

Université de Montréal

**Étude du rôle de la signalisation canonique des Bmp lors
de la régénération de la patte d'axolotl**

Par Etienne Vincent

Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor*
en Biochimie

Mai 2018

© Etienne Vincent, 2018

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Étude du rôle de la signalisation canonique des Bmp lors de la régénération de la
patte d'axolotl

Présentée par :

Etienne Vincent

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Claude Labbé Ph.D., président-rapporteur

Stéphane Roy Ph.D., directeur de recherche

Antonio Nanci Ph.D., membre du jury

Nicolas Pilon Ph.D., examinateur externe

Jean-Sébastien Delisle Ph.D., représentant du doyen de la FES

Résumé

Les salamandres ont la capacité rare de parfaitement régénérer leurs membres suite à une amputation. Ceci en fait un excellent modèle pour comprendre comment recréer le phénomène chez les humains. Cependant, les mécanismes internes qui permettent la régénération sont encore peu connus. Un nombre limité de gènes a été étudié dans le contexte de la régénération et encore moins ont été le sujet d'analyses fonctionnelles. Les travaux présentés ici se concentrent sur la voie de signalisation canonique des Bmp. Nous démontrons que celle-ci est distincte de la voie de signalisation des Tgf- β . Nous observons que les Bmp, ainsi que plusieurs de leurs cibles potentielles sont exprimées durant la période de redéveloppement du blastème du membre en régénération. En utilisant l'inhibiteur pharmacologique LDN193189, nous explorons les conséquences de la perte de la signalisation canonique des Bmp. Les résultats morphologiques vont d'hypoplasies à l'absence complète de membre régénéré. En limitant les traitements à des périodes spécifiques, on tente de séparer temporellement les différents rôles des Bmp. Nous trouvons que la signalisation des Bmp est effectivement requise pour l'expression de plusieurs des gènes sélectionnés, mais seulement à des stades spécifiques. La signalisation des Bmp maintient l'expression des gènes *Msx*, qui sont requis pour la prolifération durant la phase de croissance du blastème. Elle est aussi requise pour l'induction de *Fgf8* et *Shh* durant la formation initiale du patron de développement. Les gènes chondrogéniques dépendent également de la signalisation des Bmp, mais seulement aux stades plus tardifs. En traitant les axolotls avec le LDN193189 à différents temps durant la régénération, nous montrons également que la régénération du membre procède clairement du proximal vers le distal, allant à l'encontre d'une vision de la régénération qui persiste depuis 50 ans, c'est-à-dire l'intercalation. Nos résultats suggèrent également que le patron antéro-postérieur est déterminé durant une courte période de temps. Ceci démontre que les Bmp jouent un rôle majeur dans la formation de patron durant la régénération et que le processus est progressif comme durant le développement.

Mots-clés : Régénération, développement, axolotl, Bmp, signalisation, inhibiteur pharmacologique, *Msx*, *Fgf*

Abstract

Salamanders possess the rare ability to perfectly regenerate its limbs following amputation. This makes it a great model to understand how to bring the phenomenon closer to human use. However, the inner workings of regeneration remain largely unknown. A limited number of genes have been studied in this context and even fewer have been analyzed functionally. This work focuses on the roles of the canonical Bmp signaling pathway. We find that Bmps act distinctly from Tgf- β during limb regeneration. We also find that Bmps, and many of their potential targets are expressed throughout the redevelopment blastema phase of regeneration. By using the chemical inhibitor LDN193189, we explore the consequences of loss of canonical Bmp signaling in regeneration. This results in severe hypoplasia or complete absence of the regenerated limbs. By limiting treatments to specific timeframes, we try to separate the possible roles of Bmp temporally. We find that Bmp signaling is indeed required for the expression of selected target genes, but that requirement varies from one stages of regeneration to another. Bmp signaling maintains expression of *Msx* genes and is required for proliferation during the growth stage of the blastema. It is required for the induction of *Fgf8* and *Shh* during the early pattern formation events. Chondrogenic genes are also dependent on Bmp signaling, but only at later stages. By administering LDN193189 treatments at different time points during regeneration, we clearly show that limb regeneration progresses in a proximal to distal fashion, going against an intercalary interpretation of regeneration that has lasted for 50 years. Our results also suggest that antero-posterior patterning is determined during a narrow period. This demonstrates that Bmps play a major role in patterning of regenerated limbs and that regeneration is a progressive process like development.

Keywords : Regeneration, development, axolotl, Bmp, signaling, pharmacological inhibitor, *Msx*, *Fgf*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
1 Introduction.....	1
1.1 De la fiction à la réalité.....	1
1.1.1 Régénération dans les mythes et les cultures.....	1
1.1.2 Historique de la recherche sur la régénération.....	4
1.2 Régénération à travers les espèces.....	9
1.2.1 À l'extérieur du règne animal.....	9
1.2.2 Régénération chez les animaux invertébrés.....	10
1.2.2.1 Éponges.....	10
1.2.2.2 Cnidaires (polypes, anémones et méduses).....	11
1.2.2.3 Échinodermes (étoiles de mer, concombres de mer, oursins).....	11
1.2.2.4 Vers.....	12
1.2.2.5 Chordés invertébrés.....	13
1.2.3 Régénération chez les vertébrés.....	13
1.2.3.1 Poissons.....	13
1.2.3.2 Amphibiens.....	14
1.2.3.3 Sauropsidés (Reptiles et oiseaux).....	15
1.2.3.4 Mammifères.....	16
1.3 Définir la régénération.....	17
1.4 L'axolotl.....	20

1.5 Le processus de régénération de la patte chez l'axolotl	21
1.5.1 Amputation et réaction immédiate.....	24
1.5.2 Formation de l'épithélium de guérison et nettoyage de la plaie.....	24
1.5.3 Formation de la coiffe apicale épithéliale.....	25
1.5.4 Dédifférenciation et formation du blastème	25
1.5.5 Formation du patron de redéveloppement	29
1.5.5.1 Formation des axes d'asymétries de la patte	31
1.5.5.2 Régénération par intercalation versus régénération progressive	32
1.5.6 Participation des nerfs.....	35
1.5.7 Phase de redéveloppement.....	35
1.6 Gènes d'intérêt.....	36
1.6.1 La famille des Bone Morphogenetic Proteins.....	37
1.6.1.1 Structure et signalisation canonique des Bmp	37
1.6.1.2 Modulation de la voie des Bmp	40
1.6.1.3 Bmp durant le développement	41
1.6.2 Les Bmp et leurs cibles dans la régénération.....	46
1.6.2.1 Expression des Bmp et de leurs cibles durant la régénération.....	46
1.6.2.2 Les Bmp en tant que prérequis à la régénération.....	48
1.6.2.3 Rôles des Bmp et Msx dans la dédifférenciation de tissus musculaires matures	50
1.7 Hypothèses et objectifs	51
2 Matériaux et méthodes.....	53
2.1 Animaux.....	53
2.1.1 Entretien des animaux.....	53
2.1.2 Amputations.....	53
2.1.3 Préparation du LDN193189 et Traitements.....	54
2.1.4 Micro-injections de la protéine Fgf8.....	54
2.2 ARN	55
2.2.1 Isolation d'ARN	55
2.2.2 Transcription inverse pour qPCR.....	55

2.2.3 qPCR	56
2.2.4 RACE 3' et 5' (Rapid Amplification of cDNA Ends)	57
2.3 Protéines et Western Blot (Immuno-buvardage de type Western)	59
2.3.1 Préparation des protéines	59
2.3.2 Méthode d'immunobuvardage de type Western.....	59
2.3.2 Mesure de densitométrie pour les immunobuvardages de type Western.....	61
2.4 Histologie.....	61
2.4.1 Coloration du cartilage au Victoria Blue	61
2.4.2 Hématoxyline & Éosine, BrdU et TUNEL	62
2.4.3 Immunofluorescence pour pi-Smad1/5.....	62
2.5 Hybridation <i>in situ</i> sur coupes	63
2.5.1 Synthèse des sondes d'ARN marquées à la DIG.....	63
2.5.1 Protocole d'hybridation <i>in situ</i> sur coupes.....	64
2.6 Photos.....	65
2.6.1 Prise de photos et traitement d'images	65
2.6.2 Compte de noyaux	65
3 Résultats.....	67
3.1 Guide.....	67
3.2 Expression des Bmp et activation de leur signalisation durant la régénération des membres de l'axolotl	69
3.3 Inhibition de la voie des Bmp	75
3.3.1 Inhibition de la signalisation des Bmp par le LDN193189.....	75
3.3.2 Effet de l'inhibition de la signalisation des Bmp sur le développement des pattes..	77
3.3.3 Effet de l'inhibition de la signalisation des Bmp sur la régénération du membre....	79
3.3.4 Impact de l'inhibition de la voie des Bmp sur la prolifération et la survie cellulaire.	84
3.3.5 Effet de l'inhibition de la signalisation des Bmp sur la régénération du membre - Traitements commençant à différents stades de la régénération	88
3.3.6 Expression de gènes cibles des Bmp durant la régénération et effet du LDN193189	96

3.3.7 Rétablir le phénotype normal par l'injection de la protéine Fgf8.	107
4 Discussion	110
4.1 Analyse des résultats.....	111
4.1.1 La signalisation canonique des Bmp est fonctionnelle du stade de bourgeon précoce jusqu'à la fin de la régénération	111
4.1.2 Le LDN193189 inhibe la voie de signalisation canonique des Bmp de façon préférentielle	112
4.1.3 L'inhibition de la voie canonique des Bmp a plusieurs conséquences morphologiques sur les membres.....	114
4.1.3.1 Traitements aux LDN193189 durant le développement original des pattes... ..	114
4.1.3.2 Traitements aux LDN193189 durant la régénération	115
4.1.4 L'inhibition de la voie canonique des Bmp durant la régénération affecte l'expression de plusieurs gènes à des périodes spécifiques.....	117
4.1.5 La voie de signalisation canonique des Bmp participe à plusieurs étapes de la régénération.....	119
4.1.5.1 Fermeture de la plaie et formation initiale du blastème.....	119
4.1.5.2 Croissance du blastème.....	119
4.1.5.3 Formation du patron de redéveloppement de la patte	120
4.1.5.4 Formation osseuse.....	124
4.1.6 Régénération par intercalation versus régénération par spécification progressive	125
4.2 Conclusions.....	128
Bibliographie.....	130
Annexe I - Tableaux supplémentaires.....	I

Liste des tableaux

Tableau I.	Amorces pour qPCR	56
Tableau II.	Amorces non-spécifiques pour RACE 3' et 5'	58
Tableau III.	Amorces spécifiques pour RACE 3' et 5' de <i>Shh</i>	59
Tableau IV.	Anticorps utilisés en immunobuvardage de type Western.....	61
Tableau V.	Amorces utilisées pour amplifier les sections servant à faire des sondes.....	64
Tableau VI.	Ratio de la longueur du blastème, versus la largeur du membre, chez les animaux traités au LDN193189 durant toute la régénération.....	I
Tableau VII.	État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 : Animaux traités de 24 heures avant l'amputation jusqu'à la fin de la régénération.....	I
Tableau VIII.	Cellules positives pour le BrdU	II
Tableau IX.	Cellules positives pour le TUNEL	II
Tableau X.	État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de 24h avant l'amputation jusqu'à MB	III
Tableau XI.	État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de EB jusqu'à la fin de la régénération	III
Tableau XII.	État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de MB jusqu'à la fin de la régénération	IV
Tableau XIII.	État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de LB jusqu'à la fin de la régénération	IV
Tableau XIV.	État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de Palette jusqu'à la fin de la régénération	V
Tableau XV.	État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux amputés à travers l'humérus - 0,5µM de LDN193189, débuts à différents stades.....	V
Tableau XVI.	État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de JPA 5 à JPA 12, rétablissement avec Fgf8	VI

Liste des figures

Figure 1.	La régénération dans la culture	3
Figure 2.	Exemples de régénération à travers les espèces	8
Figure 3.	Les axolotls et les structures qui régénèrent.....	19
Figure 4.	Exemples représentatifs des stades de régénération de Tank.....	23
Figure 5.	Suivi de fibres musculaires coupées durant la régénération	28
Figure 6.	Le bras d'axolotl	30
Figure 7.	Identité positionnelle et formation d'axes morphogénétiques supplémentaires par transplantation de blastème	34
Figure 8.	Voie de signalisation canonique des Bmp.....	39
Figure 9.	Régulation dynamique de l'activité des Bmp	43
Figure 10.	Stades de régénération.....	68
Figure 11.	Expression génique des Bmp	71
Figure 12.	Activation de la signalisation canonique des Bmp.....	72
Figure 13.	Effet du LDN193189 sur la phosphorylation de Smad1/5	74
Figure 14.	Effets du LDN193189 sur le développement des pattes d'embryons d'axolotl.	78
Figure 15.	Effets du LDN93189 sur les pattes en régénération.....	82
Figure 16.	Aspect histologique des pattes en régénération traitées au LDN193189	83
Figure 17.	Prolifération et apoptose dans les pattes en régénération chez les animaux traités au LDN193189	87
Figure 18.	Traitements au LDN193189 durant la phase de préparation de la régénération	90
Figure 19.	Traitements au LDN193189 durant la croissance du blastème et la phase de redéveloppement	91
Figure 20.	Traitements au LDN193189 durant la croissance du blastème et la phase de redéveloppement - représentation graphique	92
Figure 21.	Traitements au LDN193189 durant la croissance du blastème et la phase de redéveloppement - Amputations à travers le stylopode	95
Figure 22.	Expression des Bmp et effet du LDN193189.....	97

Figure 23.	Expression de gènes impliqués dans la prolifération et le maintien de l'état dédifférencié et effet du LDN193189	99
Figure 24.	Expression de gènes impliqués la formation du patron et l'élongation du membre et effet du LDN193189	101
Figure 25.	Expression de gènes impliqués lors de l'ostéogénèse et effet du LDN193189	104
Figure 26.	Expression de gènes marqueurs de l'axe proximo-distal et effet du LDN193189	106
Figure 27.	Fgf8 permet de rétablir le phénotype normal chez des animaux traités au LDN193189.....	109

Liste des abréviations

Pour les abréviations des noms de gènes et de protéines, le format suit autant que possible les conventions établis pour chaque espèce (ex : *Bmp7* chez la souris, *bmp7* chez la grenouille, *BMP7* chez le poulet et l'humain...) [1-4]. Pour fin de simplicité, les noms de gènes/protéines de l'axolotl et des autres animaux où il n'y a pas de convention de format sont écrits avec la première lettre en majuscule et les suivantes en minuscule. Ce même format est utilisé dans les cas où le même nom de gène/protéine réfère à plusieurs espèces simultanément. Dans tous les cas, les noms de gènes (génomique ou ARNm) sont en italique et les noms de protéines sont en police standard. Les familles de gènes ou protéines suivent les mêmes règles, mais en omettant les chiffres ou lettres qui réfèrent à un membre spécifique (ex : protéines de la famille des Bmp).

A-P : Antéro-postérieur

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AEC : Apical Ectodermal/Epithelial Cap (coiffe apicale ectodermique/épithéliale)

AER : Apical Ectodermal/Epithelial Ridge (crête apicale ectodermique/épithéliale)

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messagers

Bmp : Bone Morphogenic Protein

BrdU : Bromodésoxyuridine

D-V : Dorso-Ventral

DRG : Dorsal Root Ganglia

dsRNA : double-stranded RNA (ARN double-brins)

EB : Early Bud (stade de bourgeon primaire)

ED : Early Differentiation (stade de différenciation primaire)

EdU : 5-ethynyl-2'-désoxyuridine

FBS : Fetal Bovine Serum

Fgf : Fibroblast Growth Factor

GFP : Green Fluorescent Protein

H₂O_d : Eau déionisée

HDAC : Histone deacetylase

H&E : Hématoxyline et Éosine

IP : Intrapéritonéal

JPA : Jours post-amputation

KO : Knock-Out

LB : Late Bud (stade de bourgeon tardif)

MH1 : MAD homology 1

MH2 : MAD homology 2

MB : Medium bud (stade de bourgeon moyen)

ORF : Open Reading Frame (cadre de lecture ouvert)

Pal : Palette (stade palette)

PASMC : Pulmonary artery smooth muscle cells

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase chain reaction

P-D : Proximo-Distal

PFA : Para-formaldéhyde

qPCR : Quantitative polymerase chain reaction

RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends

RT-qPCR : Reverse Transcription, quantitative polymerase chain reaction

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Shh : Sonic hedgehog

Tm : Température d'hybridation

WH : Wound Healing (stade de guérison de la plaie)

Remerciements

Bien que j'aie passé la majorité de mon doctorat sur l'horaire d'après-midi et de soir, j'ai côtoyé beaucoup de gens qui ont apporté leur contribution à ces travaux et ils méritent d'être remerciés.

Merci Stéphane de m'avoir accueilli dans ton laboratoire. Pour tes conseils, tes connaissances et le fait que tu te rappelles toujours de l'article que je cherche et que j'ai oubliés. Je ne crois pas qu'il y ait d'autres laboratoires avec une expérience d'apprentissage équivalente.

Merci à mes anciens collègues. Mathieu, on attend encore que t'organise les glissades d'eau. Jean-Charles, mon prédécesseur, comme toi j'ai hérité d'un projet sur les Bmp, parce que les Msx sont trop difficiles à étudier. Samuel, est-ce que je pourrais profiter de ta carte de Costco?

Merci à mes collègues actuels. Éric, dommage que le band du lab n'ait pas démarré. Au moins, tu peux encore nous introduire à de la nouvelle musique. Fadi, merci de baisser le volume quand la musique est mauvaise. Merci à Jean-François, qui est toujours prêt à aller prendre une bière.

Merci à mes stagiaires Faranak, clairement la meilleure stagiaire. Merci à Hien, pour avoir installé la barre.

Merci aux gens des autres laboratoires, pour la jasette, et pour l'aide aux expériences. Particulièrement à Annie du laboratoire Barbeau, qui a toujours la poudre qui me manque. Au laboratoire Nanci, pour l'aide à la microscopie.

Merci au personnel de soutien, particulièrement à Sylvie et maintenant Kathie, qui ont dû endurer mon incapacité à respecter une date limite.

Finalement, merci à ma famille, qui me supporte depuis toujours.

1 Introduction

1.1 De la fiction à la réalité

1.1.1 Régénération dans les mythes et les cultures

La régénération fait partie de la culture humaine depuis l'Antiquité et on retrouve plusieurs exemples dans la mythologie grecque. Dans deux histoires semblables, le demi-dieu Tityos et le titan Prométhée sont punis pour avoir vexé les dieux. Chacun est attaché dans un endroit reculé et chaque jour un oiseau de proie vient leur dévorer le foie (Figure 1 A). La nuit venue, ce dernier se régénère complètement, permettant à la torture d'être répétée le jour suivant [5, 6]. Un autre exemple est l'hydre de Lerne, un énorme serpent à neuf têtes qu'Hercule avait pour tâche de tuer. Chaque tête qu'il écrasait était rapidement remplacée par deux nouvelles. Le problème fut finalement réglé en cautérisant la base de chaque tête dès sa décapitation [7]. Parmi les exemples les plus extrêmes de régénération se trouve celui de Dionysos, qui fût morcelé et dévoré par les titans. Athéna récupéra son cœur, à partir duquel le dieu fut complètement reconstitué [8].

Des écrits moins anciens incluent également le concept de régénération. Dans *La Divine Comédie* (1320, une histoire basée sur la théologie chrétienne), Dante traverse les enfers et témoigne de nombreux châtiments, incluant lacération, éviscération, mutilation et immolation (Figure 1 B). Comme avec Tityos et Prométhée, les condamnés se reforment très rapidement pour que les punitions soient perpétuées éternellement [9].

La régénération est encore présente dans l'imaginaire moderne et certains auteurs tentent maintenant de l'expliquer par des raisons scientifiques (qui ne sont pas nécessairement basées sur la réalité). Par exemple, le populaire Wolverine de Marvel Comics doit sa régénération à une mutation génétique. Une évolution parallèle est d'ailleurs souvent présentée comme la source de la capacité de régénération de personnages fictifs, particulièrement chez les extra-terrestres (p. ex. : les pilotes de la série télévisée *Farscape*). Dans le film *"Le Sixième Jour"* de Roger Spottiswoode (2000), ce sont plutôt des exploits technologiques qui permettent la régénération d'organes, de membres et même d'un clone complet.

L'imagination humaine dépasse de loin nos compétences technologiques actuelles. Un des objectifs de la science est donc de développer les connaissances et les technologies permettant de réaliser ce qui, jusqu'à maintenant, est limité à la fiction. Il y a cependant beaucoup de chemin à faire pour y arriver.

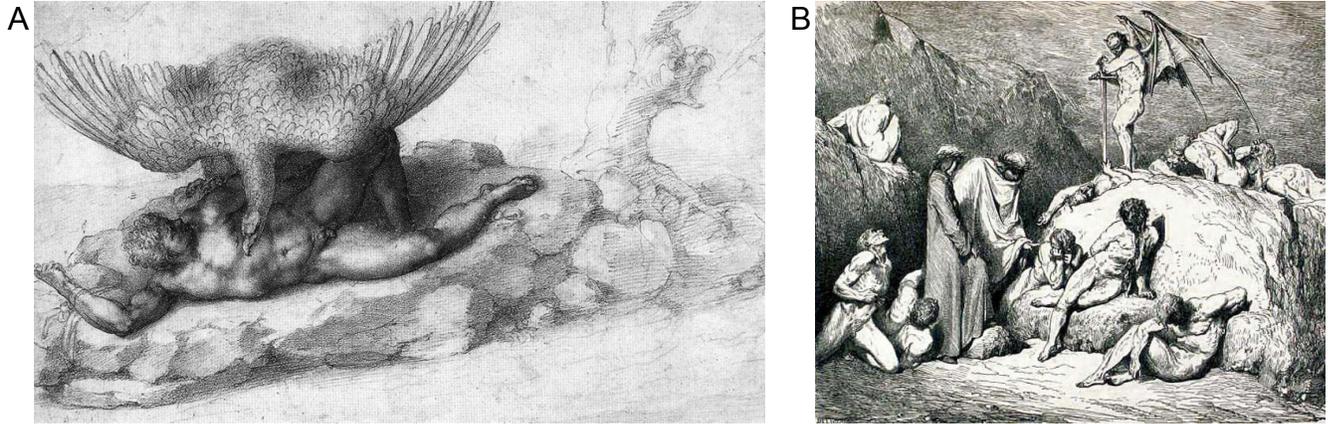


Figure 1. La régénération dans la culture

(A) Représentation de Tityos enchaîné, se faisant dévorer le foie. Malgré que le mythe mentionne deux vautours, la plupart des représentations n'en montrent qu'un. Michel-Ange : 1532. (B) Représentation des tortures des semeurs de discorde. Comme ils divisaient les autres dans la vie, ils sont eux-mêmes divisés dans la mort. Gustave Doré : 1890.

1.1.2 Historique de la recherche sur la régénération

En comparant les mythes anciens avec les connaissances actuelles, on peut se demander si les exemples fictifs de régénération étaient basés sur des connaissances du monde réel. À travers les œuvres de non-fiction, on peut effectivement retrouver des observations concernant la régénération qui remontent à très loin. Les traces les plus anciennes de telles observations remontent à Aristote (384-322 av. J.-C.), qui mentionne plusieurs exemples de régénération animale dans "L'Histoire des animaux". Il rapporte correctement la régénération des éponges, de la queue des reptiles et des bois de cerfs (sauf s'ils sont castrés), ainsi que le remplacement rapide des sabots de chevaux. Par contre, il mentionne incorrectement que les yeux des serpents et des jeunes hirondelles peuvent se régénérer, quoiqu'il prenne soin de préciser que ce sont des ouï-dire. Aristote discute également des structures qui ne sont pas régénérées (ailes d'abeilles, plume, os, cartilage,) ou qui guérissent mal (paupières) [10].

Les faits biologiques rapportés par Aristote viennent d'observations faites principalement chez les animaux. Il témoigne effectivement de nombreuses dissections chez ceux-ci, mais admet que les structures internes de l'humain sont moins bien connues. Il est cependant capable de comparer les structures majeures avec les autres espèces et reconnaît les similarités entre elles. Malgré les observations d'Aristote sur la régénération et ses descriptions étendues du foie, il ne mentionne pas spécifiquement la régénération de ce dernier. En fait, il faut attendre jusqu'au 19^e siècle A.D. pour que le concept de régénération du foie chez l'humain soit suggéré par Cruveilhier et Andral [11]. Il semble donc que les mythes de Prométhée et Tityos ne soient pas basés sur des faits déjà observés à l'époque. Le choix du foie pourrait plutôt être symbolique (en lien avec l'hépatoscopie, puisque Prométhée était prescient) ou autrement ésotérique (le foie était vu à cet époque comme le siège de la vie ou de la passion) [8].

Les écrits d'Aristote sont généralement descriptifs et il faut attendre au 18^e siècle, avec René Antoine Ferchault de Réaumur (1683-1757), Abraham Trembley (1710-1784) et Charles Bonnet (1720-1793) pour la publication d'expériences pratiques qui confirment la régénération animale [12, 13]. De Réaumur tente de déterminer si la régénération des pinces des crustacés, perçue comme des fables par les "Sçavans" [*sic*] de l'époque, était réelle. Il remarque d'abord que les crabes adultes ont des pinces dont la taille varie grandement l'une par rapport à l'autre

et que les pinces les plus petites ont une carapace molle. Il coupe ensuite une patte à quelques écrevisses et les garde en captivité pendant plusieurs mois. De Réaumur observe que les pattes coupées repoussent toutes, généralement de façon parfaite [14]. Ses travaux sont exhaustifs autant par les descriptions apportées que par les essais sur les différents niveaux de la patte et les différentes parties de l'animal. Cette approche rigoureuse servira d'exemple aux biologistes expérimentaux qui le succède.

Quelques années plus tard, Trembley entreprend une vaste série de travaux sur les polypes d'eau douce qu'il nomme plus tard les "hydres". Ce nom vient d'expériences où Trembley les tranche partiellement sur la longueur, à partir de la tête. Au lieu de rejoindre les deux moitiés, les polypes forment plusieurs têtes distinctes sur un même corps (Figure 2 A). Après avoir obtenu un polype à 7 têtes, il les ampute toutes et, comme pour l'hydre de Lerne, chacune repousse. L'hydre de Trembley ne se limite cependant pas aux capacités de l'animal mythique : chaque tête amputée devient elle-même un animal entier [15].

L'identification des polypes comme étant des animaux (au lieu de plantes) est considérée ambiguë par la communauté scientifique de l'époque, ce qui rend leur régénération en plusieurs individus séparés moins impressionnante [13, 16]. Les travaux d'un contemporain de Trembley, Charles Bonnet, apportent un soutien considérable à l'idée d'une régénération animale étendue. Celui-ci rapporte que certains vers annélides aquatiques peuvent être coupés en plus d'une vingtaine de tranches, dont la plupart régénèrent une tête et une queue [17]. Quelques années plus tard, Peter Simon Pallas rapporte des résultats semblables chez les vers planaires [18, 19].

En 1768, les connaissances de la régénération animale prennent une grande expansion grâce à Lazzaro Spallanzani. Celui-ci publie un recueil d'essais, son *Prodromo*, décrivant la régénération du ver de terre, de mollusques (incluant la tête d'escargots), la queue et les pattes de jeunes grenouilles et salamandres, ainsi que la mâchoire des salamandres. Spallanzani voit la régénération des salamandres comme stupéfiante, non seulement parce qu'elle est parfaite durant toute sa vie, mais aussi à cause de la complexité des structures régénérées [20]. Aucun vertébré avec une combinaison de capacités plus impressionnante n'a été trouvé depuis et Spallanzani contemple déjà la possibilité d'amener la régénération chez l'humain.

Avant d'entreprendre ses travaux sur l'hérédité, Thomas Hunt Morgan (1866-1945) étudie la régénération. Il effectue une série d'expériences sur plusieurs animaux, notamment les planaires, dont l'étendue est comparable aux travaux de Trembley chez l'hydre. Morgan a par contre l'avantage des connaissances de la fin du 19e siècle, dont l'histologie, le concept de cellule et la théorie de l'évolution par sélection naturelle. Parmi ses contributions majeures est la découverte des phénomènes qu'il nomme *morphallaxie* et *épimorphose*. La morphallaxie est le phénomène où un tissu manquant est reformé par le remodelage de tissus préexistants, ce qu'il démontre chez le planaire [21]. Ceci contraste avec l'épimorphose : le phénomène où la masse des tissus manquants est générée par la prolifération cellulaire et est donc constituée de nouvelles cellules. Morgan note cependant que ces façons de régénérer ne sont pas mutuellement exclusives [22].

Les progrès du dernier siècle sur la régénération sont principalement des avancées sur les idées déjà établies, suivant les avancées technologiques. Par exemple, Child élabore sur le concept de polarité de Morgan et présente la théorie des gradients métaboliques [23]. Spemann propose plus tard que des "organiseurs" contrôlent les axes de développement [13, 24]. On sait maintenant que ces organisateurs sont des groupes de cellules produisant des molécules spécifiques, influençant les cellules avoisinantes qui sont capables d'intégrer le signal. De façon similaire, au concept de remodelage tissulaire, Driesch ajoute en 1902 la dédifférenciation cellulaire [25]. Chez la salamandre, le concept est repris pour le cartilage en 1933 par Butler, la peau en 1948 par Rose et la dédifférenciation du muscle est décrite à l'aide de la microscopie électronique par Hay en 1959 [26-28]. Les techniques modernes de marquage cellulaire permettent maintenant d'observer la dédifférenciation en temps réel sur un animal vivant [29, 30], mais les mécanismes biologiques restent encore à élucider [31].

Même aujourd'hui, nous sommes encore limités par les outils qui sont à notre disposition, mais le contexte scientifique a beaucoup avancé depuis Aristote. Les progrès technologiques incluent maintenant la biologie moléculaire, la génétique et l'utilisation d'anticorps spécifiques. Le nombre d'espèces animales où la régénération est reconnue a augmenté considérablement. De plus, nos interprétations ne sont plus limitées par des dogmes externes telle que l'orthodoxie philosophique ou religieuse du 18e siècle [32]. Nous sommes

donc mieux équipés que jamais pour répondre aux questions qui entourent le phénomène de la régénération.

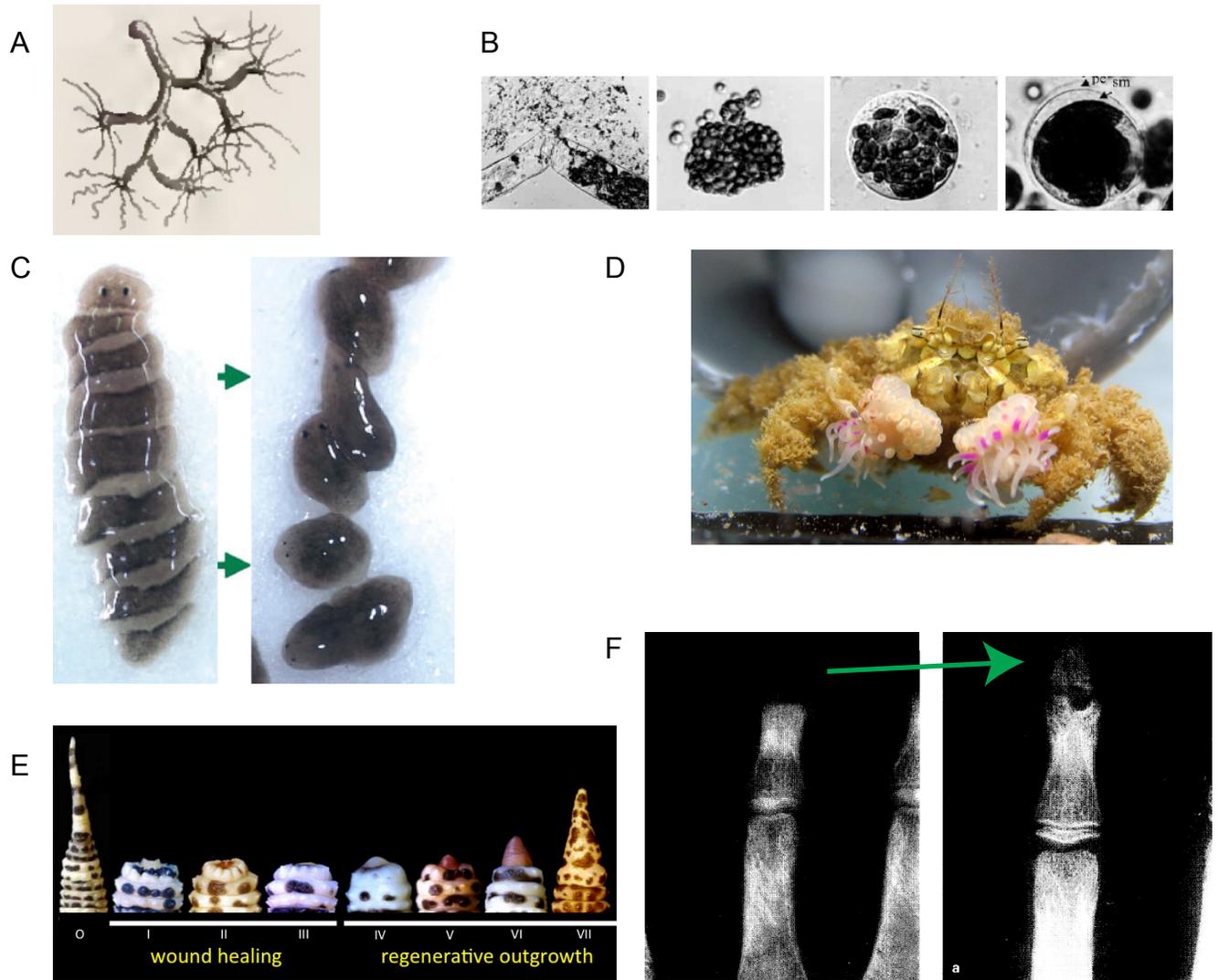


Figure 2. Exemples de régénération à travers les espèces

(A) L'hydre de Tremblay, créé par plusieurs coupes partielles sur la longueur de l'animal. De [15]. (B) Les organelles de *Bryopsis plumosa* se ré-agrègent si expulsées de la cellule et reforment une nouvelle membrane. Adapté de [33]. (C) Chaque morceau du planaire reforme un planaire individuel et entier. Adapté de [34]. (D) Le crabe *Lybia leptochelis* multiplie son anémone symbiotique *Alicia* sp. par bouturage. De [35]. (E) Régénération de la queue du gecko léopard. Pris du site web du laboratoire de Dr Matt Vickaryous. (F) Doigt d'un enfant de 9 ans dont la dernière phalange a été coupée. Photographie en rayons-X après amputation (gauche) et 6 mois plus tard (droite). Adapté de [36].

1.2 Régénération à travers les espèces

Outre les avancées technologiques, on doit se baser sur des modèles animaux pour mieux comprendre la régénération. On en retrouve heureusement des exemples à travers une grande variété d'eucaryotes. Bien que leur proximité phylogénétique fasse que notre intérêt principal se situe chez les vertébrés, la régénération est souvent plus impressionnante à l'extérieur de ce groupe. Il peut cependant être difficile de faire des généralisations, puisque les capacités de régénération varient beaucoup d'un groupe à l'autre et peuvent même être très différentes chez des espèces rapprochées. De plus, certains groupes ont leurs propres particularités concernant la régénération. Ceci leur donne par contre le potentiel de contribuer de façon unique à la compréhension de la régénération. Un survol de la régénération à travers les eucaryotes sera présenté ici avant d'arriver à notre modèle de recherche, l'axolotl.

1.2.1 À l'extérieur du règne animal

À l'extrême des eucaryotes les plus simples se trouvent les espèces unicellulaires classées parmi les protistes, dont certains peuvent régénérer d'une destruction partielle. Par exemple, le protozoaire cilié *Stentor coeruleus* peut être tranché en plusieurs sections et chacune d'entre elles reforme une cellule entière, tant qu'une partie de la membrane et qu'au moins un des macronoyaux est présents [37-39]. De façon similaire, les cellules multi-nucléées de l'algue verte *Bryopsis plumosa* peuvent survivre à un bris majeur de leur membrane cellulaire. Les organelles et noyaux éjectées s'agrègent en plusieurs petites sphères. Une enveloppe gélatineuse est rapidement formée, suivi de la nouvelle membrane cytoplasmique et d'une couche de cellulose (Figure 2 B) [40].

Bien que le terme "régénération" soit peu utilisé chez les plantes, le concept est en fait très bien connu. C'est d'ailleurs un des critères que Trembley utilisait pour définir si une nouvelle espèce devait être considérée comme faisant partie du règne végétal (d'où l'ambiguïté de classification de l'hydre) [15]. La plupart des plantes ont une grande capacité de régénération, passant généralement par la formation d'un nouveau méristème (tissu en croissance peu différencié) à partir des cellules environnantes. Ce phénomène est largement dû

à la grande plasticité développementale des cellules végétales. Selon la plante spécifique, les feuilles peuvent développer des pousses et un nouveau système de racines, et des plantes entières peuvent même être reformées à partir de cellules isolées. Ces capacités ont un impact majeur sur la vie humaine puisqu'elles sont exploitées en agriculture, notamment pour la propagation des plantes par bouturage, greffage et clonage [41-45]. L'impact sur la médecine est cependant limité, puisque la physiologie végétale est complètement différente de celle des animaux.

1.2.2 Régénération chez les animaux invertébrés

1.2.2.1 Éponges

Les métazoaires les plus simples font partie du groupe des éponges. Celles-ci possèdent une variété limitée de cellules organisées en canaux et chambres (supportés par un squelette de spicules minéralisés) où l'eau circule activement. Les éponges ont une capacité de régénération qui varie à travers les espèces mais qui est généralement très étendue [46]. Si les cellules de l'éponge sont complètement dissociées, elles sont capables de s'agréger et de se réorganiser en un individu complet [47-49]. Lorsque leur structure macroscopique est maintenue, elles peuvent être coupées en morceaux et tant qu'une partie de sa surface conserve son pinacoderme (analogue d'épithélium chez les éponges), un nouvel individu peut être reformé. Le bouturage des éponges est d'ailleurs très utilisé en culture commerciale, comme chez les plantes [50].

La régénération des éponges commence toujours par le rétablissement du pinacoderme de surface et est caractérisée par la transdifférenciation. Chez les homoscléromorphes, les différents types cellulaires exposés par la blessure se transdifférencient en pinacocytes de surface [51]. La même chose se produit chez les démosponges mais avant de reformer les structures internes de l'éponge, tous les types cellulaires participent au nettoyage de la plaie et forment une structure qui ressemble à un blastème [52].

1.2.2.2 Cnidaires (polypes, anémones et méduses)

Les cnidaires existent sous forme de polype (ou anémone) sessile, de méduse libre, ou incluent les deux formes dans leur cycle de vie. Comme observé par Trembley, les fragments d'hydres d'au moins quelques centaines de cellules reprennent la forme d'hydres miniatures. L'hydre peut aussi récupérer d'une inversion complète (comme un gant) par la migration des cellules de l'ectoderme et l'endoderme vers leurs positions originales [15, 53, 54]. Comme chez les éponges, les cellules d'une hydre dissociées mécaniquement s'agrègent et reforment un animal normal, tant que le nombre de cellules agrégées est à l'intérieur d'une certaine fenêtre et qu'il y a suffisamment de cellules épithéliales [55, 56]. Ces exemples de régénération se font généralement par morphallaxie, bien que des traits d'épimorphose soient parfois observés [57, 58].

