la résolution de l'inflammation, les médiateurs lipidiques tels que la prostaglandine PGD₂ et son dérivé, le 15d-PGJ₂ jouent un rôle pivot et sont des ligands naturels du facteur de transcription PPAR γ , qui est exprimé par un grand nombre de cellules parmi lesquelles les macrophages¹⁹⁷. Au regard de l'explosion de la littérature disponible sur les rôles joués par PPAR γ (et ses ligands) lors de la réponse inflammatoire (inflammation et résolution), nous avons cherché à déterminer si ce récepteur nucléaire était important dans l'orientation de la réparation tissulaire vers la régénération ou la cicatrisation³³⁵.

Nous avons ainsi comparé la capacité de régénération de souris transgéniques dans lesquelles PPAR γ a été invalidé spécifiquement dans les cellules myéloïdes (Mph PPAR $\gamma^{-/-}$) par rapport à celle de souris sauvages (Mph PPAR $\gamma^{+/+}$). Nos résultats indiquent que l'absence de PPAR γ dans les macrophages inhibe la régénération du TAsc normalement induite par le traitement à la NaIM (Figure 43A), suggérant un rôle important de PPAR γ dans l'activité des macrophages au cours de la régénération.

Dans l'article 1, nous avons montré que les macrophages issus de l'hématopoïèse du TA sont nécessaires à la régénération (Article 1, Figure 4). Nous nous sommes donc interrogés sur l'importance de PPAR γ spécifiquement dans cette population de macrophages. Nous avons donc généré des souris chimères, reconstituées avec des cellules souches hématopoïétiques de TA provenant de souris Mph PPAR $\gamma^{-/-}$. Chez ces souris chimères, les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA n'expriment pas PPAR γ contrairement aux macrophages dérivés de la moelle osseuse. Ces souris chimères ont subi une LP et la réparation du TAsc a été évaluée 1 mois post-lésion. Les souris traitées à la NaIM, donc placées en condition de régénération, ne sont pas capables de régénérer leur TAsc (Figure 43B). Ce résultat montre que la présence de PPAR γ dans les macrophages issus de l'hématopoïèse du TA est essentielle pour permettre la régénération.

2 HGMB1 stimule la migration des cellules progénitrices du TAsc.

Nos résultats montrant le rôle-clef des macrophages issus de l'hématopoïèse du TA dans l'orientation de la réparation tissulaire, nous avons trié 24h post-LP, les macrophages issus de l'hématopoïèse du TA ou de la moelle osseuse, respectivement à partir de TAsc de souris TAMO ou MOMO, placées en condition de cicatrisation ou de régénération. Nous avons comparé le profil d'expression de ces deux populations par une approche sans a priori à l'aide de puces Affymétrie. L'analyse des résultats révèle qu'en condition cicatrisante (NaCl), le profil d'expression des macrophages est relativement similaire quelle que soit leur origine tissulaire. En revanche, en conditions de régénération (NaIM), on observe une modification spécifique du profil d'expression des macrophages issus de l'hématopoïèse du TA par rapport au profil d'expression des macrophages issus de l'hématopoïèse de la MO (Figure 44).

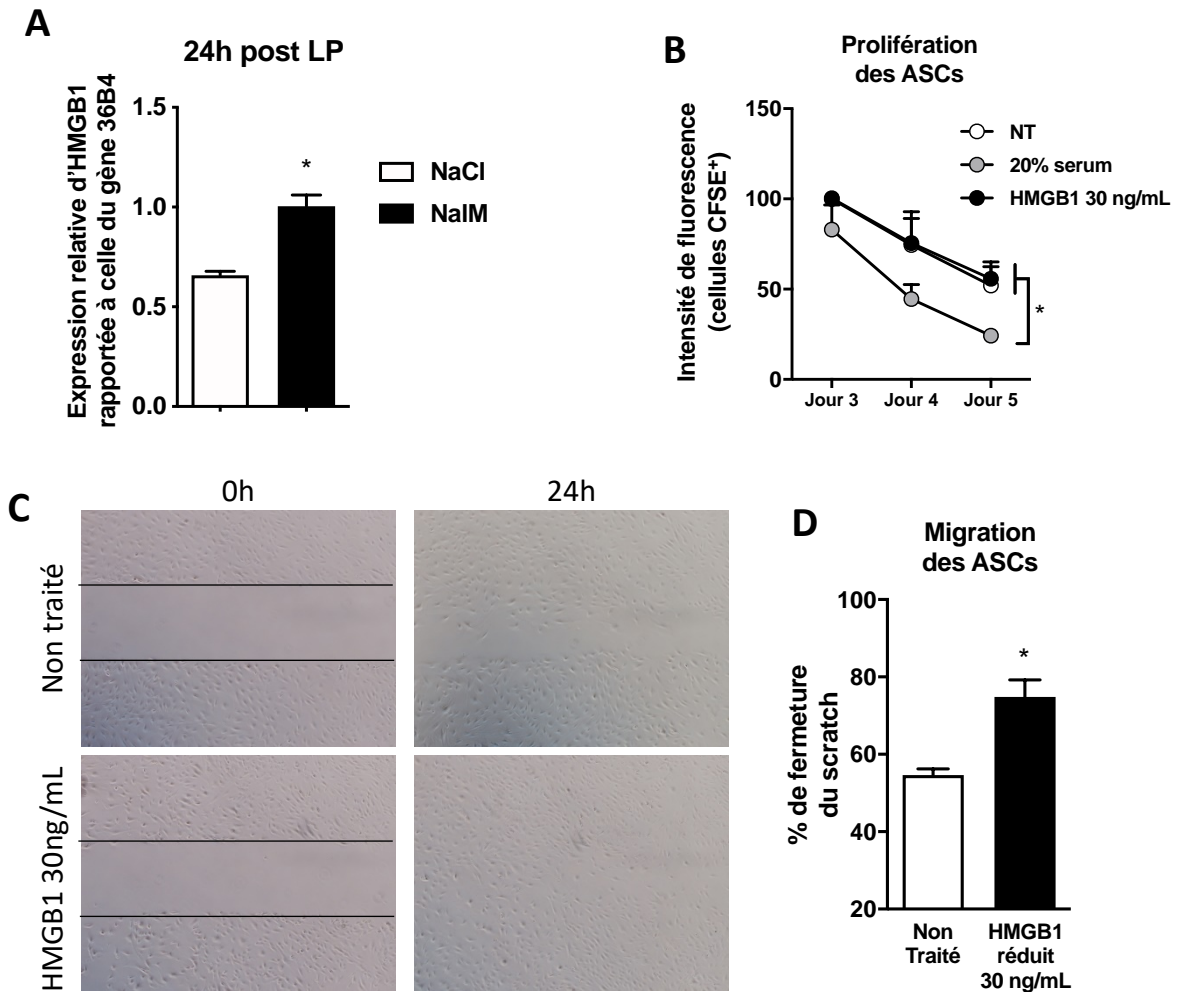


Figure 45. Effet d'HMGB1 sous sa forme réduit sur les ASCs de Tasc après lésion.

(A) Quantification du niveau d'expression du gène HMGB1 dans le Tasc de souris LP (24h post LP) en condition de cicatrisation (NaCl) ou de régénération (NaIM). (B) Intensité de fluorescence des ASCs marquées (CFSE⁺) en absence de traitement (NT, condition contrôle), après traitement avec 30ng/mL d'HMGB1 sous forme réduite ou après traitement avec du sérum 20% (contrôle positif). (C) Images représentatives de la migration des ASCs 0 et 24h après le scratch (matérialisé par les 2 traits), après traitement ou non avec HMGB1 sous forme réduite (30ng/mL). (D) Quantification de la fermeture du scratch, 24h après traitement ou non avec HMGB1 sous forme réduite (30ng/mL). Toutes les données sont représentées sous la forme : moyenne \pm ESM (écart standard à la moyenne). * $p < 0,05$. ASCs : Adipose Stromal Cell, LP : Lipectomie, NaIM : Naloxone Méthiodide, NT : condition contrôle.

Parmi les gènes les plus surexprimés chez les souris TAMO traitées à la NaIM, HMGB1 a attiré notre attention en raison d'un nombre croissant d'études décrivant son implication dans les processus de régénération musculaire ou hépatique²¹¹. En effet, les EAOs générées lors d'une lésion musculaire, conduisent à l'oxydation d'HMGB1 qui est sécrété par les macrophages.

Dans un premier temps, nous avons mesuré le niveau d'expression d'HMGB1 au niveau du front de lésion, 24h post-LP, après traitement au NaCl ou à la NaIM. La Figure 45A montre que la NaIM induit une augmentation significative de l'expression d'HMGB1 dans le TAsc.

Dans les phases tardives de la régénération, les cellules mésenchymateuses sont activées et migrent vers le front de lésion pour participer à la reconstruction du/des tissus³³⁶. La littérature suggère un effet pro-régénérant d'HMGB1 *via* un effet sur les cellules progénitrices musculaires^{211,337}. Nous avons donc évalué si HMGB1, sous sa forme réduite, modulait les capacités migratoires et/ou la prolifération des cellules mésenchymateuses du TAsc (les ASCs). La prolifération des ASCs a été évaluée en suivant la dilution du CFSE, molécule perméable aux cellules qui se couple de manière covalente, via son groupe succinimidyle, à des molécules intracellulaires (notamment à des résidus intracellulaires de lysine et à d'autres sources d'amines)³³⁸. Le traitement des cellules avec la forme réduite d'HMGB1 (30ng/ml) n'induit pas de modification de la prolifération des ASCs par rapport à la condition contrôle (Figure 45B). En revanche, un traitement des cultures avec du sérum à 20% stimule bien la prolifération de ces cellules (Figure 45B). La capacité migratoire des ASCs a été, par la suite, évaluée à l'aide d'un test de blessure (« scratch »). Au bout de 24h, le traitement avec HMGB1 sous forme réduite accélère la fermeture de la blessure sur le tapis cellulaire (75% de l'espace généré lors du scratch est recouvert d'ASCs en présence d'HMGB1 vs 55% en condition contrôle) (Figures 45C et 45D). Puisque HMGB1 ne modifie pas la prolifération des ASCs à 24h (Figure 45B), nous pouvons conclure que cette fermeture de la blessure, plus rapide en présence d'HMGB1, est due à une augmentation de la migration de ces cellules. En accord avec ces résultats, l'observation de la localisation et de la morphologie des ASCs au niveau du front de lésion montre qu'en condition de régénération (NaIM), les ASCs sont très nombreuses et s'alignent les unes par rapport aux autres 24 heures après la lipectomie, suggérant un comportement migratoire collectif alors qu'en condition de cicatrisation (NaCl), la morphologie des ASCs est hétérogène et leur densité est plus faible (Figure 46). De plus, après analyse de l'expression génique de protéines impliqués dans la dégradation de la MEC (MMP), nous avons montré une augmentation significative de l'expression de certaines MMP en condition NaIM dans les jours suivant la LP en comparaison aux souris placées en condition de cicatrisation (NaCl) (Résultats non montrés). Ces résultats suggèrent qu'en condition de régénération, dans notre modèle, la MEC serait plus souple et faciliterait la migration des ASCs, et donc la régénération.



NaCl

NaIM

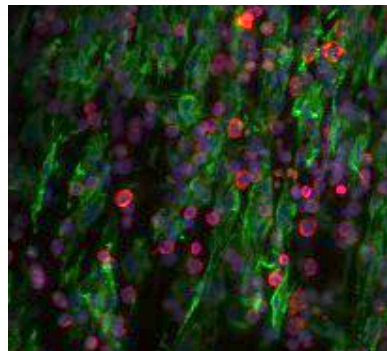
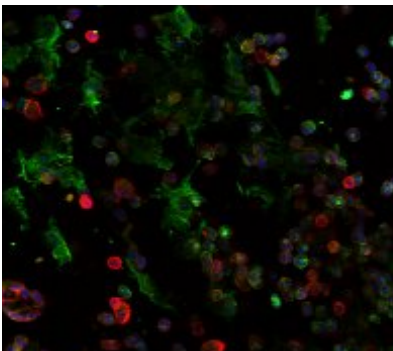
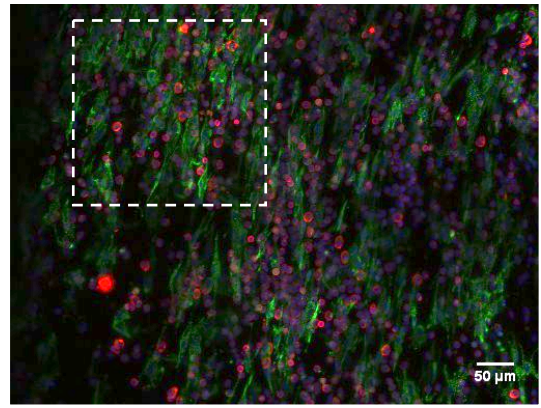
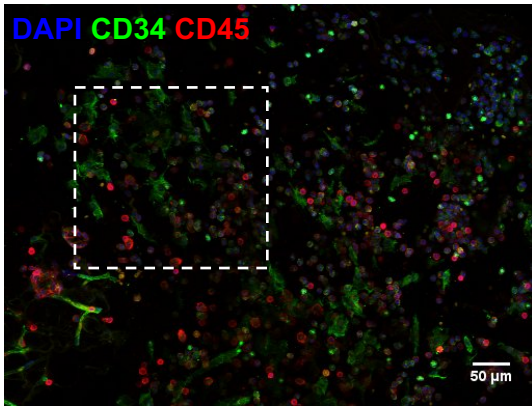


Figure 46. Les ASCs présentes sur le front de lésion 24 heures après la lipectomie, ont une morphologie différente entre les conditions cicatrisante et régénérante.

Marquage immunohistochimique au niveau du front de lésion de TAsc de souris lipectomiées (24h post LP) en condition de cicatrisation (NaCl) ou de régénération (NaIM). Les ASCs sont marquées en vert (CD34⁺), les cellules immunitaires en rouge (CD45⁺) et les noyaux en bleu (DAPI). ASCs : Cellules Stromales Adipeuses, NaIM : Naloxone Méthiodide. LP: lipectomie.

L'ensemble de ces résultats, bien que préliminaires, laisse penser qu'HMGB1 pourrait jouer un rôle important dans la régénération du TAsc en facilitant notamment la reconstruction du tissu par les ASCs. Il est désormais primordial d'évaluer les conséquences de la perte d'HMGB1 sur la régénération.

En conclusion, la gestion de la réponse inflammatoire est primordiale pour orienter la réparation tissulaire vers une régénération ou une cicatrisation. PPAR γ et HMGB1 sont des candidats moléculaires qui méritent des investigations plus poussées qui pourraient permettre d'identifier des voies de signalisation fondamentales à l'induction de la régénération chez le mammifère. Celles-ci pourraient alors représenter des cibles potentielles que l'on pourrait envisager de manipuler dans le but d'orienter la réparation tissulaire vers une régénération.

III Les nocicepteurs sont indispensables à la régénération chez la souris adulte.

A Contexte scientifique

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 2 de la partie introductive, de nombreuses études font état du caractère indispensable de l'innervation au cours des processus de régénération tissulaire^{122,339,88}. Ces études montrent notamment qu'une dénervation chirurgicale conduit à l'inhibition de la régénération spontanée de la patte chez la salamandre^{122,125}. Toutes ces études sont basées sur des expériences de neurotomie des nerfs rachidiens qui sont des nerfs mixtes renfermant à la fois des fibres nerveuses afférentes et des fibres nerveuses efférentes. La dénervation chirurgicale ne permettant pas d'être spécifique d'un type donné de fibres nerveuses, il n'est donc pas possible, par cette approche, de déterminer leur implication différentielle dans les processus de régénération. Si l'on se base sur les deux seules études qui ont distingué l'implication des différentes voies nerveuses, les conclusions concernant le type de fibres requis pour permettre la régénération divergent^{28,140}. A l'heure actuelle, cette identification reste donc une question ouverte à laquelle il est pourtant indispensable de répondre pour pouvoir envisager de moduler spécifiquement leur activité et contrôler l'issue de la réparation tissulaire vers une régénération.

Comme nous l'avons aussi présenté dans le chapitre 2, suite à une lésion, les fibres sensorielles nociceptives génèrent un message à l'origine de la perception douloureuse, agissant ainsi comme un système d'alarme. La douleur générée peut être inhibée par des opioïdes endogènes qui bloquent la transmission du signal nociceptif au niveau spinal, produisant ainsi un effet analgésique. Ces opioïdes peuvent aussi exercer un effet hors du SN, en inhibant le relargage local de substance P et/ou de CGRP par les terminaisons périphériques des nocicepteurs au niveau du tissu lésé.

Les travaux de Labit et coll. montrent que le TAsc de la souris MRL est capable de régénérer spontanément après une lésion massive et que cette capacité est inhibée lorsque la souris est traitée avec un agoniste des récepteurs aux opioïdes²²⁴. Inversement, la souris C57BL/6 qui cicatrise après une lésion, est capable, après un traitement sous-cutané avec la NalM, un antagoniste des récepteurs aux opioïdes qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique, de déclencher les processus de régénération du TAsc suggérant un effet périphérique et non central des opioïdes.

Au regard des données de la littérature relatives i) à l'implication des nerfs dans les processus de régénération ii) l'activité inhibitrice des opioïdes sur les nocicepteurs, et de nos résultats précédents démontrant le rôle inhibiteur des opioïdes sur les processus de régénération chez le mammifère

adulte²²⁴, **nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les nocicepteurs seraient nécessaires pour déclencher les processus de régénération.**

Dans l'étude qui suit, nous avons donc cherché dans un premier temps à savoir s'il existait un lien entre la sensibilité nociceptive et la capacité à régénérer. Nous avons ensuite évalué l'implication des fibres sensorielles nociceptives dans la capacité de régénération (ces résultats sont actuellement soumis pour publication dans le journal PNAS au format Brief Report). Je présenterai les résultats ainsi obtenus à la suite de l'article.

Nociceptors control tissue regeneration in adult C57BL/6 mice

Lise Rabiller¹, Silveric Gilardi¹, Christophe Guissard¹, Elodie Labit^{1,2}, Bruno P Guiard³, Lionel Moulédous³, Luc Pénicaud¹, Anne Lorsignol¹, Louis Casteilla^{1,*} and Cécile Dromard Berthézène^{1,*,†}

¹ STROMALab, Université de Toulouse, CNRS ERL5311, EFS, ENVT, Inserm U1031, UPS, Toulouse, France

² Actual address: Department of Comparative Biology and Experimental Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada

³ Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA), Centre de Biologie Intégrative (CBI), CNRS UMR-5169, Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France.

* These authors contributed equally to this work.

† Correspondence: Cecile Dromard Berthézène, PhD, cecile.dromard-berthezene@inserm.fr

Running title: Nociceptors drive tissue regeneration

Key Words: regeneration, sensory afferent nociceptive nerve fibers, nociceptors, CGRP, morphine, adipose tissue

Abstract

Tissue repair after injury usually results in scarring and loss of function in adult mammals, including humans. Understanding the regulatory processes that guide the outcome of tissue repair is therefore a worrisome challenge for regenerative medicine.

Throughout the animal kingdom, in species that display regenerative ability, the regenerative response is controlled through nerve activity, but until now, the nature of the innervation required for tissue regeneration has not been defined. Using our model of induced adipose tissue regeneration in adult C57BL/6 mice, we first demonstrated that the specific denervation of afferent sensory nerves by capsaicin impedes tissue regeneration. We also observed that the administration of the CGRP sensory neuropeptide is sufficient to induce this regeneration and overcome the scar healing effect of morphine while allowing its analgesia effect. This study highlights the need for sensory nociceptive nerves in the control of regeneration in adult C57BL/6 mice and allows to propose a novel postoperative analgesic strategy promoting tissue regeneration via CGRP and morphine treatment.

Introduction

Despite clinical advances, humans cannot regenerate injured tissue after traumatic lesion or surgical intervention. Instead, tissue trauma leads to fibrosis and ultimately to the formation of scar tissue and loss of function (1). Understanding the regulatory processes that guide the outcome of repair is therefore a concerning challenge for regenerative medicine.

Nerves are known to be crucial for regeneration. Numerous studies have reported that denervation impairs or severely delays the regeneration of various structures, from the limb of the salamander to the ear of the MRL mouse (2–5). However, these studies are based on neurotomy which does not distinguish the contribution of efferent nerve fibers from that of afferent fibers.

Afferent nerve fibers carry sensory information associated with tissue injury, including nociceptive information that causes pain. It is usually managed with opioids, such as morphine, which provide analgesia by activating opioid receptors located in the central nervous system and also on the endings of primary afferent sensory nerves in peripheral tissues (6).

We have recently shown that opioids negatively impact regenerative ability (7). Our model is based on a massive resection of the subcutaneous adipose tissue (scAT), which plays a central role in energy and glucose homeostasis. After resection, this fat pad heals spontaneously leading to the formation of a scar, and regeneration of the scAT can be induced by inhibition of peripheral opioid receptors with naloxone methiodide (NaIM).

Thus, we propose that afferent sensory nerve fibers control tissue regeneration after tissue injury through the release and activation of pro-nociceptive neuropeptide signaling. However, pain management is an ethical obligation and the challenge would be to induce tissue regeneration while ensuring analgesia.

To that aim, we first examined whether specific sensory denervation by capsaicin injections was sufficient to affect adipose tissue regeneration. We then tested the ability to regenerate after pharmacological disruption of the calcitonin gene-related peptide (CGRP) sensory neuropeptide signaling. Finally, we evaluated whether the administration of CGRP (i) was sufficient to induce regeneration of damaged tissue, (ii) counteracted the scar healing effect of morphine and (iii) impacted the analgesic effect of morphine.

Results and discussion

Specific denervation of sensory terminals impairs tissue regeneration

To determine the role of afferent sensory nerve fibers in tissue regeneration, we specifically destroyed afferent sensory nerve fibers using capsaicin in our model of massive resection of the inguinal scAT. First, we confirmed that denervation was effective and specifically affected the activity of the scAT sensory nerves. Indeed, twenty-one days after capsaicin treatment in the intact scAT, the number of sensory nerve fibers was drastically reduced while that of efferent sympathetic nerve fibers was unaffected, as assessed by immunostaining for CGRP and TH (Tyrosine Hydroxylase) respectively (Fig. 1A and 1B). Moreover, under regenerative condition (NaIM), sensory denervation induced a significant decrease in the percentage of response to Von Frey filament stimulation of the resected fat pad area (Fig. 1C), while paw sensitivity was unaffected (Fig. 1D). Then, we analysed the impact of denervation of the afferent sensory fibers on tissue regeneration. As expected, one month after resection, mice placed in scar healing condition (morphine) or regenerative condition (NaIM) exhibited macroscopic scAT healing or regeneration respectively (Fig. 1E and 1F). Strikingly, sensory denervation significantly inhibited regeneration (NaIM + Den) and induced scar healing (Fig. 1E and 1F) in mice. These results show that specific denervation of afferent sensory nerves in scAT impairs tissue regeneration in adult C57BL/6 mice.

CGRP is sufficient to induce regeneration of the injured tissue and overcomes opioid scar healing effect

We then investigated whether sensory nerve-dependent scAT regeneration relies on the sensory neuropeptide CGRP. ScAT-resected mice were placed in regenerative condition (NaIM) and treated with the selective CGRP receptor antagonist BIBN (8). In contrast to mice treated with NaIM, which regenerated, mice treated with NaIM and BIBN displayed macroscopic scar healing one month after resection (Fig. 2A and 2B). This shows that CGRP is required for NaIM-induced tissue regeneration in adult mice. We therefore tested whether CGRP would be sufficient to induce regeneration on its own without NaIM treatment. Mice treated only with CGRP exhibited macroscopic scAT regeneration one month after resection (Fig. 2C and 2D). Finally, as one cannot ignore analgesic management after surgery, we evaluated regenerative capacity and nociception after co-administration of CGRP and morphine in scAT resected mice. We showed that CGRP counteracted the scar healing effect of morphine (Fig. 2C and 2D), while maintaining its analgesic effects (Fig 2E).

Discussion

Through animal phylogenesis, the regenerative response to a lesion involves functional nerves in several species, but until now, studies were performed in lower vertebrates and specific mammalian models (neonatal mice and MRL mice with autoimmune disease and organomegaly), and the nature of the innervation required for tissue regeneration has not been defined. The present study sheds light on the requirement for afferent sensory nociceptive nerves in the control of regeneration in the most commonly used C57BL/6 scar healing adult mice. This means that, in adult mice, nociceptive innervation would have two distinct and complementary functions after injury (i) to protect the organism by activating protective physiological and behavioural mechanisms, (ii) to restore functional tissue by controlling repair processes.

In regeneration, studies performed so far used mainly neurotomy, preventing the distinction between afferent and efferent innervation. Owing to the involvement of efferent motor nerve fibers in sensory-motor loops, the involvement of such fibers in the scAT regenerative response cannot be excluded. Thus, involvement of cholinergic nerve activity in heart regeneration was shown in zebrafish and neonatal mice(5). On the other hand, the lack of sensory innervation negatively affects cutaneous and corneal wound healing after moderate lesion (9, 10), however, these studies focus on the closure of wounds, not on complex tissue regeneration. The present work, consistent with

the study of Meda et al (11) in zebrafish, is the first demonstration in mammals that sensory fibers are essential for tissue regeneration.

If we cannot rule out the intervention of other neuropeptides, our pharmacological approach targeting the signaling of the sensory neuropeptide CGRP, suggests that afferent sensory nerve fibers control regeneration probably through the release of CGRP. This is consistent with previous studies on scar healing, showing that local injection of CGRP, after skin injury resulted in a significant acceleration of wound closure, but it is still not regeneration (12, 13). Since CGRP has been described to induce chemotactic migration of mesenchymal stem cells to the lesion site (14), it remains to be determined if there is an interplay between afferent sensory nerve fibers and adipose stromal stem cells in our model.

All together, these results demonstrate that nociceptors are essential for tissue regeneration and that administration of sensory neuropeptide CGRP is sufficient to induce regeneration of damaged tissue and overcome the scar healing effect of morphine while allowing for analgesia. We are therefore able to propose a new post-operative analgesic strategy that promotes tissue regeneration through the co-administration of morphine and CGRP.

Figure Legends

Figure 1. Specific reduction of sensory terminals impairs tissue regeneration

(A) Imaging of control or denervated scAT, 21 days after capsaicin injection, showing sensory fibers (CGRP, red), sympathetic fibers (TH, green) and nuclei (DAPI, blue). Scale bars: 0,5 cm. (B) Quantification of the area occupied by the sensory fibers (CGRP) and the sympathetic fibers (TH) (n=3). (C) Mean frequency (\pm SEM) of withdrawal reflex during Von Frey test on the resected fat pad area, in NalM-treated mice, previously denervated or not (n=6-7 per group), from day 1 (D1) to day 3 (D3) post-resection. (D) Mean frequency (\pm SEM) of withdrawal reflex during Von Frey test on the paw, in NalM-treated mice previously denervated or not (n=6-7 per group), from day 1 (D1) to day 3 (D3) post-resection. (E) Representative pictures of scAT 1 month after resection and Morphine or NalM treatment in mice previously denervated or not (Scale bar: 0.5 cm). (F) Weight ratio quantification (n=7-11 per group). CGRP: Calcitonin Gene Related Peptide, TH: Tyrosine hydroxylase, NalM: Naloxone Methiodide, Den: denervated. (*p < 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Figure 2. CGRP induces regeneration of the injured tissue and overcomes opioid scar healing effect

(A) Representative pictures of scAT, 1 month after resection and NalM or NalM + BIBN treatment (Scale bars: 0.5 cm). (B) Weight ratio quantification (n=4-5 per group). The dotted line indicates the weight ratio in scar healing condition (morphine). (C) Representative pictures of scAT, 1 month after resection and Morphine, CGRP or Morphine + CGRP treatment (Scale bars: 0.5cm). (D) Weight ratio of scAT 1 month after resection and Morphine, CGRP or Morphine + CGRP treatment (n=5 per group). (E) Mean frequency (\pm SEM) of withdrawal reflex during Von Frey test on the resected fat pad area, in Morphine, CGRP or Morphine + CGRP treated mice (n=5 per group), from day 1 (D1) to day 3 (D3) post-surgery. NalM: Naloxone Methiodide, BIBN: BIBN-4096, CGRP receptors antagonist, CGRP: Calcitonin Gene Related Peptide. (*p < 0.05, ** p<0.01, **** p<0.0001 vs morphine, \$\$\$\$p<0.0001 vs morphine + CGRP).