Même s'ils nécessitent parfois une prolifération cellulaire, d'autres polypes et anémones régénèrent aussi bien que l'hydre (Figure 2 D) [59-61]. Les méduses ne sont pas aussi impressionnantes. Les fragments de *Campanularia jonstoni* reprennent la forme de cloche typique et régénèrent partiellement ses organes, mais la symétrie interne originale n'est jamais rétablie [62]. L'opposé se voit chez la forme juvénile à 8 bras d'*Aurelia aurita*. Lorsque coupé à travers le corps, le système musculaire force une symétrie radiaire avec les bras restants, mais ceux qui manquent ne repoussent jamais [63, 64]. Des structures complexes peuvent quand même être régénérées par les méduses, tels les yeux de *Cladonema radiatum*, qui régénèrent parfaitement si excisés [65, 66].

1.2.2.3 Échinodermes (étoiles de mer, concombres de mer, oursins)

La régénération des échinodermes est un phénomène bien connu et est une partie intégrale de leur cycle de vie. D'ailleurs, les étoiles de mer trouvées dans la nature ont fréquemment 1 ou 2 bras en train de régénérer et les bras isolés peuvent eux-mêmes régénérer un animal complet s'ils possèdent une partie du disque central [67]. La régénération des crinoïdes est tellement commune que les anomalies des bras régénérés ont été suggérées comme moyen de détecter la bioaccumulation de contaminants environnementaux [68]. Le concombre de mer *Holothuria forskali* peut éjecter et autotomiser ses tubules de Cuvier pour

piéger des prédateurs pendant sa propre fuite. Ils sont ensuite régénérés en vagues de 10-30 tubules à la fois, permettant la réutilisation du mécanisme [69]. D'autres espèces, tel *Eupentacta quinquesemita*, régénèrent leur système digestif après leur auto-éviscération automnale, possiblement pour compenser leur système excréteur inefficace, ou pour éjecter des parasites intestinaux [70]. Quant aux oursins, ils régénèrent fréquemment leurs épines, test et "pieds" mais sont le seul groupe d'échinoderme où aucune espèce ne peut recréer tous ses organes ou se reproduire par fission chez l'animal adulte [67, 71-73].

1.2.2.4 Vers

Le terme "vers" englobe plusieurs groupes d'animaux distincts et leurs capacités de régénération disparates reflètent leur distance phylogénétique [74]. Elle est rare chez les nématodes et n'a été trouvée que chez certains organes internes de la sous-classe *Enoplia* et pour les axones de *C. elegans* [75, 76]. Comme mentionné plus haut, certains annélides aquatiques n'ont besoin que d'un seul segment pour régénérer complètement. Par contre, cette capacité varie beaucoup à travers les espèces. La capacité de reformer une queue est très fréquente, mais elle l'est beaucoup moins pour la tête [77].

Le planaire, un type de vers plat, est un modèle de régénération intéressant puisqu'il a une anatomie complexe, 3 axes morphogénétiques distincts, est facile d'utilisation et a une capacité de régénération exceptionnelle (Figure 2 C) [78-80]. La seule partie de son corps qui est incapable de reformer un animal complet est la région antérieure aux yeux [21]. Cette régénération est caractérisée par les néoblastes répartis à travers l'animal, qui peuvent remplacer n'importe quelle autre cellule. Après une amputation, ceux-ci forment un blastème par épimorphose, qui est suivi d'un remodelage du tissu mature du planaire par morphallaxie. C'est ce dernier processus qui reforme la majorité des organes manquants [21, 81]. Un seul néoblaste est suffisant pour régénérer à partir d'une section de planaire, tant que l'ectoderme maintient le tissu ensemble. D'ailleurs, un néoblaste transplanté vers un animal irradié (donc non-mitotique et qui ne régénère pas [26]) permet de rétablir sa capacité de régénérer et finit éventuellement par remplacer toutes les cellules de l'hôte [21, 82, 83].

1.2.2.5 Chordés invertébrés

Les invertébrés les plus près des mammifères font partie de groupes également classés parmi les chordés, c'est-à-dire les Céphalochordés et les Tuniciers. Le premier groupe inclut l'amphioxus, chez lequel sont observés les deux types de régénération décrits par Morgan : ses cirres oraux sont régénérés par morphallaxie et sa queue est régénérée par épimorphose [84-86]. Le groupe le plus près des vertébrés est celui des Tuniciers, dont plusieurs espèces forment des colonies composées d'individus connectés par un système vasculaire commun. Les cellules sanguines qui y circulent sont capables de remplacer complètement un individu arraché de la colonie [87-89]. Ils sont donc les animaux les plus près des humains qui sont capables d'une régénération de la totalité de leurs tissus [90].

1.2.3 Régénération chez les vertébrés

Comme chez les différents groupes d'invertébrés, la capacité de régénération des vertébrés varie beaucoup d'un clade à l'autre. Par contre, elle est généralement loin d'être aussi étendue que ce qui peut être observé chez certains invertébrés [91]. Effectivement, dans plusieurs situations qui permettent la régénération chez les invertébrés, telle la décapitation, les vertébrés vont rapidement mourir. L'intérêt de les étudier est plutôt dans leur proximité phylogénétique aux humains, ce qui les rend plus pertinents pour nous que les invertébrés. Par exemple, la structure des appendices humains est plus près de celle des nageoires d'un poisson, qui ont une ossature interne, que celle des pattes d'arthropodes, qui ont un exosquelette. De plus, en s'approchant de l'humain, il devient plus probable de travailler avec les mêmes gènes. La similarité de séquence entre les gènes homologues va également augmenter.

1.2.3.1 Poissons

La régénération est peu étudiée chez les chondrichthyens, mais quelques exemples sont répertoriés, dont les requins qui sont connus pour la régénération de leurs dents. Chez la petite roussette, celles-ci se forment périodiquement à la surface intérieure de la mâchoire et se déplacent progressivement vers l'extérieur [92].

Les téléostéens comprennent un des modèles de recherche animale populaires, le poisson-zèbre, qui est aussi utilisé dans le domaine de la régénération. Cet animal a l'avantage d'un développement rapide, d'une reproduction facile et est apte à l'induction thermique d'expression génique, permettant le criblage à grande échelle et l'établissement de lignées génétiquement modifiées [93]. Ses nageoires peuvent se régénérer plusieurs fois (>25) sans changement dans leur taille finale, quoique la pigmentation ne revient pas toujours complètement [94, 95]. Le processus passe par un blastème, formé en partie par la prolifération des ostéoblastes, un phénomène rare dans l'animal intact. Ces ostéoblastes ne redeviennent que des ostéoblastes, les types cellulaires étant normalement conservés dans la nouvelle structure [93, 96]. Le poisson-zèbre est également un modèle populaire pour la régénération du muscle cardiaque. Suite à un dommage cryogénique à l'apex du cœur, une dédifférenciation et prolifération des cardiomyocytes est observée. Contrairement aux amputations externes, ces blessures ne sont pas couvertes rapidement par un épithélium. Les cellules impliquées sont néanmoins supportées et stimulées par l'endocarde et l'épicarde avoisinant. Ceux-ci recouvrent et remplacent le tissu manquant au même rythme que les cardiomyocytes [93]. En plus de ces exemples, les écailles, ainsi que les neurones et axones de la rétine, du nerf optique et de la moelle épinière peuvent être remplacés chez le poisson-zèbre [97-100].

1.2.3.2 Amphibiens

Chez les grenouilles, la régénération dépend largement du stade de développement de l'animal. Par exemple, les jeunes larves de *Xenopus laevis* peuvent régénérer leur cristallin à partir de la couche intérieure de la cornée, mais la capacité diminue après quelques semaines et disparaît complètement à la métamorphose [101]. La même tendance est observée avec l'amputation de la patte. Avant le stade 52, la patte arrière régénère parfaitement, mais à mesure que l'animal vieillit, elle ne reforme éventuellement que des pointes cartilagineuses [102, 103]. Il a été proposé que la qualité de la régénération est inversement proportionnelle à la calcification des os coupés [104].

C'est chez les amphibiens que l'on retrouve le groupe de vertébrés qui régénère le mieux : les urodèles (salamandres). Certaines salamandres peuvent régénérer plusieurs structures complexes (membres, organes internes, tissus nerveux, ...) de façon parfaite et ce tout au long de leur vie. Plusieurs espèces sont utilisées en recherche, dont la salamandre mexicaine et quelques espèces de tritons [105, 106]. C'est d'ailleurs la salamandre mexicaine, ou "axolotl", qui est le modèle animal utilisé pour les travaux de cette thèse et elle sera couverte en détails plus loin. Les processus observés varient peu entre ces espèces, mais il existe quelques différences notables dans leur capacité de régénération. Contrairement aux tritons, par exemple, l'axolotl ne peut régénérer son cristallin que durant une période limitée [107, 108].

1.2.3.3 Sauropsidés (Reptiles et oiseaux)

Les lézards sont un autre groupe où la régénération fait partie d'un moyen de défense. En situation de détresse, de nombreuses espèces sont capables de l'autotomie de leur queue. Ce comportement dépend d'adaptations très spécifiques, tel un système de muscles et vertèbres permettant un plan de fracture bien défini, ainsi que des sphincters artériels limitant la perte sanguine. Chez le gecko léopard (Figure 2 E), il ne suffit que d'un pincement ferme de la queue pour provoquer une amputation, facilitant son utilisation en recherche [109, 110]. La régénération de la queue des lézards est cependant imparfaite. La colonne vertébrale n'est remplacée que par un cône cartilagineux et les muscles et le système nerveux sont arrangés différemment. Quant aux pattes, l'amputation est parfois suivie de la formation d'un pseudo-blastème, mais celui-ci progresse lentement et finit par être remplacé par de la fibrose et la cicatrisation [111-113].

Les exemples de régénération aviaire sont rares [114]. Il a néanmoins été démontré que les cellules ciliées de leur système auditif peuvent être remplacées, suite à un dommage sonore ou toxique, par la prolifération et différenciation de cellules adjacentes [115].

1.2.3.4 Mammifères

Comme la plupart des vertébrés, les mammifères ont des capacités de régénération limitées. De façon générale, les mammifères répondent au dommage tissulaire majeur par la fibrose. Par exemple, si une blessure perce la peau jusqu'au derme, le remodelage de la plaie ne recrée pas l'organisation originale des cellules, des organes (glandes, poils...) ou de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes vont plutôt déposer du collagène de façon désorganisée et former une cicatrice [116]. Les muscles subissent un phénomène similaire. Ceux-ci possèdent une réserve de cellules souches, les cellules satellites, qui vont proliférer et fusionner avec les fibres musculaires endommagées. Par contre, avec l'âge (~70 ans chez l'humain), l'efficacité de remplacement diminue et une partie de la masse musculaire est remplacée par du tissu fibreux [117, 118].

Il existe quand même des exemples qui peuvent être qualifiés de régénération chez les mammifères. Les plus grandes structures sont les bois des cerfs, qui sont régénérés annuellement, mais peuvent aussi se rétablir d'une amputation si elle est faite tôt durant la saison de croissance [119]. La nouvelle croissance est entièrement dépendante du périoste des pédicules, la base osseuse permanente des bois, et si le pédicule est éliminé, la régénération ne se fait pas [120]. Chez le lapin, une perforation de 5mm de diamètre dans l'oreille peut se refermer complètement, incluant la formation de nouveau cartilage. Le taux de succès est cependant plus faible chez les femelles, ou si la perforation est faite plus près de l'apex de l'oreille [121]. Les souris épineuses (genre *Acomys*) sont également capables de ce type de régénération, en plus d'être parmi les rares mammifères capables d'une "fausse" autotomie. Effectivement, elles n'ont pas de mécanisme spécifique d'autotomie, mais leur peau est friable et de larges morceaux se détachent facilement. La ré-épithélialisation chez les *Acomys* est plus lente que chez *Mus musculus* mais le dépôt de collagène est organisé comme dans la peau intacte, contrairement à la cicatrisation. Les follicules pileux et les glandes sont également rétablis, en passant par la réexpression des gènes impliqués lors de leur développement embryonnaire [122-124].

Chez l'humain, le bout des doigts régénère si on se contente de nettoyer et couvrir la plaie, sans la fermer avec des sutures (Figure 2 F). Le doigt doit aussi conserver au moins une trace de la dernière phalange et possiblement la racine de l'ongle. La régénération est limitée,

puisque l'épiphyse ne revient pas et la capacité est entièrement perdue autour de l'adolescence [36, 125-127]. Le phénomène n'est pas limité à l'humain et a aussi été observé chez les jeunes souris. L'âge est encore ici un facteur et la majorité des souris amputées à l'âge de 4 semaines régénèrent la phalange mais leur ongle/griffe est difforme ou absent [128].

1.3 Définir la régénération

La majorité des exemples de régénération qui ont été donnés dans les sections précédentes sont des réponses à un traumatisme, pour la simple raison que c'est notre intérêt principal. Le terme régénération est cependant vague et est utilisé dans la littérature pour décrire une variété de phénomènes plus ou moins reliés dans lesquels "quelque chose" est recréé. Ce "quelque chose" peut être une structure, un état, une fonction ou une combinaison des trois [114].

La *régénération physiologique* n'implique pas nécessairement de blessure. Au niveau cellulaire, par exemple, les composants moléculaires sont constamment remplacés. Au niveau tissulaire, les cellules de la peau, du tube digestif, du sang, les ongles, les poils et même les carapaces des arthropodes ont une durée de vie limitée et sont remplacés périodiquement [14, 129].

Les vertébrés régénèrent leur foie après une hépatectomie partielle, ce qui implique la prolifération cellulaire pour regagner sa masse et sa fonction originale, mais sa forme n'est jamais rétablie [11, 130-132]. Ce phénomène est donc mieux décrit comme étant une *hyperplasie compensatoire*. Un phénomène similaire, *l'hypertrophie compensatoire*, est observé lors de l'augmentation de la taille d'un rein quand la fonction du 2^e rein est perdue. Cette fois-ci, les cellules grossissent mais ne prolifèrent pas [133, 134]. À l'opposé de ces deux phénomènes, la *réparation* inclue le rétablissement d'une partie de la forme de l'organe mais pas la fonction au complet, comme lorsque la peau est remplacée par une cicatrice [116].

La régénération physiologique et les phénomènes compensatoires peuvent être considérés comme des formes d'homéostasie, puisqu'ils sont des formes de maintien ou d'adaptation à leur charge. Par exemple, le foie n'a pas besoin d'être endommagé pour changer

de taille. Si le flux sanguin des lobes hépatiques est modifié par une constriction sélective des branches de la veine porte, les lobes surchargés grossissent, tandis que les lobes sous-utilisés rétrécissent [135]. À l'extrême du maintien est la *régénération cellulaire*, où des dommages aux cellules sont réparés, comme chez les neurones endommagés qui peuvent reformer leurs axones et même les reconnecter à leurs cibles [136], ou comme chez le stentor, présenté plus tôt.

Les travaux de cette thèse sont tous faits sur la régénération de la patte d'axolotl, qui est le mieux décrit comme étant de la *régénération épimorphique*. Ce terme implique premièrement que le remplacement d'une structure complexe se fait suite à un traumatisme. Deuxièmement, un blastème est formé par la migration et la prolifération de cellules provenant des tissus à la base du site d'amputation. Dans le cas des salamandres, la forme (structure osseuse), la fonction (muscles, nerfs et peau), ainsi que l'état (taille chez l'adulte) sont tous retrouvés à la fin du processus [114].

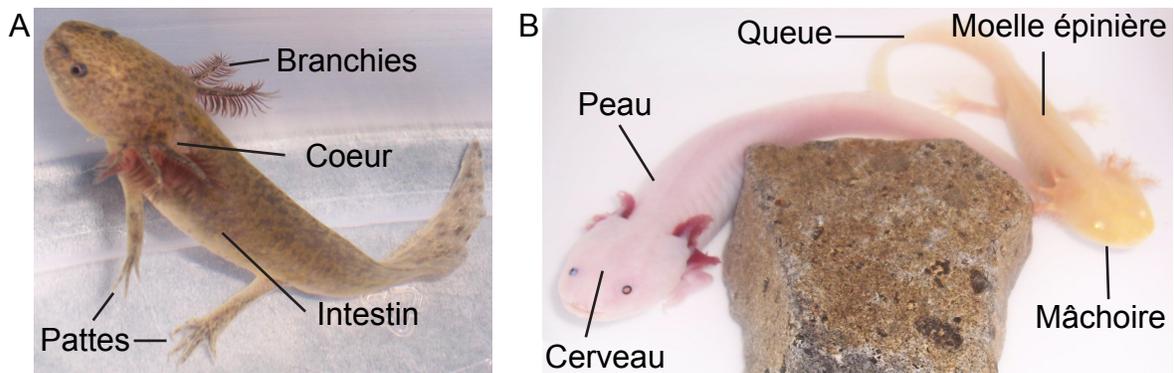


Figure 3. Les axolotls et les structures qui régénèrent

(A) Axolotl de "type sauvage" **(B)** Axolotl de type "Blanc" (gauche) et "albinos" (droite). Les structures qui régénèrent après amputation sont indiquées (s'applique à tous les types d'axolotls).

1.4 L'axolotl

Comme mentionné plus haut, l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) (Figure 3) est un des vertébrés qui régénère le mieux et est le modèle animal utilisé pour les travaux de cette thèse. Cet animal est originaire des lacs près de la ville de Mexico. Suite à sa découverte par une expédition française en 1863, une trentaine d'individus furent ramenés à Paris. Six d'entre eux (5 mâles, une femelle) ont alors été donnés à Auguste Duméril du Muséum d'Histoire Naturelle et la progéniture de ceux-ci fut distribuée à travers l'Europe et éventuellement l'Amérique, principalement pour la recherche embryologique. Pour éviter l'endogamie, les collections d'animaux ont été supplémentées périodiquement par des échanges de stocks, ainsi que par l'introduction d'animaux sauvages. La population sauvage d'axolotl est cependant en voie d'extinction, sa densité de population dans le lac Xochimilco aillait passé de 6000 par km² en 1998 à 35 par km² en 2014. Des efforts de conservation ont récemment été mis en place en collaboration avec les fermiers locaux, avec un certain niveau de succès [137-139].

L'axolotl a plusieurs caractéristiques qui en font un bon modèle de recherche. Les salamandres régénèrent leurs pattes, queue, mâchoire, branchies, peau, intestin, apex du cœur, moelle épinière et même une partie du cerveau. La régénération se fait tout au long de leur vie, sans cicatrice et est généralement parfaite [140-149]. L'axolotl a un cycle de vie entièrement aquatique et atteint la maturité sexuelle en l'absence de métamorphose (néoténie), ce qui facilite l'utilisation de drogues et rend son entretien plus simple [106, 150-152]. Il peut se reproduire plusieurs fois par année et produire des centaines d'œufs par ponte [139]. Finalement, la proximité phylogénétique à l'humain fait que l'on peut travailler sur des organes et des membres semblables, ainsi que sur les mêmes gènes.

Il y a aussi des inconvénients à travailler avec l'axolotl. Son génome est très gros (~32Gb) et jusqu'à récemment non-séquencé. On a donc longtemps dû se contenter des banques d'EST ("expressed sequence tag") et des contigs disponibles, en complétant les séquences par des expériences de RACE ("rapid amplification of cDNA ends") 5' et 3', au besoin. De plus, les séquences génétiques et protéiques peuvent diverger des homologues des autres espèces. Les anticorps commerciaux sont normalement générés contre les protéines de mammifères et il est parfois coûteux d'en trouver des fonctionnels chez l'axolotl. Les méthodes

de transfections chez l'adulte affectent un nombre limité de cellules ou cause du dommage (électroporations) ou des syncytiums (virus) [153, 154]. Bien que les œufs soient disponibles au stade 1-cellule et que l'injection d'ADN soit consistante, la recombinaison génique a un succès limité. L'approche CRISPR promet par contre d'améliorer la situation [155]. Même une fois la transgénèse accomplie, les animaux nécessitent plus d'un an pour commencer à se reproduire, rendant l'établissement de lignées peu pratique [156].

Des efforts sont continuellement faits pour faciliter la recherche avec l'axolotl. Par exemple, des données brutes de séquençage (couverture de 19X le génome) ont été obtenues en 2015, mais les méthodes informatiques étaient alors incapables de les assembler. Ce n'est qu'en 2017 qu'un assemblage préliminaire de la moitié du génome a été généré [157, 158]. En 2018, la combinaison de plusieurs améliorations (longues lectures de séquençage, nouveau programme d'assemblage...) a finalement permis la publication d'un assemblage comparable à la taille estimée du génome [159]. Une tentative de séquençage direct des protéines a aussi été tentée en 2016, avec un succès limité [160].

1.5 Le processus de régénération de la patte chez l'axolotl

Les salamandres régénèrent plusieurs structures, mais certaines sont plus pratiques à étudier que d'autres. La patte est un choix commun puisqu'elle offre plusieurs avantages. Elle est externe à l'animal, donc facile d'accès. Son amputation ne risque pas de mettre en danger la vie de l'animal. Son processus de régénération est bien défini. Elle est constituée d'un assemblage complexe de tissus (os, muscles, nerfs, peau, etc). Finalement, la patte est définie sur trois axes morphologiques asymétriques : proximo-distal (P-D, de l'épaule vers le bout des doigts), antéro-postérieur (A-P, l'équivalent du pouce vers le petit doigt chez l'humain) et dorso-ventral (D-V, dos de la main vers la paume) [140, 161]. Peu importe le site d'amputation, le processus de régénération de la patte est le même et redonne une patte sans structure manquante ou supplémentaire. De plus, en conditions identiques, la durée du processus change peu : un doigt prend autant de temps à régénérer qu'une patte complète [22, 105, 114, 162, 163].

Suite à l'amputation, les étapes qui mènent à la régénération peuvent être séparées en deux grandes phases. La phase de préparation amène la plaie ouverte suite à l'amputation d'un membre mature (constitué de tissus différencié et fonctionnel) vers un blastème de régénération. Elle comprend la fermeture de la plaie, son nettoyage, la dédifférenciation de cellules, leur migration vers la plaie et leur prolifération. La phase de redéveloppement consiste en la transformation du blastème en patte complète, en passant par sa croissance, la formation de son patron morphogénétique, et la redifférenciation en tissus fonctionnels [164, 165]. Afin d'uniformiser les travaux, des groupes de recherches ont déterminé des stades de régénération reconnaissables visuellement chez le triton et l'axolotl. Ceux qu'on utilise chez l'axolotl sont montrés dans la Figure 4 et consistent en la guérison de la plaie (*wound healing*, **WH**), bourgeon primaire (*early bud*, **EB**), bourgeon moyen (*medium bud*, **MB**), bourgeon tardif (*late bud*, **LB**), palette (*palette*, **Pal**), différenciation primaire (*early differentiation*, **ED**). La transition de la préparation au redéveloppement est considérée par certains auteurs comme se faisant entre les stades MB et LB, puisque la régénération ne dépend plus de l'innervation après ce stade (voir section 1.5.6) [163, 165, 166].

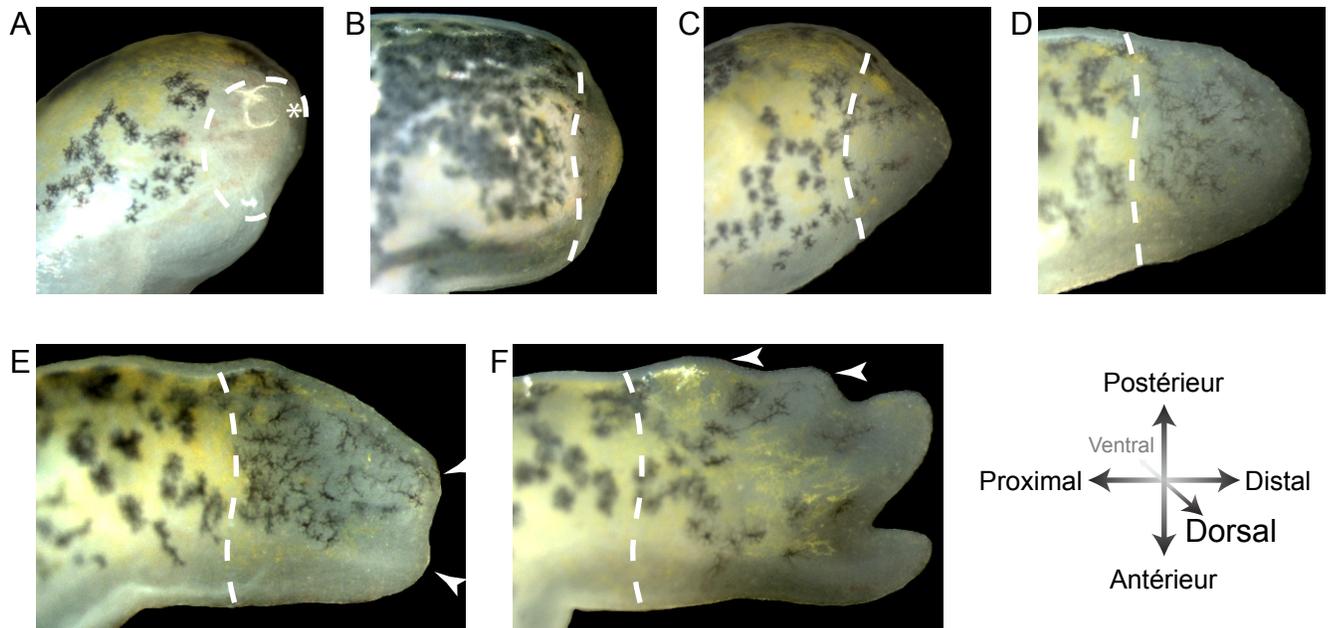


Figure 4. Exemples représentatifs des stades de régénération de Tank

Les animaux ont été amputés à travers le zeugopode (radius et ulna) de la patte antérieure (4 doigts) et la régénération a été suivie en photos (pas toutes du même animal). Le contour du site d'amputation est marqué par la ligne pointillée blanche. Vues du dos des pattes, sauf pour (A). **(A)** WH : guérison de la plaie, 1 jour post-amputation (JPA). Vue de l'angle entre dorsal et distal. Les tissus mous se sont légèrement contractés et la plaie est couverte par l'épithélium de guérison. Le bout de l'ulna est visible à travers celui-ci (astérisque). **(B)** EB : bourgeon primaire, 7 JPA. Une accumulation de cellules forme un blastème. **(C)** MB : bourgeon moyen, 9 JPA. Le blastème prend la forme d'un cône. **(D)** LB : bourgeon tardif, 12 JPA. Le blastème s'élargit et prend une forme aplatie. **(E)** Pal : stade palette, 15 JPA. Deux doigts présomptifs deviennent apparents (têtes de flèches), séparés par une indentation. **(F)** ED : différenciation primaire, 18 JPA. La pointe des deux autres doigts présomptifs devient également visible (têtes de flèche).

1.5.1 Amputation et réaction immédiate

Dès l'amputation du membre, la tension des muscles cause une rétraction des tissus mous. La perte de sang est arrêtée en quelques secondes par la contraction des vaisseaux sanguins coupés [114]. L'amputation cause une réponse rapide chez l'axolotl, mais le mécanisme qui informe les cellules avoisinantes de la perte du tissu est incertain.

Parmi plusieurs possibilités, deux voies principales ont été suggérées pour l'activation du processus de régénération : la bioélectricité et l'activité de la thrombine. La peau maintient effectivement une différence de potentiel entre les tissus internes et l'extérieur de l'animal, qui change immédiatement à l'amputation, probablement à cause du changement de forme du tissu et à son exposition au milieu externe. D'ailleurs, chez le triton, un courant électrique peut provoquer la dédifférenciation et la prolifération de fibres musculaires, même en l'absence d'amputation [167, 168]. Quant à la thrombine, elle participe à la formation de caillots sanguins et son activation suit donc les amputations [168, 169]. Elle peut également provoquer la prolifération des fibres musculaires de triton et son activité est nécessaire à la prolifération des cellules de l'iris lorsque le cristallin est amputé. Contrairement au triton, il n'y a pas d'activation de la thrombine dans l'œil de l'axolotl, qui ne régénère pas son cristallin [170, 171].

1.5.2 Formation de l'épithélium de guérison et nettoyage de la plaie

En moins d'une heure après l'amputation, le moignon de l'axolotl devient couvert d'un caillot de fibrine et les cellules de l'épithélium avoisinant commencent à se détacher. Elles prennent une forme aplatie, réduisent leur nombre d'hémidesmosomes et utilisent le caillot de fibrine pour migrer et couvrir la plaie, d'abord en une seule couche [172, 173]. Cette étape dure environ 2 heures chez un axolotl de 4-5cm (pattes larges de 1-2mm) mais prend 9h chez des tritons de la même taille et plus de 24h chez des animaux plus gros [114, 172, 174]. La membrane basale ne revient qu'après plusieurs semaines et il a été suggéré que son absence permet l'interaction entre l'épithélium et le mésenchyme, ainsi que l'insertion des nerfs dans l'épithélium [144, 175-177].

Enlever l'épithélium de guérison à chaque jour retarde la régénération ou l'inhibe complètement, selon le temps requis pour qu'il se reforme et la taille de l'animal [178]. Recouvrir le moignon de peau mature a le même effet mais si la couverture est incomplète, une réponse partielle est obtenue, dont une expression génique caractéristique de la régénération (*Msx2*) [174, 179]. Cependant, même une couverture totale par la peau mature permet l'accumulation de cellules au site d'amputation [180]. La formation de l'épithélium de guérison est donc cruciale à la régénération, mais n'est pas le seul processus enclenché par l'amputation.

Avant d'être converties en coiffe apicale épithéliale, les cellules épithéliales participent entre autres au nettoyage de la plaie, en phagocytant des débris cellulaires et bactéries [172]. Cette fonction est également remplie par le peu de cellules inflammatoires qui infiltrent les tissus sous le caillot de fibrine [114, 144]. D'ailleurs, la réponse immunitaire (inflammation, présence de leucocytes) demeure généralement réduite et la stimuler inhibe la régénération [181].

1.5.3 Formation de la coiffe apicale épithéliale

Dans les 2 jours suivant l'amputation, l'épithélium de guérison s'épaissit par la migration et la prolifération cellulaire. La prolifération cesse ensuite temporairement [182, 183]. L'épithélium se convertit alors en coiffe apicale épithéliale (*apical epithelial cap*, AEC), l'équivalent urodèle de la crête apicale ectodermique (*apical ectodermal ridge*, AER) [184-186]. Elle comporte une couche basale de cellules qui sécrètent des facteurs nécessaires à l'élongation du membre (*Fgf4*, *Fgf8*, Fibronectine...) [183, 187]. Cependant, la source de leur induction à partir de tissus matures durant la régénération demeure inconnue.

1.5.4 Dédifférenciation et formation du blastème

La blessure provoque la perte de l'état différencié de cellules du tissu mature du moignon et stimule leur migration vers la plaie [186, 188, 189]. Une expérience d'irradiation localisée a démontré que ce sont seulement les cellules en proximité immédiate du site

d'amputation qui participent au nouveau membre [190]. En 4 à 5 jours, la prolifération cellulaire commence à être observée à l'intérieur de 1mm du site d'amputation [182]. Ces cellules s'accumulent sous l'AEC pour former la masse interne du blastème qui deviendra le nouveau membre. Les cellules de l'épiderme et de l'AEC ne participent pas au mésenchyme du blastème, même si elles sont essentielles à sa formation [191].

L'origine exacte des cellules du blastème a longtemps été débattue, en partie parce qu'elles ont une apparence homogène dans le blastème. De plus, un tissu n'a pas besoin d'être présent dans le moignon pour être régénéré. Par exemple, si le radius et l'ulna sont extirpés de la patte du triton et qu'une amputation est ensuite faite à travers l'avant-bras, le patron osseux distal au site d'amputation peut quand même être régénéré [192]. Ces nouveaux os seraient créés à partir du derme de la peau, comme démontré par Dunis. Celui-ci utilise des membres irradiés, donc sans prolifération cellulaire ou régénération, sur lesquels il greffe des anneaux de peau prélevés de pattes non-irradiées. Une amputation à travers la peau non-irradiée permet une régénération osseuse presque normale. Les muscles sont cependant absents dans la majorité des cas, même si leurs tendons sont présents [193, 194].

En 1959, Hay observe en microscopie électronique la fragmentation des fibres musculaires en cellules mono-nuclées 5 jours après l'amputation de la patte. Leur noyau s'arrondit et elles perdent leur membrane basale et beaucoup de cytoplasme, bien que des myofibrilles peuvent encore être détectées une fois les cellules séparées [28]. Dépendamment de l'espèce de salamandre, ainsi que l'étape spécifique de son cycle de vie, la contribution cellulaire du muscle peut plutôt venir des cellules satellites, une réserve de cellules souches en contact direct avec les fibres musculaires [195-197]. La Figure 5 montre un suivi de la dissociation, migration et prolifération de fibres musculaires marquées avec la protéine fluorescente mRFP.

La contribution exacte des tissus matures durant la régénération normale a également été déterminée. En utilisant des greffes des régions embryonnaires destinées à former les tissus du membre d'un animal GFP+ vers celles d'un animal GFP-, Kragl obtient des animaux où le muscle, le derme, l'os ou les cellules de Schwann sont spécifiquement marqués. Ses résultats démontrent qu'en temps normal, les tissus gardent généralement leur identité après la régénération. Le derme peut cependant contribuer à la formation du cartilage [30]. Les cellules

matures peuvent donc non seulement être dédifférenciées, elles peuvent aussi se transdifférencier.

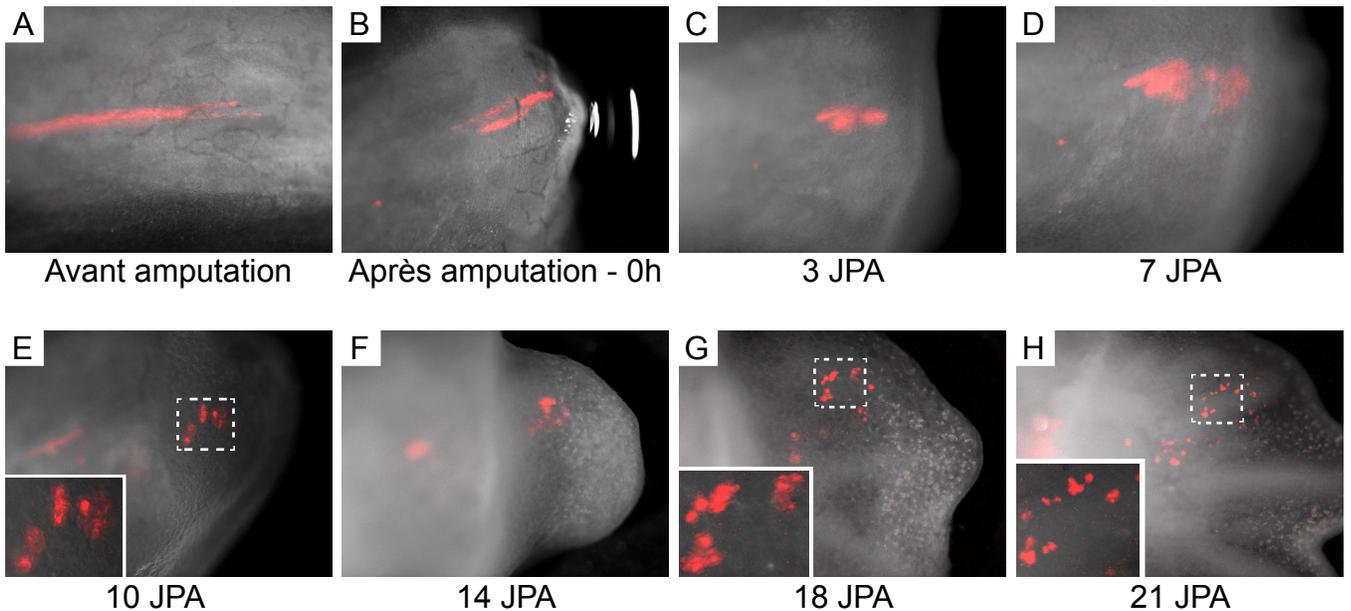


Figure 5. Suivi de fibres musculaires coupées durant la régénération

La patte a été électroporée avec un plasmide d'expression de mRFP. Un nombre limité (3-4) de fibres musculaires est transfecté. Deux mois après l'électroporation, la patte a été amputée à travers les fibres musculaires fluorescentes. Des photos ont été prises **(A)** avant l'amputation, **(B)** immédiatement après l'amputation **(C)** 3 JPA, **(D)** 7 JPA, **(E)** 10 JPA, **(F)** 14 JPA, **(G)** 18 JPA, **(H)** 21 JPA. Des grossissements des régions encadrées sont fournis pour les images **(E)**, **(G)** et **(H)**. On peut voir le changement de forme des fibres musculaires causé par la perte de tension après l'amputation en **(B)**. La migration cellulaire commence à être visible à 7 JPA. Le nombre exact de cellules est difficile à estimer à travers l'épaisseur du blastème, mais il augmente clairement : **(E)** ~5 cellules à 10JPA, **(G)** ~15 cellules à 18JPA et **(H)** >30 cellules à 21JPA.

1.5.5 Formation du patron de redéveloppement

En plus de la guérison du site d'amputation, de sa couverture et de l'apport de cellules en prolifération, le processus de régénération doit recréer le patron de la patte. Les connaissances acquises en biologie du développement sont souvent utilisées comme point de départ pour comprendre la phase de redéveloppement durant la régénération. Il y a effectivement des similarités dans les gènes et processus impliqués, rendant la compréhension de la formation du patron de la patte utile dans les deux domaines [198]. Par contre, la régénération n'est pas un phénomène présent chez tous les animaux et est un processus généralement étudié chez des animaux dont le développement est déjà terminé. Il est donc probable que cet aspect de la régénération chez l'axolotl comporte des caractéristiques distinctes du développement observé chez la souris ou le poulet. Il faut d'ailleurs tenir compte que contrairement au membre en développement, le membre en régénération est formé à partir de tissu mature qui a déjà été différencié. De plus, l'emplacement à partir duquel la régénération s'effectue peut varier d'une amputation à l'autre. La phase de redéveloppement doit donc être adaptable au traumatisme qui induit la régénération.

Le patron de redéveloppement de la patte en régénération est principalement reconnu par la forme et l'emplacement des os. Une patte antérieure gauche est illustrée à la Figure 6, avec l'emplacement des axes d'asymétries et les régions proximo-distales. La formation des 3 axes d'asymétrie du patron de la patte seront présentés brièvement ici, suivi des théories sur le processus qui mène à leur positionnement approprié durant la régénération.