Materials and methods

Animals

All experiments were performed on 5- to 7-weeks-old male mice. C57BL/6 mice were obtained from Harlan Laboratories and bred in the CREFRE (Centre Regional d'Exploration Fonctionnelle et Ressources Expérimentales). Animals were group-housed (3 or 4 per cage) in a controlled environment (12-hours light/dark cycles at 21 °C) with unrestricted access to water and a standard chow diet in a pathogen-free animal facility. The animals were maintained in accordance with the guidelines of the European Community Council. Mice were killed by cervical dislocation. All experiments were carried out in compliance with European Community Guidelines (2010/63/UE) and approved by the French ethics committee (protocol reference: 2016031009332865).

In vivo treatments

Mice were treated with naloxone methiodide (NAL-M) (subcutaneous injection, 17 mg/kg, N129, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), or Morphine (subcutaneous injection, 10 mg/kg, generously donated by our collaborators L.Moulédous and B.Guiard), or CGRP (subcutaneous injection, 7,5µg/mice, 1161/100U, R&D Systems, Minneapolis, MN), or the CGRP antagonist receptor BIBN4096 (subcutaneous injection, 1mg/Kg, Cat. No. 4561, R&D Systems, Minneapolis, MN) on days 0–3 after scAT resection.

scAT resection

Control mice were used for the baseline control and did not undergo surgery. Mice underwent unilateral resection of subcutaneous adipose tissue (scAT) as described in our previous report (7). Briefly, animals were anaesthetized by inhalation of isoflurane 2,5% and a single incision was made on the abdomen to access and excise 35 to 40% of the right scAT between lymph node and groin. The left scAT did not undergo surgical procedure and was used as an internal control. To quantify scAT regeneration, the weight ratio between the right (i.e. resected) and the left (i.e. contralateral) scAT was calculated.

scAT denervation

scAT denervation was adapted from a protocol previously published by Vauhan et al (15). Capsaicin (M2028, Sigma Aldrich, St Louis, MO) was diluted in 100% ethanol, then in olive oil (1:10, 01514, Sigma Aldrich, St Louis, MO). Animals were anesthetized by inhalation of isoflurane 2,5% and scAT was wetted with NaCl 0,9% during the length of experiment. Briefly, 8 micro injections of 5 μ L capsaicin (20 μ g/ μ L) were performed in scAT using Hamilton needle (Dutsher, 25 μ L). Denervation effectiveness 21 days after injection of capsaicin was previously assessed.

Behavioral tests

Mechanical nociception (allodynia) was quantified by measuring the hind paw withdrawal response to von Frey filament stimulation. Unrestrained mice were placed beneath a clear plastic chamber on an elevated mesh floor and were allowed to settle for 45 minutes. Withdrawal responses to mechanical stimulation were determined using calibrated Von Frey filaments applied from underneath the cage through the mesh floor to the scAT surgery area or to the hind paw plantar skin on the same side as the resection. Testing was carried out with Von Frey filaments of increasing stiffness (from 0,07g to 1,4g). Each trial consisted of 10 applications of the filament within a one-minute period. The mouse reaction to Von Frey filament was scored as percentage of withdrawal.

Immunohistochemistry

scAT sections 300 μ m thick were incubated in blocking solution (2% Normal Horse Serum and 0.2% triton X-100 in PBS) then with CGRP (rabbit, 1:350, PC205L, Sigma Aldrich, St Louis, MO) and Tyrosine Hydroxylase (sheep, 1:750, AB1542, Sigma Aldrich, St Louis, MO) antibodies at room temperature for 24 hours. Then sections were incubated overnight at 4 °C with A1594 donkey anti-rabbit (1:250, Molecular Probes A21207) and A1488 donkey anti-sheep (1:250, Molecular Probes A11015) secondary antibodies, mounted on a coverslip and imaged using a confocal laser scanning microscope (LSM780, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were processed using Fiji software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Statistical Analysis

Studies were not randomized and investigators were blinded to analyzes. All results are given as means \pm SEM. Data were analyzed using a two-way ANOVA for Von Frey tests and a one-way ANOVA for weight ratio quantifications. All statistical analyzes were performed in GraphPad Prism 5.0 software and a two-tailed P value with 95% confidence interval was acquired.

Acknowledgments

We thank C. De Vecchi for technical assistance and P. Verwaerde and G. Jourdan for insightful discussions. The authors also thank the US006/CREFRE INSERM/UPS (Anexplo-Genotoul, Toulouse, France) and specifically the zootechnical core facility for animal care.

Lise Rabiller was a fellow of the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, FDT201904008033).

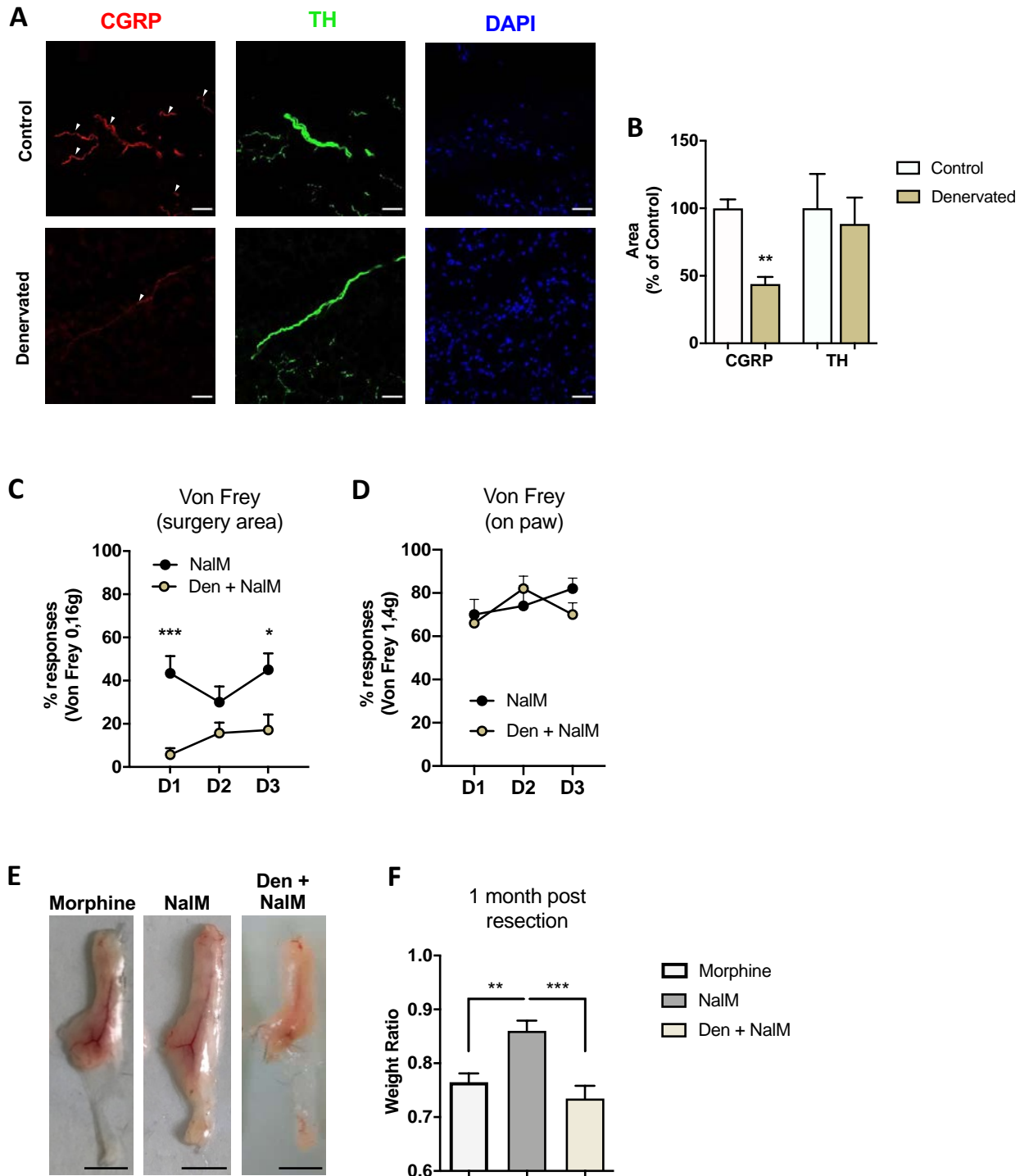
Declaration of interests

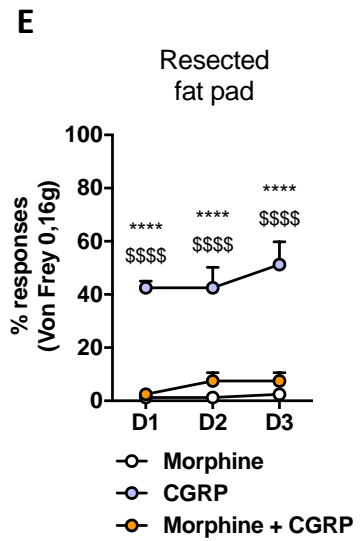
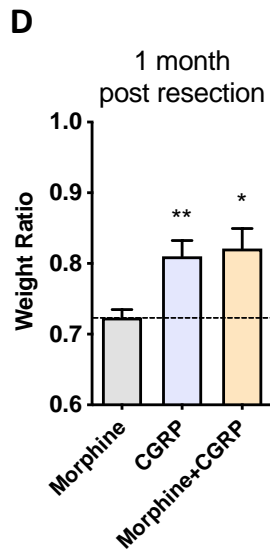
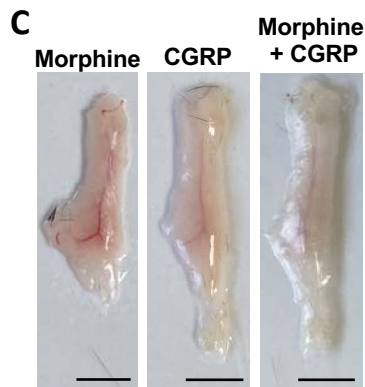
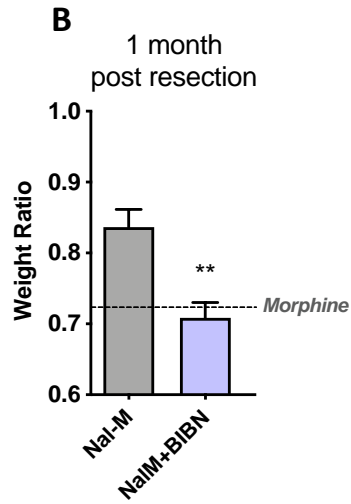
The authors declare no competing interests.

References

1. S. A. Eming, P. Martin, M. Tomic-Canic, Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Science translational medicine* **6**, 265sr6 (2014).

2. Todd, On the process of reproduction of the members of the aquatic salamander. *The Quarterly Journal of Science, Literature, and the Arts.* **16** (1823).
3. M. G. Simoes, *et al.*, Denervation impairs regeneration of amputated zebrafish fins. *BMC Dev Biol* **14**, 49 (2014).
4. G. Buckley, J. Wong, A. D. Metcalfe, M. W. Ferguson, Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds. *J Anat* **220**, 3–12 (2012).
5. A. I. Mahmoud, *et al.*, Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Developmental cell* **34**, 387–99 (2015).
6. A. I. Basbaum, D. M. Bautista, G. Scherrer, D. Julius, Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**, 267–84 (2009).
7. E. Labit, *et al.*, Opioids prevent regeneration in adult mammals through inhibition of ROS production. *Scientific reports* **8**, 12170 (2018).
8. J. Olesen, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *The New England journal of medicine* **350**, 1104–10 (2004).
9. P. G. Smith, M. Liu, Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell and tissue research* **307**, 281–91 (2002).
10. A. Lambiase, *et al.*, Capsaicin-induced corneal sensory denervation and healing impairment are reversed by NGF treatment. *Investigative ophthalmology & visual science* **53**, 8280–7 (2012).
11. F. Meda, *et al.*, Nerves Control Redox Levels in Mature Tissues Through Schwann Cells and Hedgehog Signaling. *Antioxidants & redox signaling* **24**, 299–311 (2016).
12. J. Kjartansson, C. J. Dalsgaard, Calcitonin gene-related peptide increases survival of a musculocutaneous critical flap in the rat. *European journal of pharmacology* **142**, 355–8 (1987).
13. M. Toda, *et al.*, Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. *Biomed Pharmacother* **62**, 352–9 (2008).
14. Y. Zhang, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide is a key factor in the homing of transplanted human MSCs to sites of spinal cord injury. *Scientific reports* **6**, 27724 (2016).
15. T. J. Bartness, C. H. Vaughan, C. K. Song, Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *International journal of obesity (2005)* **34 Suppl 1**, 42 (2010).





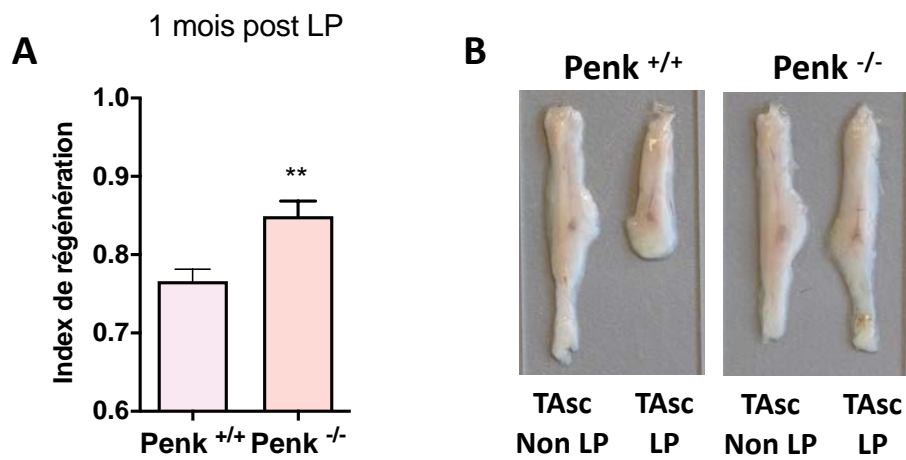


Figure 47. Les souris invalidées pour le précurseur des enképhalines (penk) régénèrent spontanément leur TAsc.

(A) Index de régénération des souris contrôles (penk^{+/+}) ou invalidées pour le gène codant pour le précurseur des enképhalines (penk^{-/-}), 1 mois après la lipectomie. (B) Photos représentatives de la régénération du TAsc de souris penk^{+/+} et penk^{-/-} 1 mois post LP. LP : lipectomie, TAsc : tissu adipeux sous cutané.

B Résultats et interprétations

1 Les souris qui régénèrent présentent une sensibilité accrue à la douleur.

Afin de déterminer s'il existe un lien entre la sensibilité nociceptive et la capacité de régénération, nous avons comparé la capacité de régénération de souris C57BL/6 à celle de souris invalidées pour le précurseur de l'enképhaline (PENK), donc présentant potentiellement une sensibilité nociceptive accrue. En parallèle, nous avons comparé la sensibilité nociceptive des souris C57BL/6 à celle des souris MRL capables de régénération spontanée. Enfin, nous avons évalué la capacité de régénération et la sensibilité nociceptive de souris invalidées pour le récepteur μ aux opioïdes et nous avons comparé la sensibilité nociceptive des souris C57BL/6 lipectomiées placées en condition de cicatrisation (Morphine) à celle des souris placées en condition de régénération.

- i Les souris invalidées pour la proenképhaline régénèrent spontanément.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Gilles Dietrich (IRSD, Toulouse), nous avons eu accès à des souris invalidées pour le précurseur des enképhalines (Penk^{-/-}) sur fond génétique C57BL/6. Un mois après lipectomie, le TAsc des souris Penk^{-/-} régénère spontanément contrairement au TAsc des souris sauvages de la même portée (Penk^{+/+}) (Figure 47). Ces résultats suggèrent qu'une quantité d'opioïdes endogènes réduite permet la mise en place de la régénération chez le mammifère adulte, aux dépens d'une cicatrisation qui serait associée à une quantité d'opioïdes endogènes élevée. Ces données viennent renforcer nos résultats précédents démontrant l'effet délétère des opioïdes endogènes sur la régénération.

- ii Les souris MRL présentent une sensibilité nociceptive accrue par rapport aux souris C57BL/6.

Nous avons comparé la sensibilité nociceptive des souris C57BL/6 à celle des souris MRL, en condition basale (c'est à dire en absence de toute lésion tissulaire). En réponse à l'application de filaments de Von Frey (1,4g), le nombre de retraits des souris MRL est significativement supérieur à celui des souris C57BL/6 (respectivement 27% et 15%, Figure 48A). Ces résultats suggèrent que les souris MRL, capables de régénération spontanée, présentent un seuil de sensibilité à la douleur moins élevé que celui des souris C57BL/6. Lorsqu'on applique un filament de taille supérieure (4g), comme attendu, le nombre de retraits augmente chez les deux souches de souris (de 15% à 39% chez la souris C57BL/6 et de 27% à 49% chez la souris MRL), en revanche, aucune différence significative n'est observée entre les deux souches de souris.

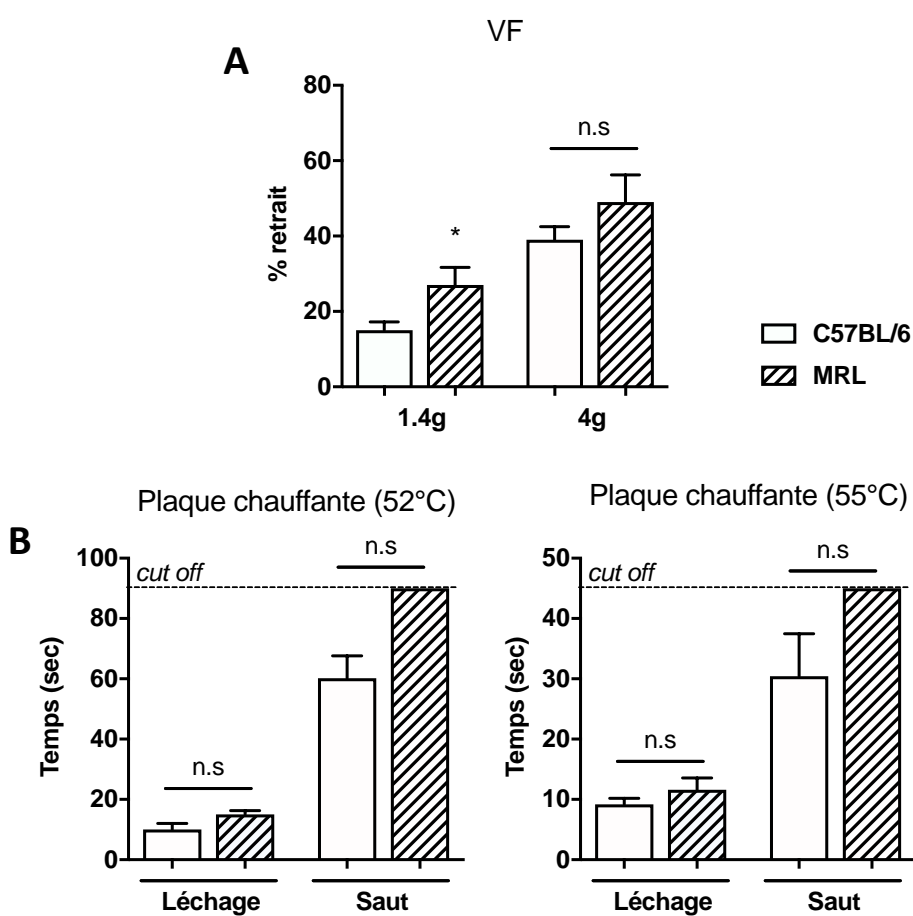


Figure 48. Évaluation de la douleur chez les souris MRL et C57BL/6 en condition basale.

(A) Quantification du retrait des souris, après 10 applications de filaments de grammage croissant (1,4g et 4g) au niveau de la patte (n=10 animaux par groupe). (B) Évaluation du temps de latence avant le premier léchage (partie gauche des histogrammes) et avant le premier saut (partie droite des histogrammes), des souris C57BL/6 ou MRL placées sur des plaques chauffantes à 52°C (histogramme de gauche) et 55°C (histogramme de droite) (n=5 animaux par groupe).

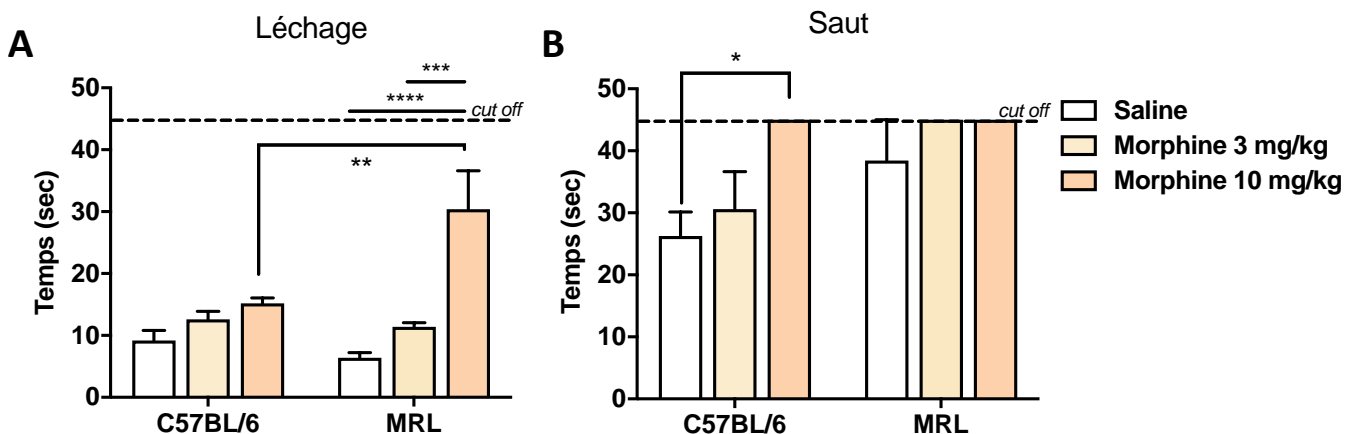


Figure 49. Évaluation de la douleur chez les souris MRL et C57BL/6 après injection intra-péritonéale de Morphine.

Mesure du temps de latence avant le premier léchage (A) et avant le premier saut (B), des souris C57BL/6 ou MRL placées sur une plaque chauffante à 55°C (n=5). Le « cut off » représente le moment auquel l'expérimentateur arrête l'expérience (ici, 45 secondes après avoir positionné la souris sur la plaque chauffante).

Dans un second temps, la sensibilité à la douleur a été évaluée par le test de la plaque chauffante. La Figure 48B montre que le temps de latence mesuré avant le premier léchage et le temps de latence mesuré avant le premier saut, ne sont pas significativement différents entre les souris C57BL/6 et MRL, et ceci pour des températures de 52°C et 55°C. Ce résultat à priori étonnant compte tenu des résultats obtenus avec le test de Von Frey, peut être expliqué par le fait que le comportement naturel de la souris MRL est peu actif^{340,341}. En effet, il a été rapporté un comportement dépressif de cette souche de souris à partir de l'âge de 8 semaines³⁴². De plus le poids de la souris MRL est largement supérieur à celui des souris C57BL/6.

Enfin, afin de compléter cette étude nous avons testé, chez ces deux souris, la sensibilité à la Morphine, qui peut refléter le tonus d'opioïdes endogènes. Pour cela, nous avons réalisé une nouvelle série d'expériences sur plaques chauffantes au cours de laquelle nous avons administré de la Morphine aux souris MRL et C57BL/6 (injection intrapéritonéale à 3 ou 10mg/kg, 30 minutes avant le test) (Figure 49). L'injection de morphine à la dose de 3mg/kg est sans effet sur le temps de latence avant le premier léchage, quelle que soit la souche souris. En revanche, comme attendu, le traitement à la Morphine à 10mg/kg, augmente significativement le temps de latence avant le premier léchage chez les deux souches de souris par rapport à la condition sans traitement (Figure 49A). A noter, que ce temps de latence est significativement supérieur chez les souris MRL par rapport aux souris C57BL/6 suggérant qu'elles ont une sensibilité à la Morphine plus élevée et donc potentiellement un tonus d'opioïdes endogènes plus faible (Figure 49A).

En revanche, si le traitement avec 10 mg/kg de morphine augmente bien le temps de latence avant le premier saut chez les souris C57BL/6, (comme cela était le cas pour le léchage) (Figure 49B), ce critère d'évaluation n'est pas adapté aux souris MRL qui présentent un temps de latence avant le premier saut, tel, que l'expérimentateur est obligé de retirer l'animal de la plaque chauffante, empêchant toute conclusion.

Les résultats obtenus avec les souris invalidées pour le gène de l'enképhaline ainsi qu'avec les souris MRL et C57BL/6, montrent que les animaux présentant un tonus opioïde endogène faible et/ou un seuil de détection des stimulations nociceptives bas, sont capables de régénérer spontanément, suggérant un lien entre la sensibilité nociceptive et la capacité de régénération.

2 Les souris C57BL/6 lipectomiées ont une sensibilité nociceptive accrue lorsqu'elles sont placées en condition de régénération.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Gilles Mithieux à Lyon (UMR1213), nous avons eu accès à des souris invalidées pour le récepteur μ aux opioïdes (souris μ KO). Dans un premier temps, nous avons

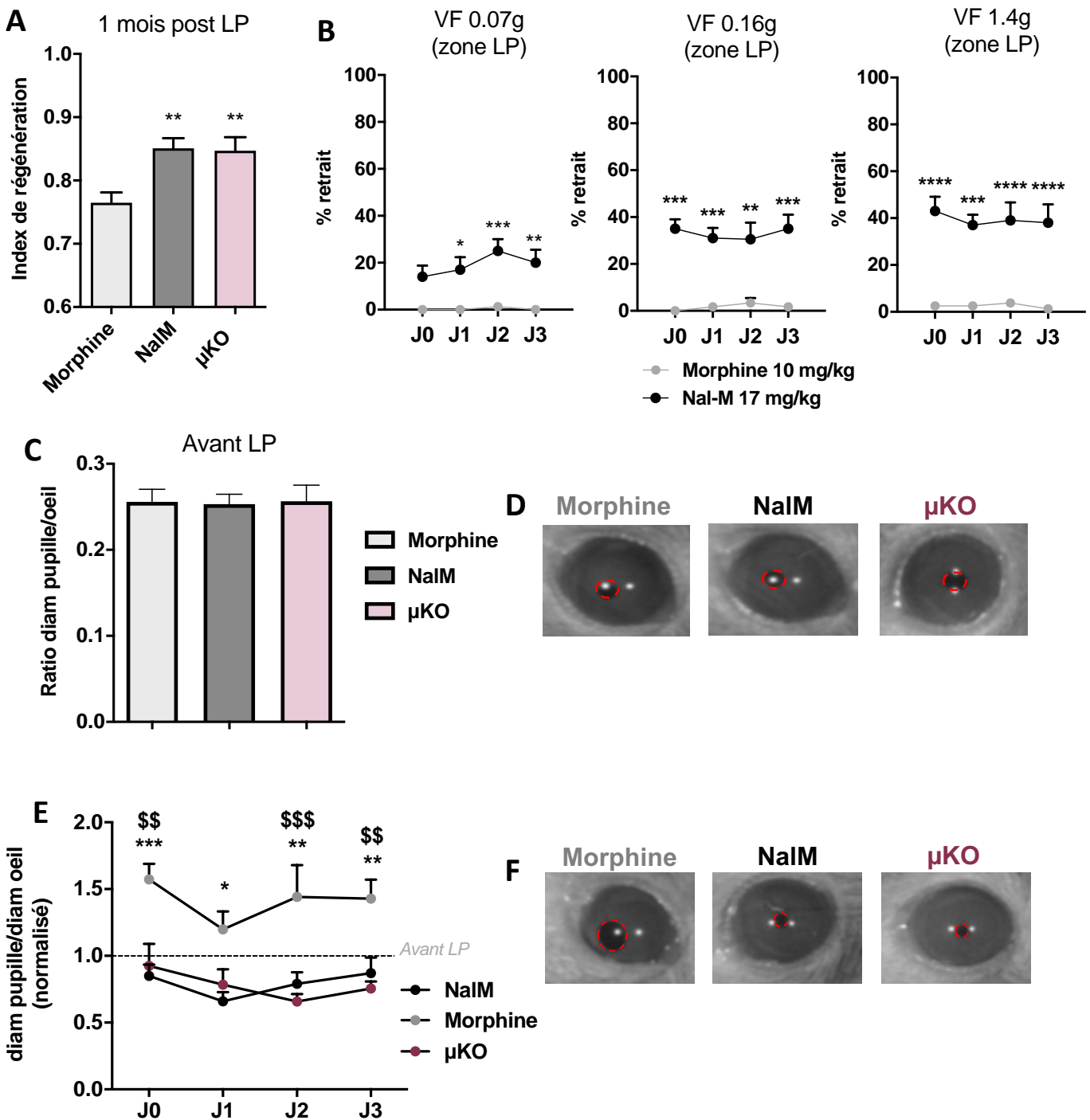


Figure 50. Évaluation de la douleur et la régénération du TAsc.