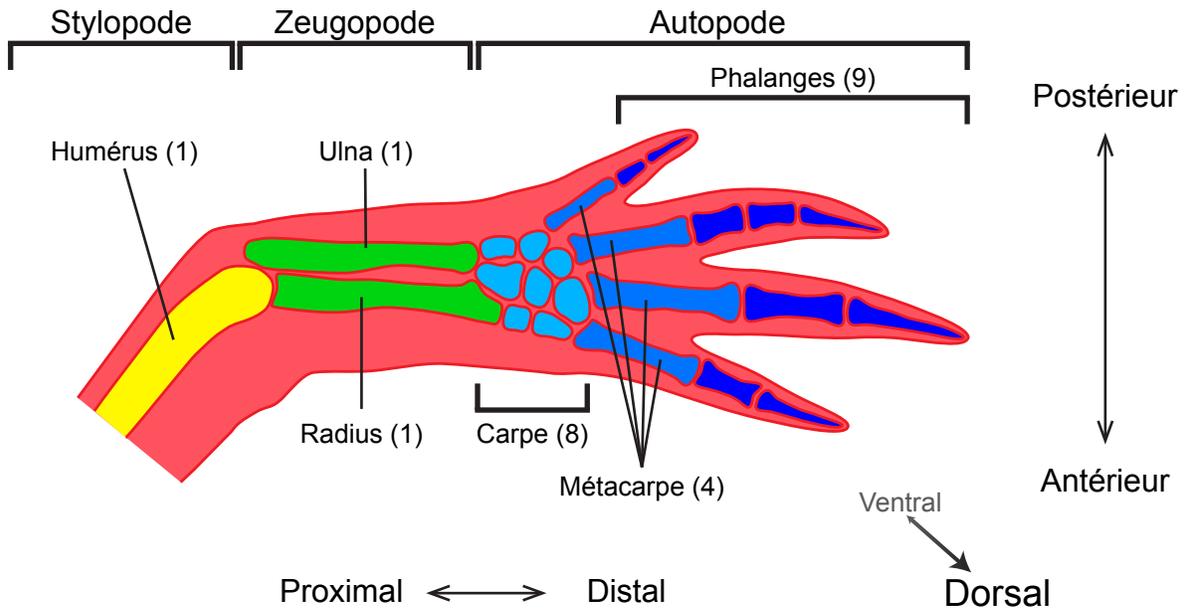


Figure 6. Le bras d'axolotl

Les éléments osseux des membres antérieurs de l'axolotl. Les os des 3 régions proximo-distales du membre sont colorées différemment et leur nom est indiqué au-dessus du dessin, dans l'ordre proximal vers distal : stylopode (jaune), zeugopode (vert) et autopode (bleu). Les os spécifiques sont nommés et leur quantité normale est indiquée entre parenthèses.

1.5.5.1 Formation des axes d'asymétries de la patte

L'axe antéro-postérieur (A-P) du membre est défini du pouce vers le petit doigt (ou l'équivalent chez les animaux qui n'ont pas de pouce). Durant le développement et la régénération, il est contrôlé par un petit groupe de cellules en postérieur de la patte, la zone d'activité polarisante (ZPA), qui produit transitoirement la protéine Sonic Hedgehog (Shh). Une greffe de ZPA ou la surexpression du gène *Shh* dans la région antérieure de la patte produit une polydactylie en image miroir de la région postérieure [154, 199-202]. À l'opposé, l'inhibition de la signalisation de Shh réduit le nombre de doigts développés, particulièrement les postérieurs [150, 203]. L'influence de *Shh* sur le nombre de doigts et leur identité passe entre autres par son contrôle sur l'expression et la signalisation de gènes de la famille des *Gli*. De plus, la signalisation de *Shh* active l'expression des gènes homéoboîtes (*Hox*) postérieurs *HoxD11* et *HoxD13* dans la région postérieure du membre [199, 203-206].

L'axe proximo-distal (P-D) de la patte s'étend à partir de l'épaule vers le bout des doigts. Chez l'axolotl, une fois que le blastème du membre en régénération est formé, les facteurs de croissances de fibroblastes (Fgf) *Fgf8* et *Fgf10* commencent à être exprimés dans l'AEC et les cellules du mésenchyme distal du blastème [184, 207, 208]. Durant le développement du membre chez le poulet, FGF10 induit et maintient l'expression de *FGF8* dans l'AER, qui maintient à son tour l'expression de *FGF10*, et stimule l'élongation distale du membre. Chez les animaux qui ont un AER, l'expression continue de *Fgf8* devient ensuite interdépendante avec l'expression de *Shh*, dans une boucle complexe de rétroaction positive qui va encore une fois stimuler l'élongation distale du membre [209, 210]. Il n'est cependant pas connu si ces boucles exactes sont présentes chez les salamandres durant la régénération. Durant cette période, le membre en régénération voit également apparaître l'expression de *HoxA9*, *HoxA11* et *HoxA13*, qui marquent le stylopode, le zeugopode et l'autopode présomptifs [211-213].

Comme pour les autres axes, les gènes qui marquent l'axe dorso-ventral (D-V, dos de la main vers la paume) sont exprimés durant la régénération chez les urodèles dans un patron qui ressemble partiellement à celui durant le développement chez les amniotes. Chez ceux-ci, *Wnt7a* et *En1* sont exprimés dans l'ectoderme dorsal et ventral respectivement, avec une séparation bien définie. *En1* inhibe l'expression ventrale de *Wnt7a*, qui en retour n'induit

l'expression de *Lmx1b* que dans le mésenchyme dorsal seulement. Dans le membre d'axolotl en régénération, *Lmx1b* est également restreint au mésenchyme dorsal, mais *Wnt7a* a un patron diffus à travers tout le blastème. Le patron d'expression de *En1* n'est pas publié pour ce contexte, mais comme il n'y a pas de restriction dorsale de *Wnt7a*, il semble que ces deux gènes ne soient pas responsables de la localisation dorsale de *Lmx1b*. Dans ce cas-ci, il est possible que ce soit un trait d'amphibien, puisque le même patron d'expression diffus de *Wnt7a* est observé dans les pattes en développement de *Xenopus* [214-216].

1.5.5.2 Régénération par intercalation versus régénération progressive

À la différence du développement, le point de départ de la patte en régénération est le tissu mature. Peu importe le niveau de l'amputation, le moignon réussit à recréer le membre sans structures manquantes [91, 163]. Ceci a mené à une des grandes questions du domaine de la régénération : comment les membres réussissent-ils à reformer exactement ce qu'il leur manque? Historiquement, une multitude de concepts ont émergé pour tenter d'y répondre (spécificité tissulaire, polarité, gradients métaboliques, champs morphogénétiques...), mais ils sont souvent limités par les connaissances de l'époque et dépendent d'un contexte expérimental spécifique [217]. Parmi ceux encore considérés aujourd'hui sont ceux d'identités positionnelles, suivi d'une régénération soit par intercalation, soit par spécification progressive.

Le concept d'*identité positionnelle* propose que les cellules reconnaissent leur position dans l'organisme et, selon leur identité initiale, peuvent répondre à un changement de position par un changement de comportement approprié. Ceci attribue aux cellules une nouvelle identité positionnelle qui persiste en tant que *mémoire positionnelle*. En étendant le concept sur les 3 axes d'asymétrie de morphogénèse, on obtient un système de *coordonnées polaires* sur lequel se place chaque cellule (Figure 7) [217-219]. Puisque la peau est suffisante pour reformer le patron morphogénétique de la patte et que la rotation du derme crée des anomalies dans ce patron, il a été suggéré que ses fibroblastes sont les cellules qui déterminent les coordonnées polaires présentes dans le blastème [161, 194, 220]. Cette déduction est maintenant supportée par la démonstration que, chez l'humain, les fibroblastes de la peau ont un patron d'expression spécifique à l'emplacement où ils sont prélevés. Ces patrons sont

distincts selon qu'un fibroblaste vienne du tronc ou des membres, du stylo-pode, du zeugopode ou de l'autopode (les *HoxA* demeurent exprimés chez l'adulte), des membres antérieurs ou postérieurs (Figure 7 A, B) [221, 222].

Le modèle original d'intercalation postule que la régénération est induite par la confrontation d'identités positionnelles qui ne sont normalement pas en contact (i.e. l'extrême postérieur et l'extrême antérieur) et que leur contact stimule le remplissage de "l'intervalle d'identité" entre elles. Chez la blatte, la greffe d'une patte vers la patte controlatérale va causer l'opposition soit de l'axe A-P, soit l'axe D-V au point de jonction et il s'en suit la formation de 2 pattes surnuméraires à ces endroits [218]. La même chose est observée chez les salamandre lors de la greffe d'un blastème de stade MB sur un membre controlatéral [223]. On sait maintenant que les gènes qui définissent les axes (*Shh*, *Wnt*,...) sont exprimés à la fois dans la greffe et dans le tissu de l'hôte, créant des axes morphogénétiques supplémentaires (Figure 7 C) [224, 225].

Le cas de l'axe proximo-distal durant la régénération normale est un peu plus ambigu. Le modèle d'intercalation dicte qu'une fois les axes D-V et A-P rétablis complètement, la croissance se fait exclusivement vers le distal (règle de la *transformation distale*), ce qui serait une spécification progressive pour l'axe P-D. Par contre, la détection du marqueur distal (autopode) *HoxA13* varie selon le groupe de recherche. Suite à l'amputation à travers le stylo-pode, le groupe de Bryant voit son expression en même temps que *HoxA9* (dès 24h post-amputation), ce qui indiquerait la spécification de l'autopode avant les structures proximales, donc une intercalation [212]. Les expériences de greffes montrent aussi qu'une greffe distale vers proximale (blastème de zeugopode vers moignon de stylo-pode) permet la croissance des structures intermédiaire. La contribution cellulaire vient à la fois de l'hôte et de la greffe, indiquant une intercalation P-D [226, 227]. Le groupe de Tanaka observe cependant que *HoxA9* apparaît en premier, suivi de *HoxA11* et finalement *HoxA13* (après 12 jours), comme durant le développement, ce qui supporte le modèle de spécification progressive [213]. Il faut d'ailleurs tenir compte qu'une expérience de greffe n'est pas représentative du processus normal de régénération. L'apposition des deux régions tissulaires est un traumatisme supplémentaire qui induit plusieurs voies de signalisation à l'endroit de leur contact, ce qui ajoute à l'ambiguïté.

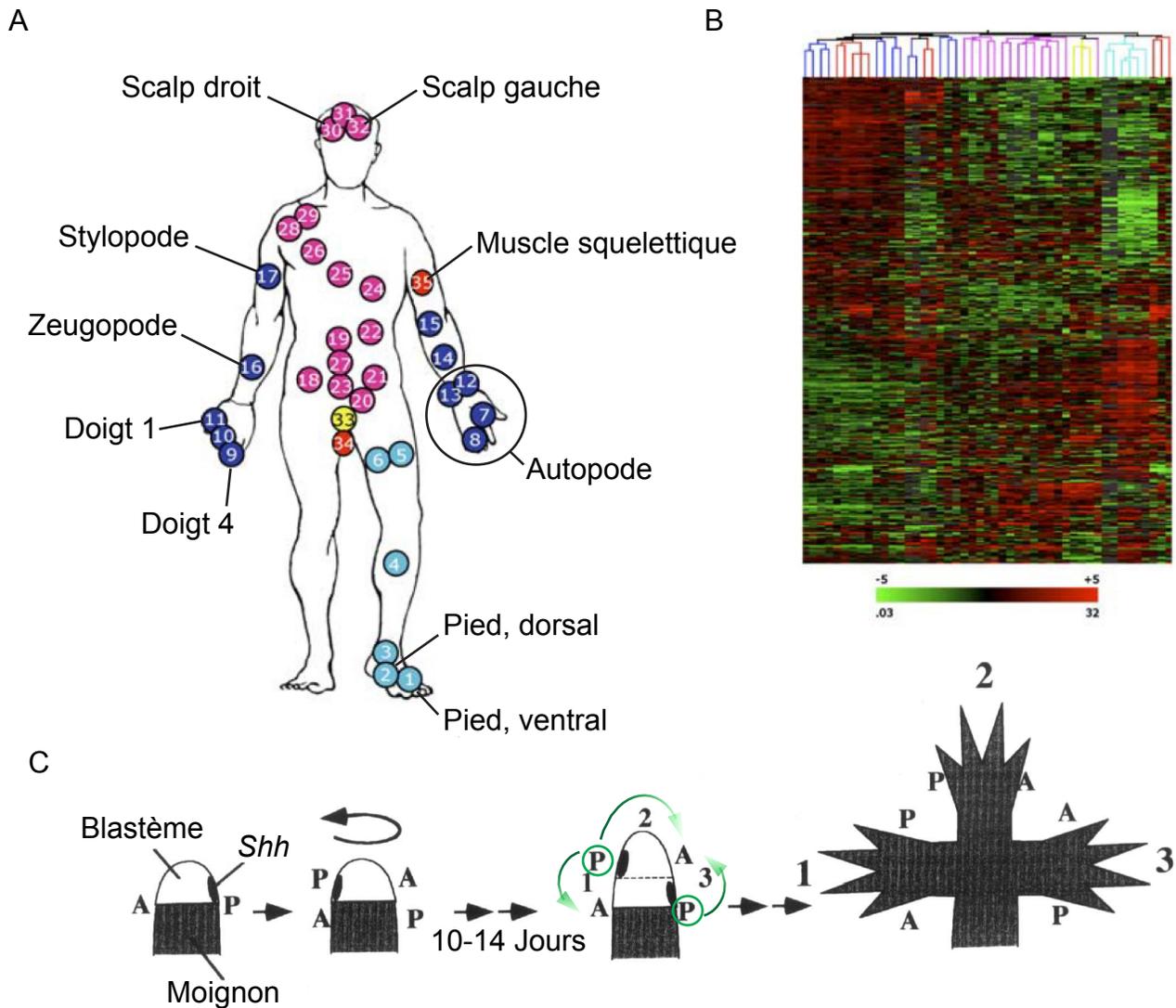


Figure 7. Identité positionnelle et formation d'axes morphogénétiques supplémentaires par transplantation de blastème

(A) Des fibroblastes peuvent être prélevés à de nombreux endroits de la peau ou des organes internes. Adapté de [221]. (B) Chaque population de fibroblastes a un patron d'expression caractéristique (mesurés par l'hybridation d'ARNm sur une puce de cDNA). Chaque colonne représente une population et chaque rangée représente un gène. Adapté de [221].

(C) Un blastème de triton au stade MB est transplanté sur la patte controlatérale, causant ainsi une opposition de l'axe antéro-postérieur (A-P) du blastème avec celui de la patte hôte. Ceci crée trois régions où il y a opposition entre une zone d'expression de *Shh* (déterminée comme postérieure) et une sans son expression (déterminée comme antérieure). Le résultat est la régénération de trois pattes, dont les axes A-P reflètent la position de *Shh*. Figure adapté de [224].

1.5.6 Participation des nerfs

Une des premières découvertes dans la compréhension de la régénération des pattes amphibiennes fut que les nerfs y sont essentiels [228]. Une innervation suffisante est d'ailleurs un prérequis à la régénération à travers plusieurs groupes phylogénétiques (échinodermes, mollusques, amphibiens...), ainsi qu'à la guérison de la peau chez les mammifères. Le rôle des nerfs dans la régénération constitue une différence majeure entre celle-ci et le développement, puisqu'ils sont nécessaires pour le premier, mais n'entrent dans le bourgeon du membre que tardivement durant le développement [67, 168, 229, 230].

Lorsqu'une patte est dénervée avant l'amputation, l'épithélium de guérison se forme et les cellules commencent à se différencier comme dans les pattes innervées. Ces cellules commencent même la synthèse d'ADN et migrent vers la plaie, mais elles n'entament pas de mitoses et ne forment jamais de blastème. Elles vont plutôt disparaître progressivement par apoptose [231-234]. La dépendance à l'innervation est cependant temporaire et si le blastème a déjà progressé jusqu'au stade LB avant la dénervation, la formation du membre se termine sans problème, comme durant le développement. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle la séparation entre les phases de préparation et redéveloppement est placée à ce stade [235].

1.5.7 Phase de redéveloppement

À partir du stade LB, la phase de préparation est considérée comme terminée. Les nerfs ne sont plus requis pour la régénération, les gènes déterminant les axes d'asymétries sont tous exprimés et le membre en régénération a tout ce qu'il faut pour se compléter [164, 185, 202, 207, 212, 214, 236]. À partir de ce stade, le patron morphogénétique de la patte commence à se reformer. Pendant que la région distale du blastème continue à s'étendre, les structures proximales commencent à se différencier et le cartilage se reforme progressivement [114, 237]. Le muscle commence à se reformer peu après l'os, entre le stade Pal et ED [235]. Finalement, les doigts apparaissent dans l'ordre antérieur vers postérieur, puis s'étendent jusqu'à leur taille normale, complétant ainsi le processus de régénération [238, 239].

1.6 Gènes d'intérêt

La régénération est un phénomène complexe et le fait qu'elle soit possible chez certaines espèces mais limitée chez d'autres dépend d'une multitude de différences entre celles-ci : type de guérison, niveau d'innervation, sources de cellules de remplacement, capacité de reformation de patron... De plus, même si la régénération est un des domaines de la biologie étudié depuis le plus longtemps, l'aspect moléculaire du processus demeure relativement peu approfondi. Il y a donc un vaste choix de processus et gènes sur lesquels se pencher.

Parmi les travaux précédents faits par notre laboratoire, la signalisation canonique des Tgf- β a été identifiée comme étant importante durant les stades précoces de la régénération de l'axolotl, dont la guérison de la plaie et la formation initiale du blastème [151, 240]. Ces résultats ont soulevé une interrogation sur des rôles possibles d'autres groupes appartenant à la superfamille des Tgf- β , dont celui des Bmp. Le patron d'expression de *Bmp2* a donc été caractérisé et quelques expériences fonctionnelles ont été faites : sa surexpression et celle de son antagoniste *Noggin*, ainsi que l'analyse de leur impact sur la prolifération, l'apoptose et le patron de la patte [239]. Les résultats montrent que *Bmp2* est effectivement important pour la chondrogenèse durant la régénération. Par contre, l'étude est limitée par la technique d'électroporation. Son niveau de transfection est difficile à contrôler et si elle est faite avant le stade LB, l'expression du rapporteur mRFP disparaît rapidement et les surexpressions de *Bmp2* ou *Noggin* ont peu d'effet. Ceci rend difficile l'analyse de la fin de la phase de préparation. De plus, cette étude ne se concentre que sur un seul Bmp et n'offre aucune information sur son influence envers ses gènes cibles. Il reste donc beaucoup d'inconnus concernant la signalisation des Bmp durant la régénération chez l'axolotl.

La signalisation des Bmp a déjà été étudiée dans plusieurs contextes autres que la régénération. La section qui suit explique brièvement la voie canonique des Bmp et quelques exemples de ses fonctions durant le développement. Ensuite, ses implications déjà connues durant la régénération chez différentes espèces sont couvertes. Celles-ci serviront de pistes de départ pour mieux comprendre ses rôles chez l'axolotl.

1.6.1 La famille des Bone Morphogenetic Proteins

Les protéines morphogéniques d'os (Bone Morphogenetic Proteins ou Bmp) tiennent leurs noms de la découverte que lorsqu'une matrice d'os mort est décalcifiée et transplantée dans un animal vivant, elle est infiltrée par les cellules de l'hôte et retransformée en os calcifié [241]. Plusieurs facteurs responsables furent éventuellement purifiés et identifiés comme étant des protéines de l'os de 18.5, 22 ou ~30kDa, pouvant être réduites en composants de 16 et 18kDa [242-245]. Une trentaine de membres de la famille des Bmp ont depuis été identifiés et plusieurs autres fonctions leurs sont maintenant attribuées (patron embryonnaire, neurogenèse, homéostasie...). En fait, les Bmp sont impliqués dans tellement de processus qu'il a été proposé de les renommer *Body* Morphogenetic Proteins [246, 247].

1.6.1.1 Structure et signalisation canonique des Bmp

Les Bmp sont initialement synthétisés en précurseurs qui incluent un domaine signal de sécrétion, un pro-domaine aidant le repliement et un domaine actif. Trois paires de cystéines forment des ponts disulfures internes très conservés et la plupart des Bmp ont une septième cystéine qui permet une dimérisation stable entre les peptides. Le domaine signal de sécrétion est clivé dans le réticulum endoplasmique et une fois que les protéines sont dimérisées, leurs pro-domaines sont clivés dans le Golgi. Les dimères actifs sont alors sécrétés dans la matrice extracellulaire ou dans le sang. Ces protéines passent ainsi d'une traduction initiale de 400-500 acides aminés à 50-100 par monomère [247-249].

Les Bmp matures produisent leur signalisation en se liant au domaine extracellulaire de leurs récepteurs (Figure 8). Ceux-ci sont constitués de 2 types de kinases sérine/thréonines ayant un seul domaine transmembranaire. Le type I comprend Alk2, Alk3 et Alk6, tandis que le type II comprend BmpR2, ActR2a et ActR2b. Chaque combinaison de Bmp et de récepteurs a sa propre affinité de liaison. Il y a un certain niveau de redondance dans l'expression de la plupart des récepteurs à travers les organes, bien que leur mutation individuelle provoque des phénotypes différents. Dans la voie canonique (dépendante des Smad), les Bmp se lient à des complexes préformés de deux récepteurs de chaque type. Cette liaison permet aux récepteurs de type II de phosphoryler les récepteurs de type I, qui recrutent et phosphorylent à leur tour

leurs Smad associés aux récepteurs (R-Smad), c'est-à-dire Smad1, Smad5 et Smad8. Deux R-Smad phosphorylés forment un complexe avec Smad4, puis ce trimère se déplace vers le noyau où, en collaboration avec des activateurs ou répresseurs de transcription, il régule les gènes cibles des Bmp [248-251]. Dans le noyau, des phosphatases inactivent les R-Smad, qui sont finalement recyclés vers le cytoplasme [252].

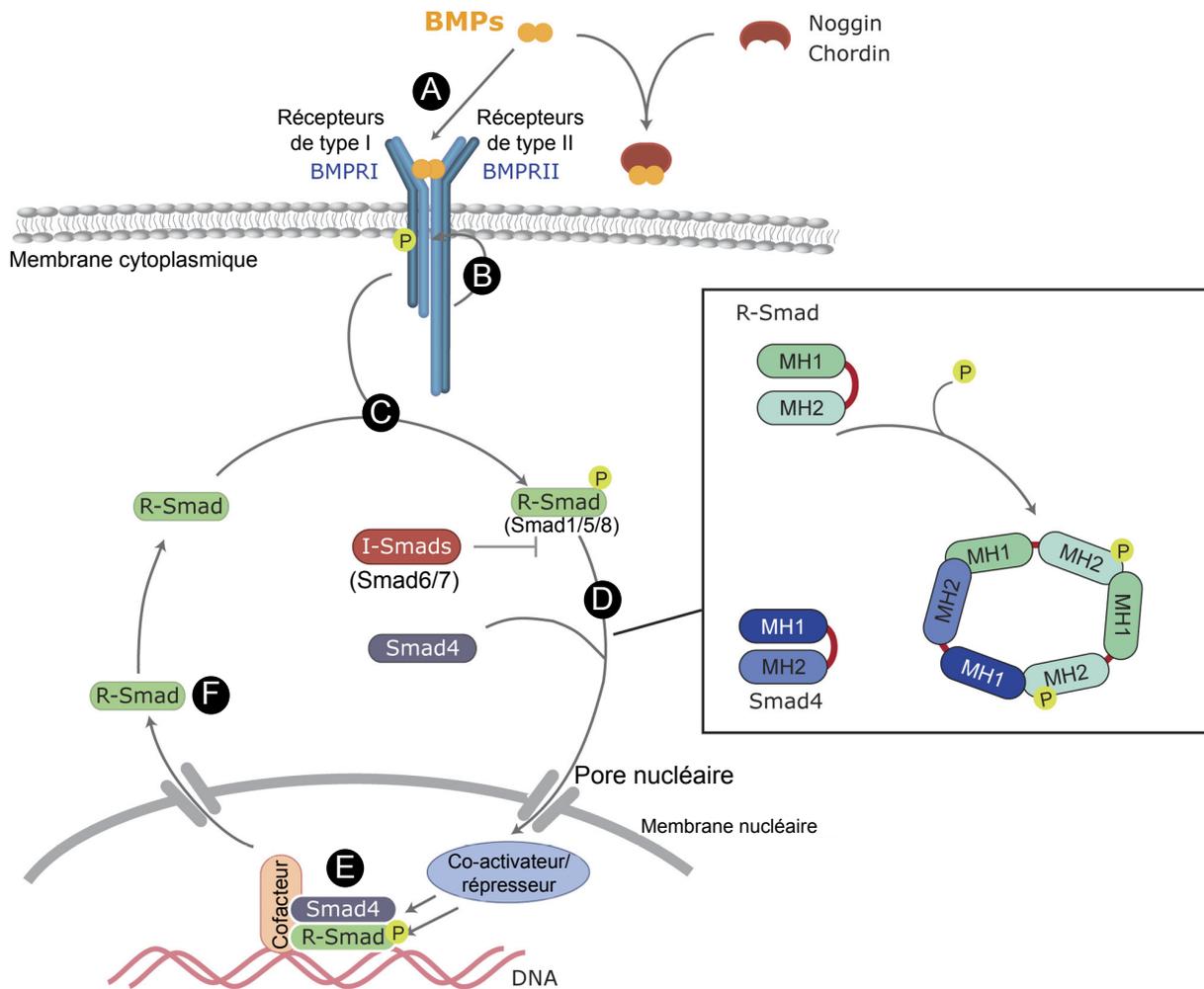


Figure 8. Voie de signalisation canonique des Bmp

(A) Un dimère de Bmp se lie à ses récepteurs en hétérotétramère. (B) Les récepteurs de type II phosphorylent les récepteurs de type I. (C) Smad1/5/8 peuvent maintenant se lier aux récepteurs de type I et se faire phosphoryler. (D) Deux monomères de Smad1/5/8 se lient à un monomère de Smad4 et ce trimère se déplace vers le noyau. (E) En collaboration avec une variété de co-facteurs, activateurs ou répresseurs, il module la transcription. (F) Les R-Smad sont éventuellement déphosphorylés, sortent du noyau et sont prêts à être réutilisés. Figure adapté de [253].

1.6.1.2 Modulation de la voie des Bmp

En plus de leur niveau de transcription, la signalisation des Bmp est régulée à plusieurs endroits. Par exemple, le clivage de leur pro-domaine dépend de protéases spécifiques et le destin de la protéine varie selon celles qui sont présentes. Dans le cas de Bmp4, une fois que le premier site est clivé, le pro-domaine reste associé au domaine actif, mais de façon non-covalente. Le clivage du deuxième site est nécessaire pour dissocier les domaines, sans quoi cette protéine ne signale qu'à courte distance et est préférentiellement dégradée [254]. De plus, une fois sécrétés, plusieurs Bmp dont le pro-domaine est encore lié vont s'associer à la matrice extracellulaire, réduisant leur capacité de diffusion [247].

À l'extérieur de la cellule, plusieurs protéines antagonistes (GREMLIN, NOGGIN, CHORDIN...) peuvent prévenir le contact entre les Bmp et leurs récepteurs. Certains se lient directement aux Bmp, couvrant la surface d'interaction avec les récepteurs, comme NOGGIN avec BMP7 [255]. D'autres, comme BMP3 et INHIBIN, lient plutôt les récepteurs sans les activer et agissent donc en tant que compétiteurs des Bmp [256]. Comme avec les récepteurs, chaque antagoniste peut lier un certain nombre de Bmp, chacun avec leur affinité d'interaction spécifique [247].

Les récepteurs de Bmp ne sont pas les seules protéines membranaires qui interagissent avec les Bmp. En combinaison avec les récepteurs de type I, la protéine membranaire RGM lie BMP2 et BMP4 et facilite leur interaction avec ACTR2A, résultant en l'augmentation de la phosphorylation des SMAD1/5/8. À l'opposé, BAMBI possède un domaine extracellulaire homologue aux récepteurs de type I, mais pas de domaine kinase intracellulaire. Son interaction avec les autres récepteurs mène donc à la formation de tétramères avec une transduction de signal déficiente [257].

Les Smad inhibiteurs Smad6 et Smad7 possèdent un domaine MH2 mais contrairement aux autres Smad, ils n'ont pas de domaine MH1. Le domaine MH2 leur permet d'interagir avec les récepteurs de type I, Smad4 et autres modulateurs transcriptionnels dans le noyau. Cependant, aucune de ces interactions ne permet une signalisation fonctionnelle, ce qui fait d'eux des compétiteurs des R-Smad. Ils stimulent aussi l'interaction d'ubiquitines ligases

comme Smurf1 avec les récepteurs de type I et Smad1/5, menant à leur dégradation [248, 258].

Finalement, il faut tenir compte de la notion selon laquelle la présence de chacun des facteurs régulateurs dépend du contexte biologique spécifique qui est étudié (organe, développement, maladie...) [250]. Ceci amène une énorme complexité et variété à la signalisation des Bmp.

1.6.1.3 Bmp durant le développement

Les rôles physiologiques des Bmp commencent dès la gastrulation. Chez de nombreux groupes d'animaux, *Bmp2/4* sont exprimés à la face ventrale de l'embryon, tandis que leurs inhibiteurs (*Chordin*, *Noggin*...) sont exprimés dans la région dorsale. L'antagonisme entre ces groupes de protéines crée un gradient de phosphorylation des R-Smad, permettant la formation et l'emplacement normal du mésendoderme, de l'épiderme ventral, ainsi que du neurectoderme [259-262]. Chez *Xenopus*, l'inhibition de la voie des Bmp par la surexpression des gènes *smad6* ou *gremlin* provoque la dorsalisation de l'embryon ou même la formation d'un axe de neurulation secondaire. À l'opposé, la surexpression de *bmp2* et *bmp4* causent une ventralisation. De plus, la surexpression de *bmp2* affecte à la fois l'axe D-V et l'axe A-P par la réduction de l'expression de *gsc* et *otx2* par la notochorde et par l'organisateur de Spemann, ce qui provoque l'inhibition de la neurulation [263-265].

Ce type d'implications de la signalisation des Bmp se répète à travers une multitude de processus développementaux, chacun impliquant leur propre groupe de Bmp, de récepteurs et de Smad. Selon les tissus et le gène affectés, une mutation individuelle peut être létale au niveau embryonnaire ou néonatal, affecter la taille et la densité des os/cartilage, créer des anomalies dans le développement du cœur/pancréas/rein/œil, réduire la fertilité, etc. [250, 266]. Un rôle fréquent des Bmp est le maintien de la prolifération [250, 267, 268]. Notamment, ils induisent l'expression de gènes des familles Id et Msx. Les Id se lient à certains facteurs de transcription et inhibent leur liaison à l'ADN. Par exemple, ils visent MyoD et NeuroD, ce qui prolonge la prolifération de précurseurs cellulaires et prévient la myogenèse et la neurogenèse, respectivement [269, 270]. Les Msx ont un effet similaire sur la

prolifération, cette fois-ci par le maintien de l'expression de CyclinD1, ce qui prévient la sortie du cycle cellulaire. De plus, *Msx1* inhibe l'expression de *MyoD* et *Myf5* par le recrutement de l'histone H1b à leur promoteur [271-273]. Selon le contexte, les Bmp peuvent aussi être impliqués dans l'apoptose. Par exemple, ils sont nécessaires à l'apoptose dans l'espace interdigital dans les membres de souris, mais sont inhibés par l'expression de Gremlin entre les doigts des pattes chez le canard [274, 275].

Le développement des pattes, où sont exprimés *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* et *Bmp7* est d'intérêt particulier pour nous. Chez le poulet et la souris, les rôles des Bmp peuvent être séparés en 3 phases où leur activité est consécutivement élevée, faible, puis encore élevée (Figure 9) [276].

Tôt après l'apparition du bourgeon de membre chez la souris et le poulet, *Bmp4* et *Bmp7* sont détectés fortement dans l'ectoderme de l'apex du bourgeon et dans le mésoderme. *Bmp2* est initialement détecté seulement dans l'ectoderme et un peu plus tard dans le mésoderme [275, 277, 278]. Chez la souris, le récepteur *Alk3* est fortement exprimé dans le mésoderme et sa mutation prévient presque entièrement l'induction initiale de l'expression de *Fgf8* et *En1* dans l'AER, perturbant donc simultanément les axes A-P et D-V et provoquant un éventail d'anomalies dans le nombre d'éléments osseux [279]. De façon similaire chez le poulet, la transfection limitée d'un vecteur d'expression de *NOGGIN* réduit localement l'expression de *FGF8* et *EN1*. En contrepartie, la transfection locale de *BMPRIA* ou *BMPRIB* constitutivement actif induit l'expression ectopique de *FGF8* dans l'ectoderme dorsal, mais seulement aux stades précoces. Il semble que ces récepteurs induisent d'abord l'expression des facteurs de transcription *MSX1* et *MSX2* dans l'ectoderme, qui eux-mêmes induisent l'expression ectopique de *FGF8* [280]. L'expression suffisante des Bmp est donc essentielle à l'induction de l'AER.

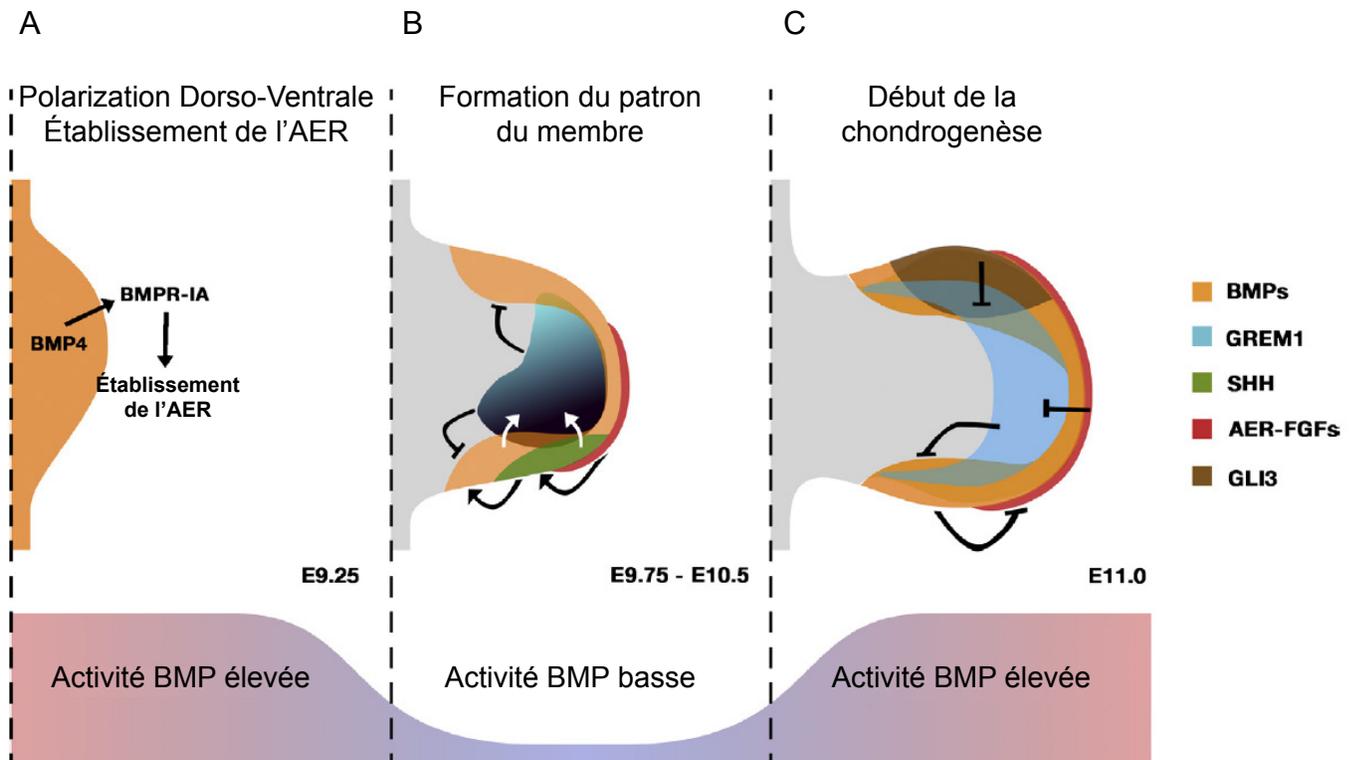


Figure 9. Régulation dynamique de l'activité des Bmp

(A) L'activité des Bmp est initialement élevée et est cruciale à l'induction de l'AER. (B) L'expression de *Fgf8* devient inhibée par les Bmp. *Fgf8* stimule l'expression de *Shh*, qui stimule *Gremlin* (initialement induit par les Bmp) qui antagonise les Bmp. Cette réduction de l'activité est nécessaire à l'expression continue de *Fgf8*. (C) Avec l'expansion du membre, l'éloignement des zones d'expression de *Fgf8*, *Shh* et *Gremlin* rend la boucle inefficace et l'activité des Bmp est reprise, permettant le début de la chondrogenèse. Figure adapté de [276].

Avec la croissance du bourgeon de membre, il y a une inversion de l'impact de l'activation et l'inhibition de la voie des Bmp sur l'expression de *Fgf8*. Les Bmp inhibent maintenant l'expression de *Fgf8*, pendant que *Bmp4* stimule l'expression de *Gremlin* dans le mésenchyme à proximité de l'AER. De son côté, *Fgf8* stimule l'expression de *Shh*, qui stimule à son tour l'expression de *Gremlin* [280-282]. Comme *Gremlin* inhibe l'action des Bmp, il stimule indirectement l'expression de *Fgf8*, créant ainsi la boucle de rétroaction positive *Shh-Gremlin-Fgf8*, qui permet l'expansion de leur patron d'expression respectif et conséquemment les axes A-P et P-D de la patte (Figure 9 B) [210].

L'expansion du membre est suivie d'une augmentation de la distance entre les régions d'expression de *Shh*, *Gremlin* et *Fgf8*, causant un affaiblissement de la rétroaction positive. De plus, l'expression de *Shh* diminue et les Fgf de l'AER inhibent l'expression de *Gremlin*. L'activité des Bmp est donc ré-augmentée et contribue elle-même à la terminaison de la boucle, ce qui mène finalement à l'induction de la chondrogenèse des os [210, 276].

La signalisation des Bmp affecte toutes les étapes de la chondrogenèse et ils sont exprimés fortement durant la formation des os [277, 283-286]. Ils induisent d'abord l'expression du facteur de transcription *Sox9*, qui est nécessaire à la condensation des précurseurs chondrogéniques des membres et à leur différenciation en chondrocytes. Ces derniers deviennent marqués par l'expression de *Col2a1* et *Cbfa1* et voient également une augmentation de l'expression de *Alk6* [237, 287-292]. C'est à cette étape que les chondrocytes commencent à sécréter la matrice de cartilage qui donne à l'os sa forme et une certaine rigidité durant sa phase cartilagineuse [293]. Les Bmp maintiennent l'expression de *Sox9* par les chondrocytes, prolongent leur prolifération et retardent leur différenciation en chondrocytes hypertrophiques [284]. Durant la période de prolifération, les Bmp stimulent également l'expression de leurs propres antagonistes, ce qui contrebalance leur activité et évite l'hyperplasie des os [285, 294]. L'hypertrophie des chondrocytes est suivie de l'ossification endochondrale, qui mène à la calcification de l'os cartilagineux [293].