(A) Évaluation de la régénération du TAsc 1 mois post LP chez des souris C57BL/6 traitées à la Morphine, à la NalM, ou chez des souris KO pour le récepteur μ (μ KO). (B) Quantification du retrait des souris après application d'un stimulus mécanique au niveau de la zone lipectomisée à l'aide de filaments de grammage croissant (0,07g, 0,16g et 1,4g), pendant les 4 premiers jours suivant la LP. (C) Calcul du ratio des diamètres de la pupille et de l'oeil avant LP. (D) Photos en infrarouge représentatives de la taille de la pupille dans les trois groupes expérimentaux. (E) Calcul du ratio des diamètres de la pupille et de l'oeil rapporté au ratio calculé avant LP, pendant les 4 premiers jours suivant la LP. (F) Photos en infrarouge représentatives de la taille de la pupille dans les trois groupes expérimentaux. * p 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. * : NalM vs Morphine, \$: μ KO versus Morphine. LP : Lipectomie, NalM : Naloxone Méthiodide, VF : test de von Frey.

montré que ces souris étaient capables de régénérer spontanément leur TAsc 1 mois après LP, et ce, de manière similaire aux souris C57BL/6 traitées à la NalM (Figure 50A). Ces données viennent elles aussi renforcer nos résultats précédents démontrant l'effet délétère des opioïdes endogènes sur la régénération, et nous indiquent que cet effet implique vraisemblablement les récepteurs μ .

Dans un deuxième temps, afin d'évaluer s'il existe une corrélation entre la capacité à régénérer et la sensibilité douloureuse, nous avons mesuré la sensibilité nociceptive au niveau de la zone lésée, chez les souris μ KO (qui régénèrent spontanément), les souris C57BL/6 traitées à la NalM (chez lesquelles la régénération est induite pharmacologiquement) et des souris C57BL/6 traitées à la Morphine. La Morphine administrée à ces animaux, vient s'ajouter aux opioïdes endogènes produits par la souris elle-même, assurant une cicatrisation maximale et très reproductible. La NalM et la Morphine ont été injectées en sous-cutané, respectivement aux doses de 17mg/kg et 10 mg/kg. La sensibilité nociceptive a été évaluée 1 fois par jour pendant 4 jours, à l'aide de deux approches, le test de Von Frey appliqué au niveau de la chirurgie (bas du ventre droit), et la pupillométrie. Les animaux ont été sacrifiés au bout d'un mois et la régénération du TAsc a été quantifiée (Figure 50A).

Les résultats du test de Von Frey indiquent que dès le premier jour, les souris placées en condition de régénération (traitées à la NalM) souffrent significativement plus que des souris placées en condition de cicatrisation (traitées à la Morphine) et ce, avec les trois grammages de filaments utilisés (0,07g, 0,16g, puis 1,4g), (Figure 50B). A noter que le test de Von Frey n'est pas adapté pour tester la sensibilité nociceptive des souris μ KO en raison de leur hyper-sensibilité aux stimuli mécaniques et thermiques à l'état basal, en dehors de tout contexte lésionnel³⁴³.

Bien que le test de Von Frey soit classiquement utilisé, il reste peu objectif car il dépend exclusivement de la pression exercée par le manipulateur qui applique le filament sous la patte ou sur la plaie de la souris. Nous avons donc souhaité confirmer nos résultats avec une méthode alternative de mesure de la sensibilité nociceptive, la pupillométrie, que nous avons donc adaptée à la souris. La mesure, qui est non invasive, est réalisée sur souris inconscientes. Alors qu'avant la LP, la taille de la pupille est similaire entre les 3 groupes d'animaux (Figures 50C et 50D), pendant les 3 jours suivant la LP, les souris μ KO et les souris C57BL/6 traitées à la NalM présentent une pupille significativement plus petite que les souris traitées à la Morphine reflétant une sensibilité nociceptive accrue pour ces deux groupes d'animaux (Figure 50E et 50F). Ces résultats permettent de conclure que les souris dont les récepteurs aux opioïdes sont inhibés (traitées à la NalM) ou absents (μ KO) sont capables de régénérer spontanément et présentent une sensibilité nociceptive accrue.

L'ensemble des résultats présentés ici indique i) que les souris présentant un tonus opioïde endogène faible (donc potentiellement plus sensibles aux stimuli nociceptifs) sont capables de

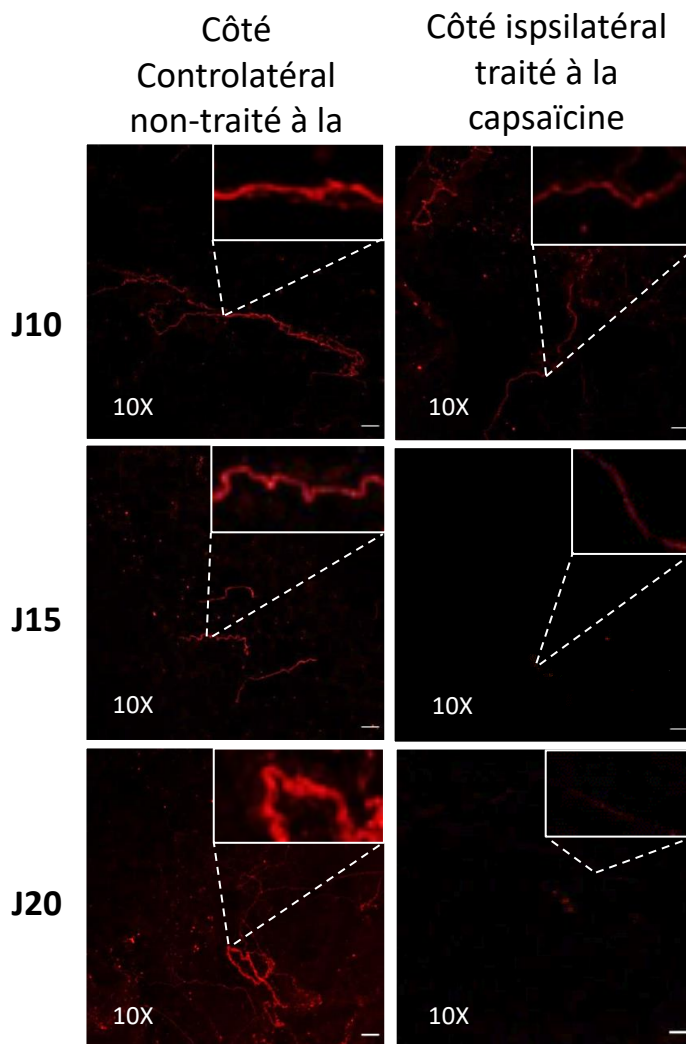


Figure 51. Dénervation sensorielle.

Immunomarquage des fibres CGRP positives (rouge) sur coupe de TAsc, 10, 15 et 20 jours après traitement ou pas à la capsaïcine. Échelle : 100 µm.

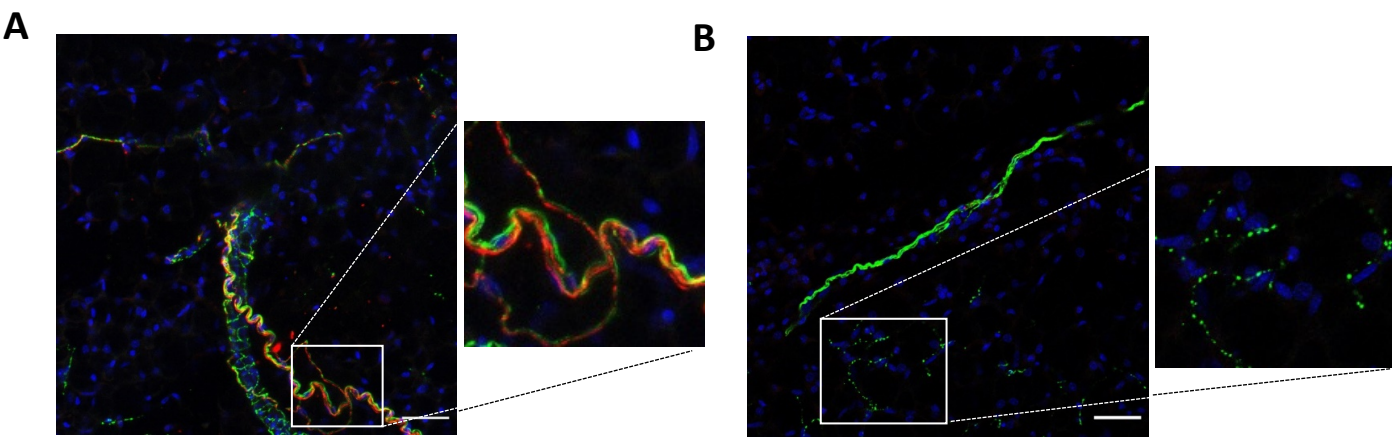


Figure 52. Dénervation sensorielle 21 jours après traitement à la capsaïcine.

Immunomarquage des fibres TH positives (en vert) et des fibres CGRP positives (en rouge), sur coupes de TAsc traités (**B**) ou pas (**A**) à la capsaïcine 21 jours auparavant. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleu (Dapi). Échelle : 100 µm.

régénération spontanée, ii) que les souris MRL capables de régénération spontanée présentent une sensibilité nociceptive accrue par rapport aux souris C57BL/6, iii) que les souris dont les récepteurs aux opioïdes sont inhibés (traitées à la NalM ou μ KO) sont capables de régénération spontanée et présentent une sensibilité nociceptive accrue.

Toute ces données suggèrent que la capacité à régénérer est associée à une sensibilité nociceptive accrue. On peut supposer que cette sensibilité nociceptive accrue après lésion, intensifie la mise en alerte de l'organisme, et amplifie ainsi la mise en place des réponses comportementales et physiologiques qui favorisent la régénération tissulaire.

3 Article 2 : Les nocicepteurs contrôlent la régénération chez la souris adulte.

La prise en charge de la douleur après une lésion est un acte essentiel, que ce soit dans le cadre de l'expérimentation animale ou après une opération chirurgicale chez des patients. Il est donc primordial de comprendre dans quelle mesure les nocicepteurs contrôlent les processus de régénération afin d'identifier des moyens de « gérer » la douleur, tout en permettant la régénération. Dans cette étude, nous avons donc cherché i) à démontrer l'implication des fibres sensorielles nociceptives dans les processus de régénération en développant un outil de dénervation spécifiques de ces dernières, ii) à déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels agissent les nocicepteurs sur les processus de régénération et iii) à proposer une solution pharmacologique qui permettrait d'induire une régénération tout en prenant en charge la douleur.

i L'innervation sensorielle est nécessaire pour permettre la régénération du TAsc.

Pour évaluer le rôle des nocicepteurs au cours des processus de régénération, nous avons développé une méthode de dénervation spécifique de ces fibres au sein du TAsc à l'aide de la capsaïcine qui permet de détruire sélectivement les fibres exprimant le canal TRPV1³⁴⁴. La mise au point du modèle de dénervation du TAsc murin selon le protocole décrit par Bartness et coll, nous a permis de définir les conditions d'injection de la capsaïcine dans le dépôt adipeux³⁴⁴. L'efficacité et la spécificité de la dénervation ont été évaluées en marquant le CGRP (pour les fibres sensorielles) et la Tyrosine Hydroxylase (TH, pour les fibres sympathiques) (Figure 52A). Alors que les fibres immuno-positives pour le CGRP sont bien visibles 10 jours après l'injection de capsaïcine, elles ont quasiment toutes disparu après 21 jours (Figure 51 et 52B). Cette dénervation est spécifique, puisqu'il reste encore des fibres sympathiques dans le TAsc (Figure 52A). Pour l'évaluation de la régénération en condition de dénervation, la LP a donc été réalisée 21 jours après le traitement à la capsaïcine.

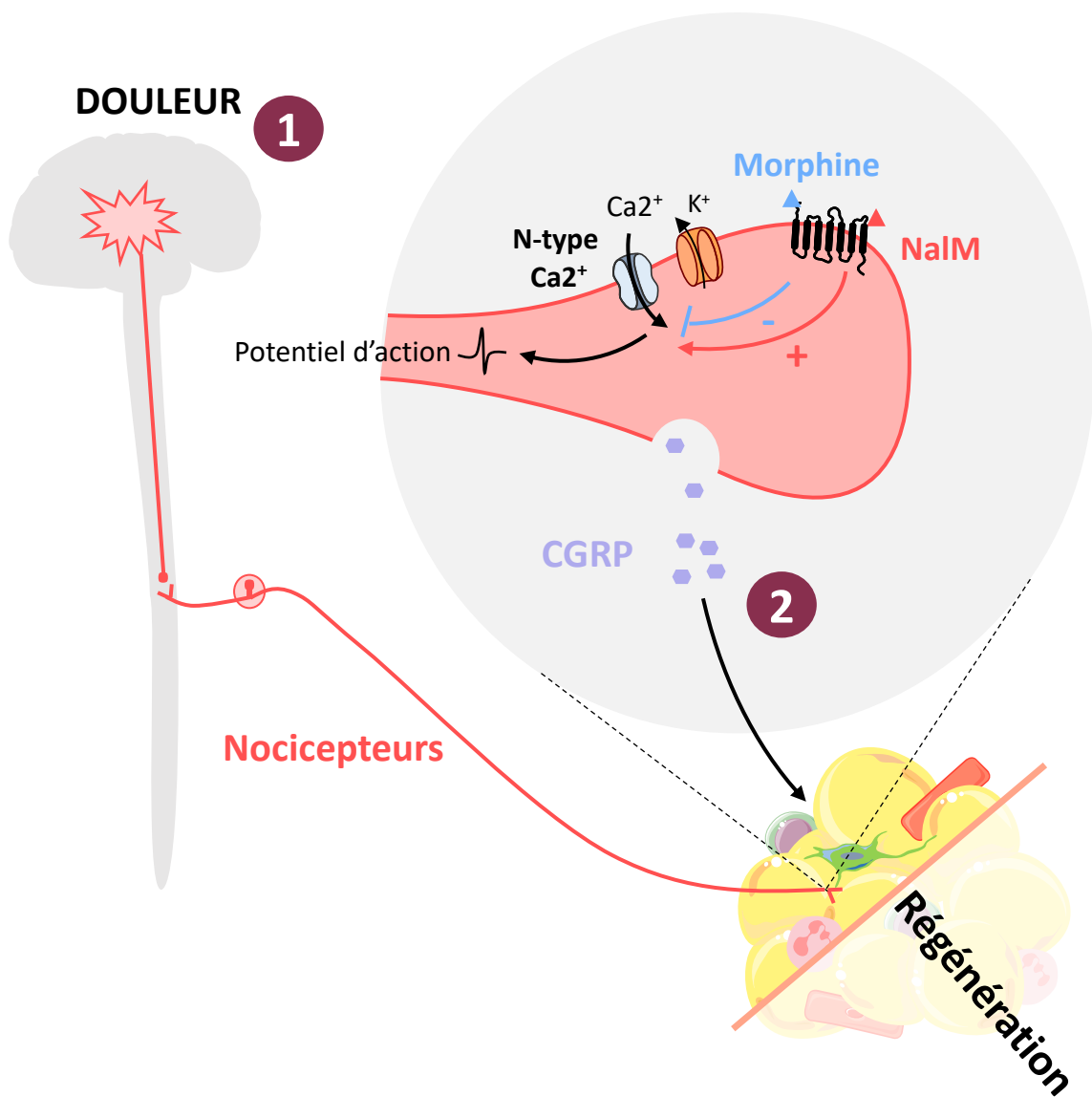


Figure 53. Résumé Graphique des résultats de l'article 2.

(1) La fixation de la NaIM sur la terminaison nerveuse du nocicepteur entraîne une perception douloureuse. (2) Le CGRP favorise la régénération du TAsc.

NaIM : Naloxone Méthiodide, TAsc : Tissu Adipeux sous cutané.

La quantification du marquage CGRP montre que le nombre de fibres sensorielles CGRP+ est significativement diminué 21 jours après le traitement à la capsaïcine (la surface occupée par ces fibres passe de 100% à $43\% \pm \text{ESM}$) (Article 2, Figure 1A et 1B), tandis que le nombre de fibres sympathiques immunopositives pour la TH n'est pas modifié, démontrant la spécificité de la dénervation (Article 2, Figure 1A et 1B).

Afin d'évaluer l'impact de la dénervation sensorielle sur la régénération, les souris préalablement dénervées ou non à l'aide de la capsaïcine, ont été lipectomiées et placées en condition de régénération (traitées à la NaIM). Dans un premier temps, la sensibilité nociceptive a été mesurée à l'aide du test de Von Frey afin de confirmer l'efficacité de la dénervation sensorielle. La diminution significative de la sensibilité nociceptive au niveau de la zone lipectomiée des souris dénervées pendant les 3 jours suivant la LP, par rapport aux souris non dénervées (Article 2, Figure 1C) et l'absence de variation de la sensibilité nociceptive au niveau de la patte (Article 2, Figure 1D) confirment la dénervation sensorielle locale et spécifique du dépôt adipeux. Dans un deuxième temps, la régénération du TAsc a été évaluée chez ces souris, un mois plus tard. Il apparaît que la destruction des nocicepteurs inhibe significativement la régénération induite par le traitement à la NaIM (Article 2, Figure 1E et 1F). Ces résultats mettent en évidence pour la première fois dans le domaine de la régénération toutes espèces confondues, que les nocicepteurs sont requis pour permettre la régénération tissulaire induite.

ii Les fibres sensorielles permettent la régénération tissulaire grâce à la sécrétion de CGRP.

Nous avons ensuite cherché à comprendre les mécanismes par lesquels les fibres sensorielles pouvaient participer à la régénération. Nous nous sommes intéressés au neuropeptide CGRP, qui est décrit dans la littérature comme étant capable d'accélérer le processus de fermeture de plaies cutanées³⁴⁵. Pour tester l'implication du CGRP dans notre modèle de régénération induite du TAsc, nous avons traité les souris à la NaIM pour les placer en condition de régénération et nous leur avons co-administré un antagoniste spécifique du récepteur au CGRP, le BIBN4096³⁴⁶. Les souris ayant reçu la NaIM et le BIBN4096 sont incapables de régénérer leur TAsc contrairement aux souris n'ayant reçu que la NaIM (Article 2, Figure 2A et 2B) indiquant que le mécanisme d'action pro-régénérant de la NaIM fait intervenir les récepteurs du CGRP. Nous avons alors montré que l'injection sous-cutanée de CGRP induit la régénération du TAsc, et ce, en absence de NaIM suggérant que le CGRP, seul, suffit à déclencher la régénération (Article 2, Figure 2C et 2D). De plus, l'évaluation de la sensibilité nociceptive sur la zone lipectomiée à l'aide du test de Von Frey, révèle que les souris traitées avec le CGRP souffrent de manière similaire aux souris traitées à la NaIM (Article 2, Figure 1C et 2E).

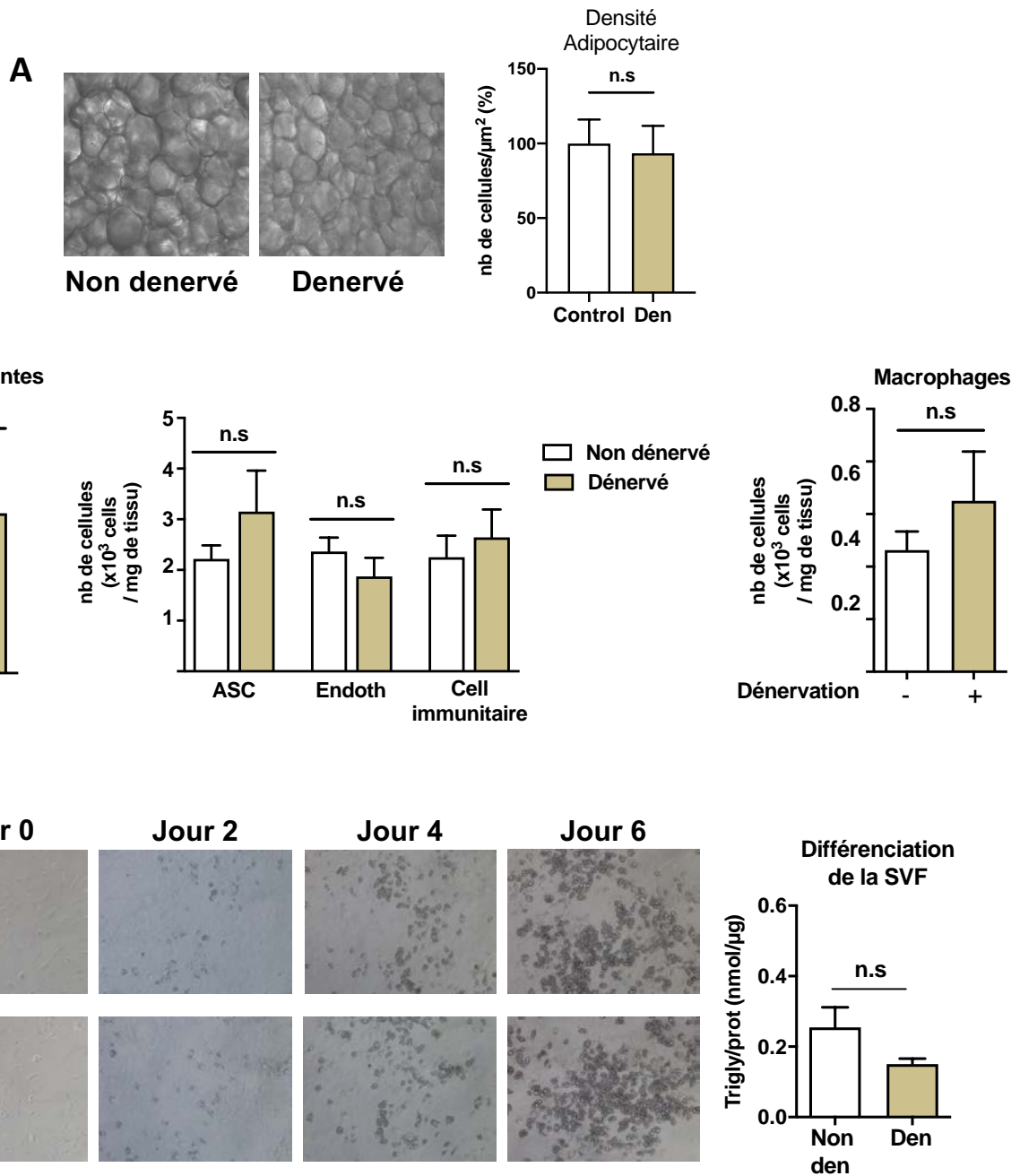


Figure 54. Effet de la capsaïcine sur la biologie du TA.

(A) Quantification de la densité des adipocytes dans le TAsc dénervé ou non 21 jours auparavant. (B) Quantification par cytométrie de flux du nombre de cellules vivantes, d'ASCs ($\text{CD31}^-/\text{CD34}^+/\text{CD45}^-$), de cellules endothéliales ($\text{CD31}^+/\text{CD34}^-/\text{CD45}^-$), de cellules immunitaires ($\text{CD31}^-/\text{CD34}^-/\text{CD45}^+$) et de macrophages, dans le TAsc 21 jours après dénervation ou non, ($n=4-5$ par groupe). (C) Evaluation in vitro de la différenciation adipocytaire à partir d'ASCs issues de TAsc dénervé ou non 21 jours auparavant ($n=3$ par groupe). ASC : Adipose Stromal Cells ; Den, Dénervé, TASC : Tissu adipeux sous cutané, SVF : Fraction stromale vasculaire.

La prise en charge de la douleur étant un acte essentiel, nous avons voulu tester si les souris pouvaient bénéficier à la fois de l'effet pro-régénérant du CGRP et de l'effet analgésique de la Morphine en co-administrant le CGRP avec de la Morphine chez les souris lipectomiées. De façon tout à fait intéressante, la co-administration de CGRP et de Morphine permet d'induire la régénération (Article 2, Figure 2C et 2D), tout en prenant en charge la douleur post-opératoire de manière efficace (Article 2, Figure 2E).

L'ensemble de ces résultats suggère que les nocicepteurs sont essentiels aux processus de régénération et qu'ils agissent probablement via la sécrétion du neuropeptide CGRP pour permettre la régénération du TAsc chez la souris adulte. Des données préliminaires (non présentées ici) montrant l'absence d'expression du gène codant pour le CGRP dans les cellules du TAsc (parmi lesquelles se trouvent de nombreuses cellules immunitaires), en condition basale comme après LP, laissent penser que ces nocicepteurs sont la seule source de CGRP.

Nos résultats montrant la nécessité des fibres nociceptives pour induire la régénération, remettent en cause l'utilisation des opioïdes (qui inactivent ces fibres) comme traitements péri-opératoires de prise en charge de la douleur. Cependant, l'identification du CGRP comme facteur pro-régénérant permet d'envisager la co-administration de CGRP et de Morphine afin d'induire une régénération tissulaire tout en permettant de prendre en charge la douleur, ce qui ouvre des perspectives très novatrices dans le domaine de la médecine réparatrice (Article 2, Résumé Graphique, Figure 53).

C Résultats complémentaires

1 La dénervation sensorielle des fibres CGRP⁺ n'impacte pas la biologie du TA.

Avant de mesurer l'effet de la dénervation sur la régénération du TAsc, nous avons vérifié que le traitement à la capsaïcine *per se* n'altérerait pas la biologie du TAsc (composition cellulaire, potentialité de différenciation des progéniteurs adipeux), ce qui aurait pu biaiser les résultats obtenus sur les animaux lipectomiés.

Dans un premier temps, nous avons quantifié la densité des adipocytes dans le TAsc de souris dénervées ou non. Il apparaît que la dénervation sensorielle n'a aucun impact sur la quantité d'adipocytes/ μm^2 entre des souris préalablement dénervées ou non (Figure 54A).