Un des aspects important de la signalisation des Bmp est qu'il y a une certaine redondance entre les différents membres. Par exemple, dans la patte de souris, la délétion individuelle de *Bmp2*, *Bmp4* ou *Bmp7* avec *Prx1:Cre* (cible le mésenchyme des membres [295]) n'a qu'un effet négligeable sur son développement. Les mutants *Bmp2^{C/C}* présentent un

amincissement de l'omoplate et une syndactylie mineure, les mutants *Bmp4*^{C/C} ont une polydactylie mineure et les mutants *Bmp7*^{-/-} n'ont généralement pas de phénotype. Les doubles mutants *Bmp2*^{C/C}; *Bmp7*^{-/-} ont le même amincissement d'omoplate que les mutants *Bmp2*^{C/C}, manquent une phalange du 3^e doigt et ont un péroné raccourci, mais sont autrement normaux. C'est seulement avec le double mutant *Bmp2*^{C/C}; *Bmp4*^{C/C} que des malformations sévères sont observées : tous les éléments osseux ont une taille très réduite et il manque des doigts et un os du zeugopode [275]. Les délétions de *Smad1*, *Smad5* et *Smad8* spécifiques aux chondrocytes (activées par *Col2-Cre*) ont un effet similaire. Individuellement, la souris mutée est normale ou presque et un seul allèle fonctionnel de *Smad1* ou *Smad5* est suffisant pour la formation du squelette. Cependant, la combinaison *Smad1*^{CKO}; *Smad5*^{CKO} ne permet la formation que de petits agrégats de chondrocytes et de matrice cartilagineuse. La perte supplémentaire de *Smad8* les réduit encore plus. Chez ces mutants, la prolifération des chondrocytes est presque nulle, leur expression de *Sox9*, *Col2a1* et *Cbfa1* n'est pas maintenue et ils ne se différencient pas en chondrocytes hypertrophiques [296]. Ces résultats indiquent que malgré certaines préférences dans les membres de la voie de signalisation des Bmp, plusieurs d'entre eux sont capables d'accomplir une même fonction.

Enfin, il est à noter que les patrons d'expression spécifiques de chaque gènes varient avec les espèces [297]. *Fgf4* est au centre de l'AER chez la souris, mais est plus postérieur chez le poulet. L'expression mésodermale de *Bmp2* est postérieure chez la souris et le poulet, mais antérieure chez l'axolotl, ce qui coïncide avec l'ordre d'apparition des doigts [239, 275, 277]. Contrairement à chez les amniotes, *gremlin* a une région d'expression qui empiète sur celle de *shh* dans la patte de grenouille [298]. L'axolotl n'a d'ailleurs pas d'AER et contrairement aux amniotes ou même *Xenopus*, l'expression de *Fgf8* est diffuse et également mésodermale [207, 298]. La conséquence de la différence dans les patrons d'expression peut d'ailleurs être vue entre les membres d'un même animal, par exemple dans la différence entre les pattes et les ailes des chauves-souris [274]. Malgré les différences d'un contexte à l'autre, les interactions entre ces gènes peuvent servir d'indices pour comprendre leur comportement dans de nouveau contexte, comme celui de la régénération. Il faut seulement éviter d'assumer que tout est identique.

1.6.2 Les Bmp et leurs cibles dans la régénération

Les fonctions de la signalisation des Bmp présentées plus haut ont été établies durant le développement chez des animaux qui ne régénèrent que temporairement, partiellement ou pas du tout (grenouille, souris, poulet). On ne peut donc pas assumer que ces informations puissent être transférées directement au contexte de la régénération chez l'axolotl. Des travaux limités sur les Bmp ont également été faits spécifiquement durant la régénération. Ils sont cependant moins étendus que ceux fait durant le développement, en plus d'être répartis à travers plusieurs espèces. Ils constituent tout de même une base d'information utile et seront présentés dans la section qui suit. De plus, des études ne traitant pas directement des Bmp, mais plutôt de leurs cibles connues, seront également présentées ici.

1.6.2.1 Expression des Bmp et de leurs cibles durant la régénération

Afin de déterminer quels gènes sont importants à la régénération, il faut d'abord savoir lesquels y sont exprimés. Un grand nombre a été détecté durant la régénération animale, mais les gènes de la famille des Bmp sont parmi ceux qui reviennent le plus souvent, en plus des cibles qu'ils affectent durant le développement. On les retrouve dans plusieurs types de régénération à travers de nombreuses espèces. Chez la souris, *Bmp2* et *Bmp7* sont exprimés beaucoup plus fortement dans le blastème du bout du doigt en régénération, comparé à un doigt intact [299]. *Bmp2/4/14* et deux de leurs récepteurs sont exprimés lors de la régénération des bois de cerfs [300]. Chez la souris épineuse, phospho-Smad1/5/8 sont détectés dans les nouveaux follicules pileux lors de la régénération du derme, indiquant que la voie de signalisation est active [122].

Les mammifères ne sont pas les seuls animaux où les Bmp sont détectés durant la régénération. On retrouve même des cas à l'extérieur des vertébrés. Par exemple, l'échinoderme crinoïde *Antedon bifida* possède un homologue de *Bmp2* et *Bmp4* des vertébrés, nommée *anBmp2/4*. Ce dernier est exprimé dans les cellules de blastème de ses bras en régénération, ce qui suggère un rôle similaire à celui observé chez les autres espèces [301].

L'expression des Bmp est souvent associée à celle de leurs gènes cibles. Durant la régénération de la queue chez le poisson-zèbre, *bmp2*, *bmp4* et *bmp6* sont exprimés, en plus des facteurs ostéogéniques *sox9*, *cbfa1* et *col2a1* [302]. Dans le cas de la queue et des pattes de *Xenopus*, l'expression de *bmp2* et *bmp4* est accompagnée de celle de leurs antagonistes *gremlin1* et *noggin*, ainsi que des gènes associés à la formation de patron *msx1*, *msx2* et *fgf8* [298, 303, 304]. Certains auteurs assument simplement l'expression de Bmp et vont se contenter de décrire l'expression de gènes en aval de ceux-ci. Les résultats reflètent généralement ce qui est observé chez les autres espèces. C'est le cas chez amphioxus, où l'homologue de *Cbfa1* est exprimé durant la régénération de ses cirres oraux cartilagineux [84]. De plus, durant la régénération de sa queue, son homologue des *Msx* est exprimé dans les cellules mésenchymateuses et celui de *Chordin* dans les cellules de la notochorde non différenciées [85].

L'expression et une des fonctions de *Bmp2* ont été comparées durant le développement et la régénération de la patte chez l'axolotl [239]. Chez celui-ci, *Bmp2* est détecté par hybridation *in situ* seulement vers la fin du développement du membre, spécifiquement au contour des doigts présomptifs. Contrairement au poulet et à la souris, son expression est initialement antérieure plutôt que postérieure [275, 277]. Ceci correspond à l'ordre de formation des premiers éléments osseux de l'autopode, qui apparaissent de l'antérieur vers le postérieur chez les axolotls. Durant la régénération, *Bmp2* est fortement exprimé à travers le blastème entier aux stades EB et MB. À LB, son expression devient plus distale et commence à refléter le patron observé durant le développement. La convergence vers le patron d'expression développemental autour de LB-Pal est également observée avec *Sox9* (forme des os présomptifs) et *Shh* (région postérieure). Ce type de similarité est aussi observé dans les phénotypes causés par des traitements pharmacologiques. Par exemple, le traitement avec 1µg/mL de cycloppamine (inhibiteur de la signalisation de Shh) ne permet qu'à 2 doigts de se former dans les 2 cas. Dans cette situation, *Bmp2* et *Sox9* demeurent exprimés mais sont restreints aux doigts présomptifs restants [239].

Chez l'axolotl, des similarités dans les patrons d'expression durant le développement et durant la régénération sont observées avec plusieurs gènes reliés aux Bmp. De façon générale, les patrons d'expression durant la régénération commencent à ressembler à ceux du

développement autour du stade LB. Les différences sont principalement avant ce stade. Durant le développement, *Fgf8* est détecté par hybridation *in situ* tôt après la formation du bourgeon de membre et est initialement situé à l'apex du mésenchyme. Durant la régénération, il apparaît vers le stade EB à travers le blastème, dans le mésenchyme directement sous l'AEC. Dans les deux cas, la croissance du membre mène à une expression plus antérieure et plus étendue, mais moins intense [207]. *Shh* apparaît à MB durant la régénération et a un patron semblable à celui qu'il a durant développement : une petite zone d'expression dans la région postérieure du membre [202, 239]. Comme mentionné plus haut, le cas des gènes de la famille des *HoxA* est un peu plus complexe. Durant le développement, *HoxA9* et *HoxA11* sont exprimés tôt à travers tout le bourgeon du membre. *HoxA13* apparaît ensuite dans la région distale. *HoxA11* devient plus tard restreint à la région du zeugopode et *HoxA13* reste dans la région de l'autopode. Les patrons qui ont été publiés pour la régénération sont inconsistants. Selon le groupe de Tanaka, *HoxA13* apparaît dans la région distale du blastème après les autres *HoxA*, comme durant le développement. Selon le groupe de Bryant, *HoxA13* apparaît tôt après l'amputation, même si elle est faite à travers le stylopede, ce qui serait une différence importante entre le développement et la régénération [212, 213, 305].

Une différence claire entre le développement et la régénération est observable chez l'hydre. Elle a un homologue de *Bmp5* et *Bmp8* nommé *hyBmp5-8b*, qui marque entre autres l'endroit où les tentacules se forment. Durant le bourgeonnement de l'hydre, ce gène est exprimé en petites régions indépendante, situées au contour de la région apical qui contient la bouche. Lors de la régénération de la tête, *hyBmp5-8b* apparaît plutôt à l'apex de la structure régénérée. Il est ensuite déplacé en direction basale et divisé en plusieurs régions distinctes autour de la bouche, pour obtenir le même résultat final [306].

1.6.2.2 Les *Bmp* en tant que prérequis à la régénération

Les *Bmp* et certaines de leurs cibles ont été identifiés comme étant nécessaires à la régénération chez plusieurs espèces. Un exemple notable est celui de leur interaction avec *Msx1*. Le gène *Msx1* est parmi les premiers isolés durant la régénération amphibienne [307]. Il a ensuite été découvert que lors du développement des doigts de souris, le domaine

d'expression de *Msx1* est limité à leur mésenchyme apical et que si une amputation est faite proximale à ce domaine, la régénération ne s'opère pas [308]. De plus, le domaine d'expression de *Bmp4* se superpose à celui de *Msx1*. Or, la souris mutante *Msx1*^{-/-} (mais pas *Msx2*^{-/-}) ne régénère pas du tout et voit une augmentation de l'expression de *Msx2* et une diminution de celle de *Bmp4*. Chez ce mutant, la prolifération qui suit normalement l'amputation n'est pas observée. L'application exogène de la protéine NOGGIN chez une souris de type sauvage va également inhiber la prolifération et la régénération, cette fois sans affecter l'expression de *Msx1*, *Msx2* ou *Bmp4*. En contrepartie, la stimulation avec Bmp4 chez la souris *Msx1*^{-/-} permet de restaurer la régénération [309]. Comme mentionné plus haut, l'expression de *Msx1* et *Msx2* est induite par la signalisation des Bmp durant le développement de la patte [280]. Des billes de BMP2 ou BMP7 peuvent étendre la zone capable de régénérer au-delà de la région d'expression de *Msx1*. Dans cette situation, une réexpression de *Msx1* est observée, en plus d'une zone de prolifération du mésenchyme qui ressemble à un blastème [299, 310]. Ces expériences montrent que des Bmp spécifiques agissent en amont et en aval de *Msx1* pour stimuler la prolifération durant la régénération.

Chez le poisson-zèbre, *bmp2*, *bmp4* et *bmp6* sont exprimés dans la queue en régénération et si la moitié d'un blastème est transfectée avec *chordin*, elle ne reforme que des rayons raccourcis. Une réduction de la prolifération est observée, accompagnée par une réduction de l'expression de gènes cibles des Bmp impliqués dans celle-ci et dans l'ostéogénèse (*msxb*, *cbfa1*, *sox9a*...) [302].

Lorsque surexprimés dans la région postérieure d'un blastème d'axolotl au stade LB, les gènes *Bmp2* et *Noggin* vont tous les deux causer une troncation de la patte. L'effet de *Noggin* est légèrement plus étendu et sévère. Dans les deux cas, un ou deux doigts se développent partiellement dans la région antérieure mais aucun n'est formé en postérieur. Le patron de développement restreint causé par *Bmp2* s'explique par une augmentation drastique de l'apoptose et une condensation anormalement élevée dans la région postérieure, qui n'est cependant pas suivie du processus de chondrogenèse normal. Dans le cas de *Noggin*, c'est une diminution de la prolifération qui prévient l'expansion du membre. Les cartilages qui sont formés sont cependant normaux [239, 311]. La chondrogenèse est donc dépendante de la signalisation des Bmp, mais un niveau trop élevé est néfaste au processus normal.

La surexpression du récepteur Alk3 dans les queues de grenouilles étend la période permissive à leur régénération [304, 312]. En contrepartie, au niveau de leurs pattes, l'inhibition de la régénération par un antagoniste inductible (*noggin* contrôlé par le promoteur de *hsp70* : induction temporaire par choc thermique) cause une réduction de l'expression de *msx1* et *fgf8*. Dans cette situation, l'inhibition de la régénération peut être partielle et le nombre de doigts régénérés va de 0 à 5, indiquant un effet sur la formation du patron en plus d'un effet sur la prolifération [303]. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'observation que la surexpression de *noggin* peut prévenir la transformation de l'épithélium de guérison en un AEC [313].

1.6.2.3 Rôles des Bmp et Msx dans la dédifférenciation de tissus musculaires matures

Puisque les Bmp jouent un rôle dans l'induction des Msx dans la régénération du bout de doigt de souris, il est possible que ce soit également le cas dans d'autres processus de la régénération. Durant le développement, *Msx1* prolonge la prolifération des myoblastes et inhibe leur différenciation et leur fusion en myotubes. Son action implique la répression des marqueurs myogéniques MYOD et MYF5. De plus, *Msx1* et *Msx2* stimulent tous les deux l'expression de CYCLIND1 [272, 273, 314]. Il a donc été suggéré que *Msx1* puisse également renverser la différenciation des myotubes. Le groupe de Odelberg a testé cette hypothèse et a observé qu'en effet, lorsque surexprimé dans des myotubes de souris générés à partir de cellules C2C12, *Msx1* provoque initialement une réduction majeure de l'expression des protéines caractéristiques de la différenciation musculaire (P21, MYOGENIN, MRF4, MYOD). Des clivages sont ensuite observés dans 9% des myotubes multi-nucléés et 5% deviennent des cellules mono-nucléées en prolifération [315]. Une prolifération comparable est induite en exposant les myotubes à un extrait de membre de triton en régénération. Les auteurs ont cependant remarqué qu'un nombre équivalent de myotubes répliquent leur génome sans se diviser (incorporent le BrdU, sans clivage) [316].

Les myotubes générés à partir de cellules de tritons ne requièrent que la stimulation avec des dimères de Bmp4 et/ou Bmp7 pour entrer dans le cycle cellulaire. Lorsque stimulés avec des Bmp recombinants, des myotubes *in vitro* voient une entrée en phase S de 24%, qui

passent à 0,2-6% s'ils sont transfectés avec des dominants négatifs des récepteurs de Bmp. Lors de transfections et stimulations similaires sur les fibres musculaires de membres en régénération, l'intégration d'EdU passe de 67% à ~45% [317]. Ceci montre que la signalisation des Bmp participe à la différenciation et prolifération des fibres musculaire lors de la régénération. Son niveau normal n'est cependant pas crucial, puisque ces phénomènes sont encore présents lorsque la signalisation est inhibée. Ceci indique soit que le niveau de signalisation est fonctionnel même s'il est bas, soit que ce n'est pas la seule voie de signalisation qui induit la différenciation et la prolifération.

1.7 Hypothèses et objectifs

Parmi les vertébrés, la régénération des salamandres est unique par l'étendue et la complexité des structures qui peuvent être reformées, ainsi que par le fait qu'elle est possible durant toute leur vie. Elle fonctionne tellement bien qu'il est impossible de distinguer une patte originale d'une patte régénérée. Pour mieux comprendre le phénomène, nous avons choisi d'étudier les rôles de la voie des Bmp durant celle-ci.

Il existe déjà des travaux qui touchent les rôles des Bmp durant plusieurs aspects de la régénération. Les résultats sont cependant fragmentés à travers plusieurs espèces et se concentrent généralement sur des aspects très spécifiques. La recherche sur la régénération chez l'axolotl bénéficierait donc grandement d'une vue d'ensemble des rôles de cette famille, spécifiquement chez cet animal. Pour y arriver, les travaux présentés ici tenteront de déterminer durant quelle(s) période(s) la signalisation canonique des Bmp est active, l'expression de quels gènes dépend d'elle et quels sont les processus qu'elle induit. Nous tenterons également d'apporter une réponse à la question de régénération progressive versus régénération par intercalation. En tenant compte des informations présentées plus haut, nous pouvons formuler les hypothèses suivantes :

Hypothèse 1 : Durant la régénération épimorphique chez l'axolotl, la voie de signalisation canonique des Bmp a un rôle distinct de la voie des Tgf- β .

Objectifs : Cloner les gènes de quelques membres de la famille des Bmp et en déterminer le patron d'expression durant la régénération. Déterminer la phosphorylation des transducteurs canoniques de la signalisation des Bmp. Déterminer l'expression de cibles potentielles des Bmp durant la régénération normale et lorsque la signalisation est inhibée. Inhiber la signalisation des Bmp durant la régénération et évaluer les conséquences morphologiques.

Hypothèse 2 : La formation du patron de régénération se fait de façon progressive (proximale vers distale) et non pas par intercalation.

Objectifs : Inhiber la signalisation des Bmp durant différentes périodes de la régénération et déterminer quels patrons de formation osseuse sont permis selon le traitement.

2 Matériaux et méthodes

2.1 Animaux

2.1.1 Entretien des animaux

Les larves d'axolotls (2,5-3cm) sont achetées du "Ambystoma Genetic Stock Center" (Lexington, Kentucky, USA) et sont utilisées lorsqu'elles atteignent une taille appropriée. Toutes les expériences présentées ici sont faites sur des animaux de 3 à 6 cm (tête au bout de la queue), selon ceux qui sont disponibles. Des animaux de la même longueur (+/- 0.5cm) sont utilisés pour chaque expérience individuelle. Les animaux sont gardés individuellement dans la solution d'Holtfreter 20% (0,29 mM MgSO₄, 0,19mM CaCl₂, 0,17mM KCl, 12,5mM NaCl, 0,45mM Trizma fish grade) à 19-22°C. Une photopériode constante est utilisée : 12h de lumière, 12h de noirceur. Selon leur taille, les axolotls sont nourris avec des artémies vivantes ou congelées.

2.1.2 Amputations

Les animaux sont préalablement anesthésiés en les transférant dans une solution de MS222 0,1% (Sigma, E10521, dilué dans la solution d'Holtfreter) jusqu'à ce qu'ils ne réagissent plus à un stimulus de douleur (pincement de la patte postérieure). Ils sont ensuite amputés des 2 pattes antérieures, à travers le radius et l'ulna (avant-bras/zeugopode) ou à travers l'humérus (stylopode) (voir Figure 6). Les os sont tronqués pour que le plan d'amputation soit plat. Les stades de régénération (voir Figure 10) sont déterminés visuellement sur les animaux non-traités ou sur les contrôles traités au DMSO. Les animaux de 3-6 cm ont besoin de 5-6 semaines pour que tous les os de la patte soient complètement reformés. Une fois les expériences terminées, les animaux sont à nouveau anesthésiés et les tissus sont recueillis. Les animaux sont ensuite euthanasiés par décapitation. Tous les protocoles animaux ont préalablement été approuvés par le Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux de l'Université de Montréal.

2.1.3 Préparation du LDN193189 et Traitements

La masse exacte de LDN193189 (Sigma SML0559) est d'abord déterminée. La drogue est diluée dans le DMSO et des solutions stocks de 0,2mM, 0,5mM et 1mM sont ensuite préparées par dilutions sérielles avec du DMSO. Le DMSO sert également de contrôle pour les traitements. Les solutions expérimentales sont préparées en diluant les stocks de LDN193189 1:1000 dans la solution d'Holtfreter, pour obtenir les concentrations finales de LDN193189 de 0,2 μ M, 0,5 μ M et 1 μ M. Les animaux sont maintenus dans les solutions expérimentales selon les horaires spécifiés pour chaque expérience. Les dilutions sont faites fraîches et changées chaque jour.

2.1.4 Micro-injections de la protéine Fgf8

La protéine recombinante de souris Fgf8 (R&D Systems, 424-FC/CF) est dissoute dans du PBS 0,7X à une concentration de 0,5 μ g/ μ L. Les animaux sont amputés à travers les deux avant-bras et traités au DMSO seulement ou au LDN193189 0,5 μ M du jour 5 au jour 12 post-amputations. Chaque jour, du jour 7 au jour 11 inclusivement, le blastème de la patte droite est injecté avec 0,3 μ L de PBS (condition contrôle) ou 0,3 μ L de solution de Fgf8. Les deux solutions contiennent 0,01% de Fast Green pour localiser où elles sont injectées.

Les aiguilles sont faites à partir de capillaires de borosilicate (Sutter Instrument B100-75-10). Leur intérieur est d'abord traité au Sigmacote (Sigma, SL-2). Elles sont ensuite chauffées et étirées mécaniquement (Sutter Instrument P-87) et leur bout est brisé en biseau pour avoir un diamètre d'environ 20 μ m. Les aiguilles sont ensuite connectées à un injecteur pneumatique (MicroData Instruments, PM 1000 Cell microinjector) dont la pression est ajustée légèrement au-dessus de ce qui est requis pour éjecter de l'eau déionisée. Les solutions sont aspirées et rapidement injectées dans le blastème. Les aiguilles sont changées entre chaque injection.

2.2 ARN

2.2.1 Isolation d'ARN

Une fois que le stade de régénération désiré est atteint, les animaux sont anesthésiés. Le blastème et 0,5-1mm du moignon des deux pattes en régénération sont recueillis, puis homogénéisés dans 0,5mL de TRIzol (Life Technologies, 15596018) avec une seringue et une aiguille. L'ARN est extrait selon le protocole fourni avec le TRIzol, à l'exception que l'ARN précipité est rincé 3 fois avec de l'éthanol 75% et qu'il est dissous dans 10 μ L d'eau "Ultrapure RNase-free water" (Life Technologies, 10977015). L'ARN est ensuite quantifié en diluant 1 μ L dans 100 μ L de SYBR Green II 2.5X (Life Technologies, S7580) (dilué dans 5 mM Tris-HCl, pH 8.0). Une lecture de fluorescence est faite (excitation: 485 nm; émission: 520 nm) et comparée avec des standards d'ARN d'embryon préparés de la même façon et pré-quantifiés par absorbance.

2.2.2 Transcription inverse pour qPCR

Les transcriptions inverses sont faites avec 250ng d'ARN. Celui-ci est mélangé avec 2 μ L d'amorce dT17 (25 μ M) (Tableau I), 0,5 μ L d'hexamères aléatoires (100 ng/ μ L) (Life Technologies, 48190011), 1 μ L de dNTP 10mM (fait à partir de : Life Technologies, 10297018) et complété à 12 μ L avec de l'eau Ultrapure. La solution est chauffée à 65°C, 5min, puis rapidement mise sur glace pendant 2min. À la solution est ajouté : 4 μ L de First Strand Buffer 5X, 2 μ L de DTT 0.1M et 1 μ L de RNaseOUT (Life Technologies, 10777019). Elle est ensuite incubée à 42°C 2min. Ensuite, 1 μ L de Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, 18064014) est ajouté au mélange (ou 1 μ L d'eau Ultrapure pour les contrôles RT-). Le mélange est incubé successivement à 25°C 10min, 42°C 50min, 50°C 10min et 70°C 15min. Finalement le mélange est dilué en ajoutant 140 μ L d'eau déionisée.

Tableau I. Amorces pour qPCR

	Amorce sens	Amorce anti-sens
Gapdh	TTGTCCTACGTGTGCTGTCTGT	TCACACAGTGCCAAGATAAGTGTT
Bmp2	GCAGCTTCCACCATGAAGAAAGT	CCAGAGGTCTCCGTGACCAG
Bmp5	TCAAGGCAAGTGAGGTTCTGCT	TGTAATCTCCGATACTGGGCATC
Bmp7	CGCAGAGAACAGTAGCAGCGA	AATTCAGTGGGAAAAGAACATTCTCT
Msx1	TGTGCACCAGCCTGAAATAC	TAATTCATGCGGCCATACAA
Msx2	AACAGTACCTGTCCATTGCTGAGAGA	AAGGGTAAACTGAAGCCAGGAGGTAAG
ID3	CCTGCTCTACACCATGAGCGA	GAAGATGTAGTCGATGACGTGCTG
Shh	GAAATCCTCTACCACATAGGGACATG	CGAAGAGGTGGGCTTTCAGC
Cbfa1	GAGGCACAGACAGAAGCTTGATG	GAAGGCCGAGGACTCTGAGTTG
Sox9	GCTTGTGCTCTGCACTACAGCTT	AGAGGTGAGTGTTCGGTTCGAG
Collagen2a1	CAGGAGTTAAAGGACACAGAGGTTACC	CTCACCAGGAGCACCACCTT
Fgf8	CTTTATGCCGGGTTACGATCC	GTAGAGAGCCGTTTATCGCTCG
Fgf10	CCACTTCCTTCCCATGCAGA	CACCAATTGTACTIONTGGCAAGAGAC
dT17 (pour RT)	AAGGATCCGTCGACATCGATAATAC GACTCACTATAGGGATTTTTTTTTTTTTTTTTT	

2.2.3 qPCR

Les réactions de qPCR sont faites dans 20µL de NEB Standard *Taq* Buffer 1X et incluent un ajout de MgSO₄ (NEB, B1003S) pour en augmenter la concentration de 0,5mM, de SYBR Green I 0,33X (Life Technologies, S7580), de dNTP 0,2mM, de 250nM de chaque amorces, de 0,5U de Hot Start *Taq* (NEB, M0495L) et de 2 µL d'échantillon de cDNA. Comme contrôle, chaque série d'expérience inclut au moins un échantillon "RT-", où l'ARN n'est pas inversement transcrit, ainsi qu'un "Blanc" où l'échantillon est seulement de l'eau déionisé. Les réactions sont faites dans des plaques LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche, 04 729 692 001). L'efficacité de toutes les paires d'amorces (synthétisées par Life Technologies) est préalablement testée. Leurs séquences sont indiquées dans le Tableau I.

Les cycles de PCR et les mesures de fluorescence sont faits dans un système LightCycler 480. Le programme suivant est utilisé : dénaturation à 95°C 2min, amplification avec 45 cycles de 94°C 15sec, 60°C 30sec, 72°C 60sec, courbe d'hybridation à 65°C 1min suivi d'une augmentation à 97°C à 0,11°C/sec. La quantification de la fluorescence est faite durant le programme d'amplification, à la fin des étapes d'élongation (à 72°C). L'analyse des données est faite avec le logiciel du LightCycler 480 v.1.5.0. Les Cp sont calculés avec l'analyse "Abs Quant/2nd Derivative Max". L'expression des gènes cibles est ensuite calculée par rapport aux

gènes de ménage, selon leur Cp et leur efficacité d'amplification spécifique. Le calcul pour obtenir une valeur relative pour chaque puit va comme suit : $(\text{Efficacité})^{(40-\text{Cp})}$. Pour chaque gène, un ratio est calculé par rapport à la valeur relative obtenue pour le gène *Gapdh* du même échantillon. *Gapdh* est utilisé comme standard puisque son expression varie peu durant la régénération [318]).

2.2.4 RACE 3' et 5' (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Ce protocole de RACE 3' et 5' est basé sur des protocoles qui exploitent l'activité "terminal-transferase" et la capacité de "template-switching" de la Superscript II [319, 320]. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le Tableau II. Les réactions de transcriptions inverses sont faites sur des mélanges d'ARN couvrant 9 stades de régénération répartis entre 0h à ED. Environ 300ng d'ARN total est mélangé avec 1µL d'amorce RACE-3-FS-1 (1µM) et 1µL de dNTP Mix 10 mM et le volume est ajusté à 12µL avec de l'eau Ultrapure. Le mélange est chauffé à 65°C, 5min, puis mis rapidement sur glace, 2min. À la solution est ajouté : 4µL de First Strand Buffer 5X, 1µL de DTT 0,1M, 1µL de RNaseOUT (Life Technologies, 10777019) et 1,5µL de Superscript III reverse transcriptase (Life Technologies, 18080044). Le mélange est incubé durant 5 cycles de 50°C 5min, 55°C, 1min, 50°C 5min, 60°C 1sec. Une incubation à 50°C 10min est ensuite faite. Est ensuite ajouté : 0,6µL de MnCl₂ 100mM fraîchement préparé, 1µL d'amorce RACE-T7-5-Adapter-5G (10 µM) et 0,5µL de Superscript II (Life Technologies, 18064014). Le mélange est incubé à 42°C 60min, 70°C 15min. Est ajouté : 0,5µL de RNase H 2U/µL, suivi d'une incubation à 37°C 20min, puis 65°C 20 min. Les réactions sont purifiées avec le "Purelink™ PCR purification kit" (Binding buffer H.C.) (Life Technologies, K310001). Les cDNA purifiés sont élués avec 100µL de Tris-HCl 10mM, pH8.0.

L'amplification par PCR est faite par trois réactions successives de 25, 25 et 35 cycles respectivement. Il faut donc au moins 3 amorces spécifiques au gène d'intérêt pour chaque direction (pour faire des "nested PCR"). Les amorces non-spécifiques sont des mélanges d'amorces qui reconnaissent les séquences ajoutées durant la transcription inverse et permettent le "step-out PCR" et "PCR suppression"[319]. Un seul de ces mélanges est utilisé

par réaction, mais ils doivent être utilisés dans l'ordre suivant : RACE-3' Primer Mix, RACE-3' Nest Mix, puis RACE-3' SO Mix 3 (voir Tableau II). Le 1^{er} PCR est fait dans 25µL : 20,3µL d'H₂O déionisée, 0,5µL de cDNA préparé pour RACE, 0,5µL d'amorce spécifique au gène 25µM, 0,5µL de mélange d'amorce non-spécifique, 2,5µL de Standard Taq Buffer NEB 10X, 0,5µL de dNTP 10mM, 0,2µL de Taq NEB 5U/µL, 0,125µL de Platinum Pfx (prédiluée à 0,04U/µL dans Buffer Taq 1X). La réaction est incubée à 95°C 2min, suivi de 25 ou 35 cycles de 95°C 20sec, 60°C 30sec, 72°C 1-4min, et une élongation finale à 72°C 7min. Un 2^e PCR est fait avec le même protocole mais en remplaçant les cDNA par 0,5µL du 1^{er} PCR. Les amorces sont aussi remplacées par la 2^e amorce spécifique et le 2^e mélange d'amorces non-spécifiques. Le même principe est utilisé pour un 3^e PCR. Les produits de chaque réaction sont analysés sur un gel d'agarose et visualisé avec du bromure d'éthidium en UV. Les produits de PCR sont purifiés avec le "Purelink™ PCR purification kit" (Life Technologies, K310001) ou par Gel Extraction (Life Technologies, K210012) et ensuite envoyés au séquençage avec une amorce spécifique au gène.

La séquence complète du *Shh* d'axolotl a été obtenue par RACE avec les amorces indiquées dans le Tableau III et est publiée à travers Genbank (Accession number : KX809594).

Tableau II. Amorces non-spécifiques pour RACE 3' et 5'

(Les "Mix" sont fonctionnels pour cloner les régions 3' et 5' des cDNA)

		Séquence	Concentration (Stock)
	RACE-3-FS-1	TAATACGACTCACTATAGGGAGATACGAGTTCGCTGCAGG ATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	1µM
	RACE-T7-5-Adapter-5G	TAATACGACTCACTATAGGGAGATACGAGTTCGCTGCAGG ATCGGGGG	10µM
RACE-3' Primer Mix	RACE-3-SP-1	GAGAGAACGTGACGAAACTGACATAATACGACTCACTATA GGGAGATACGAGTT	1µM
	RACE-SO-1	GAGAGAACGTGACGAAACTGACA	7,5µM
RACE-3' Nest Mix	RACE-3-SP-2	AGTTTGCTAGTTATTGCTCAGCGGTACGAGTTCGCTGCAGG ATC	1µM
	RACE-3-SO-2	AGTTTGCTAGTTATTGCTCAGCGG	7,5µM
RACE-3' SO Mix 3	RACE-3-SP-3	GCGAACACCACTACAGTCAGGAGAGTTTCTAGTTATTGC TCAGCGG	1µM
	RACE-3-SO-3	GCGAACACCACTACAGTCAGGAG	7,5µM

Tableau III. Amorces spécifiques pour RACE 3' et 5' de *Shh*

	Séquence	Concentration (Stock)
Pour RACE 3'		
aShh-F-113	CTCTGGTAGGGACCAGTGGGA	25µM
aShh-F-44	AGAAAGGAGCGGTGCTGTTTG	25µM
aShh-F192	GCGATACGAAGGCAAGATCAC	25µM
Pour RACE 5'		
aShh-R316	ACCTCTGGGTCATTAGCCTGTC	25µM
aShh-R743	GTCCAGGAACATGAGGAAAGTCG	25µM
aShh-R785	GTCTCTATCACGTAGAACAACACTTTTGGTGA	25µM

2.3 Protéines et Western Blot (Immuno-buvarmage de type Western)

2.3.1 Préparation des protéines

Des protéines de pattes en régénération sont recueillies à chaque stade d'intérêt. Les animaux sont d'abord anesthésiés et des tubes contenant 50µL de tampon de Laemmli modifié (Tris-HCl 97,75mM pH 6,8, SDS 3,75%, Glycerol 18,75%, DTT 200mM, NaF 50mM) sont préalablement mis sur glace sèche. Le blastème et 0,5-1mm du moignon des deux pattes antérieures sont recueillis et transférés dans les tubes de Laemmli. Une fois que tous les échantillons sont recueillis, ils sont soniqués/homogénéisés, puis quantifiés avec le EZQ Protein Quantitation Kit (Life Technologies, R33200).

2.3.2 Méthode d'immunobuvarmage de type Western

Un gel de SDS-PAGE est préparé en superposant une couche de gel avec 5% d'acrylamide, (Tris-HCl 125mM pH 6,8, SDS 0,2%, mélange acrylamide/bis-acrylamide (29:1) 5%, ammonium persulfate 0,1%, TEMED 0,1%) par-dessus une couche de gel avec 10% d'acrylamide (Tris-HCl 375mM pH 8,8, SDS 0,2%, mélange acrylamide/bis-acrylamide (29:1) 10%, ammonium persulfate 0,04%, TEMED 0,05%). 20µg de chaque échantillon de

protéines (dans 20 μ L total de Laemmli chacun) sont chargés sur le gel. Les protéines sont séparées par électrophorèse, puis transférées sur une membrane de PVDF (EMD Millipore, IPVH00010), à 65 mA, 16h. Les membranes sont rincées dans du PBS 1X 2x5min, puis fixées avec du PFA 0,4% (dilué dans du PBS 1X) durant 2h et ensuite rincées dans du PBS 1X 5x5min.

Les tampons utilisés pour chaque anticorps sont spécifiés dans le Tableau IV. Les incubations sont faites à la température de la pièce, sauf s'il est spécifié autrement. Les membranes sont incubées dans la solution de blocage (tampon, sérum de poulet 5% (Life Technologies, 16110082), Tween 20 0,1%) pendant 1h, rincées 1min dans la solution tampon, puis incubées 1h (ou 16h à 4°C pour Smad2 et phospho-Smad2) avec la solution d'anticorps primaire (tampon, BSA 3%, Tween 20 0,2%, azide de sodium 0,02%). Voir le Tableau IV pour les dilutions des anticorps. Les membranes sont ensuite rincées 3x10min dans la solution de blocage et sont incubées 1h avec l'anticorps secondaire (anti-souris ou anti-lapin) conjugué à la HRP (Bio Rad, 170-6515 et 170-6516), dilué 1:5000 dans la solution de blocage. Elles sont rincées 4x5 min dans la solution tampon (avec 0,1% de Tween 20) et incubées avec le Lumi-Light PLUS (Roche, 12 015 196 001) ou avec du LumiGLO 1X (Cell signaling, 7003) pour le Gapdh. La détection du signal est faite avec des films d'autoradiographie (Progene, 39-20810).

Les membranes sont utilisées pour plusieurs immuno-buvardages, ce qui nécessite d'enlever les anticorps qui y sont liés. Pour ce faire, elles sont incubées dans une solution constituée de SDS 2%, de β -mercaptoethanol 100 mM et de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, à 50°C pendant 15-30 min. Elles sont ensuite rincées dans l'eau déionisée jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de trace de détergent, puis utilisées avec un autre anticorps primaire.

Tableau IV. Anticorps utilisés en immunobuvardage de type Western

Protéine Cible	Source	Compagnie/Code de produit	Dilution	Tampon pour WB
Gapdh	Souris	Sigma, G8795	1:2000	1X PBS
Smad1	Lapin	Cell signaling, 9743P	1:2000	100 mM Tris, pH7,5
Smad2	Lapin	Cell signaling, 5339	1:500	1X TBS
Smad5	Lapin	Cell signaling, 9517P	1:1000	100 mM Tris, pH7,5
phospho-Smad1/5	Lapin	Cell signaling, 9516P	1:2000	100 mM Tris, pH7,5
phospho-Smad2	Lapin	Cell signaling, 3108	1:500	1X TBS
ERK1	Lapin	Santa Cruz, sc-94	1:200	100 mM Tris, pH7,5
phospho-ERK1/2	Lapin	Cell signaling, 4370S	1:2000	100 mM Tris, pH7,5

2.3.2 Mesure de densitométrie pour les immunobuvardages de type Western

Les films radiographiques sont numérisés en noir et blanc (ou convertis si numérisés en couleur). Les mesures de densitométrie sont faites dans Adobe Photoshop CS6. L'outil "Rectangle Marque Tool" est utilisé pour déterminer un rectangle de surface constante, de taille suffisante pour entourer entièrement la plus grosse des bandes de la série d'intérêt (fait pour chaque film). La valeur grise moyenne (Select data point > Gray Value (Mean)) est acquise à partir de la fenêtre "Measurement Log". Une mesure d'un endroit sans bande est faite pour déterminer la valeur du bruit de fond. La valeur moyenne de chaque bande est ensuite mesurée. Le bruit de fond est soustrait à la valeur de chaque bande. Les nouvelles valeurs sont normalisées en divisant par la valeur la plus élevée de la série. Le bruit de fond a donc une valeur de 0 et la bande la plus intense a une valeur de 1.

2.4 Histologie

2.4.1 Coloration du cartilage au Victoria Blue

Une fois les expériences complétées, les animaux sont sacrifiés et fixés dans la solution de Bouin's (71% d'acide picrique saturé, 24% de solution de formaldéhyde saturée et 5% d'acide acétique glacial), pendant au moins une nuit. Les échantillons sont ensuite rincés 2h

dans l'éthanol 70% et rincés plusieurs fois dans le NH₄OH 2%, jusqu'à ce que le tissu ne soit plus jaune. Ils sont traités 30min avec du H₂O₂ 3% pour blanchir les mélanocytes, suivi d'un rinçage à l'alcool acide (EtOH 70%, HCl 0,37%), 2h. Les échantillons sont colorés 2h dans du Victoria Blue 1% (dilué dans l'alcool acide) et rincés plusieurs fois dans l'éthanol 70%. Finalement les échantillons sont déshydratés avec des rinçages de 1h dans l'éthanol 95%, puis 100% et clarifiés dans le salicylate de méthyle.

2.4.2 Hématoxyline & Éosine, BrdU et TUNEL

Douze heures avant de sacrifier les animaux, 10µL par gramme d'animal de solution de BrdU (Life Technologies, 000103) sont injectés dans la cavité intrapéritonéale (IP). Les pattes sont recueillies et fixées dans du PFA 4% dilué dans du PBS 0,7X, à 4°C, 16-24h. Elles sont ensuite rincées au PBS 0,7X 3x20min, puis déshydratées et enrobées dans la paraffine. Les blocs de paraffine sont coupés en sections de 10µm d'épaisseur et des coupes successives sont colorées à l'Hématoxyline et l'Éosine (H&E), testées pour l'incorporation de BrdU ou testées avec l'essai TUNEL.

Pour la coloration H&E, les coupes sont colorées avec l'hématoxyline de Mayer (modification de Lillie) (Dako, S3309) et de l'Éosine Y 1% (Sigma, 1159350100) selon le protocole du fabricant. Les protocoles pour l'incorporation de BrdU et l'essai TUNEL sont décrits dans [239]. Cependant, pour la détection du BrdU, le substrat de la HRP est remplacé par la tyramide CF640R (Biotium, 92175). Pour l'essai TUNEL, l'anticorps secondaire Alexa Fluor 594 de chèvre anti-souris (Life Technologies, A11020) est utilisé.

2.4.3 Immunofluorescence pour pi-Smad1/5

Les coupes histologiques sont déparaffinées, puis rincées dans le PBST (PBS 0,7X, Tween 20 0,05%). Elles sont ensuite traitées avec 0,05µg/mL de protéinase K (diluée dans le PBST) à la température de la pièce durant 30min, puis rincées 2x5min dans le PBST. Les lames sont submergées dans la solution HIER (Citrate 10mM, EDTA 1mM, Tween 20 0,1%) et chauffées dans un autocuiseur (Cuizen digital pressure cooker) à une pression de 7.5psi,

durant 15 minutes. Elles sont rincées 1x5min fois dans la solution HIER, 2x5min dans le TBS 1X et 1x5min fois dans le TBST (TBS 1X et 0.05% Tween 20). Un blocage est ensuite fait avec 5% de sérum de poulet dans du TBST, 1h. Les lames sont incubées à 4°C durant la nuit avec l'anticorps anti-phospho-Smad1/5 (Voir Tableau IV) dilué 1:300. Après des rinçages 3x5min de TBST, elles sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP, dilué 1:400, 1h, puis encore rincées 3x5min dans le TBST. Les lames sont rincées 5min dans le PBST, incubées 8min avec la tyramide CF640R 11.2µM (dans PBST, H₂O₂ 0,015%) et rincées 3x5min dans le PBST. Finalement, une lamelle est montée sur les lames avec le Prolong Gold (Invitrogen, P36931).

2.5 Hybridation *in situ* sur coupes

2.5.1 Synthèse des sondes d'ARN marquées à la DIG

Des amplicons de PCR sont générés pour chaque gène avec les amorces indiqués dans le Tableau V. Les amorces anti-sens contiennent toutes en 5' la séquence du promoteur de la polymérase d'ARN T7 (TAATACGACTCACTATAGGGAGA, non-indiqué dans le tableau). Les amplicons sont purifiés avec le "Purelink™ PCR purification kit". Pour synthétiser une sonde, 9µL d'amplicon purifié est mélangé avec 4µL de tampon T7 5X, 2µL de DTT 0,1M, 1µL de RNaseOUT, 2µL de "RNA DIG labelled NTP mix" 10X (Roche 11277073910) et 2µL de polymérase d'ARN T7 (Invitrogen 18033019). La solution est incubée à 37°C, 3h. L'ADN est ensuite digéré en ajoutant 4µL de H₂O DEPC, 3µL de tampon de DNaseI 10X, 1µL de RNaseOUT et 2µL de DNaseI (Invitrogen 18068015). La solution est incubée à 37°C, 30min. La sonde est précipitée en ajoutant 4µL de Glycogen 5µg/µL, 2,5µL de LiCl 4M, 1µL d'EDTA et 82µL d'éthanol 100%. La solution est incubée à -20°C durant la nuit. Le lendemain, la solution est centrifugée et le culot est lavé une fois avec 500µL d'éthanol 75%. Le culot est resuspendu dans 50µL de H₂O DEPC et quantifié. Le tout est ensuite dilué à 10µg/mL dans la solution d'hybridation (SSC 4X, formamide 50%, ARN de levure *Torula* 1mg/mL, héparine 0,1mg/mL, solution de Denhart 1X, Tween 20 0,1%, CHAPS 0,05%, EDTA 5mM).

Tableau V. Amorces utilisées pour amplifier les sections servant à faire des sondes

Gène	Amorce Sens	Amorce Anti-sens	[PK]	T° Hyb.
Bmp2	CCAATGGATGTTTCCAAGCG	AGCAGGCGGAGCTCGAACTC	5µg/mL	66°C
Bmp7	AGCAACAGAGATCCACCTGC	CTTGATGCTTGCTCTGGT	25µg/mL	44°C
Fgf8	GTCCGAAGGGTTCAGAATGAA	GCGTTGATCTTCTTGTGCCAAG	10µg/mL	54°C
Fgf10	GAACGATGTGCGAATGGGTAC	GCATCAATCTTGAGGAAGTAGTTGGTA	5µg/mL	57°C
HoxA11	GCAGGCTTTCGACCAGTTCTTC	GTACGGGCACCTCTTCTTCG	5µg/mL	68°C
HoxA13	CAGTGCCGGAACCTGATG	GACGTGTCCATGTACTGTCCGG	20µg/mL	69°C

2.5.1 Protocol d'hybridation in situ sur coupes

Les coupes sont déparaffinées et rincées dans le PBST (fait avec H₂O DEPC). Les coupes sont traitées à la protéinase K (dans PBST, concentrations dans le Tableau V) à température de la pièce, 30min, puis rincées 2x5min au PBST. Elles sont refixées avec 1% de PFA (dans PBST) à température de la pièce, 30min, puis rincées 2x5min au PBST. Elles sont ensuite traitées avec 0,25% d'anhydride acétique (dans une solution de Triéthanolamine 0,1M, pH7.8) à température de la pièce, 10min, puis rincées 2x5min au PBST. Les coupes sont pré-hybridées dans la solution d'hybridation, à la température d'hybridation ("T° Hyb", voir Tableau V) durant 1h. Pendant ce temps, la sonde est fraîchement diluée à 1µg/mL dans de la solution d'hybridation contenant 10% de sulfate de dextran. Cette dilution est dénaturée en la chauffant à 80°C, 5min, puis mise sur glace, 5min. La solution est mise sur les coupes, qui sont ensuite couvertes d'une lamelle. Les lames sont mises dans une boîte humide qui est scellée, puis incubées à la T° Hyb, 16h.

Le 2^e jour, les lamelles sont enlevées et les coupes sont rincées avec du SSC 2X à T° Hyb, 10min. Elles sont ensuite incubées avec la solution d'hybridation (sans sonde ni dextran) à T° Hyb, 30min. Les lames sont rincées à T° Hyb, 2x10min dans le SSC 2X et 2x10min dans le SSC 0,2X. Elles sont ensuite rincées dans le PBS à température de la pièce, 5min. Les coupes sont bloquées avec du sérum de mouton 10% (dilué dans le MABT (maléique anhydride 100mM, NaCl 150mM, Triton X-100 0,2%, pH 7,5)), 1h. Elles sont ensuite incubées avec

l'anticorps anti-Dig (Roche 11333062910), 1:50 (dans la solution de blocage), à 4°C pendant 16h.

Le 3^e jour, les coupes sont lavées dans le MABT, 3x5min. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la HRP (dilué 1:400 dans la solution de blocage) à la température de la pièce, 1h. Elles sont rincées 3x5min dans le MABT, puis 5min dans le PBST. Elles sont alors incubées 8min avec la tyramide CF640R 11.2µM (dans PBST, H₂O₂ 0,015%) et rincées 3x5min dans le PBST. Finalement, une lamelle est montée sur chaque lame avec le Prolong Gold (Invitrogen, P36931).

2.6 Photos

2.6.1 Prise de photos et traitement d'images

Les photos d'animaux vivants et de pattes entières (Victoria Blue) sont prises avec une caméra Lumenera Infinity 2 connectée sur un stéréomicroscope Leica MZ16F. Les coupes sont photographiées avec un microscope Zeiss Axio Imager M2. La caméra Axiocam 506 (photos en couleurs) est utilisée pour les colorations histologiques et la caméra Axiocam MRm (photos monochromes) est utilisée pour les coupes marquées avec des fluorochromes. Les photos composites sont enregistrées avec le logiciel Zeiss Zen 2 Pro. Les images sont coupées et l'intensité lumineuse est ajustée dans Adobe Photoshop CS6. Les dessins des membres en régénération sont tracés à l'aide d'Adobe Illustrator CS6, à partir de photos de membres réels (quelques modifications sont faites sur les tracés). Les figures sont assemblées dans Adobe Illustrator CS6.

2.6.2 Compte de noyaux

Les noyaux positifs pour l'essai TUNEL sont comptés manuellement, tandis que les noyaux positifs pour l'incorporation de BrdU et le nombre total de noyaux (DAPI) sont comptés de façon semi-automatisée. Pour compter ces noyaux, chaque canal de couleur est isolé, les couleurs sont inversées et un auto-contraste est fait dans Adobe Photoshop CS6.

ImageJ v1.50i est ensuite utilisé pour faire le compte. Le bruit de fond est d'abord réduit (Substract Background (Rolling Ball Radius 12 pixel, Light background)), suivi des fonctions "Threshold" (auto settings, apply) et "Watershed". Les noyaux sont comptés avec la fonction "Analyse particle" (Size, 120+ pixels, circularity 0.1-1.0).

3 Résultats

3.1 Guide

Comme guide, la structure osseuse des pattes antérieures (bras) d'axolotl est présentée à la Figure 6, avec le nom des os et des sections proximo-distales. À moins qu'il ne soit indiqué autrement, toutes les amputations sont faites à travers le zeugopode. Les stades de régénération nommés sont basés sur le système de Tank [166] et sont représentés dans la Figure 10 avec leur abréviation. Au stade ED, la condensation des cartilages présomptifs est déjà entamée pour tous les doigts et nous considérons le patron morphogénétique comme largement spécifié. Nous arrêtons donc les examinations approfondies (RT-qPCR, immunobuvardage de type Western) à ce stade.

Le temps requis pour atteindre chaque stade de régénération peut varier selon la taille de l'animal et les facteurs environnementaux [105, 162, 321]. Puisque certaines de nos expériences (traitements pour RT-qPCR et WB) nécessitent de prévoir d'avance quand les stades sont atteints, les délais ont été déterminés expérimentalement avec nos animaux (3 à 6 cm, gardés à 20-22°C, amputés à travers l'avant-bras). Ils sont indiqués en jours post-amputation (ou JPA) dans la Figure 10. Ces délais varient peu à travers les différentes cohortes d'animaux utilisés. Lors de la planification des expériences, les animaux sont choisis pour que la distribution de leur taille soit uniforme à travers les conditions expérimentales.

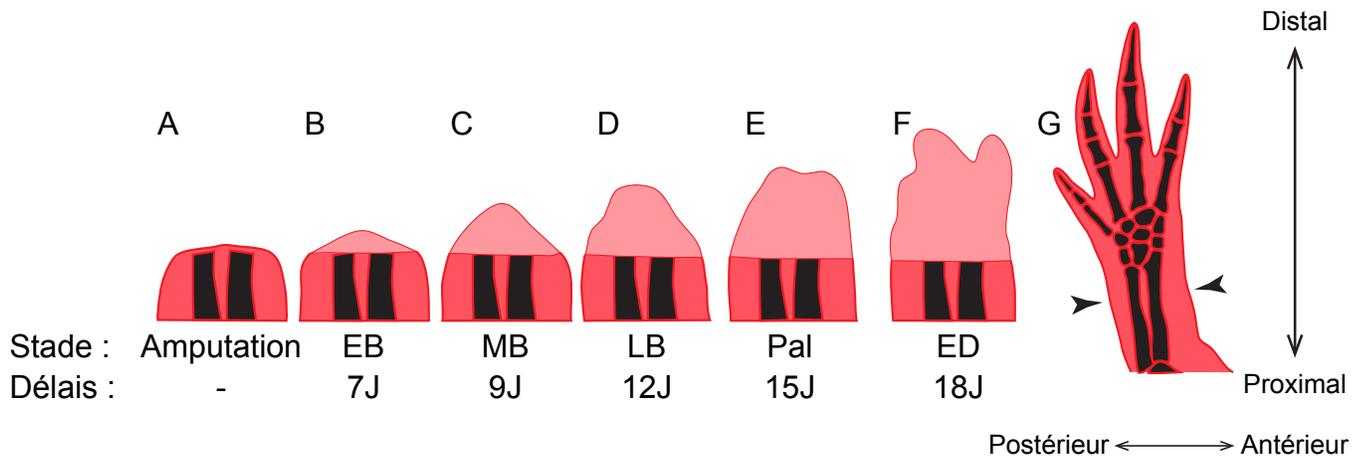


Figure 10. Stades de régénération

Dessins représentatifs des stades de régénération de Tank. **(A)** Immédiatement après l'amputation. **(B)** EB : stade "Early bud" ou bourgeon précoce. **(C)** MB : stade "Medium Bud" ou bourgeon moyen. **(D)** LB : stade "Late Bud" ou bourgeon tardif. **(E)** Pal : stade "Palette". **(F)** ED : stade "Early differentiation" ou différenciation précoce. **(G)** Patte complète après la régénération. Les pattes sont représentées du point de vue dorsal, à l'exception du bourgeon tardif (LB), qui est en angle pour illustrer l'aplatissement du blastème à ce stade. Les abréviations pour chaque stade sont indiquées sous leur dessin respectif. Le nombre moyen de jours nécessaires pour atteindre ces stades est indiqué sous ceux-ci, pour des animaux de 3-6 cm, amputés à travers l'avant-bras (zeugopode). Les têtes de flèches sur le membre complet indiquent le site d'amputation initial. Les axes antéro-postérieurs et proximo-distaux sont indiqués à côté du membre complet.

3.2 Expression des Bmp et activation de leur signalisation durant la régénération des membres de l'axolotl

Pour trouver quel est le rôle de la signalisation canonique des Bmp dans la régénération, il faut d'abord déterminer quand les Bmp sont exprimés. Comme mentionné plus haut, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* et *Bmp7* sont tous exprimés durant le développement de la patte chez le poulet et la souris [275, 277]. Plusieurs *Bmp* ont aussi été détectés durant la régénération d'appendices chez une variété d'espèces [299, 301-303]. Par contre, pour la patte d'axolotl en régénération, seul *Bmp2* a été étudié et ce, seulement en hybridation *in situ* [239]. Nous avons donc voulu mesurer l'expression de *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* et *Bmp7* durant la régénération du membre chez l'axolotl. *Bmp4* n'a cependant jamais été cloné chez l'axolotl, malgré les efforts de plusieurs laboratoires, incluant le nôtre [311]. Même l'assemblage génomique le plus récent ne contient pas sa séquence, indiquant qu'il est absent chez l'axolotl [159]. On se contente donc d'étudier son paralogue le plus proche: *Bmp2* [322]. Pour *Bmp5* et *Bmp7*, les séquences ont été obtenues à partir du criblage d'une banque de donnée d'ADN complémentaires. Nous les avons clonés et fait séquencer pour confirmer la validité de leurs séquences (résultats non-montrés).

L'expression des Bmp sélectionnés a été mesurée par RT-qPCR à différents stades de la régénération (Figure 11 A). *Bmp2*, *Bmp5* et *Bmp7* ont des patrons d'expression semblables, c'est-à-dire faibles avant la formation du blastème (avant EB) et élevés durant la croissance du blastème et la phase de redéveloppement de la patte en régénération (de EB à ED). À leur niveau le plus élevé, ces gènes atteignent respectivement une expression qui est 2,6X, 3,1X et 2,4X plus élevée que leur niveau dans une patte qui vient tout juste d'être amputée. La localisation de l'expression de *Bmp2* et *Bmp7* a été déterminée par hybridation *in situ* sur coupes pour les stades EB et LB (Figure 11 B-E). Les deux gènes sont exprimés dans les cellules mésenchymateuses du blastème. Par contre, au stade LB, l'expression de *Bmp2* est très faible à la base du blastème. De plus, *Bmp7* est exprimé dans l'épithélium, ce qui n'est pas le cas de *Bmp2*.

La présence d'ARNm corrèle généralement avec la présence de la protéine, mais l'activité de cette dernière peut être affectée par d'autres facteurs. Dans le cas des Bmp, les

protéines forment des homo- ou hétérodimères et leur signalisation peut être inhibée par des protéines antagonistes. La transduction du signal de la signalisation canonique des Bmp passe ensuite par Smad1, Smad5 et Smad8. Détecter la phosphorylation du domaine C-terminal de ces derniers devient donc un moyen simple de vérifier si la signalisation canonique des Bmp est active. Nous n'avons pas d'anticorps fonctionnel pour détecter Smad8 chez l'axolotl et le gène de ce dernier n'a pas été trouvé dans la banque de données de l'assemblage génomique le plus récent. Il n'a donc pas été regardé. À différents stades de la régénération, Smad1, Smad5 et phospho-Smad1/5 ont été détectés par immunobuvardage de type Western (Figure 12). La quantité de Smad1 et Smad5 total est initialement faible dans le moignon du membre amputé. Celle de Smad1 commence à devenir plus élevée autour de 48h post-amputation et atteint son sommet à EB et MB. Quant à Smad5, elle ne devient plus élevée qu'à EB, diminue à MB, ré-augmente à LB et demeure élevée jusqu'à ED. La phosphorylation, donc l'activation, de Smad1/5 n'est pas présente de façon significative avant EB, stade auquel elle augmente de 10 fois. Ce n'est qu'au stade Pal qu'elle recommence à diminuer, mais est encore 6 fois plus élevée que dans le moignon au stade ED. Ceci correspond aux stades durant lesquels l'expression des Bmp est élevée, indiquant une corrélation entre leur expression et leur signalisation.

La localisation de phospho-Smad1/5 a également été déterminée par immunofluorescence sur coupes histologiques, chez des animaux traités avec du DMSO seulement (contrôles) ou avec le LDN193189 (Figure 13 A-H). Au stade EB, chez les contrôles, on retrouve des noyaux positifs dans l'épithélium, dans les cellules directement sous l'épithélium et dans les muscles amputés, mais seulement en proximité du site d'amputation. Au stade LB, le signal devient principalement localisé aux noyaux des cellules situées à l'apex du blastème. Les traitements au LDN193189 réduisent le nombre de cellules positives, ce qui est surtout visible au stade EB. Une quantification du niveau de phosphorylation de Smad1/5 en fonction de cette drogue a été faite par immunobuvardage de type Western (voir prochaine section).

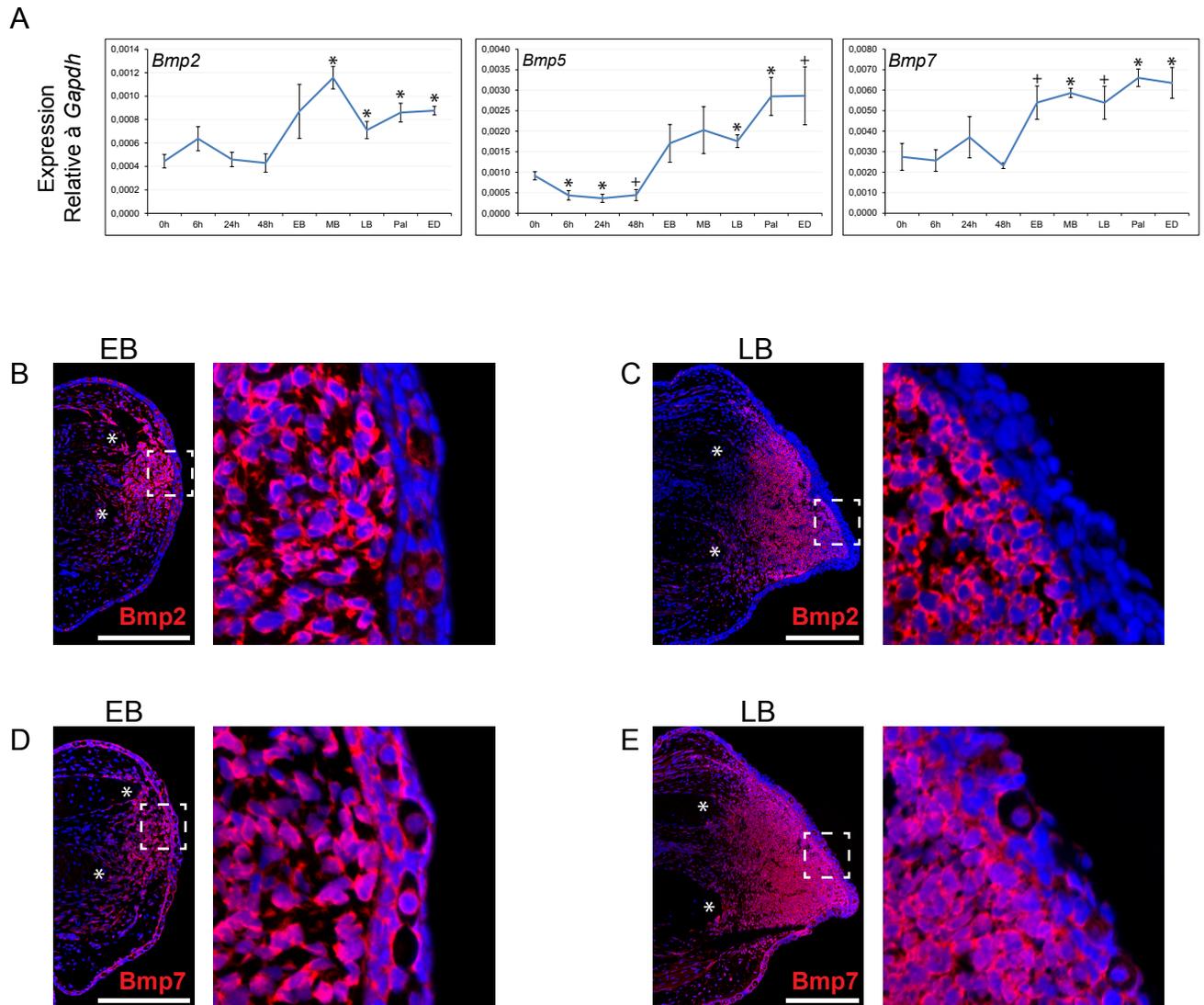


Figure 11. Expression génique des Bmp

(A) Expression moyenne des Bmp sélectionnés (*Bmp2*, *Bmp5* et *Bmp7*) à travers plusieurs stades de régénération. Pour chaque échantillon, l'expression est déterminée en RT-qPCR et normalisée par rapport à l'expression de Gapdh du même échantillon. n=4. Deux répliques techniques par échantillon.

Les abréviations sont utilisées pour les stades qui suivent 48h. Les barres d'erreur correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs-p $\leq 0,05$ et les "+" indiquent des valeurs-p $\leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral, en comparant au temps = 0h (tissu mature, immédiatement après l'amputation).

(B)-(E) Hybridation in situ pour l'expression de Bmp2 (**B et C**) et Bmp7 (**D et E**) dans les membres en régénération, aux stades EB (**B et D**) et LB (**C et E**). Les animaux sont traités au DMSO seulement. Un grossissement est inclus pour chaque encadré. Les astérisques indiquent l'extrémité amputée des os du zeugopode. La barre d'échelle = 500 μ m. n=4

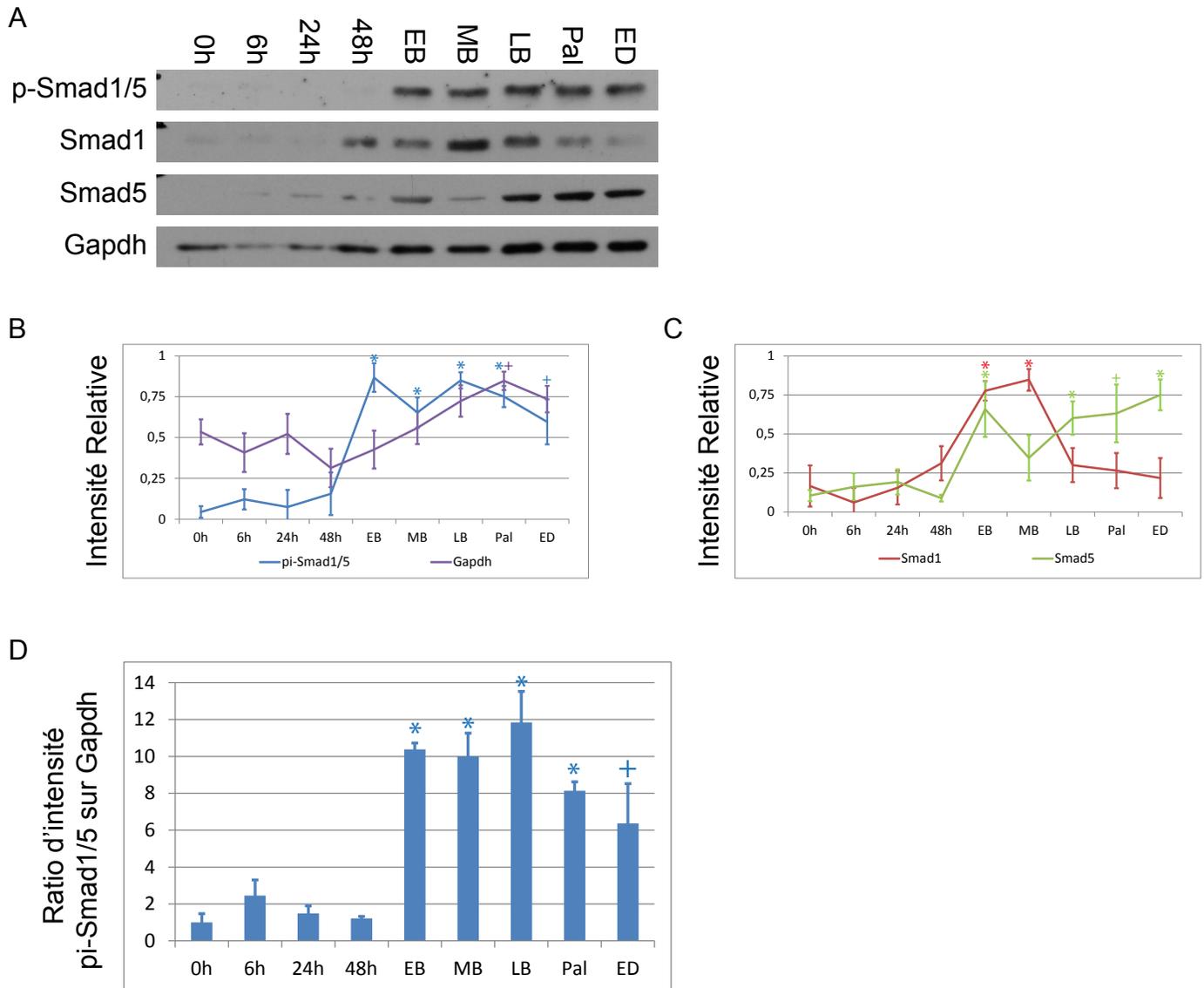


Figure 12. Activation de la signalisation canonique des Bmp

(A) Immunobuvardages de type Western sur protéines de membres en régénération. Les anticorps utilisés visent respectivement phospho-Smad1/5, Smad1 total, Smad5 total et Gapdh.

(B-C) Expressions relatives de pi-Smad1/5 et Gapdh **(B)** ou Smad1 total et Smad5 total **(C)**. Elles sont mesurées par densitométrie sur les bandes des immunobuvardages de type Western. Les données sont normalisées pour que le bruit de fond soit à 0 et que la bande la plus intense soit à 1.

(D) Ratios des expressions relatives de pi-Smad1/5 sur Gapdh (mesurées par densitométrie sur les bandes des immunobuvardages de type Western).

Les abréviations sont utilisées pour les stades qui suivent 48h. Les barres d'erreur correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs- $p \leq 0,05$ et les "+" indiquent des valeurs- $p \leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral, en comparant au temps = 0h (tissu mature, immédiatement après l'amputation). $n=4$.

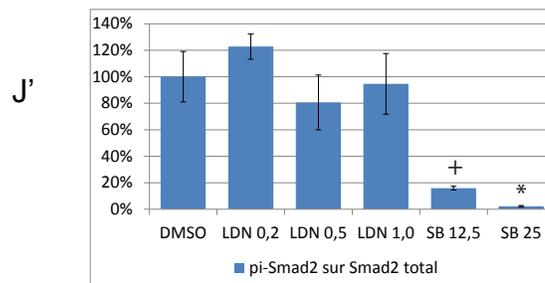
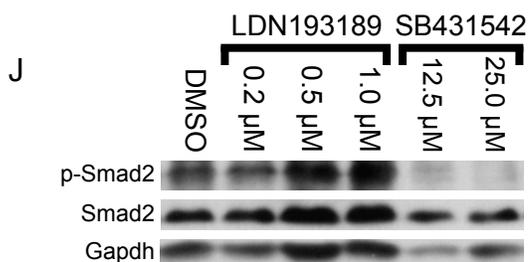
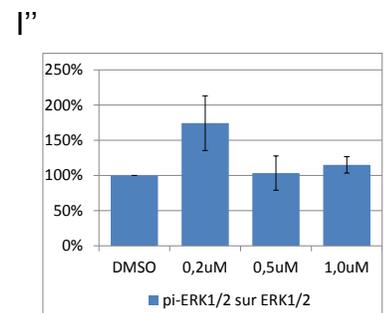
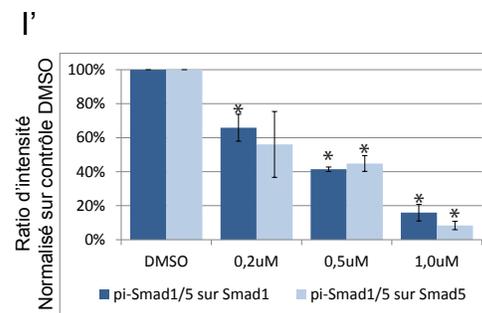
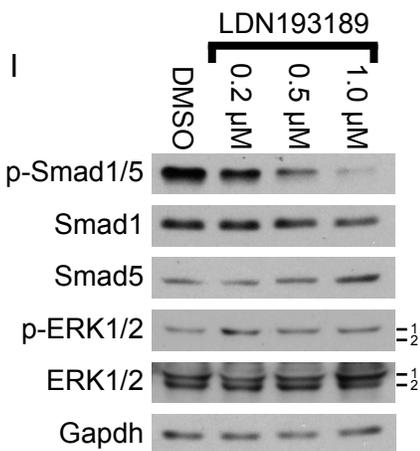
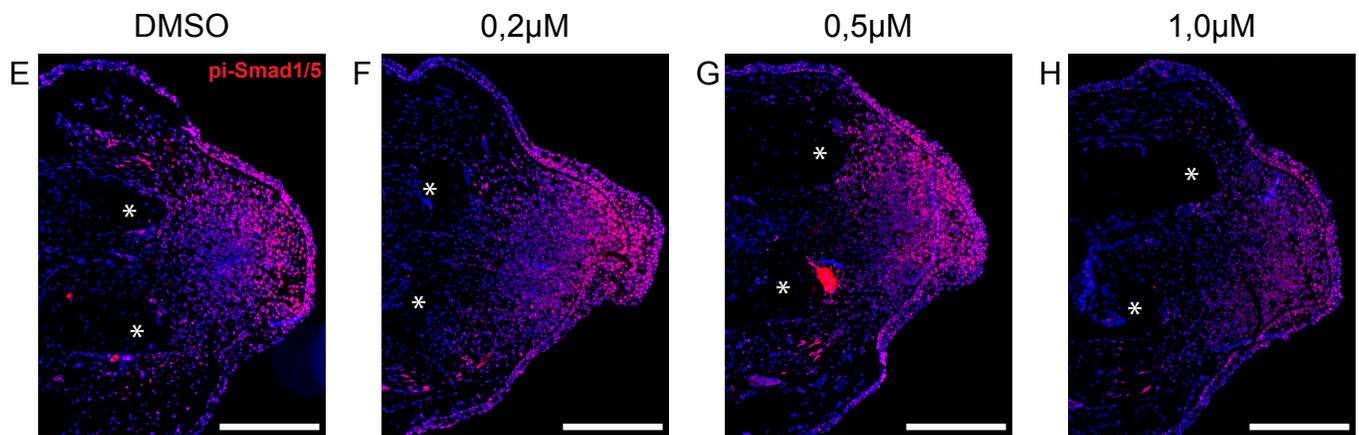
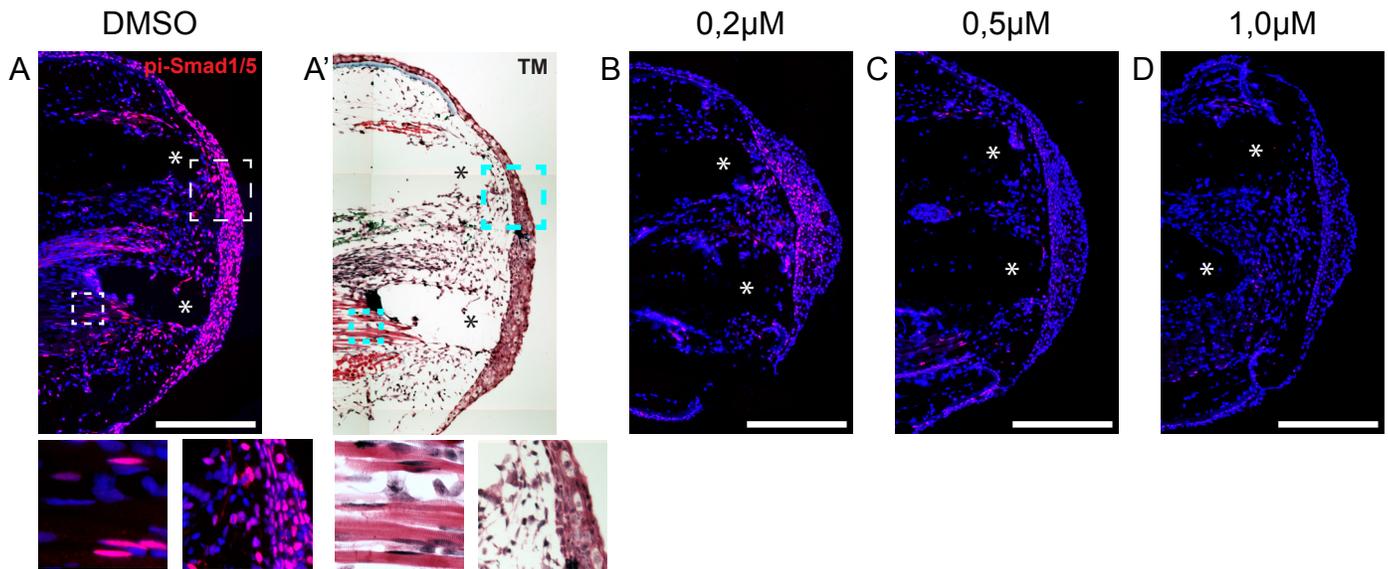


Figure 13. Effet du LDN193189 sur la phosphorylation de Smad1/5

(A-H) Immunofluorescence de phospho-Smad1/5 sur coupes de pattes au stade EB **(A-D)** ou LB **(E-H)**. Les pattes proviennent d'animaux traités 48h avec le DMSO seulement **(A, E)** ou avec 0,2 μ M **(B, F)**, 0,5 μ M **(C, G)** ou 1,0 μ M **(D, H)** de LDN193189. L'image **(A')** montre la même coupe qu'en **(A)**, mais colorée au trichrome de Masson. Les encadrés de **(A)** et **(A')** montrent l'extrémité d'un muscle strié et l'épithélium de guérison. Des grossissements sont présentés sous les images. Les astérisques indiquent l'extrémité amputée des os du zeugopode. Barres d'échelle : 500 μ m. n=4

(I) Immunobuvardage de type Western sur protéines de membre en régénération au stade MB, préalablement traité 48h au DMSO seulement ou avec différentes concentrations de LDN193189. Les anticorps utilisés visent respectivement phospho-Smad1/5, Smad1 total, Smad5 total, phospho-Erk1/2, Erk1/2 total et Gapdh. Les positions de Erk1 et Erk2 sont indiquées à côté des images pertinentes. **(I')** Ratio d'intensité des bandes de pi-Smad1/5 par rapport à Smad1 total ou Smad5 total. **(I'')** Ratio d'intensité des bandes de pi-Erk1/2 par rapport à Erk1/2 total. Les astérisques indiquent des valeurs-p $\leq 0,05$, en utilisant le test-t de Student bilatéral, en comparant avec les échantillons traités seulement avec le DMSO. n=3.

(J) Immunobuvardage de type Western sur protéines de membres en régénération au stade 24h, traités à partir de 24h avant l'amputation (48h total) au DMSO ou avec différentes concentrations de LDN193189 ou de SB431542. Les anticorps utilisés visent respectivement phospho-Smad2, Smad2 total et Gapdh. La bande de phospho-Smad2 est indiquée par la tête de flèche. **(J')** Ratio d'intensité des bandes de pi-Smad2 par rapport à Smad2 total. Les astérisques indiquent des valeurs-p $\leq 0,05$ et les "+" indiquent des valeurs-p $\leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral, en comparant avec les échantillons traités seulement avec le DMSO. n=3.

3.3 Inhibition de la voie des Bmp

3.3.1 Inhibition de la signalisation des Bmp par le LDN193189

Afin de déterminer quelles fonctions et quels gènes dépendent de la signalisation des Bmp, nous avons voulu l'inhiber. Nous avons opté pour l'approche pharmacologique, avec la molécule nommée LDN193189. Celle-ci est un dérivé de la dorsomorphine qui est spécifiquement optimisé pour inhiber la phosphorylation de Smad1/5/8 induite par Bmp4 chez des cellules PSMC. Chez ces cellules, le LDN193189 inhibe la phosphorylation de Smad1/5/8 à travers Alk2/3/6 avec un IC_{50} qui est 100 fois plus bas que la dorsomorphine [323]. L'inhibition de la phosphorylation de Smad1/5 par le LDN193189 a déjà été démontrée *in vitro* [324] et *in vivo* chez le poisson-zèbre [325], mais pas spécifiquement chez l'axolotl. Nous avons donc fait des tests d'inhibition chez ceux-ci. Les traitements chez ces animaux ont été faits en diluant les solutions stocks de drogue directement dans le milieu où ceux-ci baignent. Un stade où Smad1/5 est fortement phosphorylé (MB) a été sélectionné. Les animaux ont été traités avec différentes doses de drogue durant les 48h qui mènent à ce stade et la phosphorylation de Smad1/5 a été détectée par immunobuvardage de type Western (Figure 13 I). Nos résultats montrent que dans ce contexte, le LDN193189 provoque effectivement une diminution de la phosphorylation de Smad1/5. À $0.2\mu\text{M}$, elle n'est que ~60% de ce qui est observé chez les animaux contrôles et diminue à ~10% lorsque $1\mu\text{M}$ de LDN193189 est utilisé (Figure 13 I'). Les concentrations utilisées (de $0,2\mu\text{M}$ à $1,0\mu\text{M}$) sont jugées appropriées pour l'étude de l'inhibition de la signalisation canonique des Bmp puisqu'elles permettent plusieurs degrés d'inhibition la phosphorylation de Smad1/5. De plus, lors de traitements à long terme (plus de 45 jours), ces concentrations n'affectent pas la santé des animaux, leur capacité de se nourrir, ou leur croissance. Ceci indique qu'à ces concentrations, le LDN193189 n'est pas toxique, ce qui évite d'avoir des phénotypes qui proviennent de problèmes de santé de l'animal.