A côté des adipocytes, le TAsc renferme de nombreux autres types cellulaires tels que les progéniteurs adipocytaires (les ASCs) et les cellules immunitaires. Ces deux populations cellulaires étant décrits comme prenant activement part aux processus de régénération, nous avons évalué par cytométrie de

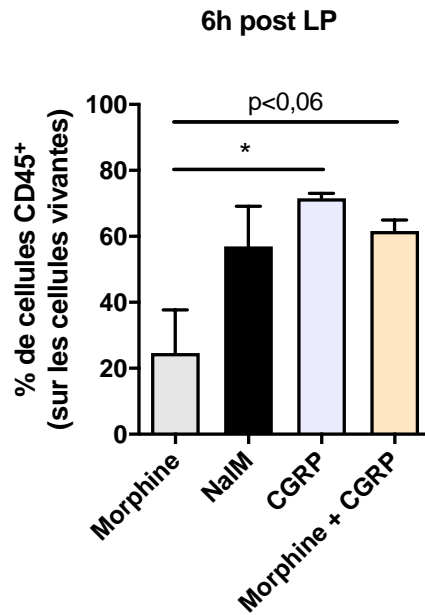


Figure 55. Effet du CGRP sur la réponse inflammatoire précoce induite par la lipectomie.

Quantification des cellules immunitaires CD45⁺ 6h post-LP, chez des souris traitées à la NalM, Morphine, CGRP ou CGRP + Morphine (n=3-5 par groupe). * $p < 0,05$. LP : Lipectomie, NalM : Naloxone Méthiodide.

flux, si ces populations étaient modifiées lors de la destruction des fibres sensorielles nociceptives. Nos résultats indiquent que le traitement à la capsaïcine n'altère pas le nombre de cellules vivantes ni les proportions des différentes populations cellulaires présentes dans le TAsc (progéniteurs, cellules endothéliales, cellules immunitaires) (Figure 54B). De plus, l'absence de différence dans le nombre de macrophages CD45⁺/F4/80⁺/CD11b⁺ (Figure 54B) suggère que la dénervation à l'aide de la capsaïcine n'induit pas d'inflammation du TAsc.

Enfin, dans un dernier temps, nous avons mesuré la capacité des ASCs à se différencier en adipocytes. Pour cela, les ASCs issues de souris préalablement dénervées ou non, ont été cultivées pendant 6 jours dans un milieu de différenciation et l'accumulation intracellulaire de triglycérides, reflet de la différenciation adipocytaire, a été quantifiée. La quantité de triglycérides n'étant pas significativement différente entre les deux conditions, il semble que la capacité de différenciation des ASCs en adipocytes n'est pas altérée par le traitement préalable à la capsaïcine (Figure 54C).

Ces trois approches complémentaires nous ont permis de vérifier que la dénervation sensorielle ne modifiait pas la biologie du TAsc. L'effet de la dénervation sensorielle sur la régénération peut donc être attribuée uniquement à l'absence des fibres nerveuses et non à une altération de la composition cellulaire du TAsc antérieure à la LP.

2 Le CGRP stimule la réponse inflammatoire post LP

Comme nous l'avons présenté dans la première partie des résultats de l'Article 1, une réponse inflammatoire rapide et intense est nécessaire pour permettre la régénération tissulaire. Le CGRP est connu pour avoir des effets vasodilatateurs et faciliter le recrutement de cellules immunitaires. Il est impliqué dans des processus de réparation tissulaire^{347,345} et participe à la régénération du TAsc chez le mammifère adulte comme le démontrent nos résultats. Afin de mieux comprendre comment le CGRP induit la régénération, nous avons cherché à déterminer si dans notre modèle, ce neuropeptide contrôlait la réponse inflammatoire. Nous avons quantifié par cytométrie en flux le nombre de cellules CD45⁺ présentes sur le front de lésion de souris traitées avec soit de la NalM (les souris régénèrent), de la Morphine (les souris cicatrisent), du CGRP (les souris régénèrent) ou du CGRP + Morphine (les souris régénèrent sans souffrir). De même qu'avec la NalM, le traitement au CGRP et la co-administration de CGRP et de Morphine induisent une augmentation (d'un facteur 2,5) du nombre de cellules CD45⁺ sur le front de lésion, comparé aux souris traitées à la Morphine (Figure 55), bien que cette augmentation ne soit significativement différente de la condition Morphine que pour le traitement au CGRP.

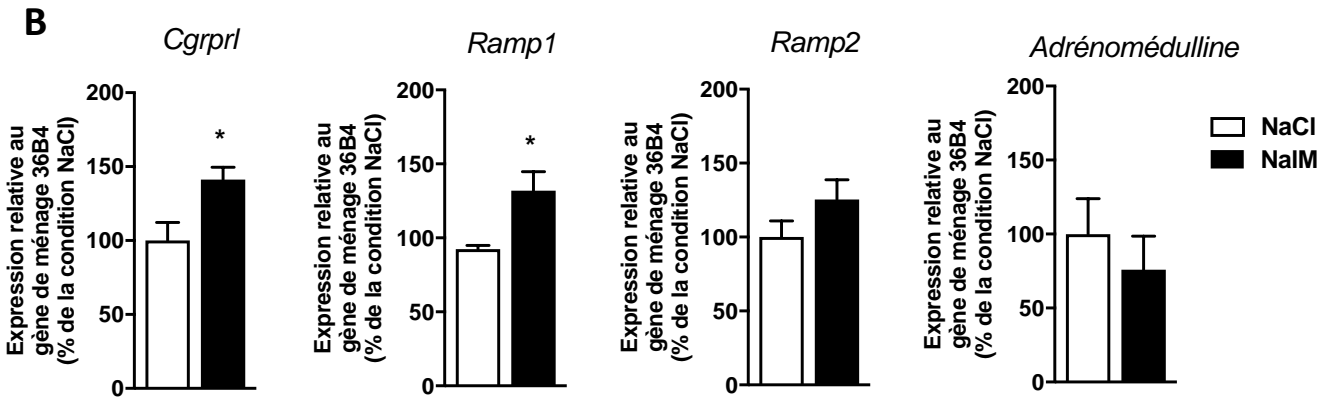
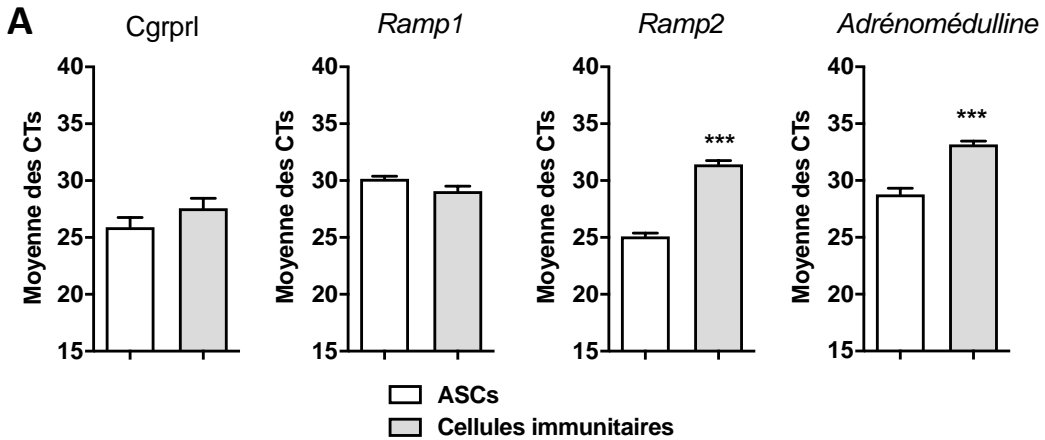


Figure 56. Niveau d'expression du récepteur au CGRP et de ses co-récepteurs dans les ASCs.

(A) Niveau d'expression (relative au gène de ménage 36B4) des gènes CGRPRL, Ramp1, Ramp2 et adrénomédulline dans les ASCs et les cellules immunitaires triées à partir de TAsc. (n=5-6 par groupe) (B) Niveau d'expression (relative au gène de ménage 36B4) des gènes CGRPRL, Ramp1, Ramp2 et adrénomédulline 24h post-LP après traitement ou pas des souris à la NaIM (n=5 animaux par groupe). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ASCs, Adipose Stromal Cells, TAsc : Tissu Adipeux sous cutané.

Compte tenu de l'ensemble de nos résultats et des données de la littérature, nous pouvons envisager que dans notre modèle de LP, le CGRP induit la régénération en stimulant la réponse inflammatoire sur le front de lésion. Il reste cependant nécessaire de reproduire ces dernières expériences et de caractériser le profil (pro- ou anti-inflammatoire) des sous-populations cellulaires CD45⁺, de même que leur cinétique d'intervention.

3 Le CGRP stimule la migration des ASCs in vitro

Alors que les effets vasodilatateurs et/ou pro-inflammatoires du CGRP sont décrits dans la littérature¹⁶², son implication dans le remodelage tissulaire est associé aux processus de régénération, n'est pas documentée. Quelques études ont mis en évidence qu'il induisait la migration de CSM in vitro³⁴⁸ et le recrutement de CSM greffées in vivo dans un modèle de lésion de moelle épinière³⁴⁹.

Le TAsc utilisé dans notre modèle expérimental, renferme une population conséquente de CSMs, les ASCs. Nous avons donc étudié si le CGRP pouvait contrôler l'activité de ces cellules.

Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si les ASCs exprimaient le récepteur (*Cgrprl* ou *Cgrp receptor like*) au CGRP ainsi que son co-récepteur (*Ramp1*). Pour ce faire, nous avons quantifié par RT-qPCR, le niveau d'expression de ces deux gènes dans des ASCs préalablement triées à partir de TAsc de souris non lipectomies. Nous avons aussi évalué l'expression de *Ramp2*, un autre co-récepteur du CGRPRL qui lorsqu'il s'y associe, forme un complexe plus afin pour la fixation d'un autre ligand, l'adrénomédulline³⁵⁰.

Sur la figure 56A, nous pouvons voir que les ASCs expriment le *Cgrp receptor like* de même que son co-récepteur *Ramp1* à des niveaux similaires à ceux retrouvés dans les cellules immunitaires (CD45⁺) triées à partir du TAsc, et qui sont considérées comme un contrôle positif. En revanche, l'expression de *Ramp2* et de l'adrénomédulline est significativement supérieure dans les ASCs (Figure 56A). Ces résultats suggèrent que le CGRP peut agir sur les ASCs. De plus, 24h après lipectomie, le niveau d'expression du *Cgrp receptor like* et de *Ramp1* est significativement augmenté au niveau du front de lésion chez les animaux placés en condition de régénération (NaIM) alors qu'aucune modification n'est observée pour *Ramp2* ni l'adrénomédulline (Figure 56B). Cette augmentation d'expression 24h après LP, du *Cgrp receptor like* et de *Ramp1* observée chez les animaux capables de régénérer, est peut-être le reflet d'une activation des cellules du front de lésion en réponse à une sécrétion accrue de CGRP déclenchée lors de la lésion.

Dans un second temps, nous avons étudié l'effet du CGRP sur la prolifération et la migration des ASCs. La prolifération des cellules a été mesurée par cytométrie de flux, en quantifiant la diminution de fluorescence du CFSE, préalablement incorporé dans les cellules en début d'expérience. Alors qu'après 2, 3 et 4 jours de culture en présence de sérum (20%) la fluorescence des ASCs diminue

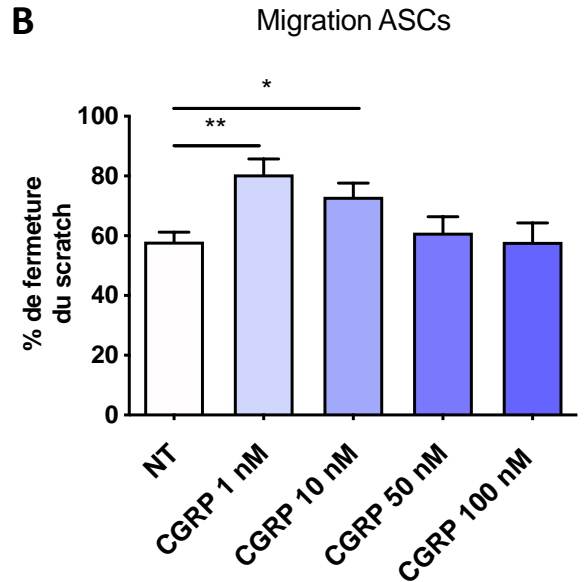
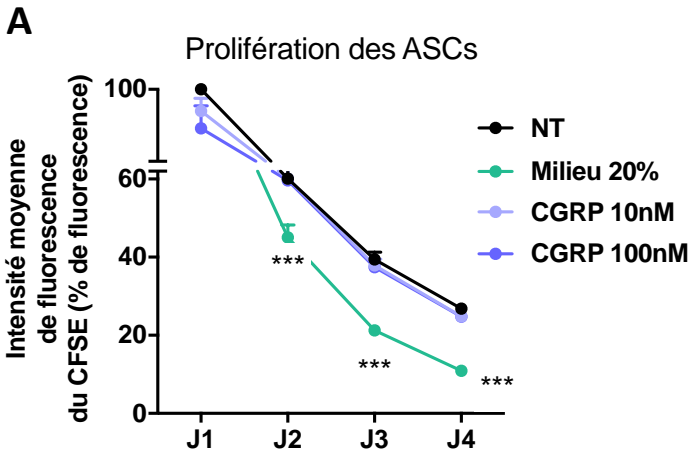


Figure 57. Effet du CGRP sur la prolifération et la migration des ASCs.

(A) Intensité moyenne de fluorescence du CFSE, après 1, 2, 3 et 4 jours de traitement des ASCs avec du CGRP à 10 ou 100 nM ou du sérum 20% (contrôle positif). (B) Quantification de la fermeture du scratch, 24h après traitement à différentes concentrations de CGRP (n=4). ASCs : Adipose Stromal Cell, CGRP : Calcitonin Gene Related Peptide, NT : cellules non traitées.

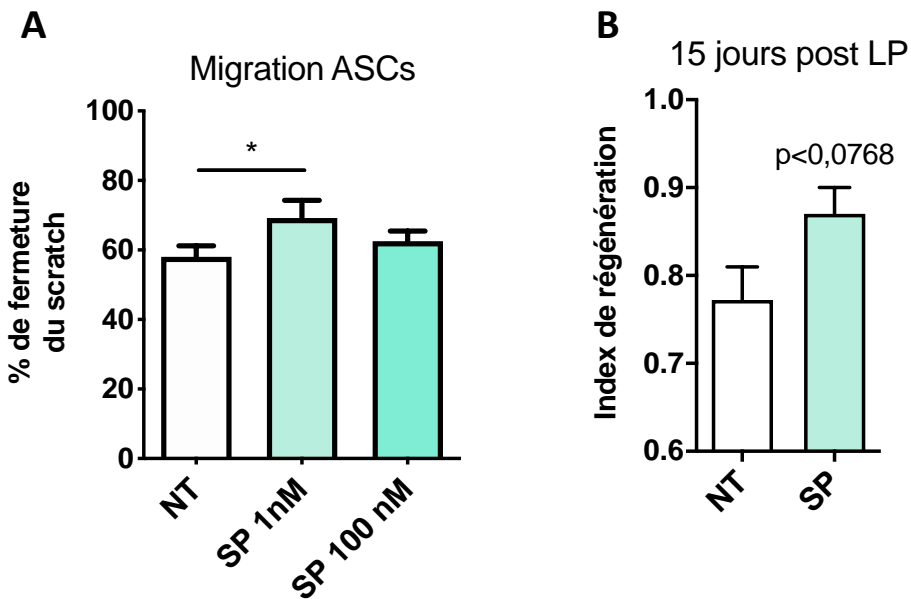


Figure 58. Effet de la substance P sur la régénération du TAsc et la migration des ASCs.

(A) Quantification de la fermeture du scratch, 24h après traitement à deux concentrations (1 et 10nM) de substance P (n=4). (B) Index de régénération du TAsc, 15 jours post-LP, chez des animaux traités ou non avec de la substance P (n=5). * $p < 0,05$. ASCs : Adipose Stromal Cell, NT : Non traité, LP : Lipectomie, TAsc : Tissu adipeux sous cutané.

significativement, celle-ci n'est pas affectée par la présence de CGRP, et ce, aux deux doses utilisées (10 et 100nM) (Figure 57A), ce qui reflète une absence d'effet du CGRP sur la prolifération des ASCs. La capacité migratoire des ASCs a été évaluée à l'aide du test de blessure (« scratch »). Il apparaît que le traitement pendant 24h avec du CGRP à 1 et 10nM accélère la fermeture de la blessure sur le tapis cellulaire (80% de l'espace généré lors du scratch est recouvert d'ASCs en présence de CGRP à 1nM *versus* 58% en condition contrôle) (Figure 57B). Le CGRP ne modifiant pas la prolifération des ASCs à 24h (Figure 57A), nous pouvons conclure que l'accélération de la fermeture de la blessure en présence de CGRP, est due à une augmentation de la migration de ces cellules.

En conclusion, nos résultats, bien que préliminaires, suggèrent que le CGRP est en mesure de moduler l'activité migratoire des ASCs.

Il reste néanmoins nécessaire de démontrer *in vivo* qu'il y a effectivement une libération locale de CGRP, augmentée en condition de régénération au moins 24h après la LP, et que ce peptide, une fois libéré, stimule la migration des ASCs vers le site de lésion (Figure 46).

4 Effet de la substance P sur la régénération

Parallèlement au CGRP, les fibres sensorielles nociceptives sécrètent aussi un autre neuropeptide, la substance P³⁰⁹. Dans un contexte de cicatrisation cutanée, la substance P joue un rôle bénéfique en accélérant la fermeture de la plaie¹⁶⁵. Afin de déterminer si, comme le CGRP, ce neuropeptide peut jouer un rôle au cours des processus de régénération tissulaire, nous avons réalisé deux expériences préliminaires. Tout d'abord, nous avons testé *in vitro* l'effet de la substance P sur la migration des ASCs. La figure 58A montre que la substance P à la concentration de 1nM accélère la fermeture de la blessure faite sur le tapis cellulaire, suggérant une stimulation de la migration des ASCs. Comme pour le CGRP, une concentration supérieure (100nM) est sans effet. Nous avons ensuite évalué l'effet d'un traitement à la substance P sur la régénération du TAsc après LP. Malgré une tendance à l'augmentation, 15 jours après la lésion, l'index de régénération n'est pas significativement différent entre le groupe de souris traitées à la substance P et le groupe contrôle, (Figure 58B). Il est bien entendu nécessaire de reproduire ces expériences et d'évaluer la régénération après un mois de traitement.

5 Importance des voies nociceptives ascendantes ?

Comme expliqué dans le chapitre 2 de l'introduction, le nocicepteur est un neurone bipolaire, qui en réponse à son activation, libère des neurotransmetteurs en périphérie (dans le tissu innervé) mais aussi au niveau central (dans la moelle épinière). Si après avoir démontré l'implication des nocicepteurs dans les processus de régénération, nous nous sommes intéressés à leur effet

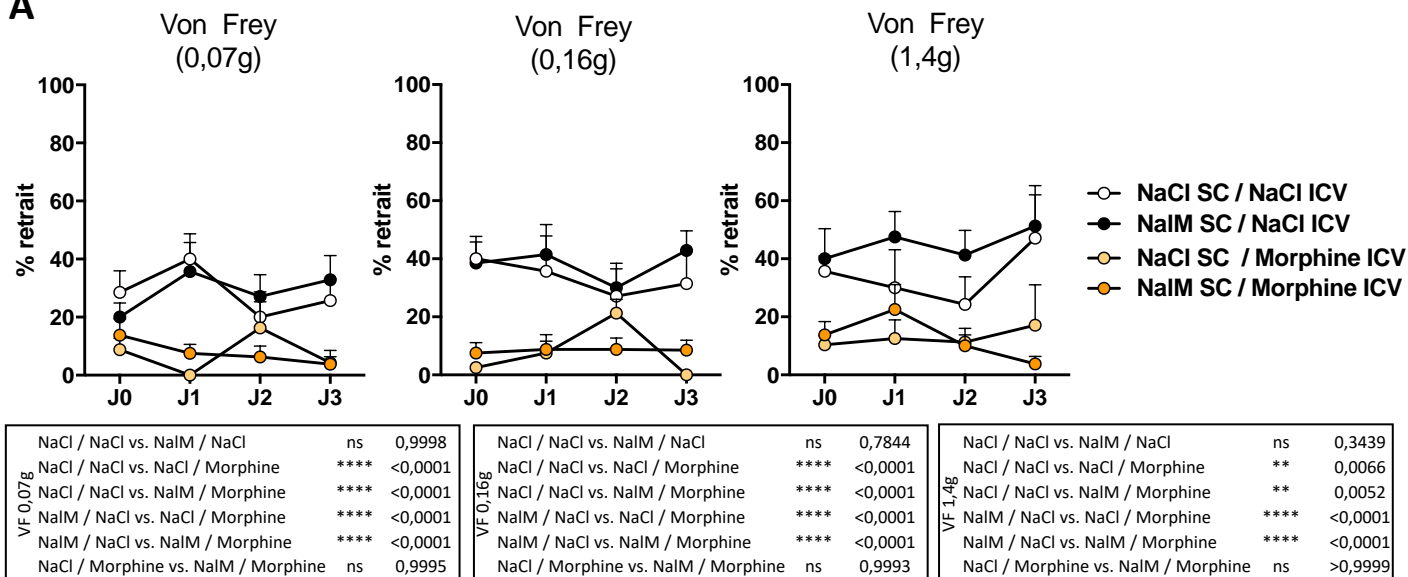
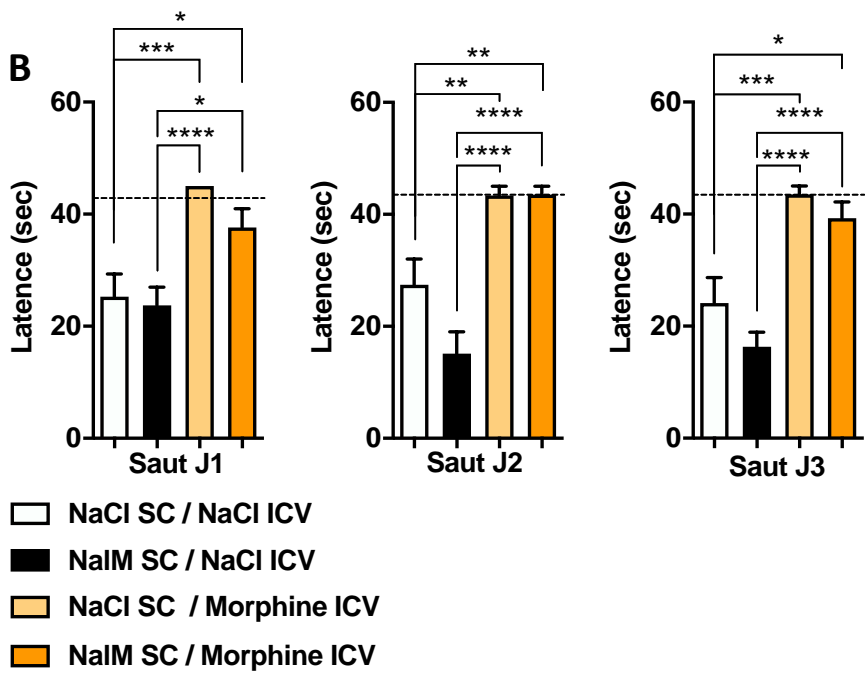
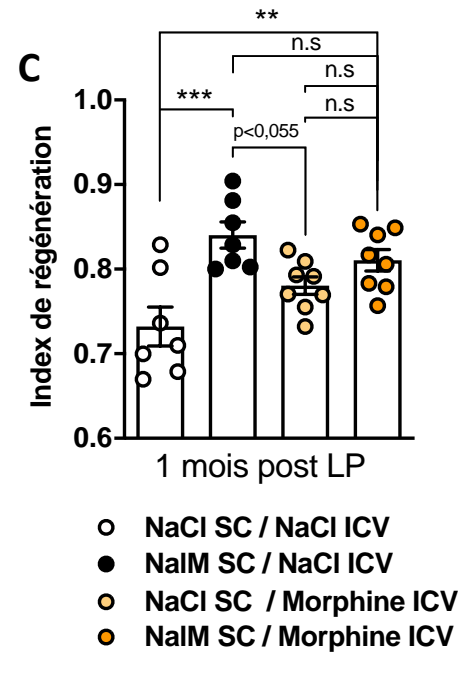
A**B****C**

Figure 59. Implication des voies nociceptives ascendantes au cours des processus de régénération ?

(A) Quantification du retrait des souris après application d'un stimulus mécanique au niveau de la zone lipectomisée, à l'aide de filaments de grammage croissant (0,07g, 0,16g et 1,4g) chez des souris traitées avec du NaCl ou de la NaIM en sous-cutané (SC), et avec du NaCl ou de la Morphine en intracérébroventriculaire (ICV). Les statistiques des résultats obtenus pour chacun des filaments du test von Frey (ANOVA) sont indiqués dans les tableaux. (B) Évaluation du temps de latence avant le premier saut chez des souris traitées avec du NaCl ou de la NaIM en sous-cutané (SC), et avec du NaCl ou de la Morphine en intracérébroventriculaire (ICV), et placées sur une plaque à 55°C. (C) Évaluation de la régénération du Tasc, 1 mois post-LP, chez des souris traitées avec du NaCl ou de la NaIM en sous-cutané (SC), et avec du NaCl ou de la Morphine en intracérébroventriculaire (ICV). (n=7-8 animaux par groupe). * p 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. ICV : Intracérébroventriculaire, LP : Lipectomie, NaIM : Naloxone Méthiodide, SC : Sous-cutané, VF : Von Frey.

périphérique (notamment à l'effet du CGRP dans le tissu), nous avons aussi cherché à savoir si dans notre modèle, les voies nociceptives ascendantes, activées par les nocicepteurs au niveau médullaire, jouaient elles aussi, un rôle dans les processus de régénération. Pour aborder cette question, nous nous sommes basés sur la capacité du SNC à moduler la transmission des messages nociceptifs ascendants. En effet, l'activation de voies descendantes inhibitrices module la transmission synaptique entre les nocicepteurs et les neurones de second ordre qui se trouvent dans la moelle épinière. Ces voies descendantes sont sous le contrôle des opiacés à tous les niveaux^{92,94,351}.

Nous avons donc activé les voies descendantes inhibitrices par injection intracérébroventriculaire (icv) de morphine et évalué les conséquences de ce traitement sur la capacité du TAsc à régénérer après LP.

Comme attendu, les tests de Von Frey (appliqué sur la zone lésée) et de la plaque chauffante, révèlent que l'injection icv de morphine diminue la sensibilité nociceptive des animaux par rapport au traitement contrôle (NaCl injecté en icv) (Figures 59A et 59B), et ceci que les animaux soient placés en condition de cicatrisation ou de régénération (NaCl ou NalM injectés en sc).

L'évaluation de l'index de régénération indique que la capacité de régénération induite chez les souris traitées à la NalM n'est pas affectée par l'injection icv de morphine. Ces résultats suggèrent que les voies nociceptives ascendantes ne sont pas impliquées dans la régénération du TAsc. Néanmoins, ces résultats doivent être pris avec précaution puisque dans cette expérience, les animaux traités uniquement avec de la morphine en icv présentent un index de régénération élevé (0.78 ± 0.010), supérieur à celui obtenu dans les expériences précédentes (Figure 50, [Article 2](#) Figures 1 et 2).

En conclusion, bien que préliminaires, l'ensemble des résultats présentés dans cette partie III.3. montre que i) le mécanisme d'action pro-régénérant de la NalM fait intervenir les récepteurs du CGRP, ii) l'effet pro-régénérant du CGRP passe probablement par une stimulation de la réponse inflammatoire et de la migration des ASCs, iii) la substance P pourrait agir en parallèle du CGRP pour favoriser les processus de régénération, et que iv) les voies nociceptives ascendantes ne sont peut-être pas nécessaires à la régénération.

Finally, to illustrate the results thus obtained (Article 1, 2 and complementary results) in my thesis, I propose the summary graphic below (Figure 60). In addition to summarizing all the necessary steps for the establishment of TAsc regeneration, the latter clearly illustrates the collaboration and the importance of the two systems that are the SI and the SN, after inhibition of the opioid signaling by the NalM.