L'inquiétude principale avec l'utilisation de drogue est le risque d'avoir des effets non-spécifiques. La concentration de drogue nécessaire pour avoir une inhibition varie grandement selon le contexte (hors cellules, cellules en culture ou animaux vivants) [324, 325]. Il vaut donc la peine de tester d'autres cibles potentielles du LDN193189 chez l'axolotl. Puisque nous

cherchons à distinguer entre la voie des Bmp et de la voie des Tgf- β , l'inhibition de la phosphorylation de Smad2 par le LDN193189 a été testée. Phospho-Smad2 est à son plus fort 24h après l'amputation [151]. Les animaux ont donc été traités à partir de 24h avant l'amputation et les échantillons de moignons ont été recueillis 24h après l'amputation. Les résultats d'immunobuvardage de type Western révèlent que le LDN193189 fait peu varier la phosphorylation de Smad2, et ce, de manière statistiquement non significative (Figure 13 J-J'). En comparaison, 25 μ M de SB431542 (un inhibiteur qui vise les récepteurs des TGF- β et empêche la phosphorylation de Smad2) réduit la phosphorylation de Smad2 à ~2% de celle des contrôles et prévient complètement la régénération, ce qui est comparable à ce qui a été vu précédemment [151, 240]. Une concentration de 12,5 μ M de SB431542 réduit la phosphorylation de Smad2 à 16%, ce qui est insuffisant pour affecter la régénération (résultats non montrés).

L'effet du LDN193189 a également été testé sur la phosphorylation de Erk1/2. Le choix de ces protéines vient du fait qu'elles font partie de la voie non-canonique des Bmp. De plus, elles font partie des transducteurs cytoplasmiques des voies de signalisation de VegfR et de FgfR1 [326-328]. Le test chez l'axolotl (*in vivo* dans des conditions naturelles) a été fait avec les mêmes protéines que le test d'inhibition de phosphorylation de Smad1/5 (Figure 13 I-I'). Étrangement, 0,2 μ M de LDN193189 cause une augmentation moyenne à 175% du niveau de phosphorylation des contrôles (statistiquement non significatif), mais 0,5 μ M ou 1,0 μ M de LDN193189 n'a pas d'effet. L'absence d'effet serait en accord avec ce qui a été vu *in vivo* chez le poisson-zèbre, où 1,0 μ M de LDN193189 n'affecte pas la phosphorylation de Erk1/2 [325].

Comme on peut le voir, le LDN193189 n'est pas un outil parfait. Il est cependant efficace pour inhiber la transduction du signal à travers la voie canonique des Bmp, c'est-à-dire Smad1/5. De plus, cette inhibition est préférentielle, puisque la phosphorylation de Smad2 n'est pas affectée. Il est possible que le LDN193189 inhibe l'activité kinase d'autres protéines *in vivo*, mais nous n'avons pas les ressources pour faire un inventaire complet de leur activité. Il est à noter qu'aucune approche n'est parfaite. Par exemple, Noggin est surtout connu comme un antagoniste des Bmp, mais il prévient également la phosphorylation de Smad2 induite par Activin [329, 330].

3.3.2 Effet de l'inhibition de la signalisation des Bmp sur le développement des pattes

Le patron d'expression de plusieurs Bmp est déjà déterminé dans le membre en développement de plusieurs espèces et le patron de *Bmp2* est déterminé spécifiquement chez l'axolotl [277, 311, 331]. Considérant les rôles connus des Bmp, il serait prévisible que l'inhibition de leur signalisation ait un impact sur le développement des pattes. Il serait donc intéressant de vérifier l'effet du LDN193189 sans la variable de l'amputation.

Des embryons ont été séparés dans des plaques de 24 puits et traités avec le LDN193189. Pour affecter le moins possible le développement des autres organes de l'animal, le traitement n'a été commencé que lorsque les bourgeons du membre étaient clairement visibles, c'est-à-dire au stade de développement 45. Ils ont été arrêtés quand le dernier doigt de la plupart des embryons contrôles était visible, au stade 53-54 (selon Nye [238]). Les pattes des animaux ayant un phénotype représentatif sont présentées dans la Figure 14. Les contrôles traités au DMSO montrent presque tous un développement qui mène à la formation du patron osseux présenté à la Figure 6, et qui est donc normal (environ 5% des embryons ont des anomalies de développement, i.e. le dernier doigt n'est pas complètement formé). À 0,2 μ M de LDN193189, 75% des pattes antérieures ont soit quelques phalanges manquantes, soit des phalanges distales raccourcies ou qui sont alignées de façon anormale sur le reste du doigt. À 0,5 μ M, le phénotype est plus sévère et est présent dans plus de 90% des pattes. De plus, des éléments squelettiques métacarpiens sont raccourcis dans 50% de ces pattes. À 1 μ M, 35% des pattes ont des anomalies dans le carpe, 88% ont des éléments squelettiques métacarpiens raccourcis ou manquants et seulement 15% possèdent au moins une phalange complète.

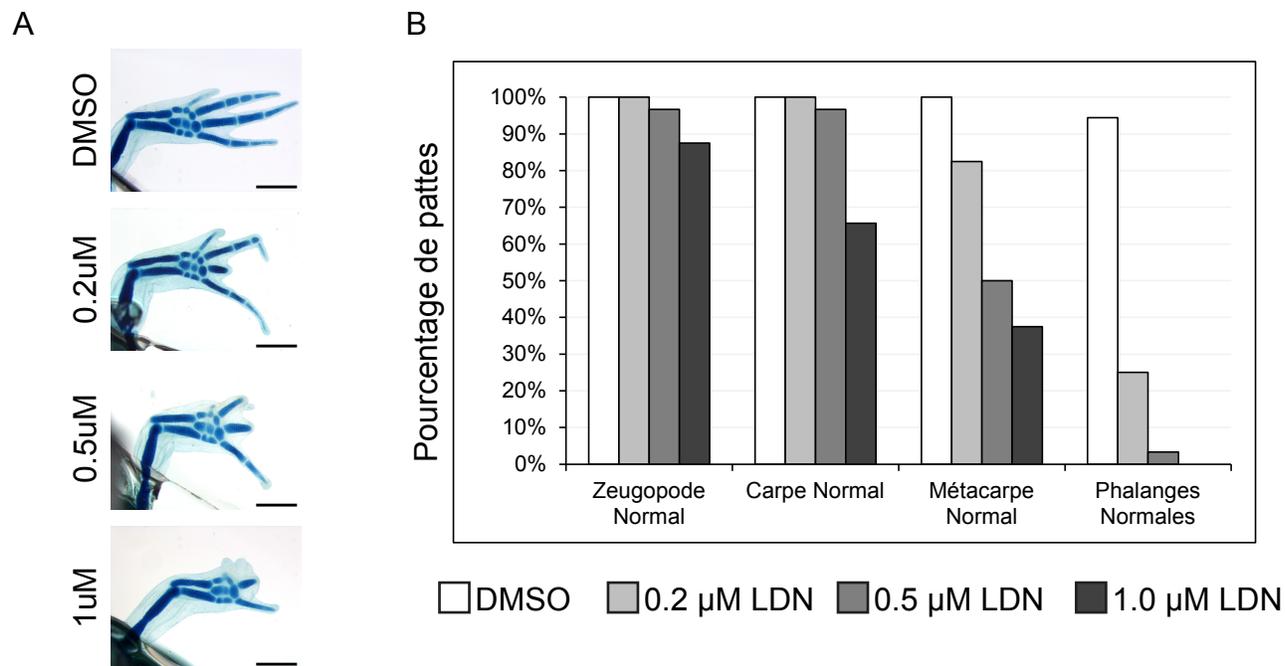


Figure 14. Effets du LDN193189 sur le développement des pattes d'embryons d'axolotl

(A) Les embryons sont traités au DMSO (contrôles) ou au LDN193189, du stade de développement 45 jusqu'au stade 53-54, puis fixés et colorés au Victoria Blue. Barres d'échelle : 500 μ m.

(B) Compte des pattes dont les éléments osseux spécifiés se sont développés normalement, selon la concentration de LDN193189. $n \geq 30$

3.3.3 Effet de l'inhibition de la signalisation des Bmp sur la régénération du membre

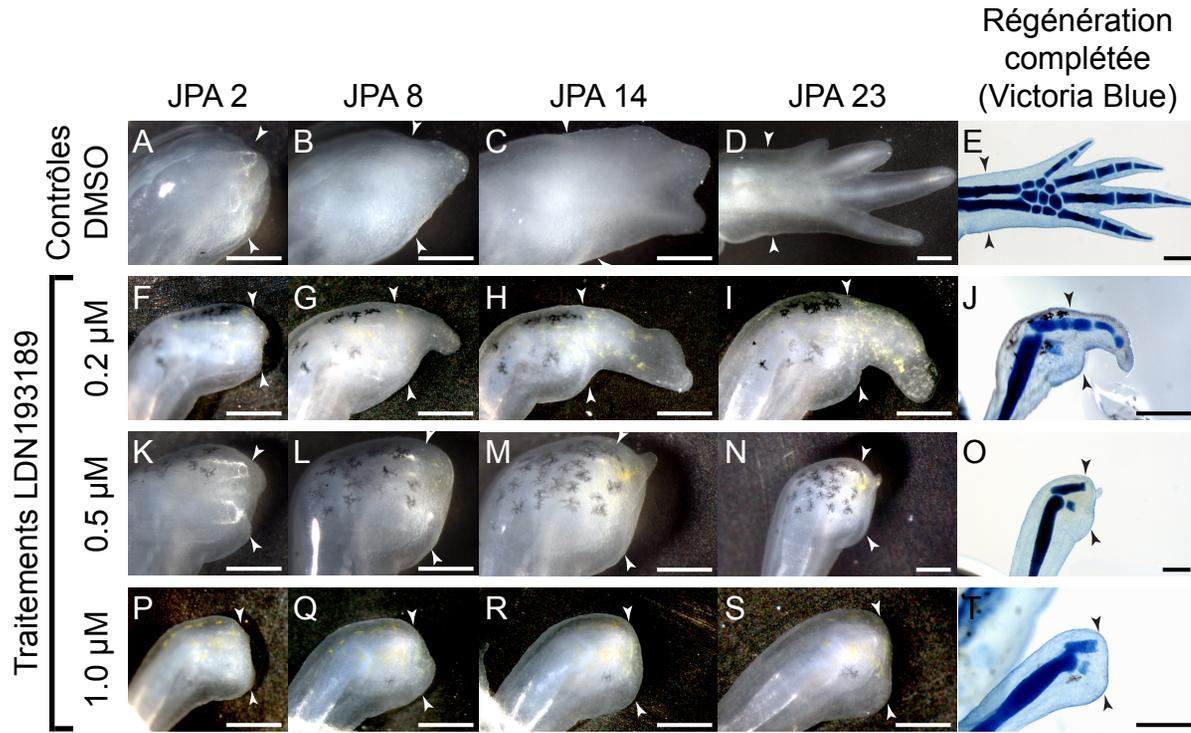
Pour déterminer l'impact de l'inhibition de la signalisation des Bmp durant la régénération, des axolotls ont été traités au LDN193189 pour la durée entière de la régénération (Figure 15). Un phénotype commence à être visible autour de EB-MB (Figure 15 B, G, L, Q) : les blastèmes des animaux traités sont déjà plus courts (Figure 15 U, détails dans Tableau V (en annexe)). À 1 μ M (Figure 15 Q), les blastèmes ont environ 50% de la longueur des blastèmes contrôles à 8 et 11 JPA (jours post-amputation). Cette taille réduite est maintenue durant le reste du processus de régénération. À 0,2 μ M et 0,5 μ M, l'élongation du blastème ralentit éventuellement et arrête autour du stade Pal (chez les contrôles) (Figure 15 H, M). Ces deux concentrations permettent encore un certain niveau de phosphorylation de Smad1/5, expliquant la croissance partielle du blastème au-delà de EB. Dans les semaines qui suivent, il y a régression du blastème chez les animaux traités avec 1 μ M LDN193189 (Figure 15 Q-S).

Une fois la régénération complétée chez les contrôles, les animaux ont été fixés et colorés au Victoria Blue pour voir la formation des structures squelettiques (encore du cartilage à l'âge des animaux utilisés) (Figure 15 E, J, O, T). La fréquence de pattes qui ont régénéré chaque section du patron osseux (complètement ou partiellement) ont été comptabilisé dans les graphiques de la Figure 15 E', J', O', T'. Les détails sont disponibles dans le Tableau VI (en annexe). L'axe PD du zeugopode est défini par la régénération d'au moins une partie du radius ou de l'ulna (les deux pour que l'axe AP soit considéré comme régénéré) (Figure 6). L'axe PD du carpe est défini par la régénération d'au moins 1 os du carpe, et est considéré complet si trois os sont présents sur l'axe PD. Pour l'axe AP du carpe, il est partiel si 2 os sont présents et est complet si 3 os sont présents. La section "métacarpe et doigts" a un axe PD partiel si au moins un élément osseux de la section est présent et l'axe est considéré complet si au moins un doigt a toutes ses phalanges. L'axe AP est considéré comme partiellement rétabli si 2 ou 3 éléments osseux sont présents sur l'axe AP, et est complet si 4 os sont est présents sur l'axe AP.

Il y a clairement des éléments squelettiques manquants chez les animaux traités au LDN193189, avec une réduction du nombre qui est en fonction de la dose. À $0,2\mu\text{M}$, seulement 58% des pattes régénèrent au moins une partie de leur zeugopode et carpe, et 33% régénèrent au moins une partie des métacarpes et doigts. À cette concentration, 8% régénèrent les deux os du zeugopode et 17% régénèrent une partie de l'axe AP du carpe. À $0,5\mu\text{M}$, il n'y a que 25% des pattes qui régénèrent une partie de l'ulna. Le reste ne se régénère pas. À $1\mu\text{M}$, aucune nouvelle formation squelettique n'est observée et les éléments squelettiques du zeugopode sont souvent plus courts qu'ils étaient à l'amputation.

La Figure 16 montre des coupes histologiques de pattes à 3 JPA, au stade LB et après la fin de la régénération, soit contrôles, soit traitées avec $0,2\mu\text{M}$ ou $1\mu\text{M}$ de LDN193189. À toutes les concentrations, l'épithélium de guérison est complété à 3JPA et a déjà jusqu'à 3 cellules d'épaisseur. Il n'y a pas encore d'accumulation de cellules sous celui-ci. Cette accumulation commence plus tard et est évidente au stade LB, où le blastème est bien formé. Le blastème est beaucoup plus petit chez les animaux traités à $1\mu\text{M}$, mais un bon nombre de cellules est quand même présent entre les os et l'épithélium. À la fin de la régénération, la patte contrôle reforme tout son squelette. À $0,2\mu\text{M}$, une série d'éléments osseux se redéveloppe, accompagnée de quelques fibres musculaires isolées. À $1\mu\text{M}$ (Figure 16 I), il n'y a pas de nouvelle formation de cartilage, mais plusieurs fibres musculaires (reconnaissables par leur stries) convergent vers l'extrémité d'un des os amputés. Il ne reste presque plus de cellules entre les os et l'épithélium.

La Figure 16 H' montre un exemple de grosses cellules multi-nucléées qui se retrouvent fréquemment aux endroits où le cartilage est endommagé, peu importe si traités ou non, à EB et LB. Ces cellules ont l'apparence de chondroclastes, un type de cellule qui participe à la résorption du cartilage, permettant leur remodelage subséquent [332].



Fréquence de pattes qui ont régénéré la section

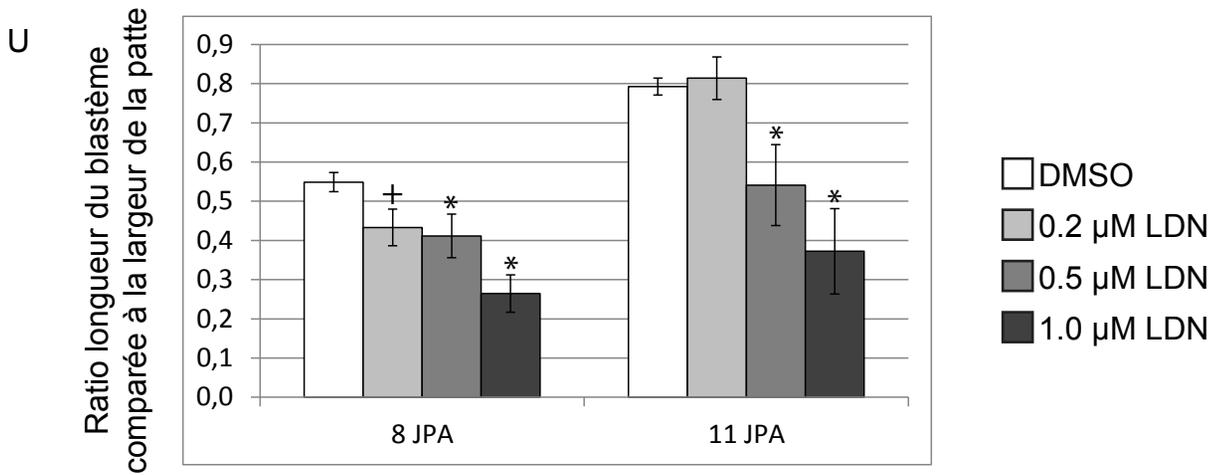
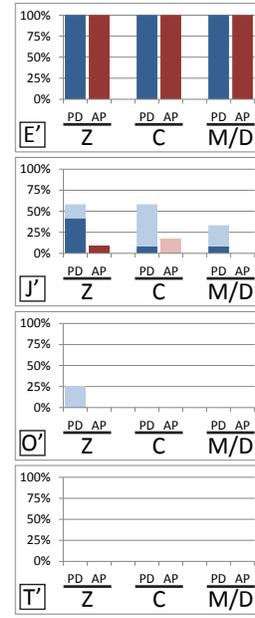


Figure 15. Effets du LDN93189 sur les pattes en régénération.

Les animaux sont traités au DMSO seulement (**A-E**) ou avec 0,2 μ M (**F-J**), 0,5 μ M (**K-O**) ou 1 μ M (**P-T**) de LDN93189 à partir de 24h avant l'amputation, jusqu'à ce que les contrôles DMSO soit complètement régénérés (38 jours). Les pattes sont prises en photo aux 3 jours et les jours post amputation (JPA) 2, 8, 14 et 23 sont montrés ici. Une fois la régénération complétée, les animaux sont fixés et une coloration du cartilage au Victoria Blue est effectuée (**E, J, O, T**). Chaque rangée suit la régénération d'une patte représentative. Les têtes de flèches noires et blanches indiquent le niveau de l'amputation. Barre d'échelle : 500 μ m.

Les graphiques **E'**, **J'**, **O'** et **T'** compilent pour chaque condition correspondante (**E, J, O, T**) la fréquence des pattes qui ont régénéré l'axe PD et AP pour chaque section indiquée de la patte (Z : Zeugopode, C : Carpe, M/D : Métacarpe et doigts), soit partiellement ou complètement. $n \geq 8$

(U) Ratios de la longueur des blastème (base jusqu'à l'apex) par rapport à la largeur de la patte amputée. Les barres d'erreurs correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs- $p \leq 0,05$ et les "+" indiquent des valeurs- $p \leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral, en comparant avec les pattes d'animaux traités au DMSO seulement. $n \geq 8$

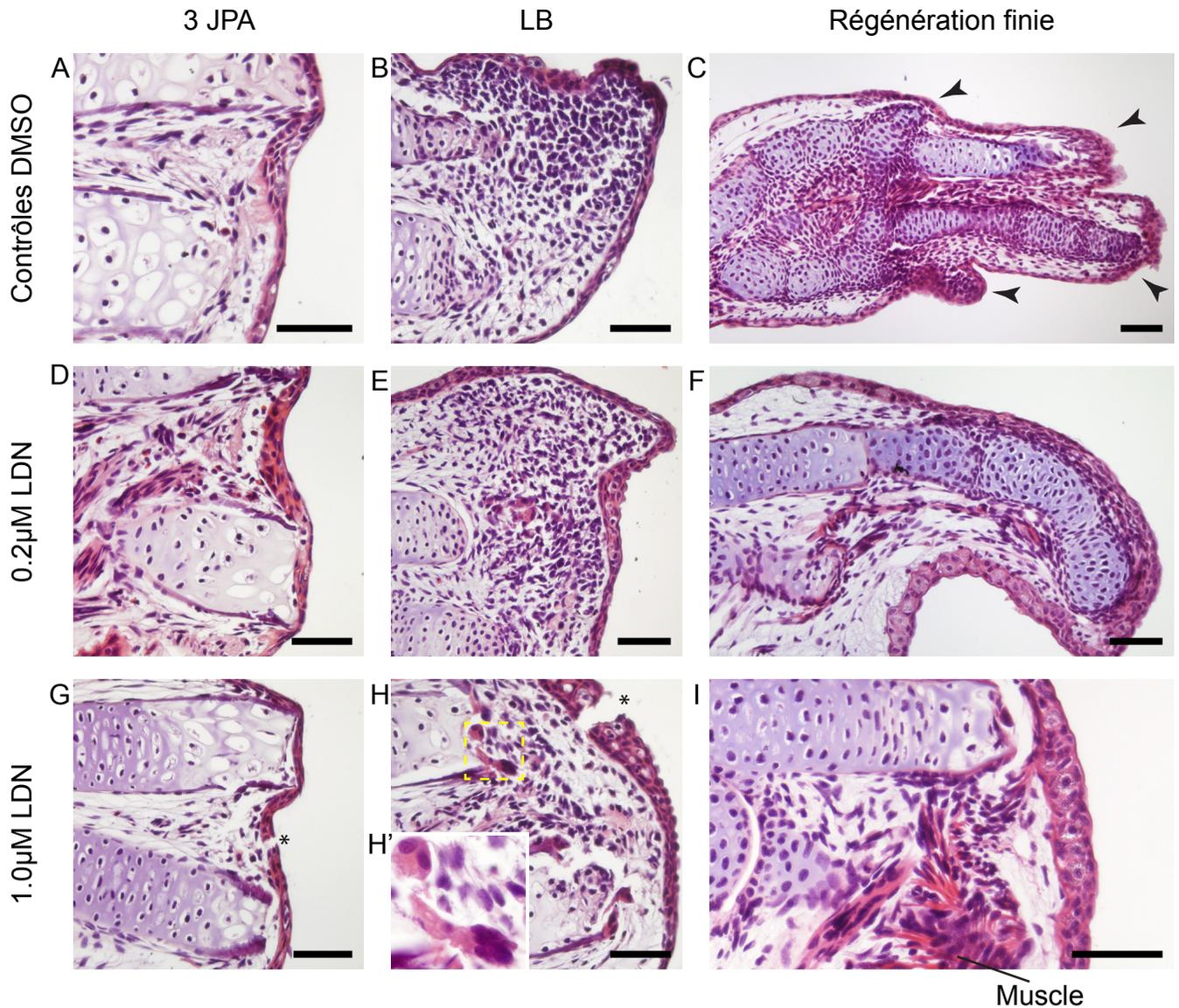


Figure 16. Aspect histologique des pattes en régénération traitées au LDN193189

Coupes histologiques (coloration H&E) de pattes en régénération, traitées avec le DMSO seulement (A-C), 0,2µM de LDN193189 (D-F) ou 1µM de LDN193189 (G-I). Les pattes sont recueillies à 3 jours post-amputation (A, D, G), au stade LB (B, E, H) ou après que la régénération des contrôles soit terminée (C, F, I). Dans l'image (C), tous les éléments osseux sont présents, mais ne sont pas tous visibles sur ce plan de coupe (les têtes de flèche indiquent la position des doigts). Un seul doigt est présent en (F), qui est une coupe de la patte vue à la Figure 15J. (H') Un grossissement sur les chondroclastes de l'encadré de (H). Les astérisques de (G) et (H) indiquent des bris dans la peau, probablement des artéfacts de leur préparation pour les coupes. Barre d'échelle : 100µm.

3.3.4 Impact de l'inhibition de la voie des Bmp sur la prolifération et la survie cellulaire.

Il semble évident que la taille réduite des blastèmes et les structures osseuses manquantes pourrait être due à la faible quantité de cellules. Pour en trouver la cause, la prolifération et l'apoptose ont été évaluées. Les animaux ont été traités au LDN193189 à partir de 24h avant l'amputation, jusqu'à ce que les pattes soient recueillies, aux stades EB et LB. Ces pattes ont ensuite été examinées en histologie, où la prolifération a été testée par l'incorporation de BrdU et l'apoptose par l'essai TUNEL (Figure 17 A-H"). Les pourcentages de cellules positives pour l'incorporation de BrdU et l'essai TUNEL sont compilés dans les graphiques de la Figure 17 I-L. Les cellules de la peau et de l'intérieur du blastème sont comptées séparément dans les Tableaux VII et VIII (en annexe), mais sont ici évaluées ensemble. La tendance générale est la même, mais il y a moins de prolifération et d'apoptose dans la peau.

À EB, il y a une prolifération abondante chez tous les animaux (de 26 à 33% des cellules sont positives pour le BrdU, la différence entre les traitements n'est pas significative), localisée principalement près de l'épithélium de guérison. À ce stade, peu de cellules apoptotiques sont observées chez les contrôles, mais les traitements à 0,5 μ M et 1,0 μ M de LDN193189 en font respectivement augmenter le nombre de 3X à 5X (jusqu'à 1.5% des cellules). Ceci s'accorde avec le raccourcissement du blastème qui est déjà observé à 8JPA (1 jour après EB) (Figure 15 U). La phosphorylation de Smad1/5 est donc déjà importante au stade EB.

Au stade LB, le nombre de cellules en prolifération est corrélé avec la taille du blastème. Ce nombre diminue avec les traitements au LDN193189 de façon dose-dépendante : 43% de cellules BrdU+ pour les contrôles DMSO versus 14% pour les animaux traités avec 1 μ M de LDN193189. L'apoptose suit la tendance inverse : 0,65% de cellules positives pour l'essai TUNEL chez les contrôles, comparé à 2,3% chez les animaux traités avec 1 μ M de LDN193189. Même à la plus haute concentration de l'inhibiteur, le nombre de cellules apoptotiques demeure bas comparativement au nombre de cellules en prolifération. Il est cependant difficile de déterminer précisément la contribution de la mort cellulaire à la

réduction de la taille du blastème. En effet, la dynamique de l'apoptose et la vitesse d'élimination des cellules peuvent varier selon le contexte et sont inconnues chez l'axolotl [333].

La tendance générale est que le LDN193189 ne cause pas de changement significatif de la prolifération à EB, mais cause une forte réduction à LB. À ces deux stades, 1 μ M de LDN193189 cause une augmentation significative de l'apoptose. Ces observations suggèrent que la réduction de la taille du blastème est causée principalement par l'apoptose à EB et par une combinaison d'apoptose augmentée et de prolifération réduite au stade LB. Ceci indique que le rôle de la signalisation des Bmp dans la prolifération ne corrèle pas entièrement avec son rôle dans la survie cellulaire.

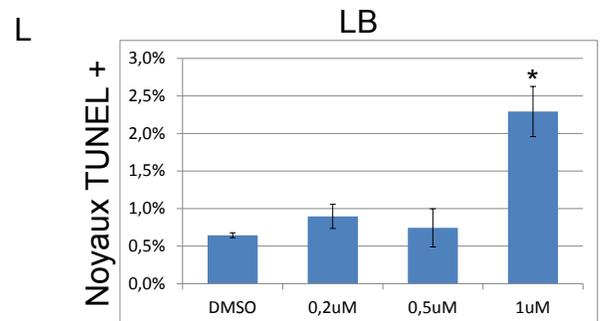
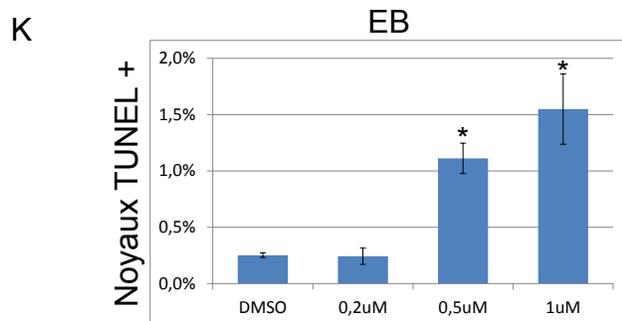
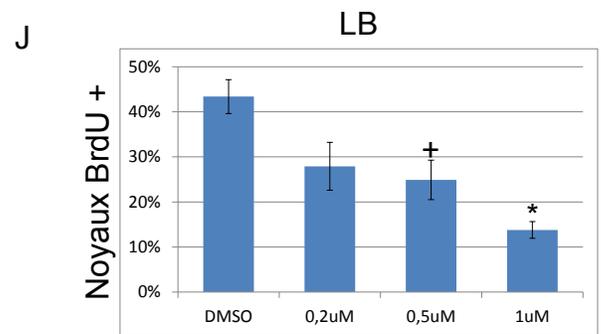
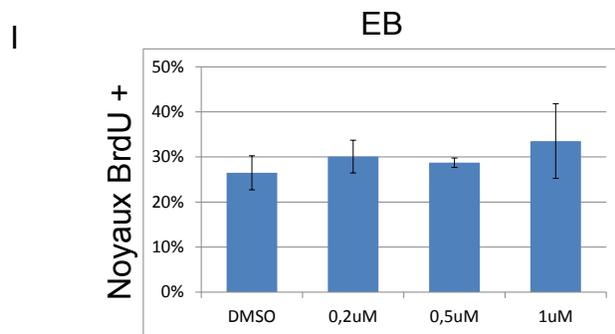
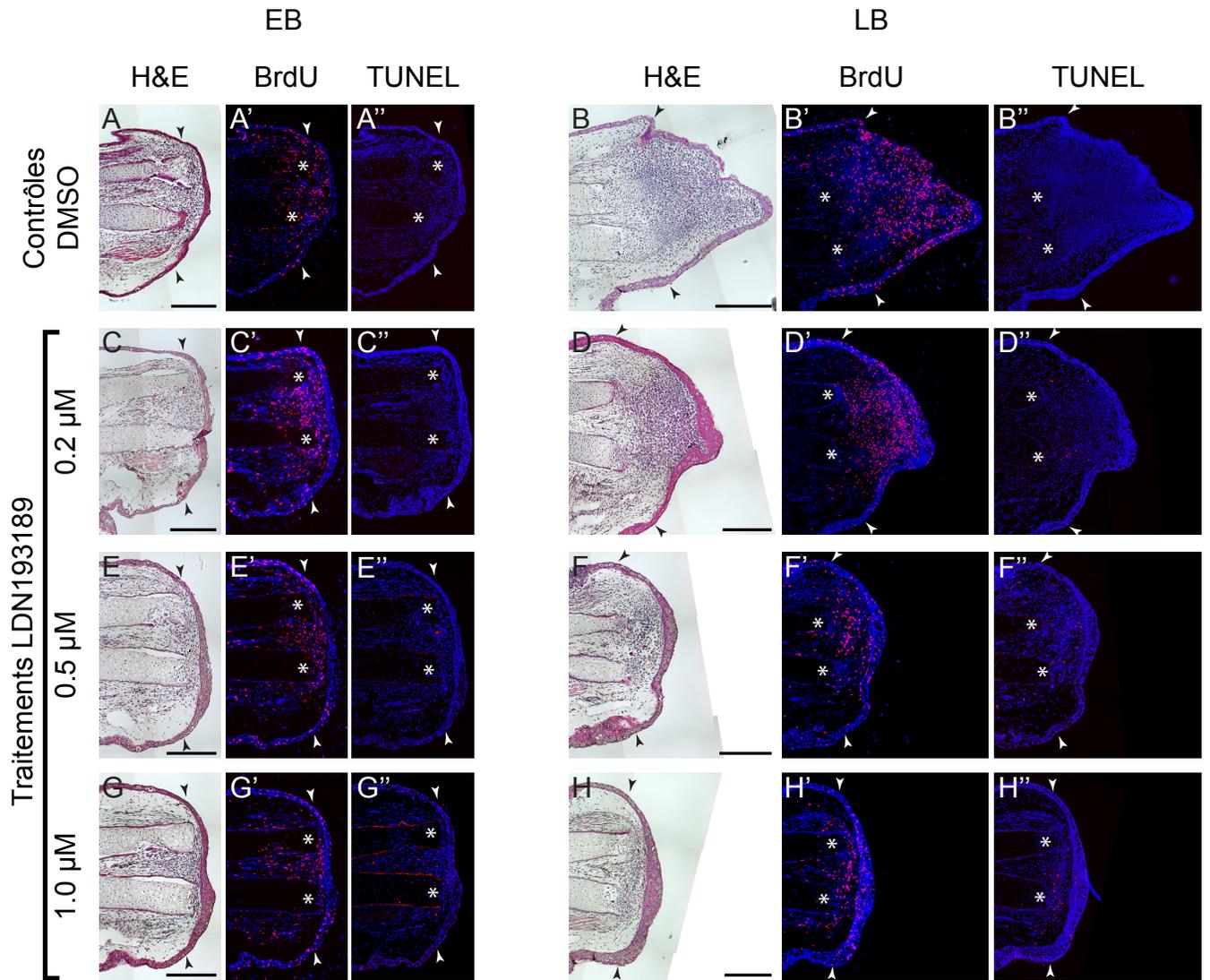


Figure 17. Prolifération et apoptose dans les pattes en régénération chez les animaux traités au LDN193189

Les animaux ont été traités au DMSO seulement (**A, B**) ou avec 0,2 μ M (**C, D**), 0,5 μ M (**E, F**) ou 1 μ M (**G, H**) de LDN193189 à partir de 24h avant l'amputation, jusqu'à ce que les contrôles DMSO aient atteint le stade EB (**A, C, E, G**) ou LB (**B, D, F, H**). 12h avant la fixation, les animaux ont été injectés au BrdU. Des coupes successives de ces pattes ont été utilisées pour la coloration H&E (**A-H**), la détection du BrdU (en rouge dans A'-H') ou pour l'essai TUNEL (en rouge dans A''-H''). Dans les images (**A'-H'**) et (**A''-H''**), les noyaux sont colorés au DAPI (en bleu). Les images montrées sont composites. Les têtes de flèches noires et blanches indiquent le niveau de l'amputation. Les astérisques indiquent l'extrémité amputée des os du zeugopode. Barre d'échelle : 500 μ m.

(I-J) Pourcentages de noyaux positifs pour les BrdU à EB (**I**) et LB (**J**).

(K-L) Pourcentages de noyaux positifs pour l'essai TUNEL à EB (**K**) et LB (**L**).

Les barres d'erreur correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs- $p \leq 0,05$ et les "+" indiquent des valeurs- $p \leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral, comparé aux pattes d'animaux traités au DMSO seulement. $n=3$.

3.3.5 Effet de l'inhibition de la signalisation des Bmp sur la régénération du membre - Traitements commençant à différents stades de la régénération

En comparant les résultats d'inhibition de la voie des Bmp chez les embryons avec ceux durant la régénération, il y a clairement une différence dans l'impact sur le patron squelettique qui est formé dans leurs pattes respectives. Aucune patte régénérée durant un traitement au LDN193189 n'est normale, peu importe la concentration. Par contre, la majorité des embryons développe un stylopode, un zeugopode et un carpe normal, même à la plus haute concentration de drogue utilisée. Pourtant, au stade où sont commencés les traitements (stade 45 de l'embryon), aucun élément osseux n'est déjà formé, pas même l'humérus [238]. Il est possible que les embryons et les animaux plus vieux réagissent différemment au LDN193189, mais il existe un autre facteur plus simple à tester. Une différence majeure entre les traitements sur ces embryons et ceux sur les animaux en régénération est que les embryons ont déjà un bourgeon de membre formé, tandis que durant la régénération, le traitement commence longtemps avant les stades de blastèmes. Les résultats de prolifération et d'apoptose montrent déjà que l'effet du LDN193189 change selon le stade de régénération. Il serait donc intéressant de tenter de séparer les différents rôles possibles de la signalisation des Bmp. D'ailleurs, dans la catégorisation de la régénération en phases de préparation et redéveloppement, la deuxième commence à LB [165].

Pour vérifier si les Bmp sont nécessaires à la réponse immédiate à l'amputation (fermeture de la plaie, inflammation), des animaux ont été traités 48h au DMSO ou au LDN193189, puis amputés. Le traitement a été arrêté au moment de l'amputation. Toutes les pattes amputées ont montré une régénération parfaite, sauf 1 des 18 traitées avec $1\mu\text{M}$ de LDN193189 (résultats non montrés). Cette dernière ne régénère aucune structure (la patte controlatérale du même animal régénère parfaitement).

Pour vérifier si les Bmp participent à la formation initiale du blastème, une cohorte d'animaux a été traitée au LDN193189 seulement durant la phase de préparation, c'est-à-dire de 24h avant l'amputation jusqu'au stade MB (Figure 18, détaillé dans le Tableau IX, en annexe). Les membres traités avec $0,2\mu\text{M}$ de LDN193189 se régénèrent de façon identique aux contrôles traités au DMSO seulement. Par contre, à $0,5\mu\text{M}$ et $1\mu\text{M}$, les pattes ne se

régénèrent que rarement. Dans la majorité des cas, la formation initiale du blastème n'est pas suivie de son élongation ou de la formation d'os. Cependant, une des 8 pattes d'animaux traités avec $0,5\mu\text{M}$ se reforme complètement (la patte controlatérale ne se régénère pas). De plus, à $1\mu\text{M}$, les deux pattes d'un même animal reforment chacune 2 doigts, mais l'axe AP est autrement incomplet. Ceci indique que la signalisation des Bmp a une fonction importante à jouer lors de l'apparition et de la croissance initiale du blastème de régénération. Cette fonction est remplie lors de traitements avec $0,2\mu\text{M}$ de LDN193189, mais les plus hautes concentrations d'inhibiteurs la bloquent dans plus de 75% des pattes.