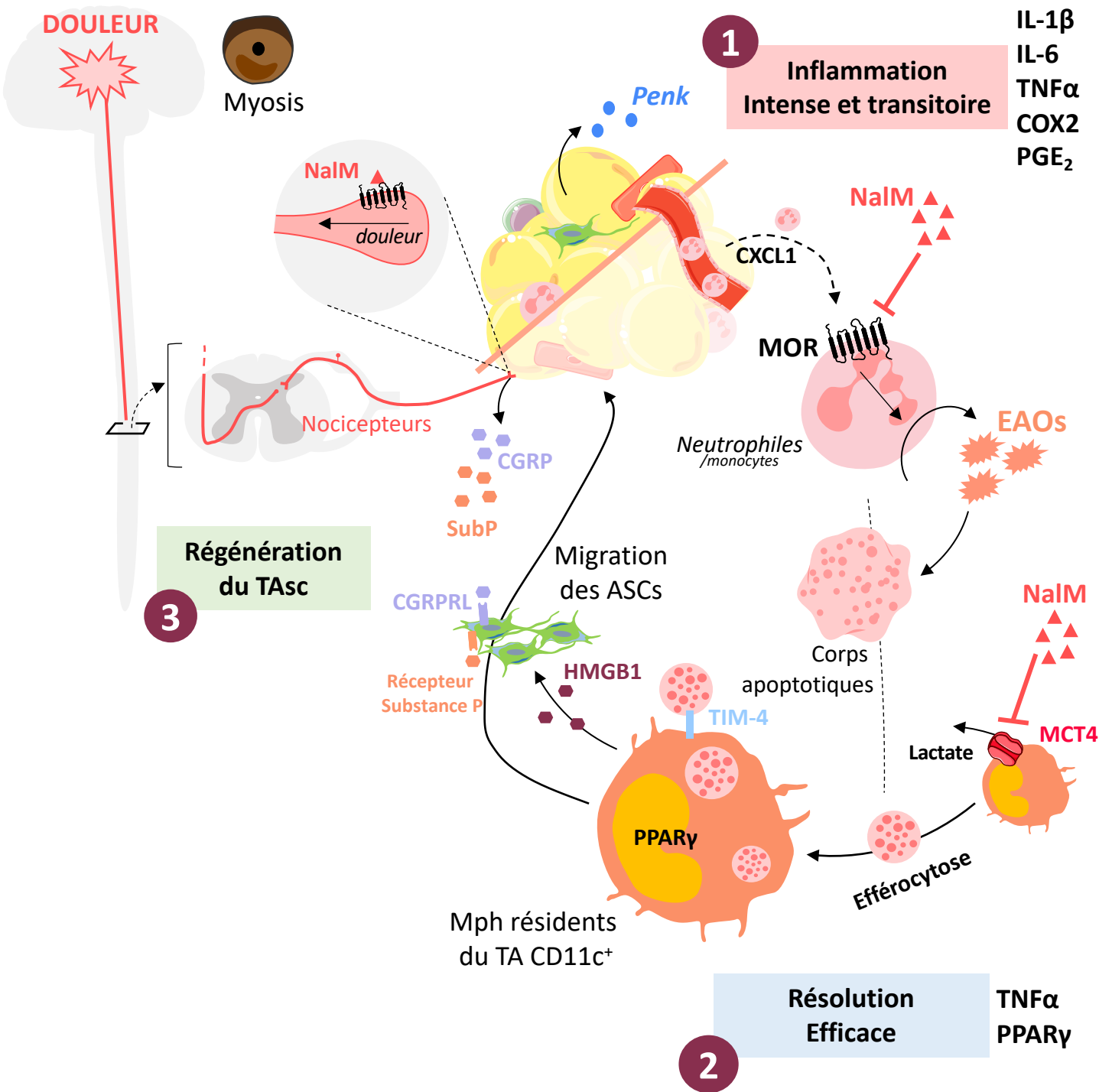


Figure 60. Résumé graphique des résultats de thèse.

Suite à une lésion massive du TAsc et un traitement à la NalM se met en place une inflammation intense et transitoire, suivie d'une résolution efficace de l'inflammation puis d'une régénération du TAsc. (1) Profil d'expression génique des acteurs cellulaires (IL-1 β , IL-6, TNF α , COX2, PGE₂, CXCL1) et recrutement massif de neutrophiles producteurs d'EAOs. (2) Macrophages CD11c⁺ efférocytiques dérivés de l'hématopoïèse endogène du TA, exprimant PPAR γ . (3) Libération d'HMGB1 par les macrophages dérivés de l'hématopoïèse du TA et sécrétion périphérique de neuropeptides (Substance P et CGRP) par les nocicepteurs. Par ailleurs, la LP associé au traitement à la NalM active les nocicepteurs, et seront à l'origine d'une perception douloureuse associée.

NalM : Naloxone Méthiodide, Mph : Macrophages, MOR : Mu Opioid Receptor.

Discussion

Dans la partie introductive, nous avons évoqué la nécessité de mieux comprendre les mécanismes de contrôle des processus de régénération chez le mammifère afin d'identifier des éléments profitables pour la médecine régénérative.

En effet, si de nombreuses données relatives aux processus de régénération sont accessibles chez les invertébrés et les vertébrés non mammaliens, très peu d'études sont menées sur le mammifère ; les souches de souris et de rats couramment utilisées en laboratoire étant incapables de régénérer leurs organes spontanément à l'exception de l'extrémité de leurs doigts. Il existe d'autres modèles mammifères dotés de certaines capacités de régénération (MRL, *Acomys*, souris au stade néonatal), mais comme nous l'avons évoqué en introduction, ceux-ci présentent des particularités notamment au niveau de leur système immunitaire, ce qui nous oblige à mesurer les conclusions tirées des expériences réalisées chez ces animaux.

Pour répondre à ce besoin de modèle mammifère commun de régénération, nous avons développé un modèle de lésion du TAsc chez la souris C57BL/6 adulte, chez laquelle nous sommes capables d'induire une régénération à l'aide d'un traitement pharmacologique (antagoniste des récepteurs aux opioïdes). Ce modèle permet une analyse comparative des processus de cicatrisation et de régénération dans une même souche de souris, et donc d'identifier le/les mécanisme(s) responsable(s) de l'orientation vers l'une des deux issues de la réparation tissulaire. Ainsi, à l'aide de ce modèle, nous avons caractérisé d'une part, les phases critiques de la réponse inflammatoire et d'autre part, des acteurs cellulaires et moléculaires nerveux qui contrôlent la régénération.

I Importance de la réponse inflammatoire au cours des processus de régénération

Nous avons comparé les événements précoces de la réponse inflammatoire au cours des processus de cicatrisation et de régénération qui font majoritairement intervenir les acteurs du système immunitaire inné.

Nos résultats montrent qu'au cours de la régénération, un recrutement massif et transitoire de neutrophiles producteurs d'EAOs se met en place et que ces derniers sont rapidement éliminés du site de lésion par un phénomène d'efférocytose assuré par les macrophages résidents CD11c⁺, dérivants de l'hématopoïèse endogène du TA.

Dans un premier temps, nous avons montré que la cinétique d'inflammation diffère drastiquement entre les deux processus de réparation. En effet, la régénération requiert une inflammation intense et transitoire caractérisée notamment par la sur-expression de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 ou TNF α), la production d'une quantité massive d'EOs, et la sécrétion de médiateurs lipidiques de la famille des prostaglandines. Ces résultats sont en cohérence avec les travaux montrant que le l'IL-6 et le TNF α favorisent la réparation foie chez le mammifère et la régénération de la queue chez la larve de poisson zèbre^{352,353}, ainsi qu'avec des travaux récents montrant que la régénération de la moelle épinière chez le poisson zèbre repose notamment sur une production de TNF α par les macrophages et d'IL-1 β à la fois par les macrophages et les neutrophiles²³⁶. Concernant la production très importante d'EOs, nous avons identifié les neutrophiles comme en étant la source principale. Si des données issues des différents modèles de régénération spontanée ont montré la nécessité de cette production pour la régénération^{77,140,223,229}, aucune de ces études n'avait identifié la source cellulaire de ces EOs. Les données qui se rapprochent le plus de nos résultats sont celles de Yang et coll., qui montre une production importante d'EOs par les neutrophiles dans le cadre de la réparation hépatique (lors de l'hyperplasie compensatoire des lobes de ce dernier)²²⁵. Le fait que cette production d'EOs soit inhibée par un effet direct des opioïdes sur les neutrophiles via les récepteurs μ , est concordant avec les études montrant, chez le rat, que les neutrophiles possèdent ces récepteurs et que leur activation inhibe la réponse inflammatoire³⁵⁴. Dans notre modèle, cette production massive d'EOs a lieu dans les premières heures suivant la lésion alors que chez la souris *Acomys*, elle n'a lieu que 24 heures après la perforation de l'oreille⁷⁹. Néanmoins, les auteurs n'ayant pas évalué la production d'EOs à des temps plus précoces, nous ne pouvons pas exclure qu'un pic de production d'EOs puisse exister en amont de celui décrit par Simkin et coll.

Au regard des conséquences possibles d'une telle production d'EOs sur les lipides membranaires, l'ADN ou encore les protéines, on peut penser que cette production massive post-lésionnelle d'espèces radicalaires puisse être délétère pour les cellules environnantes et notamment les progéniteurs du TA (les neutrophiles eux-mêmes meurent suite à cette production). Cependant, un article récemment publié dans la revue *Nature*, montre néanmoins que les populations fibroblastiques sont parmi les types cellulaires les plus résistants aux EOs en condition de lésion tissulaire³⁵⁵. Ainsi, les fibroblastes de la souris *Acomys* résistent très bien aux EOs produits après la lésion, quand ceux de la souris, du rat et du lapin y sont sensibles. Les ASCs peuvent être considérées comme des cellules fibroblastiques, dès lors qu'elles servent de soutien au TA. Il est donc tout à fait possible d'imaginer que les ASCs soient suffisamment équipées pour résister à cette vague d'oxydation, et soient mobilisées plus tard pour participer à la reconstruction du tissulaire.

Nous avons également mis en évidence qu'au cours des processus de régénération, la production de PGE₂ (pro-inflammatoire) augmente significativement au cours du temps tandis que celle de PGD₂ (anti-inflammatoire) diminue, suggérant que la PGE₂ constitue un médiateur lipidique pro-régénérant. Ceci est en accord avec les travaux de Zhang et coll. qui montrent que l'inhibition de l'enzyme de dégradation de la PGE₂, la 15-PGDH favorise la réparation du foie et du colon²³⁷. Une autre étude publiée cette année, montre qu'une augmentation de l'activité de la COX2 et de son métabolite, la PGE₂, est nécessaire à la régénération cardiaque chez le poisson zèbre, l'inhibition pharmacologique de la COX2 inhibant la prolifération des cardiomyocytes²⁹.

L'implication des macrophages au cours des processus de régénération a été largement démontrée, que ce soit après une lésion cardiaque chez le poisson zèbre, une amputation du membre chez la salamandre, ou une lésion de l'oreille chez la souris *Acomys*, leur élimination dans tous ces modèles inhibant la régénération^{79,232,233}. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires relatifs à leur implication dans les processus de régénération restent peu documentés et donc mal compris. Nous avons donc cherché à identifier le mécanisme d'action des macrophages au cours de la régénération. Tout d'abord, il est intéressant de noter que nous n'observons pas de différence dans le nombre de macrophages entre la condition de cicatrisation et de régénération. Ces résultats sont cohérents avec la littérature qui révèle i) qu'un traitement avec MCP1 (chimiokine qui permet le recrutement de monocytes/macrophages) n'accélère pas la régénération de l'extrémité du doigt après section chez la souris²²⁹ et ii) que le nombre total de macrophages présents au niveau de l'oreille, aux alentours de la lésion suite à une lésion de l'oreille est équivalent entre la souris Swiss et la « souris » *Acomys*⁷⁹. Dans cette dernière étude, les auteurs suggèrent que la répartition géographique de sous-populations de macrophages constitue également un facteur déterminant. Chez la souris Swiss, les macrophages pro-inflammatoires CD86⁺, et -inflammatoires CD206⁺, sont ainsi présents de manière homogène dans la zone lésée. En revanche, chez la « souris » *Acomys*, ces deux sous-populations ne co-localisent pas et délimitent des régions avec un « environnement inflammatoire » différent. Ces résultats corroborent des observations faites au laboratoire et non montrées dans ce manuscrit où les cellules CD45⁺ sont regroupées sur les bords du front de lésion chez les souris C57BL/6 traitées à la NaIM alors qu'elles sont distribuées de façon homogène dans l'ensemble du TAsc restant dans les 72h suivant la LP chez les souris C57BL/6 non traitées. Ces résultats restent néanmoins i) à confirmer, ii) à affiner en utilisant un marquage permettant d'identifier des sous-populations de macrophages et iii) à quantifier dans les zones proches ou éloignées de la lésion. En conclusion, la localisation et/ou l'état d'activation des macrophages semblent davantage déterminants que la quantité totale de macrophages dans l'orientation de l'issue de la réparation tissulaire vers une cicatrisation ou une régénération²²⁹.

Au cours de la réparation tissulaire, les macrophages assurent l'efférocytose, une étape fondamentale de la réponse inflammatoire permettant de faire la transition entre la phase pro-inflammatoire et la résolution de l'inflammation^{214,225,356}. Dans notre modèle, les neutrophiles ne sont pas suffisamment éliminés et s'accumulent sur le site de lésion en condition de cicatrisation. Ces résultats suggèrent qu'une efférocytose efficace est un pré-requis indiscutable pour permettre la régénération. Une seule étude, menée sur le foie et publiée en 2019, fait aussi état de l'importance de l'efférocytose dans les processus de réparation tissulaire²²⁵. Par rapport à cette étude, nous allons un peu plus loin en proposant TIM-4 comme acteur moléculaire indispensable à cette efférocytose au cours de la régénération.

Nous avons montré que 24h après la LP, les macrophages présents sur le front de lésion sont majoritairement CD11c⁺ et que leur élimination à l'aide de souris CD11cDTR, conduisait à une augmentation du nombre de neutrophiles sur le front de lésion et à une inhibition de la régénération. Ces résultats suggèrent qu'au cours de la régénération, les macrophages CD11c⁺ assurent l'élimination des corps apoptotiques des neutrophiles. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui rapporte que cette population de macrophages CD11c⁺ joue un rôle prépondérant dans l'élimination des débris cellulaires au sein du TA dans un contexte de maladie métabolique³⁵⁷. Notre étude décrit donc une autre fonction de cette sous-population de macrophages qui est d'assurer une efférocytose efficace indispensable à la régénération tissulaire.

Des résultats obtenus précédemment par le laboratoire STROMALab ont montré qu'il existe une hématopoïèse endogène dans le TA et que les cellules immunitaires issues de celle-ci assuraient un rôle différent des cellules issues de l'hématopoïèse médullaire classique en améliorant notamment le remodelage cardiaque suite à un infarctus^{320,330,331}. En nous basant sur ces données, nous avons comparé l'implication des macrophages dans la régénération en fonction de leur origine tissulaire et nous avons montré que contrairement aux macrophages issus de l'hématopoïèse médullaire, les macrophages résidents provenant de l'hématopoïèse du TA sont pro-régénérants, notamment via leur activité d'efférocytose plus efficace.

Ces résultats sont en accord avec les travaux indiquant que des sous-populations de macrophages d'origines différentes sont impliquées différenciellement dans la réparation tissulaire^{358,359}.

Afin d'évaluer si l'efférocytose observée en condition de régénération peut être associée/corrélée à un switch métabolique, nous avons mesuré le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans le métabolisme glycolytique et oxydatif. Les résultats obtenus suggèrent une transition vers un métabolisme oxydatif dans les 3 jours qui suivent la lésion chez les animaux qui régénèrent. Ces résultats sont cohérents avec la littérature indiquant que la transition phénotypique des macrophages

d'un phénotype pro-inflammatoires vers un phénotype anti-inflammatoire est associé à un switch métabolique, de glycolytique à oxydatif^{218,360}. Cependant, nos mesures d'expression génique ont été réalisées sur les fronts de lésion, sans tri préalable des différentes populations cellulaires. Il est donc nécessaire de reproduire ces expériences sur des macrophages triés et d'explorer des temps plus tardifs pour voir si cette transition métabolique n'est pas « simplement » retardée chez les animaux qui ne régénèrent pas.

Nous avons aussi identifié PPAR γ et HMGB1 comme étant des facteurs clefs des processus de régénération. En effet, nous avons montré que la régénération était inhibée (malgré un traitement à la NaIM) lorsque PPAR γ était spécifiquement invalidé dans les macrophages issus de l'hématopoïèse du TA. Ces résultats sont cohérents avec la littérature abondante décrivant l'implication de PPAR γ dans la résolution de l'inflammation, or nous avons montré que cette étape était requise pour permettre la régénération¹⁹⁷. Il est ainsi décrit que PPAR γ stimule la sécrétion d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, par les macrophages lors de la résolution de l'inflammation¹⁹⁷ et stimule l'efférocytose de corps apoptotiques par les macrophages *in vitro*^{361,362}. L'utilisation de siRNA dirigé contre PPAR γ inhibe l'efférocytose par les macrophages et l'expression génique de protéines anti-inflammatoires associées parmi lesquelles le CD36, IL-10 et le TGF β ^{361,362}. Puisque PPAR γ est essentiel pour la régénération du TAsc et qu'il est également connu pour être indispensable pour la résolution de l'inflammation, nous pourrions imaginer, dans notre modèle, que PPAR γ soit requis pour l'efférocytose nécessaire à la résolution de l'inflammation lors de la régénération du TAsc. Ainsi, il serait intéressant i) de mesurer l'impact, sur l'élimination des neutrophiles, de la déplétion de PPAR γ dans les macrophages et ii) de définir la cible moléculaire de PPAR γ . Nous pourrions proposer en faisant un parallèle avec la littérature rapportant que PPAR γ permet l'induction de CD36 (un récepteur scavenger permettant la reconnaissance des corps apoptotiques par les macrophages) que PPAR γ induise une augmentation de l'expression et/ou l'adressage à la membrane de TIM-4, récepteur requis pour la clairance des neutrophiles et la régénération, comme nous l'avons montré dans l'Article 1.

Nous avons également montré que l'expression d'HMGB1 augmente en condition de régénération 24 heures post LP et que sa forme réduite favorise la migration des ASCs *in vitro*. Nos résultats sont en accord avec ceux de Shiraldi et coll. qui montrent qu'HMGB1 est nécessaire à la régénération musculaire notamment via un effet stimulateur sur la migration de cellules de type fibroblastique²⁰⁵. Il serait intéressant d'évaluer les conséquences de l'invalidation du gène HMGB1 dans les macrophages (par exemple en utilisant la lignée de souris déficiente pour HMGB1 spécifiquement dans les macrophages ; HMGB1 Δ^{Mac}) sur la régénération. Nous pourrions également observer l'effet de cette déplétion sur la morphologie des ASCs sur le front de lésion dans les jours suivant la lésion, pour

évaluer la migration collective de ces ASCs, que nous avons observée en condition de régénération (NalM).

Ainsi, appuyés par les données de la littérature, nos résultats ont permis de caractériser les phases de la réponse inflammatoire au cours de la régénération, et notamment d'identifier qu'une inflammation intense, orchestrée par les neutrophiles, suivie d'une résolution efficace et rapide de l'inflammation assurée par les macrophages résidents CD11c⁺ sont des pré-requis nécessaires pour permettre la régénération chez le mammifère adulte. Nous avons identifié plusieurs molécules qui interviennent au cours de ces deux phases, inflammatoire et résolutive, parmi lesquelles les EAOs, des cytokines, des médiateurs lipidiques et leurs enzymes de synthèses, le récepteur membranaire TIM-4, le récepteur nucléaire PPAR γ , ou encore l'alarmine HMGB1 (Article 1, Résumé Graphique, Figure 40).

Il est important de souligner deux faits émanant des résultats que nous avons obtenus :

- Plusieurs des éléments cellulaires et moléculaires que nous avons identifiés comme indispensables à la régénération n'avaient jusqu'alors été impliqués qu'en grande partie lors de processus de régénération chez les invertébrés et vertébrés non mammaliens.
- Les études s'intéressent généralement à un acteur moléculaire et/ou cellulaire alors que nous mis en évidence une suite d'événements impliquant plusieurs acteurs moléculaires (interleukines, prostaglandines, récepteurs, marqueurs de surfaces etc...) et cellulaires (neutrophiles, macrophages résidents).

II Identification des fibres nerveuses qui contrôlent la régénération

Parallèlement à l'étude des mécanismes inflammatoires impliqués dans la régénération, nous avons cherché à identifier la nature des fibres nerveuses qui contrôlent la régénération. Nos résultats révèlent qu'un traitement à la NalM permet i) une activation des fibres sensorielles nociceptives, reflétée par une augmentation de la perception douloureuse et ii) d'induire une régénération tissulaire, très probablement grâce à la sécrétion de CGRP par ces fibres sensorielles activées. A l'inverse, la morphine inhibe la perception douloureuse et la régénération qui y est associée, très probablement en partie à cause de l'inhibition de la sécrétion de CGRP. Ces résultats mettent donc en lumière le rôle primordial des nocicepteurs et nous aident à proposer une stratégie thérapeutique visant à permettre la régénération tout en assurant une analgésie post-lésionnelle.

Depuis la première démonstration par Todd en 1823, du caractère indispensable de l'innervation dans les processus de régénération, seules deux études s'étaient intéressées à la nature des fibres, avec des conclusions divergentes^{28,122,140}.

Nos résultats indiquent que les fibres sensorielles nociceptives (ou nocicepteurs), sont indispensables pour induire la régénération du TAsc chez une souris C57BL/6, incapable de régénérer de manière spontanée. Elles agissent vraisemblablement grâce à la sécrétion du neuropeptide CGRP, qui stimulerait entre autres l'activité des cellules mésenchymateuses du TAsc ([Article 2](#), Résumé Graphique, Figure 53).

Grâce à l'utilisation d'une technique classique d'évaluation de la douleur chez la souris, combinée à une approche indirecte utilisée chez l'homme et que nous avons adaptée chez la souris, nous avons montré que les souris capables de régénérer ont une sensibilité accrue à la douleur. La dénervation pharmacologique spécifique des nocicepteurs révèle que ceux-ci sont indispensables à l'induction de la régénération. Si une première étude avait déjà mis en évidence le rôle de l'innervation sensorielle dans la régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre¹⁴⁰, nos résultats constituent la première étude identifiant clairement l'implication des fibres nerveuses sensorielles dans la régénération tissulaire chez les mammifères adultes, et plus précisément l'implication des nocicepteurs.

Il est important de noter que si nos résultats montrent une diminution drastique du nombre de fibres CGRP⁺ après dénervation, nous en détectons encore environ 40%, 21 jours après traitement à la capsaïcine. La capsaïcine détruisant spécifiquement les fibres C, le marquage CGRP correspond peut-être aussi aux fibres A δ présentes dans le TAsc. Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par les chercheurs ayant mis au point ce protocole de dénervation du TA à l'aide de capsaïcine où 70% des fibres CGRP⁺ sont supprimés après un traitement à la capsaïcine³⁶³. Les données du test de Von Frey indiquent d'ailleurs qu'une petite sensibilité (environ 15%) aux stimuli mécaniques persiste chez les animaux ainsi dénervés ([Article 2](#), Figure 1C).

Notre stratégie ne permet pas d'exclure l'implication d'autres types de fibres nerveuses dans ces processus de régénération. En effet, une étude menée parallèlement sur le poisson zèbre et sur la souris au stade néonatal a montré qu'une inhibition des récepteurs cholinergiques empêche la prolifération des cardiomyocytes suggérant un rôle primordial des fibres nerveuses autonomes parasympathiques dans la régénération cardiaque²⁸. Nous pouvons alors i) penser que ce résultat est spécifique de la régénération cardiaque chez le poisson zèbre, puisque le cœur est principalement innervé par ces fibres ou que ii) Les fibres autonomes sont impliquées dans tous les phénomènes de

régénération, en réponse à une activation des fibres sensorielles nociceptives, impliquant ainsi une boucle sensori-motrice. Ainsi, le mode d'action des nocicepteurs dans le contrôle de la régénération tissulaire pourrait être dû au relargage périphérique de neuropeptides comme nous le suggérons, mais également à l'activation d'une boucle sensori-motrice.

En effet, outre le relargage périphérique de neuropeptides, les fibres sensorielles transmettent l'information au niveau central, dans la moelle épinière. Par l'intermédiaire d'interneurones, elles peuvent être en contact avec les fibres du système nerveux autonome telles que les fibres sympathiques, formant ainsi des boucles sensorimotrices au niveau spinal.

Étant donné que des boucles sensori-motrices ont été mises en évidence au niveau des dépôts adipeux dont elles régulent les fonctions physiologiques^{307,364,365}, nous pouvons envisager qu'elles entrent en jeu lors des processus de régénération du TAsc. Plus précisément, au regard de l'abondance du nombre et des rôles joués par les fibres autonomes sympathiques dans les différents dépôts adipeux, il serait intéressant d'évaluer si celles-ci interviennent dans la régénération du TAsc suite à l'activation des fibres sensorielles. On pourrait ainsi évaluer la régénération du TAsc après lipectomie sur des souris qui auraient été péalablement traitées à la 6-OH-DA, un analogue hydroxylé de la dopamine détruisant spécifiquement les fibres sympathiques TH⁺. Pour démontrer l'activation d'une boucle sensori-motrice dans la régénération, il serait intéressant de reproduire notre dénervation sensorielle (à l'aide de la capsaïcine), sur des souris dépourvues des récepteurs à la noradrénaline (souris triple KO pour les 3 récepteurs adrénergiques : souris $\beta 1^{-/-}\beta 2^{-/-}\beta 3^{-/-}$). Pour s'assurer de l'implication d'un étage spinal dans la boucle, nous pourrions proposer une injection intrathécale d'un anesthésique local, la bupivacaïne (un inhibiteur des canaux sodiques), qui bloquera les voies ascendantes et descendantes de la nociception, ainsi que les voies motrices émanant de l'étage spinal anesthésié.

Nous avons aussi posé la question de l'implication des voies ascendantes nociceptives (voies nerveuses remontant vers l'encéphale) dans la régénération. La stratégie utilisée a été d'administrer de la Morphine par injection intracérébro-ventriculaire, afin d'activer les voies descendantes inhibitrices qui se terminent au niveau médullaire³⁶⁶. Nos résultats, bien que montrant que cette inhibition des voies nociceptives ascendantes n'altère pas la régénération du TAsc induite par la NaIM, ne nous permettent pas de conclure définitivement. Il est donc nécessaire de reproduire cette expérience afin d'augmenter le nombre d'animaux.

Par des approches pharmacologiques, nous avons montré que l'activation des récepteurs périphériques au CGRP est nécessaire et suffisante pour induire la régénération. Ces résultats sont cohérents avec le fait que les opioïdes (délétères pour la régénération), inhibent la propagation de l'influx nerveux dans les nocicepteurs mais également le relargage local de neuropeptides tels que le CGRP par leur extrémité périphérique³⁶⁷. De plus, une étude récente montre que, lors d'une hépatectomie, le CGRP induit la prolifération des hépatocytes au cours de la réparation du foie³⁴⁷, sans toutefois identifier la source de sécrétion de CGRP (nerveuse ou autre).

Le CGRP étant un neuropeptide, il est logique de penser que sa production dans un tissu ne résulte que d'une activité neuronale. Or, des données de la littérature *in vitro* indiquent que ce neuropeptide peut également être produit par les cellules immunitaires telles que les monocytes ou les macrophages, même si cette production reste quantitativement faible³⁶⁸. Même si nos données indiquent que le gène codant pour le CGRP n'est pas exprimé par les ASCs et les cellules immunitaires, il sera nécessaire de déterminer clairement sa source de production dans nos conditions de régénération en utilisant des inhibiteurs ciblant spécifiquement les neurones tels que la tétrodotoxine (TTX). Cette neurotoxine, en bloquant les canaux sodiques voltage-dépendants présents sur les nocicepteurs (excepté des NaV1.8 car ces derniers sont résistants à la TTX), supprime toute dépolarisation des nocicepteurs et donc les phénomènes d'exocytose, notamment celle du CGRP³⁶⁹. Si, comme attendu, le CGRP libéré dans le tissu est majoritairement d'origine nerveuse, une diminution drastique de la quantité de CGRP dans le tissu traité à la TTX devrait être mesurée.

Forts de tous ces résultats, nous avons envisagé une stratégie pharmacologique permettant après une lésion, d'induire la régénération tout en assurant une analgésie. Ainsi, nous avons montré qu'une co-administration sous-cutanée de CGRP et de Morphine au niveau du site de lésion permettait de déclencher la régénération du TAsc après lipectomie tout en inhibant la perception douloureuse. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Rook et coll. publiés dans le cadre de la cicatrisation cutanée^{166,303,304}. En effet, ces auteurs montrent que chez le rat, la morphine empêche la fermeture d'une plaie cutanée dorsale et que la co-administration de morphine (sous forme de gel) et de substance P (un autre neuropeptide sensoriel présenté en introduction et aux propriétés relativement similaires à celle du CGRP), restaure une fermeture de plaie normale^{166,303,304}. En revanche, la substance P est décrite comme augmentant la nociception dans un contexte lésionnel³⁷⁰, or les travaux de Rook et coll. n'ont pas évalué la douleur dans leur modèle de lésion cutanée. La dose de morphine co-administrée avec la substance P, ne permet peut-être pas d'avoir un effet analgésique suffisant, ce qui pourrait expliquer l'accélération de la fermeture de la plaie dans ces conditions.

Comme en témoignent les dernières études présentées ci-dessus par Rook et coll., nos données sur l'implication du CGRP dans le contrôle de la régénération pourraient être transposées à celle de l'implication de la substance P. C'est en effet, ce que tendent à montrer nos données préliminaires avec la substance P. Celle-ci pourrait avoir potentiellement les mêmes effets que le CGRP, à savoir : i) une stimulation de la migration des ASCs et ii) un effet pro-régénérant sur le TAsc après lipectomie. Ces résultats sont à confirmer et à approfondir pour déterminer, le cas échéant, dans quelle mesure la substance P favorise la régénération du TAsc.

III Dialogue entre le système immunitaire et le système nerveux au cours de la régénération.

Nos résultats laissent penser que le CGRP participe aux processus de régénération en agissant sur les ASCs, mais il est également décrit comme étant étroitement lié au système immunitaire. En effet, le CGRP favorise le recrutement de cellules immunitaires via la vasodilatation des vaisseaux sanguins^{162,314,345} et la quantification du nombre de cellules CD45⁺ sur le front de lésion nous laisse penser que le CGRP induit une réponse inflammatoire similaire à celle observée après traitement à la NalM. Le CGRP est également connu pour stimuler les cellules immunitaires (il peut par exemple potentialiser la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 par des macrophages préalablement stimulés au LPS)³⁷¹ et participe à la boucle d'amplification de l'inflammation^{92,94,162}. Par ailleurs, nous pouvons également imaginer que le CGRP puisse, dans un second temps, favoriser la réponse anti-inflammatoire. En effet, le CGRP peut inhiber la production de TNF α par les macrophages péritonéaux dans un modèle murin d'endotoxémie³⁷² ou encore stimuler la polarisation de macrophages péritonéaux vers un statut anti-inflammatoire in vitro après un traitement au LPS (induisant un macrophages pro-inflammatoire), notamment en inhibant l'expression génique de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β ³⁷³. Cette possibilité pour le CGRP d'être à la fois bénéfique pour permettre une inflammation brève et intense, et participer activement à la résolution de l'inflammation serait cohérent, avec l'effet de certaines cytokines (comme l'IL-6 ou le TNF α) qui, comme nous l'avons présenté dans le chapitre 3, peuvent être pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires selon le contexte tissulaire^{189,374}.

Ainsi, la mise en jeu des fibres sensorielles nociceptives lors d'une agression tissulaire, participerait à la régénération via un « contrôle » de la réponse inflammatoire par l'intermédiaire du relargage de CGRP. Néanmoins, ce dialogue n'est pas unidirectionnel puisque de nombreuses molécules de la « soupe inflammatoire » libérées lors de la lésion participent activement à l'activation des

nocicepteurs²⁴⁰. La PGE₂ et HGMB1 dont les quantités augmentent au cours de la régénération du TAsc augmentent, en effet, la sensibilité à la douleur^{196,240,375}.

Au regard de l'ensemble des données il apparaît indispensable de considérer le dialogue complexe mis en place entre le système immunitaire et le système nerveux dans les processus de régénération.

IV Les capacités de régénération ont disparu au cours de l'évolution

L'évolution a, comme présenté dans le chapitre 1 de l'introduction, sélectionné la réparation cicatricielle au détriment de la régénération. Depuis plusieurs années, il est proposé que la complexification progressive du SI soit en partie responsable de la perte des capacités de régénération. Par ailleurs, nous avons également montré, grâce à nos résultats ayant fait l'objet d'un premier article publié par Labit et coll. en 2018, que les opioïdes endogènes sont inhibiteurs des processus de régénération²²⁴. C'est pourquoi, nous discuterons également les modifications du système opioïdes ayant eu lieu au cours de l'évolution et ayant lieu au cours de la vie d'un organisme.

A Mise en cause de la complexification du système immunitaire ?

De l'organisme le plus simple qu'est un procaryote, jusqu'au vertébré le plus complexe, tous les organismes sont armés pour se défendre contre un pathogène et/ou une agression. Les mécanismes de défense des bactéries impliquent de simples enzymes, la grande majorité des invertébrés dispose d'un SI inné peu spécifique, alors que les vertébrés sont dotés, en plus du SI inné, d'un SI adaptatif spécifique de « l'agression ». Notons que le SI inné, lui-même, s'est modifié au cours de l'évolution. Si la capacité à phagocyter est très conservée, les cellules, les récepteurs et les voies de signalisation impliquées dans ce mécanisme se sont considérablement multipliés, diversifiés et complexifiés au cours de l'évolution, jusqu'à rendre les différents acteurs de ce système hautement redondants³⁷⁶. Autrement dit, si un type cellulaire (ou un récepteur) vient à faillir, un/une autre peut prendre le relais. Il en est de même pour les cascades de signalisation. Si cette redondance confère une performance incroyable au SI, elle participe aussi à « verrouiller » son fonctionnement. Ainsi, si l'on veut « dérouter le SI de son objectif », il est nécessaire d'agir sur de multiples voies pour obtenir l'effet escompté.

La complexification (ou maturation) du SI se fait aussi à l'échelle de la vie d'un organisme. Le Xénope, par exemple, n'est capable de régénérer qu'au stade larvaire, c'est-à-dire avant la métamorphose et donc le passage à la vie adulte. Parallèlement à la métamorphose s'opère effectivement toute une maturation de son SI et au stade adulte, le xénope possède un SI ressemblant en de nombreux points à celui du mammifère adulte, avec une réponse adaptative, spécifique, rapide et impliquant des lymphocytes mémoires^{377,38}. Il est donc important de prendre cet aspect en considération lors d'une

analyse exhaustive de la littérature sur les mécanismes cellulaires/moléculaires associés à la régénération. A titre d'exemple, les macrophages sont indispensables à la régénération chez le poisson zèbre quelques jours après la naissance alors qu'ils sont souvent associés à la mise en place d'un tissu cicatriciel non fonctionnel au stade adulte²³². Il en est de même pour l'homme ; son SI devient mature (avec le développement et la mise en place du SI adaptatif) au cours des premières semaines de vie et de manière intéressante, la régénération de l'extrémité du doigt n'est principalement observée que pendant les premières semaines de la vie^{378,379}.

Finalement, à la lumière de cette littérature et de nos résultats, nous pouvons imaginer qu'un SI inné qui s'est complexifié au cours de l'évolution, additionné d'un SI adaptatif complexe qui se met en place dans les premières semaines de vie, participe à empêcher la la régénération chez le mammifère.

B Mise en cause du système opioïde ?

Chez le mammifère, le système opioïde est là pour diminuer l'information nociceptive perçue suite à une lésion par exemple (voir chapitre 4). Cette information nociceptive constitue un véritable « signal d'alarme ». La question est donc de savoir si cette capacité à inhiber l'information nociceptive par la sécrétion d'opioïdes endogènes, qui est associé à une inhibition de la régénération comme nous l'avons montré (Article de Labit et coll., [Article 1](#) et [Article 2](#)), est présente dès le début du règne animal ou non. Si le système opioïde constitue réellement un verrou à la régénération comme nous le pensons, le système devrait être moins développé chez les invertébrés et vertébrés non mammaliens, ainsi qu'au début de la vie du mammifère adulte.

Le système opioïde, regroupant les différents ligands endogènes et les différents sous-types de récepteurs, est apparu relativement tôt au cours de l'évolution et est conservé au sein des différents groupes phylogénétiques. Ainsi, la présence de met-enképhaline a été détectée chez des bactéries (procaryotes) mais aussi chez le ver planaire, les annélides, les mollusques et les arthropodes, et la présence d'endorphine et de dynorphine est décrite dès les eucaryotes unicellulaires et est retrouvée dans la plupart des embranchements du règne animal. Chez le vers planaire, qui est le premier animal à avoir une structure assimilable à celle d'un cerveau, un traitement à la morphine ou avec une enképhaline entraîne une diminution de l'activité motrice spontanée ainsi qu'une diminution globale de la quantité d'AMPc intracellulaire³⁸⁰. Chez les insectes, alors que tous les gènes codant pour les différents opioïdes sont exprimés au niveau des cellules nerveuses et du tissu adipeux, peu d'études s'intéressent à leur rôle « physiologique » et encore moins à leur intervention dans les processus de nociception³⁸¹. Chez les invertébrés, il semble qu'un système opioïde soit présent, mais que la quantité « d'opioïde like peptides » détectée soit relativement faible. Par ailleurs, il a été rapporté par Edgar T

Walters en 2018, que les mollusques et arthropodes sont dotés d'un système nociceptif, mais le rôle joué par ce système dans l'analgésie reste très incertain³⁸². En d'autres termes, si les opioïdes n'interfèrent pas avec l'activité des nocicepteurs, on peut envisager que ces fibres puissent alors « agir librement » pour favoriser la régénération, ce qui pourrait potentiellement expliquer pourquoi ces espèces régénèrent si bien par rapport aux vertébrés et notamment par rapport aux mammifères. Chez le poisson zèbre et les amphibiens, les gènes codants pour les récepteurs et les ligands sont très proches de ceux qui sont retrouvés chez les mammifères^{383,384,385,386}. Cependant, le nombre d'études relatives à leur effet analgésique, bien qu'indiquant des effets similaires à ceux retrouvés chez le mammifère, reste limité. Nous pouvons envisager que chez ces espèces, le système opioïde soit similaire à celui des mammifères mais moins efficace pour la prise en charge de la douleur. Des études complémentaires relatives à l'affinité des récepteurs pour les ligands retrouvés chez les amphibiens et le poisson zèbre, pourraient nous apporter des éléments de réponse à ce sujet.

Par ailleurs, à l'échelle de la vie des individus, le système opioïde bien que mis en place au cours du développement embryonnaire, n'est pas complètement fonctionnel à la naissance. Il subit une maturation postnatale³⁸⁷, de manière similaire au système immunitaire qui acquiert d'une immunité adaptative dans les premières semaines de vie. Il est par exemple rapporté que la sensibilité nociceptive chez le rat est très différente entre un individu au stade néonatal et au stade adulte^{388,387,389}. Ceci peut être dû à la maturation des fibres sensorielles impliquées dans la perception douloureuse. En effet, comme présenté dans le chapitre 4, les opioïdes jouent au stade adulte, un rôle clef dans l'analgésie en stimulant des voies descendantes (du cerveau vers la moelle épinière) inhibitrices de l'activité des fibres C et A δ . Chez le rat, le développement de ces voies intervient majoritairement au stade post-natal; aucune voie descendante inhibitrice de la perception douloureuse n'est encore fonctionnelle 10 à 12 jours après la naissance, et c'est seulement 22 à 24 jours après la naissance que leur nombre atteint celui retrouvé chez l'adulte. De même, un test nociceptif de retrait de la queue dans lorsque celle-ci est chauffée, indique qu'un traitement à la morphine n'affecte pas la perception douloureuse, avant le 12^{ème} jour post natal³⁹⁰. Par ailleurs, on observe une différence d'expression des peptides opioïdes entre la naissance et le stade adulte. Par exemple les concentrations en enképhaline et endorphine atteignent les mêmes concentrations que celles retrouvées chez l'adulte entre le 6^{ème} et le 25^{ème} jour après la naissance³⁹¹.

De manière similaire au SI, le système opioïde s'est complexifié au cours de l'évolution. La duplication du génome et ses conséquences ont pu rendre le système « redondant », gage probable de performance, mais pouvant constituer un verrou au cours des processus de réparation tissulaire. De

plus, l'inhibition clairement démontrée de la réponse inflammatoire par les opioïdes ne fait que rajouter un verrou supplémentaire à la possibilité de régénérer chez le mammifère.

Finalement, le système immunitaire et le système opioïde apparaissent de plus en plus complexes au cours i) de l'évolution et ii) de la vie d'un individu. Nous pouvons alors tout à fait imaginer que chez les invertébrés, les vertébrés non mammaliens et les mammifères nouveau-nés, la possibilité de régénérer soit liée à un système immunitaire peu complexe couplé à un système opioïde moins efficace permettant la mise en place d'une réponse inflammatoire brève, intense et bien résolue.

L'évolution, qu'elle soit à l'échelle du règne animal, ou de la vie d'un individu, a drastiquement complexifié le système immunitaire et le système opioïde, jusqu'à les rendre anti-régénératifs au profit d'une cicatrisation rapide mais associée à une perte de fonction. A la lumière de l'ensemble des résultats obtenus lors de ma thèse, il semble que les mammifères possèdent tous les éléments requis pour permettre la régénération, et que celle-ci pourrait être déclenchée en modulant la réponse inflammatoire et nociceptive tout en prenant en charge la douleur associée à la lésion par des approches pharmacologiques simples. Cependant, la régénération est un processus beaucoup plus lent que la cicatrisation et outre l'application de nos découvertes aux autres organes, l'accélération du processus de régénération est un challenge important à relever dans les années à venir.

Bibliographie

1. Gauron, C. *et al.* Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. *Sci Rep* **3**, 2084 (2013).
2. Brockes, J. P. & Kumar, A. Comparative Aspects of Animal Regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**, 525–549 (2008).
3. Forbes, S. J. & Rosenthal, N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med* **20**, 857–869 (2014).
4. Morgan: Regeneration - Google Scholar. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Regeneration.%20Columbia%20University%20Biological%20Series&publication_year=1901&author=Morgan%20Thomas%20Hunt.
5. David, C. N. & Campbell, R. D. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. I. Epithelial cells. *J. Cell. Sci.* **11**, 557–568 (1972).
6. Marcum, B. A. & Campbell, R. D. DEVELOPMENT OF HYDRA LACKING NERVE AND INTERSTITIAL CELLS. **18**.
7. Gierer, A. *et al.* Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nature New Biol.* **239**, 98–101 (1972).
8. Technau, U. *et al.* Parameters of self-organization in *Hydra* aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 12127–12131 (2000).
9. Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J. U., Anton-Erxleben, F. & Bosch, T. C. G. Transgenic *Hydra* allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 6208–6211 (2006).
10. Technau, U. & Holstein, T. W. Cell sorting during the regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. *Dev. Biol.* **151**, 117–127 (1992).
11. Chera, S. *et al.* Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive *hydra* head regeneration. *Dev. Cell* **17**, 279–289 (2009).
12. Schummer, M., Scheurlen, I., Schaller, C. & Galliot, B. HOM/HOX homeobox genes are present in *hydra* (*Chlorohydra viridissima*) and are differentially expressed during regeneration. *EMBO J.* **11**, 1815–1823 (1992).
13. Sarras, M. P. Components, structure, biogenesis and function of the *Hydra* extracellular matrix in regeneration, pattern formation and cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* **56**, 567–576 (2012).
14. Agata, K. Regeneration and gene regulation in planarians. *Current Opinion in Genetics & Development* **13**, 492–496 (2003).
15. Agata, K. The Process of Pharynx Regeneration in Planarians.
16. Kato, K. DV interaction during planarian regeneration. **10**.
17. Wagner, D. E., Wang, I. E. & Reddien, P. W. Clonogenic neoblasts are pluripotent adult stem cells that underlie planarian regeneration. *Science* **332**, 811–816 (2011).
18. Lei, K. *et al.* Egf Signaling Directs Neoblast Repopulation by Regulating Asymmetric Cell Division in Planarians. *Developmental Cell* **38**, 413–429 (2016).
19. Gurley, K. A., Rink, J. C. & Sánchez Alvarado, A. Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science* **319**, 323–327 (2008).

20. Petersen, C. P. & Reddien, P. W. A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 17061–17066 (2009).
21. Hayashi, T. *et al.* A LIM-homeobox gene is required for differentiation of Wnt-expressing cells at the posterior end of the planarian body. *Development* **138**, 3679–3688 (2011).
22. Isolani, M. E. *et al.* Planarians as a Model to Assess In Vivo the Role of Matrix Metalloproteinase Genes during Homeostasis and Regeneration. *PLOS ONE* **8**, e55649 (2013).
23. HYMAN, L. The Invertebrates. *Echinodermata* **4**, (1955).
24. Moss, C., Jackie Hunter, A. & Thorndyke, M. C. Patterns of bromodeoxyuridine incorporation and neuropeptide immunoreactivity during arm regeneration in the starfish *Asterias rubens*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **353**, 421–436 (1998).
25. Vickery, M. C. L., Vickery, M. S., McClintock, J. B. & Amsler, C. D. Utilization of a novel deuterostome model for the study of regeneration genetics: molecular cloning of genes that are differentially expressed during early stages of larval sea star regeneration. *Gene* **262**, 73–80 (2001).
26. Ferrario, C. *et al.* Fundamental aspects of arm repair phase in two echinoderm models. *Developmental Biology* **433**, 297–309 (2018).
27. Ben Khadra, Y., Said, K., Thorndyke, M. & Martinez, P. Homeobox Genes Expressed During Echinoderm Arm Regeneration. *Biochem Genet* **52**, 166–180 (2014).
28. Mahmoud, A. I. *et al.* Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Developmental Cell* **34**, 387–399 (2015).
29. FitzSimons, M. *et al.* Cardiac injury modulates critical components of prostaglandin E2 signaling during zebrafish heart regeneration. *Sci Rep* **10**, 3095 (2020).
30. Jopling, C. *et al.* Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* **464**, 606–609 (2010).
31. Lu, J. *et al.* IGFBP1 increases β -cell regeneration by promoting α - to β -cell transdifferentiation. *EMBO J.* **35**, 2026–2044 (2016).
32. Berberoglu, M. A. *et al.* Satellite-like cells contribute to pax7 -dependent skeletal muscle repair in adult zebrafish. *Developmental Biology* **424**, 162–180 (2017).
33. Kan, N. G., Junghans, D. & Belmonte, J. C. I. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *FASEB j.* **23**, 3516–3525 (2009).
34. Smith, A., Avaron, F., Guay, D., Padhi, B. K. & Akimenko, M. A. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function. *Developmental Biology* **299**, 438–454 (2006).
35. Henry, J. J. & Tsonis, P. A. Molecular and cellular aspects of amphibian lens regeneration. *Prog Retin Eye Res* **29**, 543–555 (2010).
36. Oberpriller, J. O. & Oberpriller, J. C. Response of the adult newt ventricle to injury. *J. Exp. Zool.* **187**, 249–253 (1974).
37. Aztekin, C. *et al.* Identification of a regeneration-organizing cell in the *Xenopus* tail. *Science* **364**, 653–658 (2019).
38. Chen, G. & Robert, J. Antiviral immunity in amphibians. *Viruses* **3**, 2065–2086 (2011).
39. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition - 8th Edition. <https://www.elsevier.com/books/robbins-and-cotran-pathologic-basis-of-disease-professional-edition/kumar/978-1-4377-0792-2>.

40. Gale, A. J. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol* **39**, 273–280 (2011).
41. Lijnen, H. R. Molecular interactions between the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems. *Fibrinolysis and Proteolysis* **14**, 175–181 (2000).
42. Lefkowitz, J. B. Coagulation Pathway and Physiology. 10.
43. Periyah, M. H., Halim, A. S. & Mat Saad, A. Z. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* **11**, 319–327 (2017).
44. Pallister, C. *Haematology*. (Scion Publishing Ltd, 2007).
45. Lepilina, A. *et al.* A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* **127**, 607–619 (2006).
46. Mescher, A. L. Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *Journal of Experimental Zoology* **195**, 117–127 (1976).
47. Young, H. E., Bailey, C. F. & Dalley, B. K. Gross morphological analysis of limb regeneration in postmetamorphic adult *Ambystoma*. *Anat. Rec.* **206**, 295–306 (1983).
48. Del Rio-Tsonis, K., Washabaugh, C. H. & Tsonis, P. A. The mutant axolotl Short toes exhibits impaired limb regeneration and abnormal basement membrane formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 5502–5506 (1992).
49. Christensen, R. N. & Tassava, R. A. Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Dev. Dyn.* **217**, 216–224 (2000).
50. Poulin, M. L., Patrie, K. M., Botelho, M. J., Tassava, R. A. & Chiu, I.-M. Heterogeneity in the expression of fibroblast growth factor receptors during limb regeneration in newts (*Notophthalmus viridescens*). 9.
51. Cash, D. E., Gates, P. B., Imokawa, Y. & Brockes, J. P. Identification of newt connective tissue growth factor as a target of retinoid regulation in limb blastemal cells. *Gene* **222**, 119–124 (1998).
52. Yang, E. V. & Byant, S. V. Developmental Regulation of a Matrix Metalloproteinase during Regeneration of Axolotl Appendages. *Developmental Biology* **166**, 696–703 (1994).
53. Vinarsky, V., Atkinson, D. L., Stevenson, T. J., Keating, M. T. & Odelberg, S. J. Normal newt limb regeneration requires matrix metalloproteinase function. *Dev. Biol.* **279**, 86–98 (2005).
54. Whitehead, G. G. fgf20 Is Essential for Initiating Zebrafish Fin Regeneration. *Science* **310**, 1957–1960 (2005).
55. de Both, N. J. The developmental potencies of the regeneration blastema of the axolotl limb. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org* **165**, 242–276 (1970).
56. Schotté, O. E. & Harland, M. Effects of blastema transplantations on regeneration processes of limbs in *Amblystoma* larvae: EFFECTS IF BLASTEMA TRANSPLANTATIONS. *Anat. Rec.* **87**, 165–180 (1943).
57. Stocum, D. L. The urodele limb regeneration blastema: A self-organizing system. *Developmental Biology* **18**, 441–456 (1968).
58. Kumar, A., Godwin, J. W., Gates, P. B., Garza-Garcia, A. A. & Brockes, J. P. Molecular Basis for the Nerve Dependence of Limb Regeneration in an Adult Vertebrate. *Science* **318**, 772–777 (2007).
59. Deuchar, E. M. Regeneration of amputated limb-buds in early rat embryos. *Development* **35**, 345–354 (1976).
60. Smith, L. T., Holbrook, K. A. & Madri, J. A. Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *Am. J. Anat.* **175**, 507–521 (1986).
61. Hallock, G. G., Rice, D. C., Merkel, J. R. & DiPaolo, B. R. Analysis of collagen content in the fetal wound. *Ann Plast Surg* **21**, 310–315 (1988).

62. Peled, Z. M. *et al.* Matrix metalloproteinases and the ontogeny of scarless repair: the other side of the wound healing balance. *Plast. Reconstr. Surg.* **110**, 801–811 (2002).
63. Dang, C. M. *et al.* Scarless fetal wounds are associated with an increased matrix metalloproteinase-to-tissue-derived inhibitor of metalloproteinase ratio. *Plast. Reconstr. Surg.* **111**, 2273–2285 (2003).
64. Kountouras, J., Boura, P. & Lygidakis, N. J. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatology* **48**, 556–562 (2001).
65. Tao, Y., Wang, M., Chen, E. & Tang, H. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. *Mediators of Inflammation* **2017**, 1–9 (2017).
66. Mufti, S. A. Regeneration following denervation of minced gastrocnemius muscles in mice. *Journal of the Neurological Sciences* **33**, 251–266 (1977).
67. Reginelli, A. D., Wang, Y.-Q., Sassoon, D. & Muneoka, K. Digit tip regeneration correlates with regions of Msx1 (Hox 7) expression in fetal and newborn mice. *12*.
68. Hu, G., Lee, H., Price, S. M., Shen, M. M. & Abate-Shen, C. Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1. *Development* **128**, 2373–2384 (2001).
69. Han, M. Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development* **130**, 5123–5132 (2003).
70. Beck, C. W., Christen, B. & Slack, J. M. W. Molecular Pathways Needed for Regeneration of Spinal Cord and Muscle in a Vertebrate. *Developmental Cell* **5**, 429–439 (2003).
71. Thummel, R. *et al.* Inhibition of zebrafish fin regeneration using in vivo electroporation of morpholinos against fgfr1 and msxb. *Dev. Dyn.* **235**, 336–346 (2006).
72. Han, M., Yang, X., Lee, J., Allan, C. H. & Muneoka, K. Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Dev. Biol.* **315**, 125–135 (2008).
73. Allan, C. H. *et al.* Tissue response and Msx1 expression after human fetal digit tip amputation in vitro. *Wound Repair and Regeneration* **14**, 398–404 (2006).
74. Seifert, A. W. & Maden, M. New Insights into Vertebrate Skin Regeneration. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 310 129–169 (Elsevier, 2014).
75. Seifert, A. W. *et al.* Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature* **489**, 561–565 (2012).
76. Cyr, J. L. *et al.* Regeneration-Competent and -Incompetent Murids Differ in Neutrophil Quantity and Function. *Integrative and Comparative Biology* **59**, 1138–1149 (2019).
77. Wenger, Y., Buzgariu, W., Reiter, S. & Galliot, B. Injury-induced immune responses in Hydra. *Seminars in Immunology* **26**, 277–294 (2014).
78. Gauron, C. *et al.* Hydrogen peroxide (H₂O₂) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Developmental Biology* **414**, 133–141 (2016).
79. Simkin, J., Gawriluk, T. R., Gensel, J. C. & Seifert, A. W. Macrophages are necessary for epimorphic regeneration in African spiny mice. *eLife* **6**, e24623 (2017).
80. Brant, J. O., Lopez, M.-C., Baker, H. V., Barbazuk, W. B. & Maden, M. A Comparative Analysis of Gene Expression Profiles during Skin Regeneration in Mus and *Acomys*. *PLoS ONE* **10**, e0142931 (2015).
81. Altman, A., Theofilopoulos, A. N., Weiner, R., Katz, D. H. & Dixon, F. J. Analysis of T cell function in autoimmune murine strains. Defects in production and responsiveness to interleukin 2. *J. Exp. Med.* **154**, 791–808 (1981).
82. Steinberg, A. D. MRL-lpr/lpr disease: theories meet Fas. *Semin. Immunol.* **6**, 55–69 (1994).