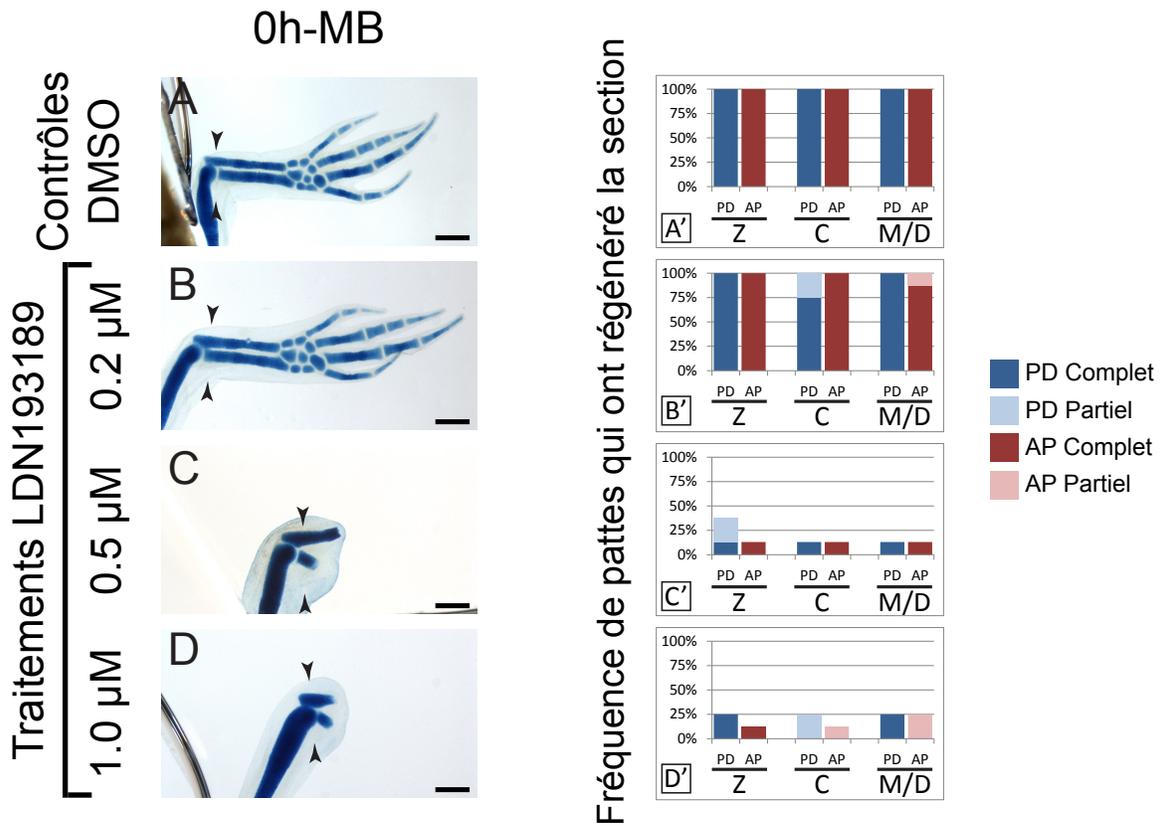


Figure 18. Traitements au LDN193189 durant la phase de préparation de la régénération

Les animaux ont été traités avec le contrôle DMSO seulement (A) ou avec 0,2 μ M (B), 0,5 μ M (C) ou 1 μ M (D) de LDN193189, à partir de 24h avant l'amputation, jusqu'à ce que les contrôles atteignent le stade MB (9 jours). Une fois la régénération complétée chez les contrôles, tous les animaux ont été fixés et colorés au Victoria Blue. Des membres représentatifs sont montrés ici. Les têtes de flèches indiquent le niveau de l'amputation. Barre d'échelle : 500 μ m.

Les graphiques A', B', C' et D' compilent pour chaque condition correspondante (A, B, C, D) la fréquence des pattes qui ont régénéré l'axe PD et AP pour chaque section indiquée de la patte (Z : Zeugopode, C : Carpe, M/D : Métacarpe et doigts), soit partiellement ou complètement. n=8

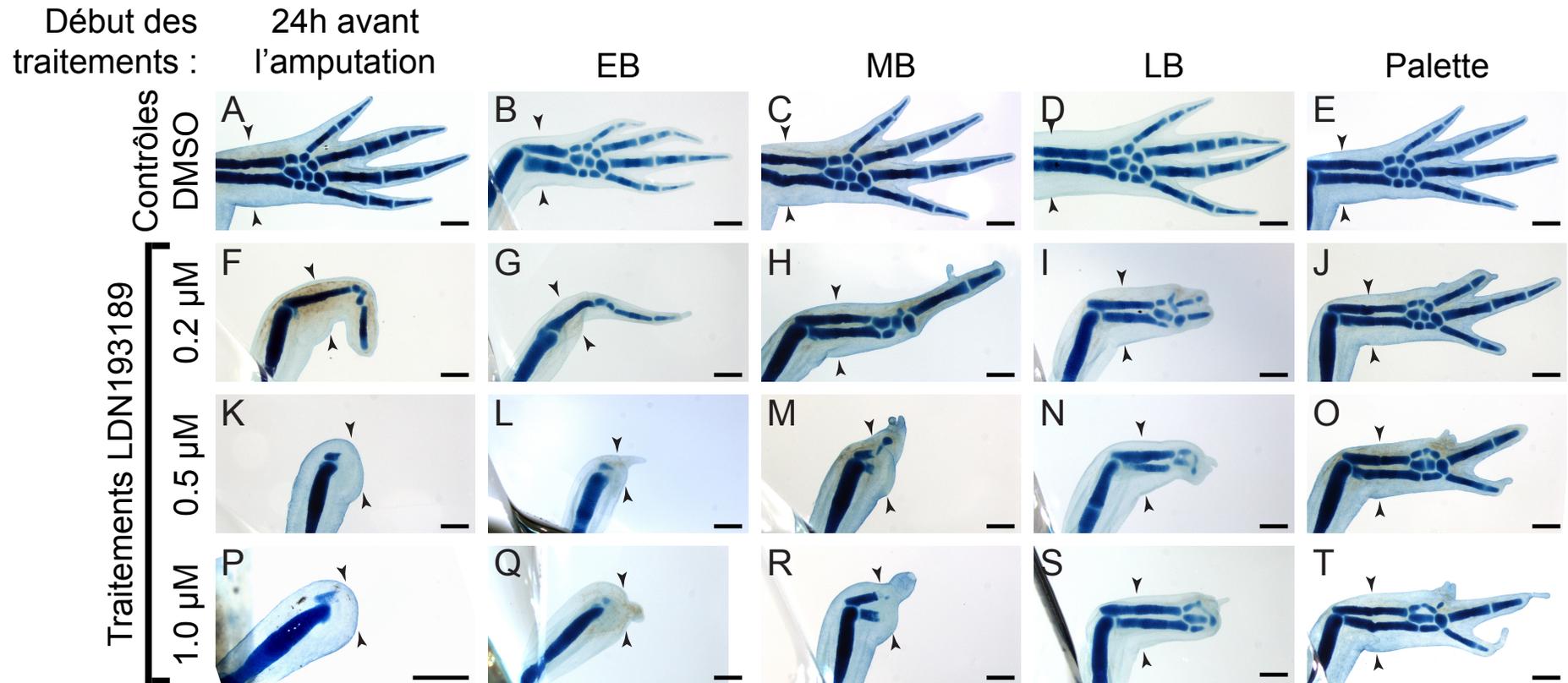


Figure 19. Traitements au LDN193189 durant la croissance du blastème et la phase de redéveloppement

Les animaux ont été traités avec le contrôle DMSO seulement (A-E) ou avec 0,2 μ M (F-J), 0,5 μ M (K-O) ou 1 μ M (P-T) de LDN193189. Les traitements ont été commencés à 24h avant l'amputation (A, F, K, P), à EB (B, G, L, Q), à MB (C, H, M, R), à LB (D, I, N, S) ou à Pal (E, J, O, T). Ils ont été terminés après la fin de la régénération des pattes contrôles. Les membres ont alors été fixés et le cartilage a été coloré au Victoria Blue. Des membres représentatifs sont montrés ici. Les têtes de flèches indiquent le niveau de l'amputation. Barre d'échelle : 500 μ m. n \geq 6

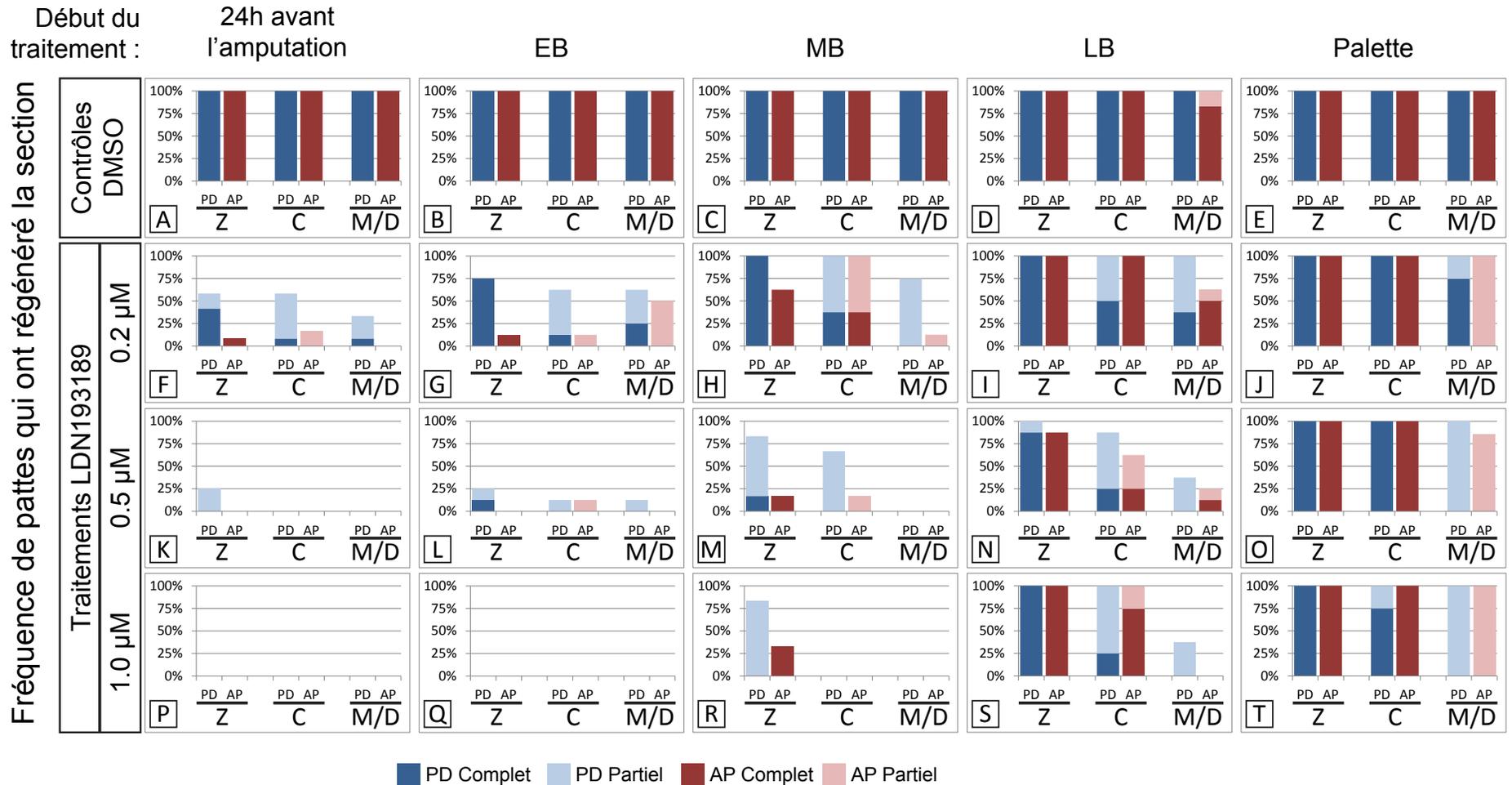


Figure 20. Traitements au LDN193189 durant la croissance du blastème et la phase de redéveloppement - représentation graphique

Les graphiques compilent pour chaque condition correspondante de la figure 19 la fréquence des pattes qui ont régénéré l'axe PD et AP pour chaque section indiquée de la patte (Z : Zeugopode, C : Carpe, M/D : Métacarpe et doigts), soit partiellement ou complètement. $n \geq 6$

Quant à la phase de redéveloppement, les Bmp ont des rôles connus dans la prolifération, la formation de patrons et l'induction osseuse [267]. En partant de l'hypothèse que ces processus agissent de manière successive, leur séparation temporelle a été tentée. Pour ce faire, des axolotls amputés ont été traités au LDN193189, mais en initiant les traitements à partir de différents stades de régénération. Les traitements ont été arrêtés lorsque les contrôles DMSO ont eu fini de se régénérer. Les animaux ont alors été fixés et des préparations squelettiques ont été faites (Figure 19). Les fréquences des pattes qui ont régénéré chaque section du patron osseux sont comptabilisées dans les graphiques de la Figure 20 (détails dans les Tableaux X à XIII, en annexe).

Tout comme dans l'expérience présentée à la Figure 15, les concentrations plus élevées d'inhibiteur provoquent un phénotype plus sévère. Retarder le début du traitement crée une tendance claire : plus il commence tard, plus il y a de structure osseuses régénérés. Par exemple, retarder de 3 jours (LB à Pal) le traitement avec $0,5\mu\text{M}$ de LDN193189 permet au nombre de pattes qui régénèrent complètement leur carpe de passer de 25% à 100%. De plus, le nombre de pattes dont au moins une partie du métacarpe et des phalanges est régénérée passe de 38% à 100% (Figure 20 N, O). Il est à noter que les éléments osseux sont toujours ajoutés des plus proximaux, suivi des plus distaux (particulièrement clair à $0,5\mu\text{M}$ et $1\mu\text{M}$ de LDN193189). Ceci indique pour la première fois de façon expérimentale que la régénération des membres se fait de façon progressive. Aux hautes concentrations de drogue, le redéveloppement de structures complètes n'est observé de façon régulière que lorsque le traitement commence à LB ou Pal (Figure 20 N, O, S, T), soutenant l'idée qu'il y a une transition critique à LB.

Un effet sur l'axe antéro-postérieur est également observé en comparant les traitements de $0,2\mu\text{M}$ commençant à EB, MB et LB (Figure 19 G-I). Bien que tous ces membres amputés régénèrent jusqu'à la première phalange, le patron antéro-postérieur devient plus complet lorsque les traitements sont commencés plus tard. Dans les traitements commencés à EB, seulement 13% des membres observés régénèrent à la fois le radius et l'ulna (62% ne régénèrent qu'un seul de ces os). Dans ceux traités à partir de MB, 62% des membres régénèrent à la fois le radius et l'ulna, et 100% d'entre eux régénèrent au moins quelques éléments du carpe. Commencer les traitements à LB permet de régénérer encore plus d'os.

L'axe AP du zeugopode et du carpe est alors complet chez 100% des pattes observées, bien que l'axe PD du carpe soit incomplet dans 50% des cas. Commencer les traitements à Pal permet la régénération des 8 os carpiens dans 100% des membres observés. Dans 75% des pattes, un doigt complet est régénéré (2^e doigt, identifié par sa position relative au carpe), ainsi que deux doigts incomplets.

La régénération se fait progressivement sur l'axe proximo-distal. Cependant, les expériences présentées ici ont jusqu'à maintenant toutes été effectuées avec des amputations faites à travers le zeugopode (radius/ulna). Pour vérifier si cette "progression" se fait à partir d'autre régions de la patte, une série d'amputations à travers le stylopode (humérus) a été effectuée (Figure 21 A-E, détails dans le Tableau XIV, en annexe). Comme pour les séries de la Figure 19, les traitements ont été commencés à différents stades de régénération. Cette fois-ci, une seule dose de LDN193189 a été testée (0,5 μ M). Comme avec les amputations à travers le zeugopode, retarder le traitement permet la régénération de plus en plus de structures osseuses. Dans toutes les pattes, au moins une partie du stylopode est régénérée et 67% des pattes régènèrent une partie du zeugopode lorsque les traitements sont commencés à EB (100% lorsque commencés à MB). Une partie de l'axe n'est reformé que dans 17% de ces pattes. Encore une fois, la différence entre commencer le traitement à MB et LB donne un résultat semblable : on passe d'une patte avec peu de structures définies à une patte où les os du zeugopodes sont régénérés dans 100% des pattes. Elles ont toutes au moins une partie du carpe de régénéré (67% sont complet). Il y a cependant quelques petites différences entre les amputations faites dans le stylopode au lieu du zeugopode. Même en commençant le traitement à EB, il n'y a jamais de régression osseuse observée. Par contre, les traitements commençant à Pal ne permettent en aucun cas la régénération de phalanges.

Début du traitement :

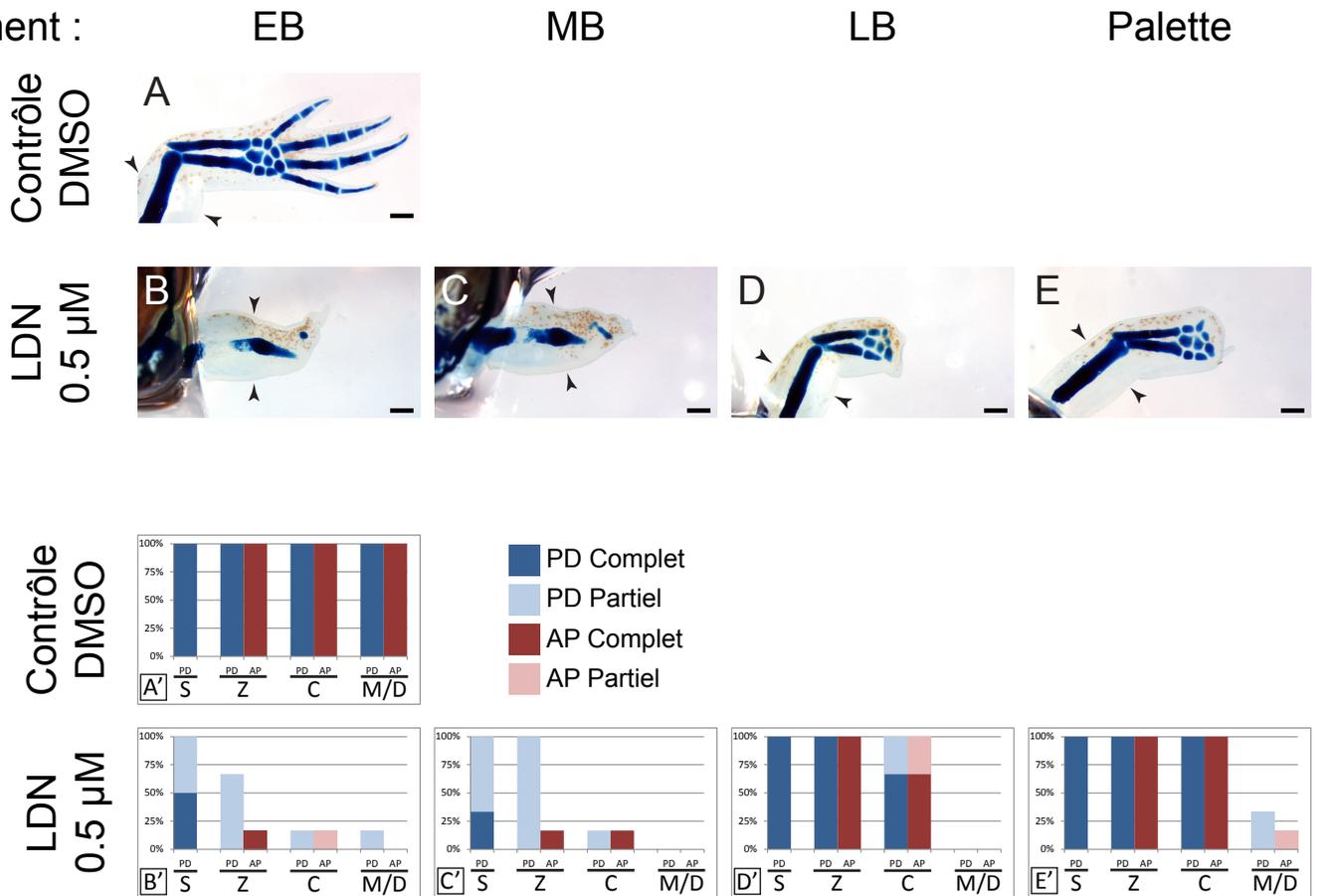


Figure 21. Traitements au LDN193189 durant la croissance du blastème et la phase de redéveloppement - Amputations à travers le stylope

Les animaux ont été amputés à travers l'humérus. Ils ont ensuite été traités avec le contrôle DMSO seulement (A) ou avec 0,5 μ M de LDN193189 (B-E). Les traitements ont été commencés à EB (A, B), à MB (C), à LB (D) ou à Pal (E) et ont été poursuivis jusqu'à la fin de la régénération des contrôles. Une fois que les contrôles étaient complètement régénérés, tous les membres ont été fixés et le cartilage a été coloré au Victoria Blue. Des membres représentatifs sont montrés ici. Les têtes de flèches indiquent le niveau de l'amputation. Barre d'échelle : 500 μ m.

Les graphiques A'-E' compilent pour chaque condition correspondante (A-E) la fréquence des pattes qui ont régénéré l'axe PD et AP pour chaque section indiquée de la patte (S : Stylope, Z : Zeugopode, C : Carpe, M/D : Métacarpe et doigts), soit partiellement ou complètement. n=6

3.3.6 Expression de gènes cibles des Bmp durant la régénération et effet du LDN193189

Quelques gènes d'intérêt ont été choisis pour mieux comprendre l'impact des Bmp durant la régénération. Les gènes choisis sont une combinaison de cibles transcriptionnelles de la voie des Bmp et de gènes qui ont des rôles potentiels dans la prolifération cellulaire, dans la formation des axes d'asymétrie ou dans la formation des os. Leur expression a d'abord été mesurée par RT-qPCR durant toute la régénération chez des animaux non-traités. Ensuite, les stades typiquement associés à la transition de la phase de préparation vers la phase de redéveloppement (EB, MB, LB et Pal) ont été sélectionnés pour tester l'effet de l'inhibition de la voie des Bmp. Les animaux ont été traités avec différentes doses de LDN193189 (ou DMSO seulement pour les contrôles) à partir de 48h avant le stade auquel l'ARN a été recueilli (voir Figure 10 pour les JPA utilisés). Les changements d'expression génique dépendent non seulement de la dose de LDN193189 utilisée, mais également du stade avant lequel cet inhibiteur a été administré.

L'expression de *Bmp2*, *Bmp5* et *Bmp7* durant la régénération a déjà été présentée à la Figure 11 A, mais est répétée ici avec les résultats d'inhibition dans la Figure 22. Il est à noter que l'expression des Bmp eux-mêmes est affectée lors de traitements avec le LDN193189 (Figure 22 A'-C'). *Bmp2* est principalement affecté aux stades plus tardifs (LB and Pal), où une augmentation de l'expression de 50% (LB) à 130% (Pal) est observée par rapport aux contrôles DMSO de ces temps respectifs. *Bmp5* est seulement affecté plus tôt, avec une réduction d'expression de 60% à EB. L'effet du LDN193189 sur l'expression des Bmp est autrement faible et inconsistant. C'est également le cas à tous les stades évalués pour *Bmp7*.

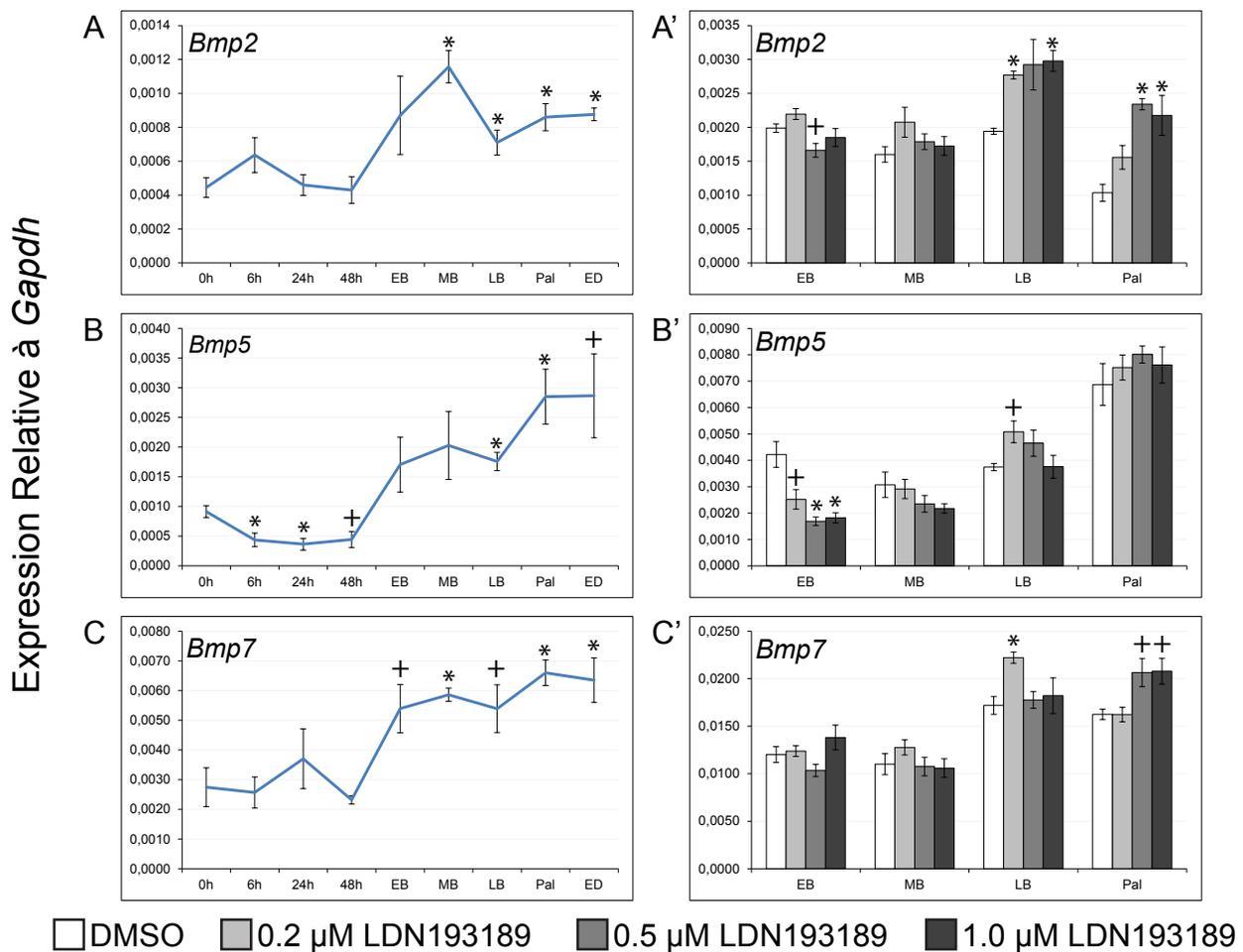


Figure 22. Expression des Bmp et effet du LDN193189

(A-C) Expression moyenne de *Bmp2*, *Bmp5* et *Bmp7* durant la régénération normale des membres (mêmes graphiques que dans la Figure 11A, pour fins de comparaison). (A'-C') Expression de ces mêmes gènes chez des animaux traités à partir de 48h avant les stades sélectionnés (EB, MB, LB et ED) avec le DMSO seulement (contrôles) ou aux concentrations de LDN193189 indiquées. Leur niveau d'expression a été déterminé par RT-qPCR et un ratio a été fait par rapport à l'expression de *Gapdh*. Les abréviations sont utilisées pour les stades qui suivent 48h. Les barres d'erreur correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs-p $\leq 0,05$ et + indiquent des valeurs-p $\leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral. Les valeurs sont comparées au temps = 0h (tissu mature) pour la régénération normale et comparées au contrôle DMSO respectif à chaque temps pour les animaux traités au DMSO/LDN193189. n=4

Msx1, *Msx2* et *Id3* sont impliqués dans la prolifération et le maintien de l'état non différencié des cellules [272, 315, 334, 335]. À première vue, leur expression est semblable à celle des *Bmp* : une expression relativement faible avant EB et forte de EB à ED (Figure 23 A-C). Cependant, les détails sont plutôt différents. Avant EB, l'expression de *Msx1* diminue de 50-75% par rapport aux tissus matures, tandis que celle de *Msx2* et *Id3* varie peu. L'augmentation de l'expression de *Msx1* et *Msx2* la plus grande se fait de 48h à EB : 10X et 5X respectivement. *Msx1* subit une seconde augmentation majeure d'expression de 3X en passant de MB à LB. L'augmentation de l'expression de *Id3* est plus progressive, atteignant 2X son niveau initial à EB et 5X à LB. Ces trois gènes ont un sommet d'expression autour de LB-Pal, suivi d'une légère diminution à ED. Ils sont aussi tous les trois affectés de façon similaire par le LDN193189, c'est-à-dire une forte diminution de l'expression, mais moins notable au stade Pal (Figure 23 A'-C'). Au stade LB, on voit l'effet le plus fort sur *Msx1* et *Msx2* (perte respective de 85% et 70% de l'expression normale avec 1 μ M LDN193189), mais le plus faible sur *Id3* (perte de 40% de l'expression normale).

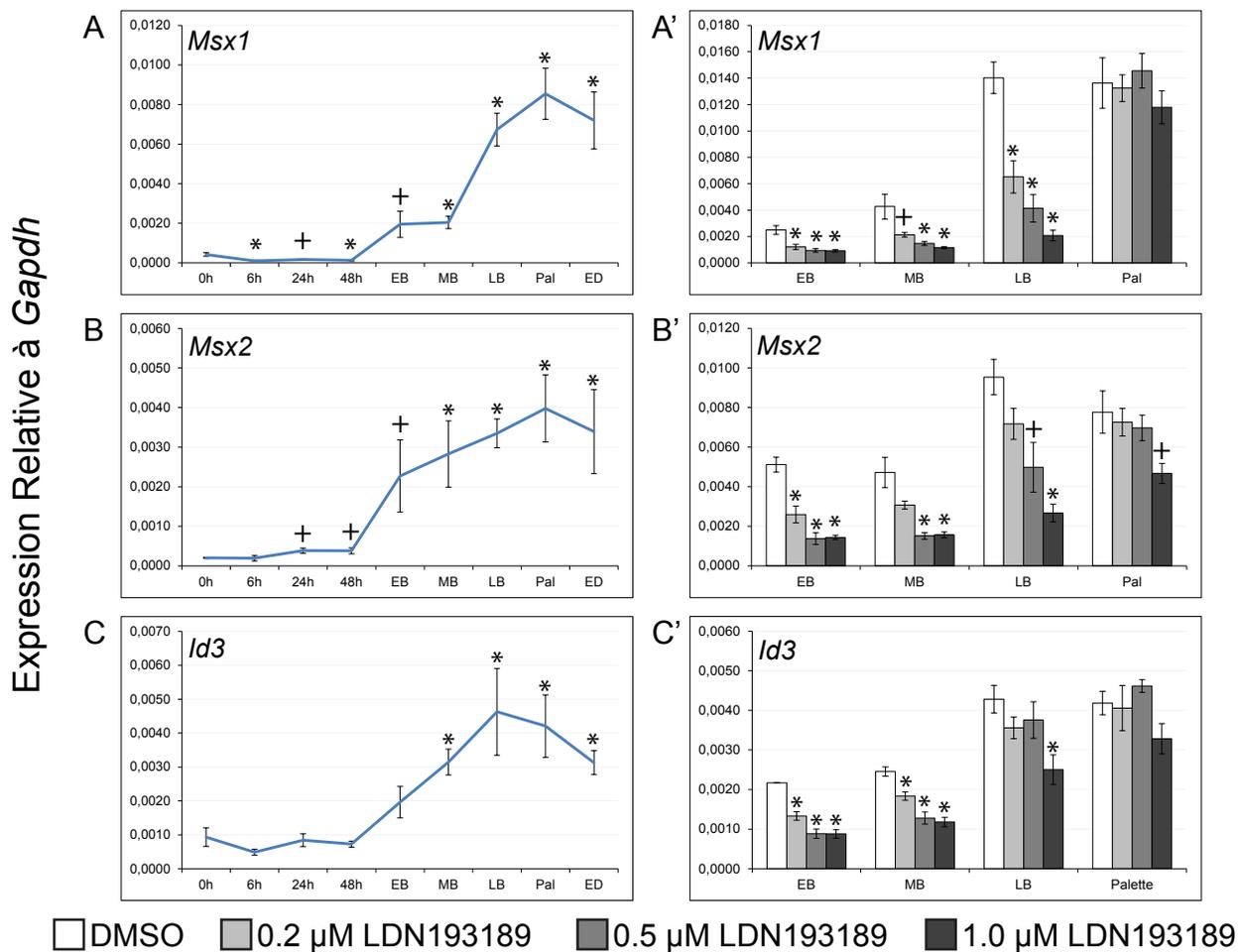
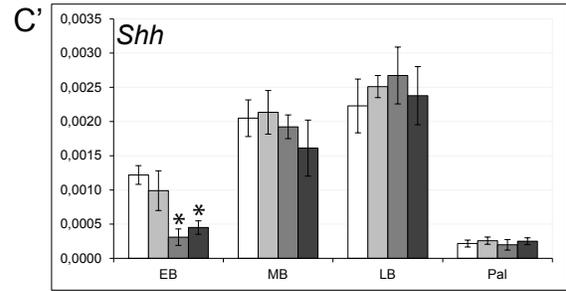
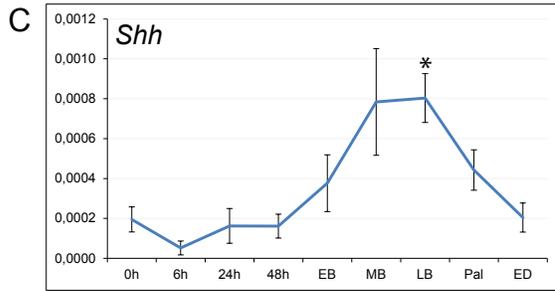
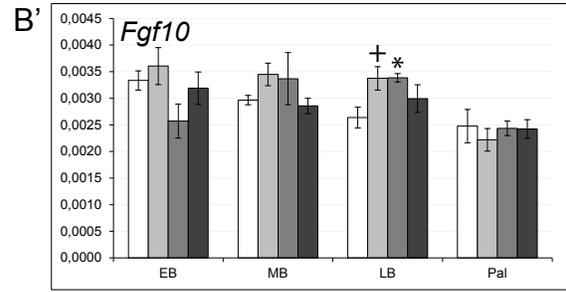
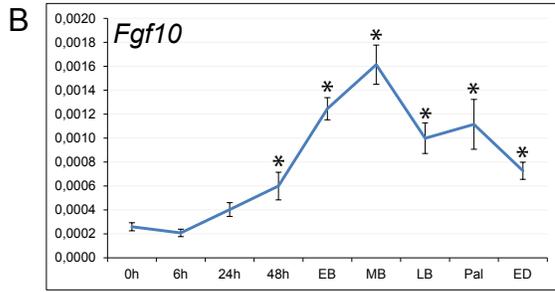
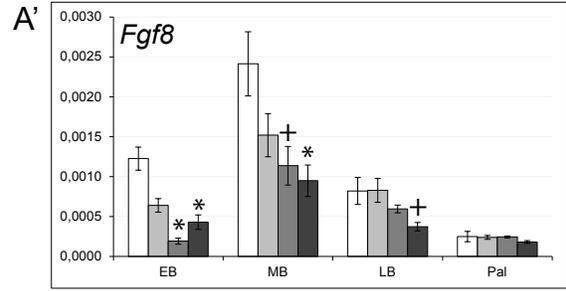
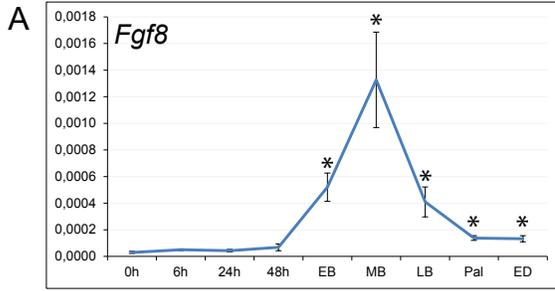


Figure 23. Expression de gènes impliqués dans la prolifération et le maintien de l'état dédifférencié et effet du LDN193189

(A-C) Expression moyenne de *Msx1*, *Msx2* et *Id3* durant la régénération normale des membres. (A'-C') Expression de ces mêmes gènes chez des animaux traités à partir de 48h avant les stades sélectionnés (EB, MB, LB et ED) avec le DMSO seulement (contrôles) ou aux concentrations de LDN193189 indiquées. Leur niveau d'expression a été déterminé par RT-qPCR et un ratio a été fait par rapport à l'expression de *Gapdh*. Les abréviations sont utilisées pour les stades qui suivent 48h. Les barres d'erreur correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs- $p \leq 0,05$ et + indiquent des valeurs- $p \leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral. Les valeurs sont comparées au temps = 0h (tissu mature) pour la régénération normale et comparées au contrôle DMSO respectif à chaque temps pour les animaux traités au DMSO/LDN193189. n=4

Expression Relative à Gapdh



□ DMSO ■ 0.2 μM LDN193189 ■ 0.5 μM LDN193189 ■ 1.0 μM LDN193189

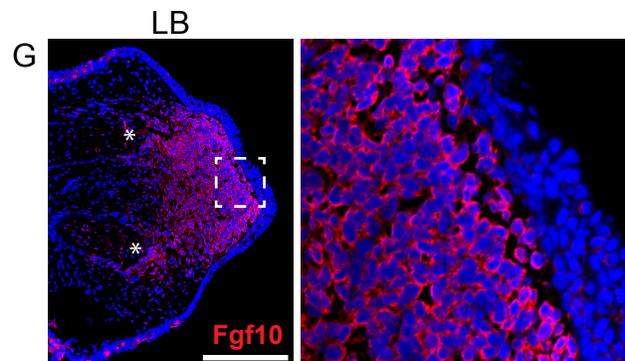
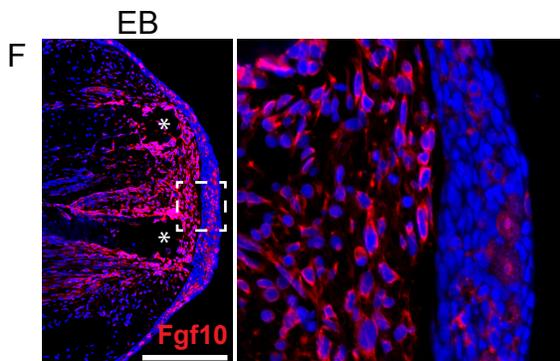
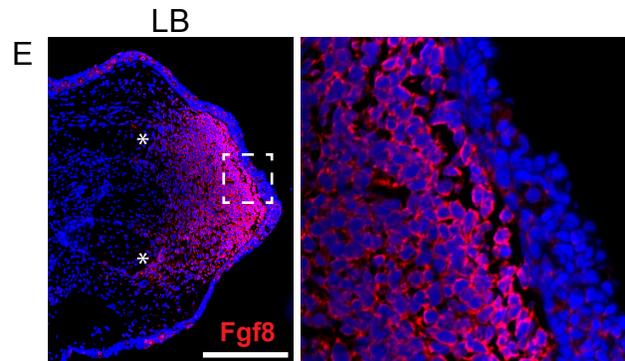
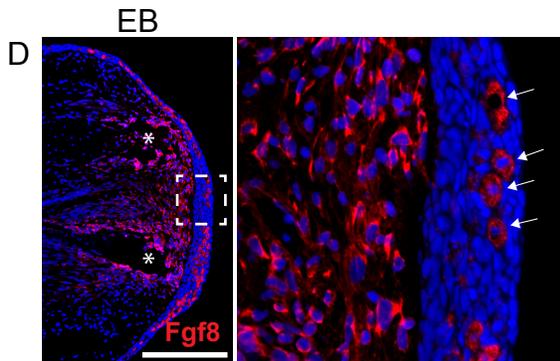


Figure 24. Expression de gènes impliqués la formation du patron et l'élongation du membre et effet du LDN193189

(A-C) Expression moyenne de *Fgf8*, *Fgf10* et *Shh* durant la régénération normale des membres. (A'-C') Expression de ces mêmes gènes chez des animaux traités à partir de 48h avant les stades sélectionnés (EB, MB, LB et ED) avec le DMSO seulement (contrôles) ou aux concentrations de LDN193189 indiquées. Leur niveau d'expression a été déterminé par RT-qPCR et un ratio a été fait par rapport à l'expression de *Gapdh*. Les abréviations sont utilisées pour les stades qui suivent 48h. Les barres d'erreur correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs-p $\leq 0,05$ et + indiquent des valeurs-p $\leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral. Les valeurs sont comparées au temps = 0h (tissu mature) pour la régénération normale et comparées au contrôle DMSO respectif à chaque temps pour les animaux traités au DMSO/LDN193189. n=4

(D-G) Hybridation *in situ* pour l'expression de *Fgf8* (D et E) et *Fgf10* (F et G) dans les membres en régénération, aux stades EB (D et F) et LB (E et G). Les animaux sont traités au DMSO seulement. Un grossissement est inclus pour chaque encadré, pour montrer l'épithélium. Les flèches pointent les cellules de Leydig, qui sont positives, même chez les contrôles sans sonde. Les astérisques indiquent l'extrémité amputée des os du zeugopode. La barre d'échelle = 500 μ m. n=4

Durant le développement, *Fgf8* et *Fgf10* participent au maintien de la croissance du bourgeon du membre et à la formation de son patron [209, 336, 337]. Chez les pattes d'axolotl en régénération, ces deux gènes ont une faible augmentation d'expression dans les jours suivant l'amputation (~2X à 48h) et une augmentation plus notable à EB (Figure 24 A-B). Leur expression atteint son sommet à MB, avec 44X et 6X l'expression du temps=0h pour *Fgf8* et *Fgf10* respectivement. Elle diminue par la suite à un rythme qui reflète l'augmentation. Le traitement au LDN193189 affecte principalement *Fgf8* en diminuant son expression de jusqu'à 85% à EB, de 60% à MB et de 55% à LB. Cette diminution n'est que de 30% à Pal. L'effet sur *Fgf10* est faible et inconsistant à travers les doses et les stades analysés (Figure 24 A'-B'). L'expression de ces deux gènes a aussi été localisée par hybridation *in situ* sur coupes (Figure 24 D-G). À EB, ils sont exprimés dans les cellules du mésenchyme, en proximité du site d'amputation. À LB, ils sont exprimés à travers les cellules du blastème, mais *Fgf10* a un signal plus uniforme que celui de *Fgf8*, qui est moins intense à la base du blastème. Ils ne sont ni l'un ni l'autre exprimés dans les cellules de l'épithélium. Les cellules qui y donnent un signal positif sont des cellules de Leydig [338]. Il est difficile de déterminer si le signal dans ces cellules est réel, puisque le cytoplasme de ces cellules donne souvent un signal positif dans les contrôles expérimentaux où aucune sonde ou anticorps primaire n'est utilisé.