83. Andrews, B. S. *et al.* Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* **148**, 1198–1215 (1978).
84. Naviaux, R. K. *et al.* Retained features of embryonic metabolism in the adult MRL mouse. *Mol. Genet. Metab.* **96**, 133–144 (2009).
85. Clark, L. D., Clark, R. K. & Heber-Katz, E. A New Murine Model for Mammalian Wound Repair and Regeneration. *Clinical Immunology and Immunopathology* **88**, 35–45 (1998).
86. Heber-Katz, E. & Gourevitch, D. The relationship between inflammation and regeneration in the MRL mouse: potential relevance for putative human regenerative (scarless wound healing) capacities? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1172**, 110–114 (2009).
87. Gourevitch, D. *et al.* Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Dev. Dyn.* **226**, 377–387 (2003).
88. Buckley, G., Metcalfe, A. D. & Ferguson, M. W. J. Peripheral nerve regeneration in the MRL/MpJ ear wound model: Peripheral nerve regeneration in the mouse ear. *Journal of Anatomy* **218**, 163–172 (2011).
89. Buckley, G., Wong, J., Metcalfe, A. D. & Ferguson, M. W. J. Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds: Denervation influences regeneration and repair in mouse ear wounds. *Journal of Anatomy* **220**, 3–12 (2012).
90. *Scarless Wound Healing*. (CRC Press, 2000). doi:10.1201/b14004.
91. Highstein, S. M. The central nervous system efferent control of the organs of balance and equilibrium. *Neuroscience Research* **12**, 13–30 (1991).
92. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **413**, 8 (2001).
93. Le Pichon, C. E. & Chesler, A. T. The functional and anatomical dissection of somatosensory subpopulations using mouse genetics. *Front. Neuroanat.* **8**, (2014).
94. Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G. & Julius, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* **139**, 267–284 (2009).
95. Perl, E. R. Ideas about pain, a historical view. *Nat Rev Neurosci* **8**, 71–80 (2007).
96. Mason, P. Placing pain on the sensory map: Classic papers by Ed Perl and colleagues. *Journal of Neurophysiology* **97**, 1871–1873 (2007).
97. Schmidt, R. *et al.* Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J. Neurosci.* **15**, 333–341 (1995).
98. Dong, X., Han, S., Zylka, M. J., Simon, M. I. & Anderson, D. J. A Diverse Family of GPCRs Expressed in Specific Subsets of Nociceptive Sensory Neurons. *Cell* **106**, 619–632 (2001).
99. Beaulieu-Laroche, L. *et al.* TACAN Is an Ion Channel Involved in Sensing Mechanical Pain. *Cell* **180**, 956-967.e17 (2020).
100. Bang, S. & Hwang, S. W. Polymodal Ligand Sensitivity of TRPA1 and Its Modes of Interactions. *J Gen Physiol* **133**, 257–262 (2009).
101. Djouhri, L. A δ -fiber low threshold mechanoreceptors innervating mammalian hairy skin: A review of their receptive, electrophysiological and cytochemical properties in relation to A δ -fiber high threshold mechanoreceptors. *Neurosci Biobehav Rev* **61**, 225–238 (2016).
102. Ranade, S. S. *et al.* Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature* **516**, 121–125 (2014).
103. Patel, T. R. Anatomy of the Sympathetic Nervous System. in *Nerves and Nerve Injuries* 495–506 (Elsevier, 2015). doi:10.1016/B978-0-12-410390-0.00038-X.
104. Waxenbaum, J. A., Reddy, V. & Varacallo, M. Anatomy, Autonomic Nervous System. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).

105. Walkowski, A. D. & Munakomi, S. Monosynaptic Reflex. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
106. Marcum, B. A. & Campbell, R. D. DEVELOPMENTAL ROLES OF EPITHELIAL AND INTERSTITIAL CELL LINEAGES IN HYDRA: ANALYSIS OF CHIMERAS. 15.
107. Westfall, I. A. Ultrastructure of synapses in the first-evolved nervous systems. *J. Neurocytol.* **25**, 735–746 (1996).
108. Bode, H. R. The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *J. Cell. Sci.* **109 (Pt 6)**, 1155–1164 (1996).
109. Miljkovic-Licina, M., Chera, S., Ghila, L. & Galliot, B. Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis. *Development* **134**, 1191–1201 (2007).
110. Nishimiya-Fujisawa, C. & Sugiyama, T. Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. XX. Cloning of interstitial stem cells restricted to the sperm differentiation pathway in *Hydra magnipapillata*. *Dev. Biol.* **157**, 1–9 (1993).
111. Hornberger, M. R. & Hassel, M. Expression of HvrACK1, a member of the RACK1 subfamily of regulatory WD40 proteins in *Hydra vulgaris*, is coordinated between epithelial and interstitial cells in a position-dependent manner. *Development Genes and Evolution* **206**, 435–446 (1997).
112. Cannon, L. R. G. *Biology of Turbellaria and some Related Flatworms: Proceedings of the Seventh International Symposium on the Biology of the Turbellaria, held at Åbo/Turku, Finland, 17–22 June 1993.* (Springer Science & Business Media, 2012).
113. Hyman, L. H. The invertebrates : Platyhelminthes and Rhynchocoela, the acoelomate Bilateria. *The invertebrates : Platyhelminthes and Rhynchocoela, the acoelomate Bilateria.* **2**, (1951).
114. Lentz, T. L. Fine structure of nerve cells in a planarian. *Journal of Morphology* **121**, 323–337 (1967).
115. Koopowitz, H. & Chien, P. Ultrastructure of the nerve plexus in flatworms. *Cell Tissue Res.* **155**, 337–351 (1974).
116. Oviedo, N. J. *et al.* Long-range neural and gap junction protein-mediated cues control polarity during planarian regeneration. *Developmental Biology* **339**, 188–199 (2010).
117. Yazawa, S., Umesono, Y., Hayashi, T., Tarui, H. & Agata, K. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior–posterior polarity by regulating Wnt signaling. *PNAS* **106**, 22329–22334 (2009).
118. THE ROLE OF THE NERVOUS SYSTEM IN SOME ACTIVITIES OF STARFISHES - SMITH - 1945 - Biological Reviews - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1469-185X.1945.tb00312.x>.
119. Smith, J. E. & Cannon, H. G. II - On the nervous system of the starfish *Mathasterias glacialis* (L.). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **227**, 111–173 (1937).
120. Huet, P. M. Le role du systeme nerveux au cours de la regeneration du bras chez une Etoile de mer: *Asterina gibbosa* Penn. (Echinoderme, Asteride). 18.
121. Thorndyke, M. C., Chen, W.-C., Beesley, P. W. & Patruno, M. Molecular approach to echinoderm regeneration. *Microsc. Res. Tech.* **55**, 474–485 (2001).
122. TODD, T. On the process of reproduction of the members of the aquatic salamander. *Quart J Sci Arts Lib* **16**, 84–86 (1823).
123. Wolff, G. XIV. Die physiologische Grundlage der Lehre von den Degenerations-Zeichen. *Archiv f. pathol. Anat.* **169**, 308–331 (1902).

124. Singer, M. The nervous system and regeneration of the forelimb of adult Triturus. I. The role of the sympathetics. *J. Exp. Zool.* **90**, 377–399 (1942).
125. Singer, M. The nervous system and regeneration of the forelimb of adult Triturus. V. The influence of number of nerve fibers, including a quantitative study of limb innervation. *J. Exp. Zool.* **101**, 299–337 (1946).
126. Singer, M. The Influence of the Nerve in Regeneration of the Amphibian Extremity. *The Quarterly Review of Biology* **27**, 169–200 (1952).
127. Schotte, O. E. & Liversage, R. A. Effects of denervation and amputation upon the initiation of regeneration in regenerates of Triturus. *J. Morphol.* **105**, 495–527 (1959).
128. Locatelli, P. Der Einfluss des Nervensystems auf die Regeneration. *W. Roux' Archiv f. Entwicklungsmechanik* **114**, 686–770 (1929).
129. Rose, S. M. THE ROLE OF NERVES IN AMPHIBIAN LIMB REGENERATION. *Annals of the New York Academy of Sciences* **49**, 818–833 (1948).
130. Tanaka, E. M. & Reddien, P. W. The cellular basis for animal regeneration. *Dev. Cell* **21**, 172–185 (2011).
131. Kumar, A. & Brockes, J. P. Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration. *Trends in Neurosciences* **35**, 691–699 (2012).
132. Garza-Garcia, A., Harris, R., Esposito, D., Gates, P. B. & Driscoll, P. C. Solution Structure and Phylogenetics of Prod1, a Member of the Three-Finger Protein Superfamily Implicated in Salamander Limb Regeneration. *PLOS ONE* **4**, e7123 (2009).
133. Blassberg, R. A., Garza-Garcia, A., Janmohamed, A., Gates, P. B. & Brockes, J. P. Functional convergence of signalling by GPI-anchored and anchorless forms of a salamander protein implicated in limb regeneration. *J Cell Sci* **124**, 47–56 (2011).
134. Mescher, A. L. & Munaim, S. I. 'Trophic' effect of transferrin on amphibian limb regeneration blastemas. *J. Exp. Zool.* **230**, 485–490 (1984).
135. Albert, P. & Boilly, B. Effect of transferrin on amphibian limb regeneration: a blastema cell culture study. *Rouxs Arch. Dev. Biol.* **197**, 193–196 (1988).
136. Kiffmeyer, W. R., Tomusk, E. V. & Mescher, A. L. Axonal transport and release of transferrin in nerves of regenerating amphibian limbs. *Developmental Biology* **147**, 392–402 (1991).
137. Mullen, L. M., Bryant, S. V., Torok, M. A., Blumberg, B. & Gardiner, D. M. Nerve dependency of regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development* **122**, 3487–3497 (1996).
138. Horzmann, K. A. & Freeman, J. L. Zebrafish Get Connected: Investigating Neurotransmission Targets and Alterations in Chemical Toxicity. *Toxics* **4**, (2016).
139. Norton, W. H. J., Folchert, A. & Bally-Cuif, L. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (*slc6a4a/b*) gene expression in the zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* **511**, 521–542 (2008).
140. Meda, F. *et al.* Nerves Control Redox Levels in Mature Tissues Through Schwann Cells and Hedgehog Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* **24**, 299–311 (2016).
141. Mahmoud, A. I. *et al.* Nerves Regulate Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Developmental Cell* **34**, 387–399 (2015).
142. Rampon, C., Gauron, C., Meda, F., Volovitch, M. & Vriza, S. Adenosine enhances progenitor cell recruitment and nerve growth via its A2B receptor during adult fin regeneration. *Purinergic Signal* **10**, 595–602 (2014).

143. Simões, M. G. *et al.* Denervation impairs regeneration of amputated zebrafish fins. *BMC Dev Biol* **14**, 49 (2014).
144. Cucchiaro, G. *et al.* Evaluation of selective liver denervation methods. *Am. J. Physiol.* **259**, G781-785 (1990).
145. Hamada, T. *et al.* The effect of denervation on liver regeneration in partially hepatectomized rats. *J. Surg. Res.* **142**, 170–174 (2007).
146. Kato, H. & Shimazu, T. Effect of autonomic denervation on DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. *Eur. J. Biochem.* **134**, 473–478 (1983).
147. Mizutani, T. *et al.* Calcitonin gene-related peptide regulates the early phase of liver regeneration. *J. Surg. Res.* **183**, 138–145 (2013).
148. Mong, F. S. F. Histological and histochemical studies on the nervous influence on minced muscle regeneration of triceps surae of the rat,. *J. Morphol.* **151**, 451–462 (1977).
149. Mufti, S. A., Carlson, B. M., Maxwell, L. C. & Faulkner, J. A. The free autografting of entire limb muscles in the cat: Morphology. *Anat. Rec.* **188**, 417–429 (1977).
150. Salonen, V., Lehto, M., Kalimo, M., Penttinen, R. & Aro, H. Changes in intramuscular collagen and fibronectin in denervation atrophy. *Muscle Nerve* **8**, 125–131 (1985).
151. Virtanen, P., Tolonen, U., Savolainen, J. & Takala, T. E. Effect of reinnervation on collagen synthesis in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* **72**, 2069–2074 (1992).
152. Fanbin, M. *et al.* Role of transforming growth factor- β 1 in the process of fibrosis of denervated skeletal muscle. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **31**, 77–82 (2011).
153. Wong, A. & Pomerantz, J. H. The Role of Muscle Stem Cells in Regeneration and Recovery after Denervation: A Review. *Plastic and Reconstructive Surgery* **143**, 779–788 (2019).
154. Mohammad, K. S. & Neufeld, D. A. Denervation retards but does not prevent toetip regeneration. *Wound Repair Regen* **8**, 277–281 (2000).
155. Takeo, M. *et al.* Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration. *Nature* **499**, 228–232 (2013).
156. Johnston, A. P. W. *et al.* Dedifferentiated Schwann Cell Precursors Secreting Paracrine Factors Are Required for Regeneration of the Mammalian Digit Tip. *Cell Stem Cell* **19**, 433–448 (2016).
157. Treede, R. D., Kief, S., Hölzer, T. & Bromm, B. Late somatosensory evoked cerebral potentials in response to cutaneous heat stimuli. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **70**, 429–441 (1988).
158. Holzer, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* **24**, 739–768 (1988).
159. Basson, M. D. & Burney, R. E. Defective wound healing in patients with paraplegia and quadriplegia. *Surg Gynecol Obstet* **155**, 9–12 (1982).
160. Kjartansson, J. & Dalsgaard, C. J. Calcitonin gene-related peptide increases survival of a musculocutaneous critical flap in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **142**, 355–358 (1987).
161. Engin, C., Demirkan, F., Ayhan, S., Atabay, K. & Baran, N. K. Delayed effect of denervation on wound contraction in rat skin. *Plast. Reconstr. Surg.* **98**, 1063–1067 (1996).
162. Benemei, S., Nicoletti, P., Capone, J. G. & Geppetti, P. CGRP receptors in the control of pain and inflammation. *Current Opinion in Pharmacology* **9**, 9–14 (2009).
163. Bossaller, C. *et al.* In vivo measurement of endothelium-dependent vasodilation with substance P in man. *Herz* **17**, 284–290 (1992).
164. Carr, R. W., Delaney, C. A., Westerman, R. A. & Roberts, R. G. Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. *Neuroreport* **4**, 467–470 (1993).

165. Smith, P. & Liu, M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell and Tissue Research* **307**, 281–291 (2002).
166. Rook, J. M., Hasan, W. & McCarron, K. E. Morphine-induced early delays in wound closure: Involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. *Biochemical Pharmacology* **77**, 1747–1755 (2009).
167. Martínez-Martínez, E., Galván-Hernández, C. I., Toscano-Márquez, B. & Gutiérrez-Ospina, G. Modulatory role of sensory innervation on hair follicle stem cell progeny during wound healing of the rat skin. *PLoS ONE* **7**, e36421 (2012).
168. Metchnikoff: Untersuchungen über die mesodermalen... - Google Scholar. https://scholar.google.com/scholar_lookup?hl=en&publication_year=1883&pages=560-5&author=E+Metchnikoff&title=Untersuchung+%C3%BCber+die+mesodermalen+Phagocyten+einger+Wirbeltiere.
169. Chaplin, D. D. Overview of the Immune Response. *J Allergy Clin Immunol* **125**, S3-23 (2010).
170. Horckmans, M. *et al.* Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J* ehw002 (2016) doi:10.1093/eurheartj/ehw002.
171. Jun, J.-I., Kim, K.-H. & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 mediates neutrophil efferocytosis in cutaneous wound healing. *Nat Commun* **6**, 7386 (2015).
172. Ogle, M. E., Segar, C. E., Sridhar, S. & Botchwey, E. A. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **241**, 1084–1097 (2016).
173. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration | Elsevier Enhanced Reader. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S000294401500320X?token=09DEF29201D58891646FE12C44133ED8273E2746D3FE283D47CCBFE6D56B1678A4666846355EFECE8E08B7A113AD8560> doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.001.
174. Phillipson, M. & Kubes, P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* **17**, 1381–1390 (2011).
175. Lin, T.-C. *et al.* Neutrophil-mediated secretion and activation of matrix metalloproteinase-9 during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesth. Analg.* **100**, 1554–1560 (2005).
176. Auffray, C., Sieweke, M. H. & Geissmann, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 669–692 (2009).
177. Hassnain Waqas, S. F. *et al.* Adipose tissue macrophages develop from bone marrow-independent progenitors in *Xenopus laevis* and mouse. *J Leuk Biol* **102**, 845–855 (2017).
178. Schulz, C. *et al.* A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* **336**, 86–90 (2012).
179. Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
180. Cavaillon, J.-M. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *Journal of Leukocyte Biology* **90**, 413–424 (2011).
181. Zhang, J.-M. & An, J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* **45**, 27–37 (2007).
182. Leonard, W. J. & Lin, J.-X. Cytokine receptor signaling pathways. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **105**, 877–888 (2000).
183. Wang, X., Lupardus, P., LaPorte, S. L. & Garcia, K. C. Structural Biology of Shared Cytokine Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 29–60 (2009).

184. Krishnaswamy, G., Kelley, J., Yerra, L., Smith, J. K. & Chi, D. S. Human Endothelium as a Source of Multifunctional Cytokines: Molecular Regulation and Possible Role in Human Disease. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **19**, 91–104 (1999).
185. Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L. & Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**, 2409–2415 (1995).
186. Dinarello, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest* **118**, 503–508 (2000).
187. Brown, M. A. & Hural, J. Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit. Rev. Immunol.* **17**, 1–32 (1997).
188. Wang, P., Wu, P., Siegel, M. I., Egan, R. W. & Billah, M. M. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**, 9558–9563 (1995).
189. Cavaillon, J. M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **47**, 695–702 (2001).
190. Khanapure, S., Garvey, D., Janero, D. & Gordon Letts, L. Eicosanoids in Inflammation: Biosynthesis, Pharmacology, and Therapeutic Frontiers. *CTMC* **7**, 311–340 (2007).
191. Shinomiya, S. *et al.* Regulation of TNF α and interleukin-10 production by prostaglandins I(2) and E(2): studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 1153–1160 (2001).
192. Treffkorn, L., Scheibe, R., Maruyama, T. & Dieter, P. PGE₂ exerts its effect on the LPS-induced release of TNF- α , ET-1, IL-1 α , IL-6 and IL-10 via the EP₂ and EP₄ receptor in rat liver macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **74**, 113–123 (2004).
193. Dey, I., Lejeune, M. & Chadee, K. Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* **149**, 611–623 (2006).
194. Chen, H. *et al.* Prostaglandin E₂ mediates sensory nerve regulation of bone homeostasis. *Nat Commun* **10**, 181 (2019).
195. Lin, C.-R. *et al.* Prostaglandin E₂ receptor EP₄ contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **319**, 1096–1103 (2006).
196. Moriyama, T. *et al.* Sensitization of TRPV1 by EP₁ and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain* **1**, 3 (2005).
197. Buckley, C. D., Gilroy, D. W. & Serhan, C. N. Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity* **40**, 315–327 (2014).
198. Sumimoto, H., Takeshige, K., Sakai, H. & Minakami, S. A cell-free preparation of human neutrophils catalyzing NADPH-dependent conversion of leukotriene B₄. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **125**, 615–621 (1984).
199. Freinbichler, W. *et al.* Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2067–2079 (2011).
200. Babior, B. M., Kipnes, R. S. & Curnutte, J. T. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**, 741–744 (1973).
201. Holmdahl, R., Sareila, O., Olsson, L. M., Bäckdahl, L. & Wing, K. Ncf1 polymorphism reveals oxidative regulation of autoimmune chronic inflammation. *Immunol. Rev.* **269**, 228–247 (2016).
202. Lam, G. Y., Huang, J. & Brumell, J. H. The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Semin Immunopathol* **32**, 415–430 (2010).

203. Yan, B. *et al.* Il-1 β and Reactive Oxygen Species Differentially Regulate Neutrophil Directional Migration and Basal Random Motility in a Zebrafish Injury–Induced Inflammation Model. *J.I.* **192**, 5998–6008 (2014).
204. Andersson, U., Yang, H. & Harris, H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Seminars in Immunology* **38**, 40–48 (2018).
205. Schiraldi, M. *et al.* HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med* **209**, 551–563 (2012).
206. Venereau, E., Schiraldi, M., Uguccioni, M. & Bianchi, M. E. HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation. *Molecular Immunology* **55**, 76–82 (2013).
207. Venereau, E. *et al.* Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med* **209**, 1519–1528 (2012).
208. Kokkola, R. *et al.* RAGE is the Major Receptor for the Proinflammatory Activity of HMGB1 in Rodent Macrophages. *Scand J Immunol* **61**, 1–9 (2005).
209. Sachdev, U. *et al.* High mobility group box 1 promotes endothelial cell angiogenic behavior in vitro and improves muscle perfusion in vivo in response to ischemic injury. *Journal of Vascular Surgery* **55**, 180–191 (2012).
210. Vénéreau, E., Ceriotti, C. & Bianchi, M. E. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol* **6**, 422 (2015).
211. Tirone, M. *et al.* High mobility group box 1 orchestrates tissue regeneration via CXCR4. *J Exp Med* **215**, 303–318 (2018).
212. Feng, J. *et al.* Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J. Lipid Res.* **41**, 688–696 (2000).
213. Furze, R. C. & Rankin, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* **125**, 281–288 (2008).
214. Lee, J. *et al.* A scaffold for signaling of Tim-4-mediated efferocytosis is formed by fibronectin. *Cell Death Differ* **26**, 1646–1655 (2019).
215. Ferracini, M., Rios, F. J. O., Pecenin, M. & Jancar, S. Clearance of Apoptotic Cells by Macrophages Induces Regulatory Phenotype and Involves Stimulation of CD36 and Platelet-Activating Factor Receptor. *Mediators of Inflammation* **2013**, 1–8 (2013).
216. Ravichandran, K. S. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J. Exp. Med.* **207**, 1807–1817 (2010).
217. Gordon, S. & Plüddemann, A. Macrophage Clearance of Apoptotic Cells: A Critical Assessment. *Front. Immunol.* **9**, 127 (2018).
218. Zhang, S. *et al.* Efferocytosis Fuels Requirements of Fatty Acid Oxidation and the Electron Transport Chain to Polarize Macrophages for Tissue Repair. *Cell Metabolism* **29**, 443-456.e5 (2019).
219. Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T. & Castegna, A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol* **10**, (2019).
220. Opal, S. M. & DePalo, V. A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* **117**, 1162–1172 (2000).
221. Rajakariar, R. *et al.* Novel biphasic role for lymphocytes revealed during resolving inflammation. *Blood* **111**, 4184–4192 (2008).
222. Niethammer, P., Grabher, C., Look, A. T. & Mitchison, T. J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* **459**, 996–999 (2009).
223. Zhang, Q. *et al.* Reactive oxygen species generated from skeletal muscles are required for gecko tail regeneration. *Sci Rep* **6**, 20752 (2016).

224. Labit, E. *et al.* Opioids prevent regeneration in adult mammals through inhibition of ROS production. *Sci Rep* **8**, 12170 (2018).
225. Yang, W. *et al.* Neutrophils promote the development of reparative macrophages mediated by ROS to orchestrate liver repair. *Nat Commun* **10**, 1076 (2019).
226. Matthews, J. D. *et al.* Neutrophil-Derived Reactive Oxygen Orchestrates Epithelial Cell Signaling Events during Intestinal Repair. *The American Journal of Pathology* **189**, 2221–2232 (2019).
227. Daly, J. M. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Yearbook of Surgery* **2010**, 220–221 (2010).
228. Robertson, A. L. *et al.* A Zebrafish Compound Screen Reveals Modulation of Neutrophil Reverse Migration as an Anti-Inflammatory Mechanism. *Science Translational Medicine* **6**, 225ra29-225ra29 (2014).
229. Simkin, J. *et al.* Macrophages are required to coordinate mouse digit tip regeneration. *Development* **144**, 3907–3916 (2017).
230. LeBert, D. C. *et al.* Matrix metalloproteinase 9 modulates collagen matrices and wound repair. *Development* **142**, 2136–2146 (2015).
231. Caldeira, J., Sousa, A., Sousa, D. M. & Barros, D. Extracellular matrix constitution and function for tissue regeneration and repair. in *Peptides and Proteins as Biomaterials for Tissue Regeneration and Repair* 29–72 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-08-100803-4.00002-4.
232. Aurora, A. B. *et al.* Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J. Clin. Invest.* **124**, 1382–1392 (2014).
233. 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 (2013).
234. Petrie, T. A., Strand, N. S., Yang, C.-T., Rabinowitz, J. S. & Moon, R. T. Macrophages modulate adult zebrafish tail fin regeneration. *Development* **142**, 406–406 (2015).
235. Aztekin, C. *et al.* The myeloid lineage is required for the emergence of a regeneration-permissive environment following *Xenopus* tail amputation. *Development* **147**, dev185496 (2020).
236. Tsarouchas, T. M. *et al.* Dynamic control of proinflammatory cytokines Il-1 β and Tnf- α by macrophages in zebrafish spinal cord regeneration. *Nat Commun* **9**, 4670 (2018).
237. Zhang, Y. *et al.* Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science* **348**, aaa2340–aaa2340 (2015).
238. Chu, C., Artis, D. & Chiu, I. M. Neuro-immune Interactions in the Tissues. *Immunity* **52**, 464–474 (2020).
239. Suvas, S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J.I.* **199**, 1543–1552 (2017).
240. Pinho-Ribeiro, F. A., Verri, W. A. & Chiu, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology* **38**, 5–19 (2017).
241. Corder, G., Castro, D. C., Bruchas, M. R. & Scherrer, G. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu. Rev. Neurosci.* **41**, 453–473 (2018).
242. Koneru, A., Satyanarayana, S. & Rizwan, S. M. Endogenous Opioids: Their Physiological Role and Receptors. [/paper/Endogenous-Opioids%3A-Their-Physiological-Role-and-Koneru-Satyanarayana/e83a851842f363f7e7f561c5ca465df9578d6bbc](#) (2009).
243. Dubin, A. E. & Patapoutian, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest* **120**, 3760–3772 (2010).
244. Cheng, J.-K. & Ji, R.-R. Intracellular Signaling in Primary Sensory Neurons and Persistent Pain. *Neurochem Res* **33**, 1970–1978 (2008).

245. Hwang, S. W. & Oh, U. Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons: *Current Opinion in Anaesthesiology* **20**, 427–434 (2007).
246. Marra, S. *et al.* Non-acidic activation of pain-related Acid-Sensing Ion Channel 3 by lipids. *EMBO J* **35**, 414–428 (2016).
247. Saghatelian, A., McKinney, M. K., Bandell, M., Patapoutian, A. & Cravatt, B. F. A FAAH-Regulated Class of *N*-Acyl Taurines That Activates TRP Ion Channels[†]. *Biochemistry* **45**, 9007–9015 (2006).
248. Cox, J. J. *et al.* An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* **444**, 894–898 (2006).
249. Dib-Hajj, S. D. *et al.* Paroxysmal extreme pain disorder M1627K mutation in human Nav1.7 renders DRG neurons hyperexcitable. *Mol Pain* **4**, 37 (2008).
250. Nassar, M. A. *et al.* Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 12706–12711 (2004).
251. Akopian, A. N. *et al.* The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat. Neurosci.* **2**, 541–548 (1999).
252. Malsch, P. *et al.* Deletion of interleukin-6 signal transducer gp130 in small sensory neurons attenuates mechanonociception and down-regulates TRPA1 expression. *J. Neurosci.* **34**, 9845–9856 (2014).
253. Fang, D. *et al.* Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model. *Pain* **156**, 1124–1144 (2015).
254. Binshtok, A. M. *et al.* Nociceptors Are Interleukin-1 Sensors. *Journal of Neuroscience* **28**, 14062–14073 (2008).
255. Bautista, D. M. *et al.* TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269–1282 (2006).
256. Matsumiya, L. C. *et al.* Using the Mouse Grimace Scale to Reevaluate the Efficacy of Postoperative Analgesics in Laboratory Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **51**, 42–49 (2012).
257. Kaur, J. *et al.* Opioid Peptides: An Overview of Functional Significance. *Int J Pept Res Ther* **26**, 33–41 (2020).
258. Kapitzke, D., Vetter, I. & Cabot, P. J. Endogenous opioid analgesia in peripheral tissues and the clinical implications for pain control. *Ther Clin Risk Manag* **1**, 279–297 (2005).
259. Rittner, H. L. *et al.* Opioid Peptide-expressing Leukocytes: Identification, Recruitment, and Simultaneously Increasing Inhibition of Inflammatory Pain. *Anesthesiology* **95**, 500–508 (2001).
260. Brack, A. *et al.* Tissue Monocytes/Macrophages in Inflammation: Hyperalgesia versus Opioid-mediated Peripheral Antinociception. *Anesthesiology* **101**, 204–211 (2004).
261. Rittner, H. L. *et al.* Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *FASEB j.* **20**, 2627–2629 (2006).
262. Chaturvedi, K., Christoffers, K. H., Singh, K. & Howells, R. D. Structure and regulation of opioid receptors. *Peptide Science* **55**, 334–346 (2000).
263. Cullen, J. M. & Cascella, M. *Physiology, Enkephalin*. *StatPearls [Internet]* (StatPearls Publishing, 2020).
264. Shanmugam, V. K., Couch, K. S., McNish, S. & Amdur, R. L. Relationship between opioid treatment and rate of healing in chronic wounds: Opioids in chronic wounds. *Wound Rep and Reg* **25**, 120–130 (2017).

265. Zagon, I. S., Sassani, J. W., Immonen, J. A. & McLaughlin, P. J. Ocular surface abnormalities related to type 2 diabetes are reversed by the opioid antagonist naltrexone: NTX repairs corneal surface epithelium. *Clin Experiment Ophthalmol* **42**, 159–168 (2014).
266. Zagon, I. S. *et al.* Opioid growth factor ([Met⁵]enkephalin) prevents the incidence and retards the growth of human colon cancer. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **271**, R780–R786 (1996).
267. Spampinato, S., Bedini, A. & Baiula, M. Prodynorphin-Derived Peptides. in *Handbook of Biologically Active Peptides* 1596–1601 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-385095-9.00218-9.
268. Houtani, T. *et al.* Distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor protein and receptor in brain and spinal cord: a study using in situ hybridization and X-gal histochemistry in receptor-deficient mice. *J. Comp. Neurol.* **424**, 489–508 (2000).
269. Fiset, M.-É., Gilbert, C., Poubelle, P. E. & Pouliot, M. Human Neutrophils as a Source of Nociceptin: A Novel Link between Pain and Inflammation^{†, ‡}. *Biochemistry* **42**, 10498–10505 (2003).
270. Mollereau, C. & Mouldous, L. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* **21**, 907–917 (2000).
271. Meunier, J.-C. *et al.* Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377**, 532–535 (1995).
272. Krishnamurti, C. & Rao, S. C. The isolation of morphine by Serturmer. *Indian J Anaesth* **60**, 861–862 (2016).
273. Streicher, J. M. & Bilsky, E. J. Peripherally Acting μ -Opioid Receptor Antagonists for the Treatment of Opioid-Related Side Effects: Mechanism of Action and Clinical Implications. *J Pharm Pract* **31**, 658–669 (2018).
274. Morgan, M. M. & Christie, M. J. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1322–1334 (2011).
275. Sacerdote, P. Opioid-induced immunosuppression. *Curr Opin Support Palliat Care* **2**, 14–18 (2008).
276. Pert, C. B. & Snyder, S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* **179**, 1011–1014 (1973).
277. Larhammar, D., Bergqvist, C. & Sundström, G. Ancestral Vertebrate Complexity of the Opioid System. in *Vitamins & Hormones* vol. 97 95–122 (Elsevier, 2015).
278. Connor, M. & Christie, M. J. Opioid Receptor Signalling Mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **26**, 493–499 (1999).
279. Eisenstein, T. K. The Role of Opioid Receptors in Immune System Function. *Front Immunol* **10**, (2019).
280. Higuchi, S., Li, M., Zhu, P. & Ashraf, M. Delta-Opioid Receptor Activation Promotes Mesenchymal Stem Cell Survival via PKC/STAT3 Signaling Pathway. *Circ J* **76**, 204–212 (2012).
281. Al-Hasani, R. & Bruchas, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology* **115**, 1363–1381 (2011).
282. Bruchas, M. R. & Chavkin, C. Kinase Cascades and Ligand-Directed Signaling at the Kappa Opioid Receptor. *Psychopharmacology (Berl)* **210**, 137–147 (2010).
283. Marie, N., Aguila, B. & Allouche, S. Tracking the opioid receptors on the way of desensitization. *Cell. Signal.* **18**, 1815–1833 (2006).

284. Baillie, L. D., Schmidhammer, H. & Mulligan, S. J. Peripheral μ -opioid receptor mediated inhibition of calcium signaling and action potential-evoked calcium fluorescent transients in primary afferent CGRP nociceptive terminals. *Neuropharmacology* **93**, 267–273 (2015).
285. Leenders, A. G. M. & Sheng, Z.-H. Modulation of neurotransmitter release by the second messenger-activated protein kinases: Implications for presynaptic plasticity. *Pharmacol Ther* **105**, 69–84 (2005).
286. Brodin, E., Gazelius, B., Panopoulos, P. & Olgart, L. Morphine inhibits substance P release from peripheral sensory nerve endings. *Acta Physiologica Scandinavica* **117**, 567–570 (1983).
287. Tumati, S., Roeske, W. R., Vanderah, T. W. & Varga, E. V. Sustained morphine treatment augments prostaglandin E₂-evoked Calcitonin Gene-Related Peptide release from primary sensory neurons in a PKA- dependent manner. *Eur J Pharmacol* **648**, 95–101 (2010).
288. Ma, W., Dumont, Y., Vercauteren, F. & Quirion, R. Lipopolysaccharide induces calcitonin gene-related peptide in the RAW264.7 macrophage cell line. *Immunology* **130**, 399–409 (2010).
289. Wybran, J., Appelboom, T., Famaey, J. P. & Govaerts, A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J. Immunol.* **123**, 1068–1070 (1979).
290. Rosettes immunes (technique des) - Dictionnaire médical. <https://www.dictionnaire-medical.net/term/51507,1,xhtml>.
291. Roy, S. & Loh, H. H. Effects of opioids on the immune system. *Neurochem Res* **21**, 1375–1386 (1996).
292. Liang, X., Liu, R., Chen, C., Ji, F. & Li, T. Opioid System Modulates the Immune Function: A Review. *Transl Perioper Pain Med* **1**, 5–13 (2016).
293. Martin, J. L. *et al.* Chronic Morphine Administration Delays Wound Healing by Inhibiting Immune Cell Recruitment to the Wound Site. *Am J Pathol* **176**, 786–799 (2010).
294. Grimm, M. C. *et al.* Opiate Inhibition of Chemokine-Induced Chemotaxis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **840**, 9–20 (1998).
295. Stefano, G. B., Leung, M. K., Bilfinger, T. V. & Scharrer, B. Effect of prolonged exposure to morphine on responsiveness of human and invertebrate immunocytes to stimulatory molecules. *Journal of Neuroimmunology* **63**, 175–181 (1995).
296. Kulkarni-Narla, A., Walcheck, B. & Brown, D. R. Opioid receptors on bone marrow neutrophils modulate chemotaxis and CD11b/CD18 expression. *European Journal of Pharmacology* **414**, 289–294 (2001).
297. Simpkins, C. O., Alailima, S. T. & Tate, E. A. Inhibition by naloxone of neutrophil superoxide release: a potentially useful antiinflammatory effect. *Circ. Shock* **20**, 181–191 (1986).
298. Tubaro, E., Borelli, G., Croce, C., Cavallo, G. & Santiangeli, C. Effect of morphine on resistance to infection. *J. Infect. Dis.* **148**, 656–666 (1983).
299. Rojavin, M. *et al.* Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. *Life Sci.* **53**, 997–1006 (1993).
300. Ninković, J. & Roy, S. Role of the mu opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids* **45**, 9–24 (2013).
301. Tomassini, N., Renaud, F., Roy, S. & Loh, H. H. Morphine inhibits Fc-mediated phagocytosis through mu and delta opioid receptors. *J. Neuroimmunol.* **147**, 131–133 (2004).
302. Barlass, U. *et al.* Morphine worsens the severity and prevents pancreatic regeneration in mouse models of acute pancreatitis. *Gut* [gutjnl-2017-313717](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313717) (2017) doi:10.1136/gutjnl-2017-313717.

303. Rook, J. M. & McCarson, K. E. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. *Biochemical Pharmacology* **74**, 752–757 (2007).
304. Rook, J. M., Hasan, W. & McCarson, K. E. Temporal Effects of Topical Morphine Application on Cutaneous Wound Healing: *Anesthesiology* **109**, 130–136 (2008).
305. Inturrisi, C. E. Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clin J Pain* **18**, S3-13 (2002).
306. Ikeda, K., Maretich, P. & Kajimura, S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **29**, 191–200 (2018).
307. Lorsignol, A., Labit, E., Rabiller, L. & Pénicaud, L. Système nerveux et tissus adipeux : une histoire de dialogues. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* S0007996020300663 (2020) doi:10.1016/j.cnd.2020.03.008.
308. Liu, R.-H., Mizuta, M. & Matsukura, S. The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 52–58 (2004).
309. Giordano, A., Morroni, M., Santone, G., Marchesi, G. F. & Cinti, S. Tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, substance P, calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in nerves of rat periovarian adipose tissue: an immunohistochemical and ultrastructural investigation. *J. Neurocytol.* **25**, 125–136 (1996).
310. Rosenfeld, M. G. *et al.* Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* **304**, 129–135 (1983).
311. Bowers, R. R. *et al.* Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **286**, R1167-1175 (2004).
312. Youngstrom, T. G. & Bartness, T. J. Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *Am. J. Physiol.* **268**, R744-751 (1995).
313. Bamshad, M., Aoki, V. T., Adkison, M. G., Warren, W. S. & Bartness, T. J. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **275**, R291–R299 (1998).
314. Brain, S. D., Williams, T. J., Tippins, J. R., Morris, H. R. & MacIntyre, I. Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* **313**, 54–56 (1985).
315. Delay-Goyet, P., Satoh, H. & Lundberg, J. M. Relative involvement of substance P and CGRP mechanisms in antidromic vasodilation in the rat skin. *Acta Physiol. Scand.* **146**, 537–538 (1992).
316. von Moltke, J. & Locksley, R. M. I-L-C-2 it: type 2 immunity and group 2 innate lymphoid cells in homeostasis. *Current Opinion in Immunology* **31**, 58–65 (2014).
317. Kenney, M. J. & Ganta, C. K. Autonomic nervous system and immune system interactions. *Compr Physiol* **4**, 1177–1200 (2014).
318. Fabbiano, S. *et al.* Caloric Restriction Leads to Browning of White Adipose Tissue through Type 2 Immune Signaling. *Cell Metabolism* **24**, 434–446 (2016).
319. Liu, R. & Nikolajczyk, B. S. Tissue Immune Cells Fuel Obesity-Associated Inflammation in Adipose Tissue and Beyond. *Front Immunol* **10**, 1587 (2019).
320. Poglio, S. *et al.* In situ production of innate immune cells in murine white adipose tissue. *Blood* **120**, 4952–4962 (2012).
321. Phinney, D. G. & Prockop, D. J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair-Current Views. *Stem Cells* **25**, 2896–2902 (2007).
322. Fajardo-Orduña, G. R., Mayani, H. & Montesinos, J. J. Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. *Archives of Medical Research* **46**, 589–596 (2015).

323. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6557979/>.
324. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinkas, A., Slaby, O. & Michalek, J. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells and Development* **21**, 2724–2752 (2012).
325. Bura, A. *et al.* Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy* **16**, 245–257 (2014).
326. Bansal, H. *et al.* Intra-articular injection in the knee of adipose derived stromal cells (stromal vascular fraction) and platelet rich plasma for osteoarthritis. *J Transl Med* **15**, 141 (2017).
327. Lemaitre, M. *et al.* Periodontal Tissue Regeneration Using Syngeneic Adipose-Derived Stromal Cells in a Mouse Model. *Stem Cells Transl Med* **6**, 656–665 (2017).
328. Coleman, S. R. & Katznel, E. B. Fat Grafting for Facial Filling and Regeneration. *Clinics in Plastic Surgery* **42**, 289–300 (2015).
329. Abu-Ghname, A., Perdanasari, A. T. & Reece, E. M. Principles and Applications of Fat Grafting in Plastic Surgery. *Semin Plast Surg* **33**, 147–154 (2019).
330. Luche, E. *et al.* Corrupted adipose tissue endogenous myelopoiesis initiates diet-induced metabolic disease. *eLife* **6**, e23194 (2017).
331. Ngkelo, A. *et al.* Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J Exp Med* **213**, 1353–1374 (2016).
332. Sawant, K. V. *et al.* Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Sci Rep* **6**, 33123 (2016).
333. Lewanowitsch, T. & Irvine, R. J. Naloxone and its quaternary derivative, naloxone methiodide, have differing affinities for m, d, and k opioid receptors in mouse brain homogenates. *Brain Research* **4** (2003).
334. Fadok, V. A., Warner, M. L., Bratton, D. L. & Henson, P. M. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J. Immunol.* **161**, 6250–6257 (1998).
335. Croasdell, A. *et al.* PPAR γ and the Innate Immune System Mediate the Resolution of Inflammation. *PPAR Research* **2015**, 1–20 (2015).
336. Fu, Y. *et al.* Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* **23**, 515–528 (2017).
337. Feng, L. *et al.* HMGB1 promotes the secretion of multiple cytokines and potentiates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine* **12**, 3941–3947 (2016).
338. Parish, C. R. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 499–508 (1999).
339. Simões, M. G. *et al.* Denervation impairs regeneration of amputated zebrafish fins. *BMC Dev Biol* **14**, 49 (2014).
340. Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction: The MRL-lpr mouse strain as a model.
341. Sakić, B. *et al.* A behavioral profile of autoimmune lupus-prone MRL mice. *Brain Behav. Immun.* **6**, 265–285 (1992).
342. Gao, H.-X. *et al.* Depression is an Early Disease Manifestation in Lupus-Prone MRL/lpr Mice. *J Neuroimmunol* **207**, 45–56 (2009).

343. Martin, M., Matifas, A., Maldonado, R. & Kieffer, B. L. Acute antinociceptive responses in single and combinatorial opioid receptor knockout mice: distinct mu, delta and kappa tones. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 701–708 (2003).
344. Vaughan, C. H., Zarebidaki, E., Ehlen, J. C. & Bartness, T. J. Analysis and Measurement of the Sympathetic and Sensory Innervation of White and Brown Adipose Tissue. in *Methods in Enzymology* vol. 537 199–225 (Elsevier, 2014).
345. Toda, M. *et al.* Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **62**, 352–359 (2008).
346. Zhao, J. & Levy, D. The CGRP receptor antagonist BIBN4096 inhibits prolonged meningeal afferent activation evoked by brief local K⁺ stimulation but not cortical spreading depression-induced afferent sensitization. *Pain Rep* **3**, e632 (2018).
347. Laschinger, M. *et al.* The CGRP receptor component RAMP1 links sensory innervation with YAP activity in the regenerating liver. *FASEB j.* fj.201903200R (2020) doi:10.1096/fj.201903200R.
348. Z, W. *et al.* [Calcitonin gene-related peptide promoting migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells and stimulating expression of vascular endothelial growth factor]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* **25**, 1371–1376 (2011).
349. Zhang, Y. *et al.* Calcitonin gene-related peptide is a key factor in the homing of transplanted human MSCs to sites of spinal cord injury. *Sci Rep* **6**, 27724 (2016).
350. Ogoshi, M., Inoue, K. & Takei, Y. Identification of a novel adrenomedullin gene family in teleost fish. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311**, 1072–1077 (2003).
351. Wang, D. *et al.* Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits. *Neuron* **98**, 90–108.e5 (2018).
352. Nguyen-Chi, M. *et al.* TNF signaling and macrophages govern fin regeneration in zebrafish larvae. *Cell Death Dis* **8**, e2979–e2979 (2017).
353. Karin, M. & Clevers, H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* **529**, 307–315 (2016).
354. Azuma, Y., Wang, P.-L., Shinohara, M. & Ohura, K. Immunomodulation of the neutrophil respiratory burst by endomorphins 1 and 2. *Immunology Letters* **75**, 55–59 (2000).
355. Saxena, S., Vekaria, H., Sullivan, P. G. & Seifert, A. W. Connective tissue fibroblasts from highly regenerative mammals are refractory to ROS-induced cellular senescence. *Nat Commun* **10**, 4400 (2019).
356. Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V. & Budinger, G. R. S. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* **129**, 2619–2628 (2019).
357. Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J. & Saltiel, A. R. Phenotypic Switching of Adipose Tissue Macrophages With Obesity Is Generated by Spatiotemporal Differences in Macrophage Subtypes. *Diabetes* **57**, 3239–3246 (2008).
358. Duffield, J. S. *et al.* Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* **115**, 56–65 (2005).
359. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
360. Tan, Z. *et al.* The monocarboxylate transporter 4 is required for glycolytic reprogramming and inflammatory response in macrophages. *J. Biol. Chem.* **290**, 46–55 (2015).
361. Chang, H. Y., Lee, H.-N., Kim, W. & Surh, Y.-J. Docosahexaenoic acid induces M2 macrophage polarization through peroxisome proliferator-activated receptor γ activation. *Life Sci.* **120**, 39–47 (2015).

362. Croasdell, A. *et al.* PPAR γ and the Innate Immune System Mediate the Resolution of Inflammation. *PPAR Res* **2015**, (2015).
363. Foster, M. T. & Bartness, T. J. Sympathetic but not sensory denervation stimulates white adipocyte proliferation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **291**, R1630–R1637 (2006).
364. Harris, R. B. S. Denervation as a tool for testing sympathetic control of white adipose tissue. *Physiol. Behav.* **190**, 3–10 (2018).
365. Nguyen, N. L. T., Xue, B. & Bartness, T. J. Sensory denervation of inguinal white fat modifies sympathetic outflow to white and brown fat in Siberian hamsters. *Physiol. Behav.* **190**, 28–33 (2018).
366. Gogas, K. R., Presley, R. W., Levine, J. D. & Basbaum, A. I. The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and c-fos expression. *Neuroscience* **42**, 617–628 (1991).
367. Stein, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1685–1690 (1995).
368. Linscheid, P., Seboek, D., Zulewski, H., Keller, U. & Müller, B. Autocrine/Paracrine Role of Inflammation-Mediated Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin Expression in Human Adipose Tissue. *Endocrinology* **146**, 2699–2708 (2005).
369. González-Cano, R. *et al.* Effects of Tetrodotoxin in Mouse Models of Visceral Pain. *Mar Drugs* **15**, (2017).
370. Sahbaie, P. *et al.* Role of substance P signaling in enhanced nociceptive sensitization and local cytokine production after incision. *Pain* **145**, 341–349 (2009).
371. Tang, Y., Feng, Y. & Wang, X. Calcitonin gene-related peptide potentiates LPS-induced IL-6 release from mouse peritoneal macrophages. *J. Neuroimmunol.* **84**, 207–212 (1998).
372. Gomes, R. N. *et al.* CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE INHIBITS LOCAL ACUTE INFLAMMATION AND PROTECTS MICE AGAINST LETHAL ENDOTOXEMIA: *Shock* **24**, 590–594 (2005).
373. Duan, J.-X. *et al.* Calcitonin gene-related peptide exerts anti-inflammatory property through regulating murine macrophages polarization in vitro. *Molecular Immunology* **91**, 105–113 (2017).
374. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. & Rose-John, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1813**, 878–888 (2011).
375. Chu, C., Artis, D. & Chiu, I. M. Neuro-immune Interactions in the Tissues. *Immunity* **52**, 464–474 (2020).
376. Yadav, D. Cytokines and autoimmunity: redundancy defines their complex nature. *Current Opinion in Immunology* **15**, 697–703 (2003).
377. Godwin, J. W. & Rosenthal, N. Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: immunological influences on regenerative success. *Differentiation* **87**, 66–75 (2014).
378. Illingworth, C. M. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *Journal of Pediatric Surgery* **9**, 853–858 (1974).
379. Neufeld, D. A. & Zhao, W. Bone regrowth after digit tip amputation in mice is equivalent in adults and neonates. *Wound Repair Regen* **3**, 461–466 (1995).
380. Dziedowiec, E. *et al.* Mu Opioid Receptor Agonist DAMGO Produces Place Conditioning, Abstinence-induced Withdrawal, and Naltrexone-Dependent Locomotor Activation in Planarians. *Neuroscience* **386**, 214–222 (2018).
381. Harrison, L. M. *et al.* The opiate system in invertebrates. *Peptides* **15**, 1309–1329 (1994).

382. Walters, E. T. Nociceptive Biology of Molluscs and Arthropods: Evolutionary Clues About Functions and Mechanisms Potentially Related to Pain. *Front. Physiol.* **9**, (2018).
383. Stevens, C., W. The evolution of vertebrate opioid receptors. *Front Biosci* **Volume**, 1247 (2009).
384. Jansen, G. A. & Greene, N. M. Morphine metabolism and morphine tolerance in goldfish. *Anesthesiology* **32**, 231–235 (1970).
385. Chervova, L. S. & Lapshin, D. N. Opioid modulation of pain threshold in fish. *Dokl. Biol. Sci.* **375**, 590–591 (2000).
386. Stevens, C. W. Relative analgesic potency of mu, delta and kappa opioids after spinal administration in amphibians. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 440–448 (1996).
387. Kwok, C. H. T., Devonshire, I. M., Bennett, A. J. & Hathway, G. J. Postnatal maturation of endogenous opioid systems within the periaqueductal grey and spinal dorsal horn of the rat. *Pain* **155**, 168–178 (2014).
388. Jennings, E. & Fitzgerald, M. Postnatal changes in responses of rat dorsal horn cells to afferent stimulation: a fibre-induced sensitization. *The Journal of Physiology* **509**, 859–868 (1998).
389. Marsh, D. F., Hatch, D. J. & Fitzgerald, M. Opioid systems and the newborn. *British Journal of Anaesthesia* **79**, 787–795 (1997).
390. Barr, G. A., Paredes, W., Erickson, K. L. & Zukin, R. S. Kappa opioid receptor-mediated analgesia in the developing rat. *Brain Res.* **394**, 145–152 (1986).
391. Bayon, A., Shoemaker, W. J., Bloom, F. E., Mauss, A. & Guillemin, R. Perinatal development of the endorphin- and enkephalin- containing systems in the rat brain. *Brain Research* **179**, 93–101 (1979).

L'étude des processus de réparation tissulaire constitue, de nos jours, un axe majeur de recherche dans le domaine biomédical. En effet, la capacité d'un tissu à régénérer après une lésion a été progressivement perdue au cours de l'évolution, laissant place au développement d'un tissu fibrotique associé à une perte de fonction, aussi appelé cicatrisation. L'étude de la régénération chez les espèces encore dotées de cette capacité, comme chez l'hydre, le poisson zèbre ou encore la salamandre, a permis de mettre en évidence le rôle substantiel du système immunitaire et de l'innervation. En revanche, la nature du verrou mis en place au cours de l'évolution, empêchant la régénération d'avoir lieu chez le mammifère reste très peu documentée. Des résultats publiés précédemment par mon laboratoire montrent qu'il est possible de déclencher les processus de régénération chez une souris C57BL/6 qui n'en n'est pas capable spontanément, grâce à l'administration d'un antagoniste des récepteurs aux opioïdes, la Naloxone Méthiodide. Les opioïdes exogènes comme la Morphine, en plus des opioïdes sécrétés de façon endogène après une lésion, sont utilisés depuis très longtemps pour prendre en charge la douleur péri-opératoire. Par ailleurs, les opioïdes sont décrits comme étant i) de puissants immunosuppresseurs et ii) capables d'agir sur les fibres sensorielles à l'origine de la perception douloureuse, en inhibant l'activité de ces dernières. Lors de ma thèse nous avons donc proposé que les opioïdes puissent constituer un verrou au processus de régénération chez les mammifères en empêchant la mise en place d'une réponse inflammatoire adéquate et/ou l'activation efficace des fibres sensorielles suite à une lésion. D'une part, nos résultats montrent, i) que la signature cellulaire (neutrophiles, monocytes, macrophages) et moléculaire (cytokines, chimiokines et médiateurs lipidiques) des phases précoces de l'inflammation post-lésionnelle permet de prédire l'issue de la réparation tissulaire (i.e cicatrisation *versus* régénération), ii) que les neutrophiles sont la source cellulaire d'espèces actives de l'oxygène (EAOs) requises pour permettre la régénération et iii) que les macrophages dérivés de l'hématopoïèse endogène du tissu adipeux sous cutané permettent au tissu de régénérer grâce à leur haut potentiel d'élimination des neutrophiles (aussi appelé efférocytose), contrairement aux macrophages d'origine médullaire qui, eux, favorisent la mise en place d'une cicatrice. D'autre part, nous montrons grâce à l'utilisation i) du test comportemental Von Frey classiquement utilisé dans le domaine de la douleur et ii) d'un outil développé au laboratoire basé sur la mesure de la pupille, que la régénération induite après un traitement à la Naloxone Méthiodide est associée à une perception douloureuse significativement augmentée. La douleur pouvant être un reflet de l'activation des fibres sensorielles, nous avons donc spécifiquement détruit ces dernières. Cette dénervation des fibres sensorielles inhibe la régénération induite après un traitement à la Naloxone Méthiodide. Enfin, les fibres sensorielles semblent être indispensables en raison de leur sécrétion locale du neuropeptide CGRP, qui contrôlerait i) la mise en place de la réponse inflammatoire requise à la régénération et ii) le remodelage tissulaire en activant la migration des cellules mésenchymateuses vers le site de lésion. L'ensemble de ces résultats nous permet aujourd'hui de proposer comme traitement péri-opératoire/post-lésionnel, la co-administration de Morphine et de CGRP, permettant ainsi à la régénération tissulaire d'avoir lieu tout en gérant la douleur, chez le mammifère adulte.

Inhibition of regeneration mechanisms and induction of tissue fibrosis are classic outcomes of tissue repair in adult mammals. Because fibrosis leads to loss of tissue function, studying the processes of tissue repair remains a major issue in regenerative medicine. Studying regeneration in species with this ability, such as hydra, planarian, zebrafish or salamander, has highlighted the substantial role of immune system and innervation during regeneration processes. The nature of the locks developed during the evolution that prevent regeneration in mammals remains poorly documented. Previously published results from my laboratory showed that administration of an opioid receptor antagonist, also called Naloxone Methiodide, can induce tissue regeneration in a non-regenerative strain of mice (C57Bl/6). Exogenous opioids such as morphine, in addition to those being endogenously secreted after injury, have been used for decades in the management of perioperative pain. Opioids are also described as i) potent immunosuppressors and ii) able to act on the sensory fibers to silence electrical activity of these fibers. During my thesis, we hypothesized that opioids could be a lock for regeneration processes by preventing an acute and intense inflammatory response and/or the activation of sensory fibers after injury. On one hand, our results demonstrate for the first time in mice, i) that the cellular (neutrophils, monocytes, macrophages) and molecular (cytokines, chemokines and lipid mediators) signature of the early phases of post-lesional inflammation can predict the outcome of tissue repair (i.e scar healing versus regeneration), ii) granulocytes are the cellular source of reactive oxygen species required for regeneration, and iii) that, unlike classical macrophages derived from medullar hematopoiesis which promote scar formation after injury, macrophages derived from endogenous hematopoiesis of subcutaneous adipose tissue allow tissue regeneration thanks to their high neutrophil clearance potential after Naloxone methiodide treatment. On the other hand, by using the behavioral Von Frey test and the measurement of pupil diameter in order to assess pain perception, we also show that the regeneration induced after Naloxone Methiodide treatment is strongly correlated with an increase in pain perception. As pain depend on harmful signals detection by sensory fibers, we specifically destroyed these peripheral neurons. This denervation leads to the inhibition of previously induced tissue regeneration. Moreover, these sensory fibers appear to act through their peripheral secretion of the CGRP neuropeptide. This molecule could control the establishment of adequate inflammatory response and initiate efficient tissue remodeling by activating mesenchymal cells migration to the injured area. Altogether, our results allow us to propose co-administration of Morphine with CGRP as a perioperative/post-lesional treatment allowing tissue regeneration and pain management.