Shh contrôle la formation du patron antéro-postérieur [150, 339]. Son niveau d'expression varie comme celui de *Fgf10*, mais en plus modéré et tardif (Figure 24 C). Son expression est à son maximum autour de MB-LB. Le LDN193189 n'affecte son expression de façon importante qu'à EB, mais une perte de 65-75% y est observée (Figure 24 C').

Sox9, *Collagen2A1* (*Col2A1*) et *Cbfa1* sont impliqués dans la chondrogenèse et l'ostéogenèse [289, 292, 340]. Ces gènes ont un rôle plus tardif durant la régénération, mais commencent à être exprimés durant la formation du blastème (Figure 25 A-C). L'expression de *Sox9* et *Col2A1* diminue respectivement de jusqu'à 60% et 80% suite à l'amputation, mais *Cbfa1* varient peu à ce stade. L'expression de *Sox9* et *Cbfa1* augmente au-dessus de leur niveau initial à partir de EB. Les niveaux d'expression de *Sox9* et *Col2A1* sont à leur plus fort entre LB et ED, où ils sont respectivement 3-4X et 4-6X plus élevés que dans le moignon qui vient d'être amputé. *Cbfa1* atteint son sommet à Pal, avec une expression 3,4X plus élevée que son niveau initial. Peu importe le stade, un traitement au LDN193189 diminue l'expression de

Sox9 de jusqu'à 50% (Figure 25 A'-C'). Un résultat similaire est observé avec *Cbfa1*, mais seulement à LB et Pal. *Col2A1* ne voit une diminution comparable qu'au stade Pal.

Puisque retarder le début des traitements au LDN193189 permet la régénération d'un nombre croissant d'éléments osseux proximaux, nous nous sommes penchés sur l'expression des marqueurs proximo-distaux *HoxA11* et *HoxA13* chez les animaux traités (Figure 26). Le niveau d'expression de *HoxA11* dans les contrôles varie peu sauf à LB, où il a un niveau d'expression 50% plus élevé qu'aux autres stades. Quant à *HoxA13*, il y a une différence d'expression de 8,5X entre son niveau le plus bas à EB et le plus haut à LB. Au stade EB, la drogue fait réduire l'expression de *HoxA11* de jusqu'à 38% par rapport à l'expression chez les contrôles. Par contre, cette réduction est moins importante aux stades qui suivent : 20% à MB et 15% aux stades LB et Pal. Les traitements au LDN193189 font réduire l'expression de *HoxA13* dans un patron semblable, quoi que plus efficacement. À EB, jusqu'à 60% de l'expression de *HoxA13* est perdue par rapport aux contrôles. Cette perte est de 38% à MB, 34% à LB et 18% à Pal.

Le patron d'expression de *HoxA11* et *HoxA13* a également été évalué par hybridation *in situ* sur des coupes provenant d'animaux traités au LDN193189 (Figure 26 C-D). Les deux gènes ont un patron semblable à EB : ils sont exprimés dans les cellules mésenchymateuses (incluant les cellules qui entourent les os) en proximité du site d'amputation. Encore une fois, l'expression dans l'épithélium vient entièrement des cellules de Leydig et il n'est pas possible de savoir si le signal dans ces cellules est spécifique. À LB, l'expression de *HoxA11* et *HoxA13* est encore dans les cellules mésenchymateuses du blastème, mais celle de *HoxA13* est légèrement plus restreinte à la portion distale de celui-ci. À EB, les traitements au LDN193189 réduisent l'expression de *HoxA11* et *HoxA13*, mais n'affectent pas l'emplacement de leur expression. À LB, peu de changement est observé pour *HoxA11*. Pour *HoxA13*, une diminution du niveau d'expression est observée comme en RT-qPCR, mais est principalement dans la portion proximale du blastème.

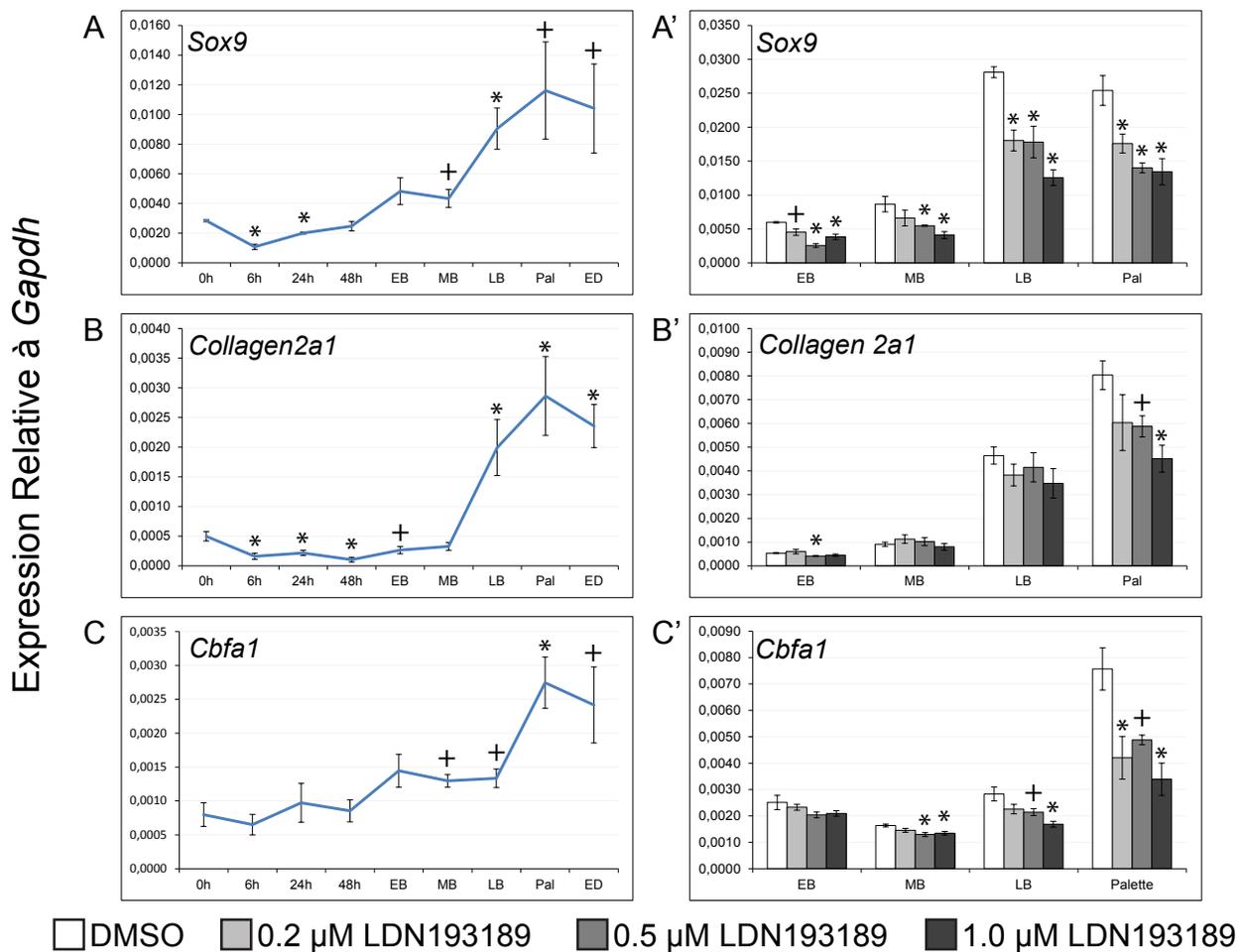


Figure 25. Expression de gènes impliqués lors de l'ostéogénèse et effet du LDN193189

(A-C) Expression moyenne de *Sox9*, *Col2A1* et *Cbfa1* durant la régénération normale des membres. (A'-C') Expression de ces mêmes gènes chez des animaux traités à partir de 48h avant les stades sélectionnés (EB, MB, LB et ED) avec le DMSO seulement (contrôles) ou aux concentrations de LDN193189 indiquées. Leur niveau d'expression a été déterminé par RT-qPCR et un ratio a été fait par rapport à l'expression de *Gapdh*. Les abréviations sont utilisées pour les stades qui suivent 48h. Les barres d'erreurs correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs-p $\leq 0,05$ et + indiquent des valeurs-p $\leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral. Les valeurs sont comparées au temps = 0h (tissu mature) pour la régénération normale et comparées au contrôle DMSO respectif à chaque temps pour les animaux traités au DMSO/LDN193189. n=4

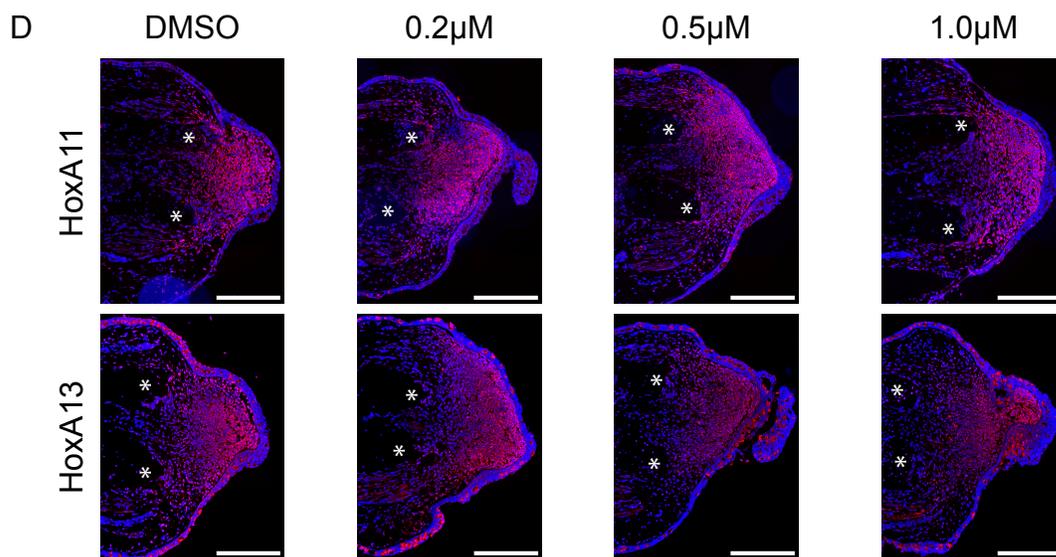
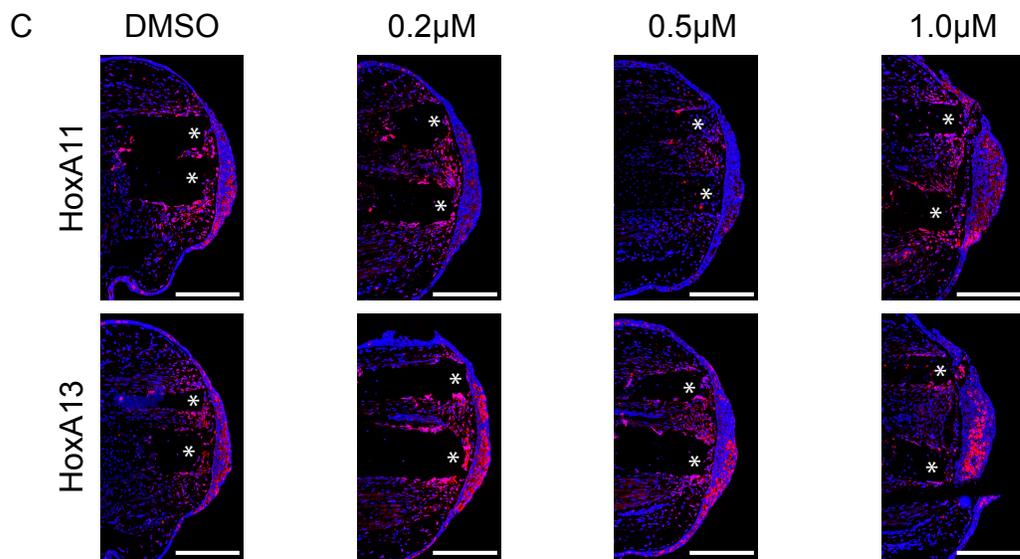
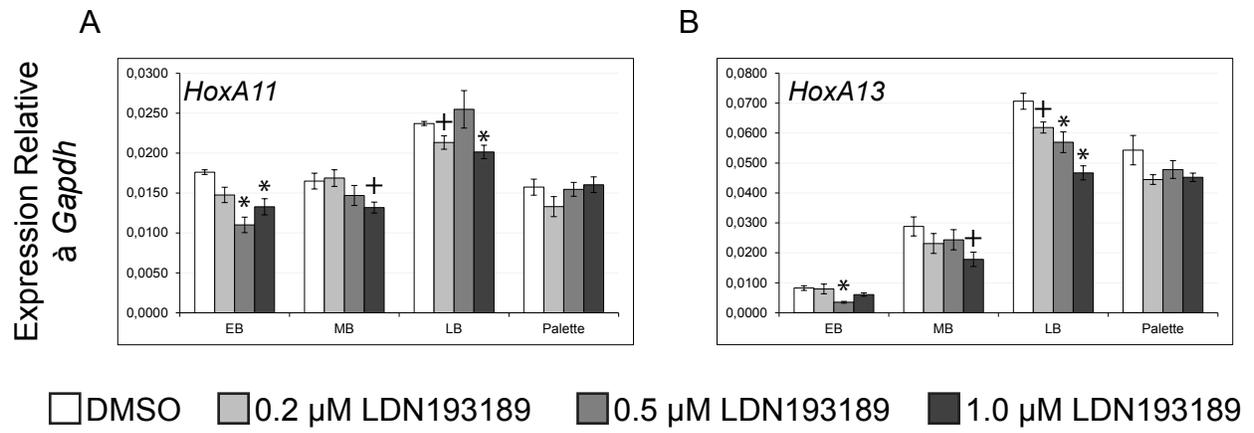


Figure 26. Expression de gènes marqueurs de l'axe proximo-distal et effet du LDN193189

(A, B) Expression moyenne de *HoxA11* et *HoxA13* chez des animaux traités à partir de 48h avant les stades sélectionnés (EB, MB, LB et ED) avec le DMSO seulement (contrôles) ou aux concentrations de LDN193189 indiquées. Leur niveau d'expression a été déterminé par RT-qPCR et un ratio a été fait par rapport à l'expression de *Gapdh*. Les barres d'erreur correspondent à \pm l'erreur type. Les astérisques indiquent des valeurs- $p \leq 0,05$ et + indiquent des valeurs- $p \leq 0,10$, en utilisant le test-t de Student bilatéral. Les valeurs sont comparées au DMSO respectif à chaque temps. n=4

(C, D) Hybridation *in situ* pour l'expression de *HoxA11* et *HoxA13* dans les pattes d'animaux traités au DMSO seulement ou avec 0,2 μ M, 0,5 μ M ou 1,0 μ M de LDN193189, aux stades EB **(C)** et LB **(D)**. Les astérisques indiquent l'extrémité amputée des os du zeugopode. Les barres d'échelle = 500 μ m. n=4

3.3.7 Rétablir le phénotype normal par l'injection de la protéine Fgf8.

Commencer les traitements de LDN193189 à des stades de régénération plus tardifs mène à des formations osseuses qui ressemblent aux phénotypes observés quand l'AER est excisée chez l'embryon de poulet. Plus l'AER est éliminée tard, plus il y a de structures osseuses qui se développent [187]. Chez les amniotes, l'AER est un épaissement cellulaire de l'épithélium distal qui exprime fortement le gène *Fgf8* [209]. En plus de l'observation que l'expression de *Fgf8* est diminuée en présence de LDN193189, ces faits suggèrent que ce gène est essentiel au rôle que les Bmp ont dans la formation de patron ou, au moins, dans le maintien de la croissance du bourgeon de membre en régénération. Le rétablissement du phénotype causé par l'inhibition des Bmp a donc été tenté en injectant la protéine Fgf8 purifiée dans le blastème durant la période à laquelle elle est normalement exprimée.

Dans cette expérience, les animaux ont été exposés à 0,5 μ M de LDN193189, à partir de 2 jours avant EB, jusqu'à LB (JPA 5 à 12). Les animaux sont ensuite laissés sans traitements jusqu'à ce que les contrôles aient terminé de régénérer, puis colorés au Victoria Blue (Figure 27, Tableau XV en annexe pour plus de détails). Chez les animaux traités au LDN193189 et dont les pattes droites sont injectées au PBS, aucune des pattes ne se régénèrent parfaitement, qu'elles soient injectées ou non. Dans les deux cas, 60% des pattes ont régénéré complètement l'axe PD du zeugopode et des métacarpes/doigts, mais celui du carpe n'est complet que dans 20% des pattes. Quant à l'axe AP des trois sections, il n'est régénéré complètement ou partiellement que dans 40% des pattes et n'est jamais complet dans les métacarpes et les doigts.

Chez les animaux traités au LDN193189 et injectées au Fgf8, il y a une augmentation de la fréquence des éléments osseux régénérés dans les pattes injectées, versus celles non-injectées. Comparée à la patte non-injectée, la fréquence des pattes avec un axe PD complet reste le même pour le zeugopode, mais passe de 20% à 80% pour le carpe et de 60% à 80% pour les métacarpes et doigts. Pour ce qui est de la fréquence de pattes où l'axe AP est complet, il passe de 40% à 80% dans le stylopode, de 20% à 60% dans le carpe et de 20% à 60% dans les métacarpes et doigts. Trois des 5 blastèmes injectés au Fgf8 régénèrent donc une patte qui ressemble aux contrôles chez les animaux traités au DMSO seulement, comparé à un seul des blastèmes non-injectés. Les membres injectés avec Fgf8 ne sont pas régénérés de

façon tout à fait parfaite. Parmi les 3 pattes qui ont tous leurs doigts, 2 ont des os carpiens fusionnés ou manquants et 2 ont une jointure supplémentaire parmi les phalanges du 2^e doigt. Malgré ces imperfections, il est clair que l'injection de Fgf8 aide à compenser pour l'inhibition de la voie des Bmp.

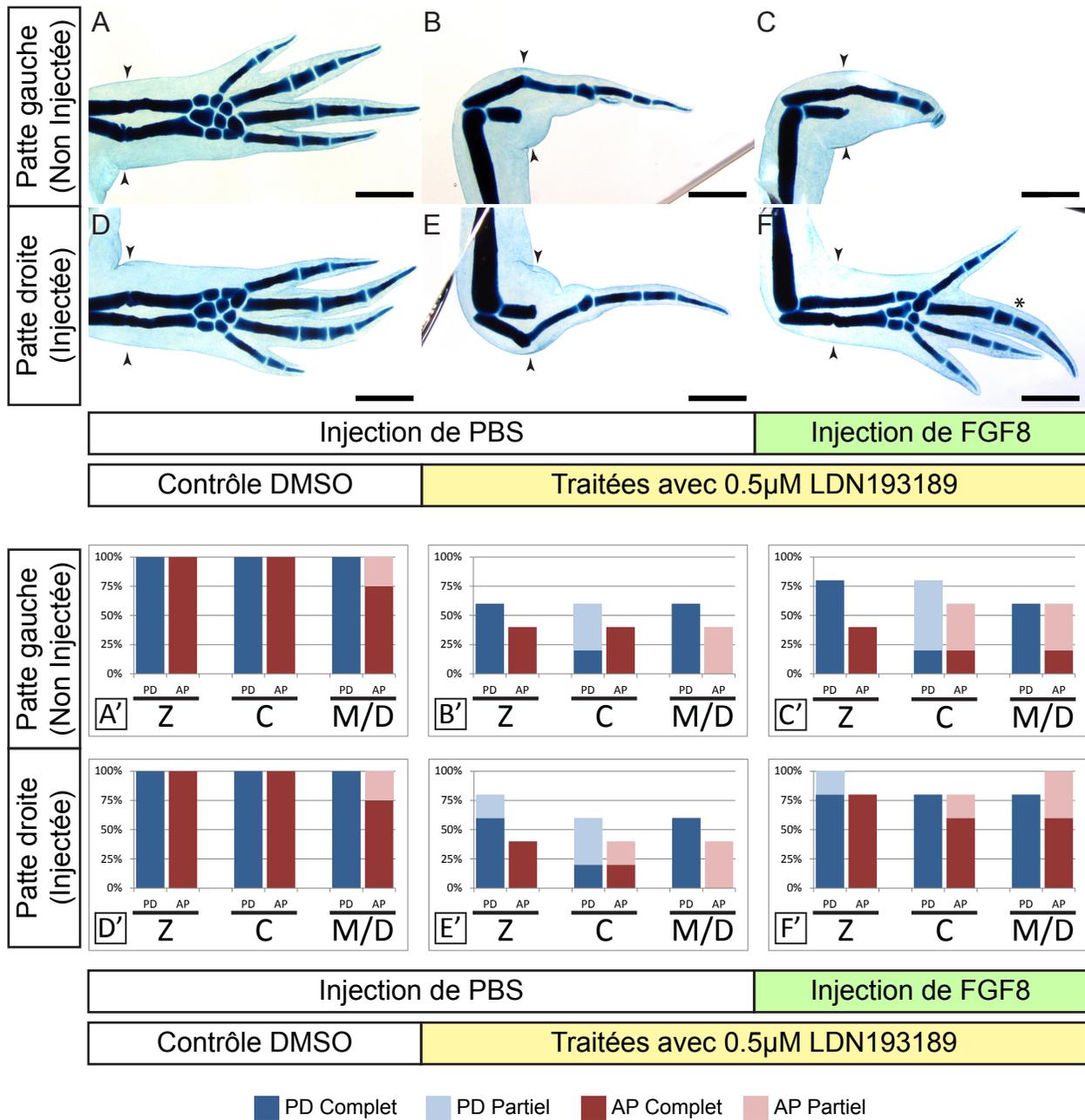


Figure 27. Fgf8 permet de rétablir le phénotype normal chez des animaux traités au LDN193189

Les animaux ont été traités à partir de 48h avant le stade EB jusqu'au stade LB (JPA 5 à JPA 12) au DMSO seulement (A, D) ou avec 0,5µM de LDN193189 (B, C, E, F). De JPA 7 à JPA 11 inclusivement, les blastèmes de la patte droite ont été injectés avec du PBS (D, E) ou avec la protéine Fgf8 recombinante (F). Après la complétion de la régénération des contrôles DMSO, les animaux ont été fixés et colorés au Victoria Blue. Les pattes gauches (A-C) et droites (D-F) présentées pour chaque condition appartiennent à un même animal représentatif. Les têtes de flèches indiquent le niveau de l'amputation. L'astérisque indique une jointure surnuméraire. Barre d'échelle : 500µm.

Les graphiques (A'-F') compilent pour chaque condition correspondante (A-F) la fréquence des pattes qui ont régénéré l'axe PD et AP pour chaque section indiquée de la patte (Z : Zeugopode, C : Carpe, M/D : Métacarpe et doigts), soit partiellement ou complètement. n=4 pour les animaux traités au DMSO seulement. n=5 pour les animaux traités au LDN193189.

4 Discussion

La régénération épimorphique représente la forme de guérison la plus complète qui existe chez les vertébrés. Chez l'axolotl, les résultats finaux de la régénération sont tellement parfaits que les membres et tissus régénérés sont difficiles à distinguer des originaux. Le processus est composé de plusieurs phénomènes interdépendants, tous essentiels à la formation des nouveaux tissus. En comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires a donc le potentiel d'être utile au développement de thérapies humaines. De nombreux gènes ont été identifiés durant la régénération, mais il y a encore peu de recherche approfondie sur ceux-ci. Généralement, la compréhension de leurs fonctions est plutôt basée sur la recherche faite chez des animaux qui ont des capacités de régénération limitées. Déterminer leur implication spécifiquement durant la régénération est donc bien plus pertinent pour comprendre comment celle-ci fonctionne.

L'objectif de ce projet était de déterminer quels sont les rôles de la signalisation canonique des Bmp durant la régénération de la patte d'axolotl. Pour y arriver, nous avons dû acquérir de nombreuses nouvelles informations. Nous avons mesuré le niveau d'expression génique de *Bmp2*, *Bmp5* et *Bmp7*, ainsi que celui de certaines de leurs cibles potentielles, à travers le processus de régénération. Pour plusieurs de ces gènes, nous avons aussi déterminé par hybridation *in situ* quels tissus les expriment durant la formation du blastème. Nous avons également mesuré la phosphorylation des transducteurs de la signalisation canonique des Bmp, Smad1/5, à travers la régénération et les avons localisés par immunofluorescence durant la croissance du blastème. À l'aide d'un agent pharmacologique (LDN193189), nous avons inhibé l'activité des récepteurs qui phosphorylent Smad1/5 chez des axolotls en régénération et avons analysé comment la morphologie des pattes régénérées est affectée. Nous avons aussi fait des traitements d'inhibition qui étaient limités à des périodes restreintes de la régénération, dans le but d'étudier séparément les rôles que la voie de signalisation des Bmp joue aux différents stades et d'éclaircir leur fonction dans l'ordre de la formation du patron de la patte. Nous avons mesuré l'effet du LDN193189 sur le niveau d'expression de plusieurs gènes, pour confirmer qu'ils sont bien en aval de la signalisation des Bmp. Finalement, nous avons tenté de

rétablir la morphologie normale de pattes d'animaux traités au LDN193189, par l'injection d'une des protéines dont l'expression est inhibée par cette drogue, c'est-à-dire Fgf8.

La vaste majorité des résultats obtenus ici sont complètement nouveaux dans le contexte de la régénération chez l'axolotl. Dans ce chapitre, ils seront mis en relation avec ce qui est déjà connu de la régénération et le rôle que les différents joueurs ont dans d'autres contextes. Nous pourrions ainsi tenter de répondre aux questions initiales de cette thèse : Quelles sont les rôles de la voie des Bmp durant la régénération chez l'axolotl? Sont-ils distincts de ceux de la voie de Tgf- β (lequel est essentiel à la formation du blastème durant la phase initiale de la régénération)? Le patron de régénération se forme-t-il progressivement ou par intercalation?

4.1 Analyse des résultats

4.1.1 La signalisation canonique des Bmp est fonctionnelle du stade de bourgeon précoce jusqu'à la fin de la régénération

La différence du niveau d'expression des ARNm des Bmp est de 2X à 3X entre le moment de l'amputation et leur maximum. Cette expression ne devient élevée qu'à partir de la formation du blastème de régénération (stade EB), mais le demeure jusqu'à la fin des stades de régénération étudiés (Figure 11 A). Ce patron est similaire à ce qui a été décrit précédemment pour *Bmp2* : en hybridation *in situ*, celui-ci est fortement détecté dans les blastèmes de pattes en régénération [239]. La voie de signalisation canonique des Bmp passe par la phosphorylation des protéines Smad1, Smad5 et Smad8 [248, 249]. L'existence de Smad8 n'a cependant pas été confirmée chez l'axolotl et seuls Smad1/5 ont été étudiés ici. Selon nos résultats, l'augmentation de la quantité des protéines Smad1 et Smad5 au-dessus du niveau basal se fait respectivement vers 48h après l'amputation et à EB (Figure 12). Une augmentation significative de leur phosphorylation n'est cependant observée qu'à partir du stade EB, coïncidant avec l'augmentation d'expression des Bmp. Malgré la présence de l'ARNm de Tgf- β 1 jusqu'au stade EB, la phosphorylation de Smad2/3 n'est observée que durant les 48h qui suivent l'amputation [151, 240]. Ceci correspond à l'opposé de ce que l'on

observe avec la phosphorylation de Smad1/5. Ces résultats permettent donc déjà de constater qu'il y a une séparation temporelle entre l'activation de la signalisation canonique des Bmp et celle de Tgf- β .

L'anticorps utilisé ici pour détecter la phosphorylation ne fait pas la distinction entre Smad1 et Smad5, mais ces protéines n'ont pas le même patron d'expression. La détection de Smad1 total par immunobuvardage de type Western montre son augmentation progressive de 48h jusqu'à MB, après quoi il diminue d'expression. Quant à Smad5, son expression est relativement forte entre LB et ED, ce qui correspond à la période où la chondrogenèse est enclenchée. Chez la souris, *Smad1*, *Smad5* et *Smad8* peuvent tous être mutés spécifiquement dans les chondrocytes avec *Col2-Cre*. Parmi eux, un seul allèle fonctionnel de *Smad1* est suffisant pour la formation d'un squelette presque normal, tandis qu'il devient complètement normal si c'est un allèle de *Smad5* qui est fonctionnel. L'ARNm de *Smad8* n'est que peu détecté dans le membre en développement et les souris *Smad8*^{-/-} n'ont pas de phénotypes visibles. Il y a donc une redondance partielle entre les trois, mais le gène *Smad5* est le seul d'entre eux qui est suffisant pour avoir une chondrogenèse entièrement normale chez la souris [296, 341]. Un rôle de Smad5 plus important dans la chondrogenèse serait en accord avec l'augmentation de son niveau d'expression que l'on observe aux stades tardifs de la régénération, concomitant avec la réduction de Smad1 (Figure 12 C).

4.1.2 Le LDN193189 inhibe la voie de signalisation canonique des Bmp de façon préférentielle

Afin de comprendre les rôles des Bmp, nous utilisons le LDN193189 pour inhiber leur signalisation canonique. Malgré les avantages de l'approche pharmacologique, aucune drogue n'est parfaite et il est possible de perturber des cibles non-désirées lorsque des doses élevées sont utilisées. Nous avons donc comparé l'effet du LDN193189 sur la phosphorylation de Smad1/5 à celui qu'il a sur Erk1/2 (voie non-canonique des Bmp) et sur Smad2 (voie canonique des Tgf- β) [253, 342]. Dans les pattes d'axolotl en régénération, la diminution de la phosphorylation de Smad1/5 suit l'augmentation de la concentration de LDN193189, avec une perte de 40% à 0,2 μ M et 90% à 1 μ M (Figure 13 I). L'effet du LDN193189 sur la

phosphorylation de Erk1/2 est plutôt une augmentation, mais seulement à 0,2 μ M, puisqu'il n'y a pas de différence significative aux plus hautes concentrations. Quant à Smad2, sa phosphorylation n'est pas affectée de manière significative. Le peu d'effet sur Smad2 est en accord avec les résultats d'incorporation de BrdU. Même à 1 μ M de LDN193189, des cellules du blastème sont positives pour le BrdU. Or, ce n'est pas le cas avec un traitement au SB432542, qui ne permet même pas la formation d'un blastème [240]. Ces résultats soutiennent l'idée que le LDN193189 affecte préférentiellement la voie canonique des Bmp.

Selon la littérature, le LDN193189 affecte l'activité kinase de plusieurs autres récepteurs, mais ces tests ont été faits soit en conditions hors cellules, soit en culture cellulaire [324]. Par exemple, dans des essais artificiels *in vitro*, le LDN193189 commence à inhiber la phosphorylation de Smad2 à travers Alk4 à une concentration de 1 μ M. En cellules HaCat, cette inhibition reste faible, même à une concentration 10X plus élevée [324]. En plus de la voie non-canonique des Bmp, Erk1/2 sert aussi de transducteur pour les récepteurs VegfR et FgfR. *In vitro*, la sensibilité de ces récepteurs au LDN193189 est comparable à celle de Alk2 et Alk3. Nos tests durant la régénération ne montrent cependant pas de réduction de la phosphorylation de Erk1/2 et ce même à 1 μ M. La phosphorylation d'autres transducteurs de signal de la voie non-canonique des Bmp a également été testée en cellules C2C12 et HPAEC par d'autres groupes. Par exemple, celle de p38 commence à être inhibée à 0,5 μ M, mais une inhibition totale n'est jamais observée, même à 5 μ M. Chez ces cellules, il n'y a pas d'effet sur Erk1/2 à 1 μ M [325, 343]. Changer de type cellulaire peut aussi affecter la réponse au LDN193189. Par exemple, chez des cellules PASMOC, il n'a pas d'effet sur la phosphorylation de p38, même à 8 μ M [344]. On ne peut donc pas assumer que les essais dans un contexte sont valides partout. On ne peut pas non plus tester toutes les kinases dans tous les types cellulaires d'une patte en régénération. Il faut simplement ne pas attribuer une spécificité absolue du LDN193189.

Les concentrations utiles varient entre les systèmes *in vivo* et *in vitro*, mais sont similaires d'une espèce animale à l'autre. La différence entre les systèmes pourrait venir de la voie d'administration de la drogue. Chez les embryons de poisson-zèbre [325], ainsi que chez nos expériences avec les axolotls, les animaux sont baignés dans une solution contenant de 0,2 μ M à 1 μ M de LDN193189. La molécule doit donc entrer dans l'animal par les branchies, la

peau et le système digestif. De plus, elle peut être dégradée par l'animal. Nous n'avons pas d'information spécifique à l'axolotl, mais en présence de protéines de microsomes de foie de souris, le LDN193189 a une demi-vie de 82min. De plus, lorsqu'injecté dans une souris par voie intrapéritonéale, il a une demi-vie dans le plasma de 96 min [323, 344]. On peut s'attendre au même phénomène chez l'axolotl, bien que la demi-vie de la drogue y soit inconnue. Il y aura donc un équilibre entre l'entrée de drogue et sa dégradation. De plus, nous ne voyons pas d'indication de toxicité, même chez les axolotls traités à 1 μ M. Il faut monter la concentration à 5 μ M (résultats non montrés) pour voir des effets toxiques : les animaux mangent peu, deviennent jaunâtres et vont même rétrécir. Plusieurs survivent tout de même jusqu'à la fin des traitements (5-6 semaines). La concentration tolérée est comparable chez d'autres animaux. Par exemple, des souris injectées IP aux 12 heures avec 3mg/kg de LDN193189 (mesuré à 1 μ M dans le sang peu après l'injection) pendant 60 jours n'ont pas d'effets secondaires observés. L'objectif, c'est-à-dire réduire l'ossification ectopique causée par la surexpression d'un récepteur Alk2 constitutivement actif, est atteint mais il n'y a pas de poids ou croissance anormal, pas de fractures spontanées... [344]. La combinaison de ces facteurs expliquerait pourquoi nos animaux nécessitent une concentration de drogue plus élevée pour que l'inhibition de la phosphorylation de Smad1/5 soit comparable à ce qui est observé en culture cellulaire [324].

4.1.3 L'inhibition de la voie canonique des Bmp a plusieurs conséquences morphologiques sur les membres

4.1.3.1 Traitements aux LDN193189 durant le développement original des pattes

Chez les embryons d'axolotls traités au LDN193189, les pattes développées comportent des anomalies. Chez les animaux en développement non-traités, l'ordre d'apparition des doigts va du plus antérieur vers le plus postérieur (doigt 1 jusqu'à doigt 4) [238, 239]. Les traitements au LDN193189 empêchent la formation complète de tous les doigts et le nombre d'éléments osseux manquants augmente avec la concentration de drogue utilisée. Puisqu'au stade 45, les doigts plus postérieurs sont moins avancés dans leur

différenciation et leur développement que les doigts antérieurs, leur dépendance à la signalisation des Bmp devrait en principe être plus grande que chez ces derniers. Plus le doigt est postérieur, plus il devrait être affecté par le traitement. La perte de doigts en fonction d'une augmentation de la concentration de LDN193189 devrait donc se faire dans l'ordre inverse de leur développement, c'est-à-dire du postérieur vers l'antérieur, en plus de distal vers proximal. Pourtant, même avec des traitements qui commencent au même stade, les phalanges du 2^e doigt sont perdues avec une concentration plus basse que celles du 3^e doigt (0,2µM vs 0,5µM, Figure 14). Ceci suggère que l'ordre de formation des phalanges n'est pas strictement de l'antérieur vers le postérieur.

Durant le développement, augmenter la concentration du LDN193189 cause l'absence de doigts dans un ordre qui soutient un rôle des Bmp qui passe à travers *Shh*. En effet, un phénomène d'alternance semblable est observé chez la patte de souris qui ont une mutation (K.O.) inductible de *Shh*. L'activation du knockout au stade E9.5 permet la formation de l'axe PD complet du 1^{er} doigt, mais prévient entièrement la formation des autres doigts. Si l'induction du K.O. est retardée, plus de doigts se forment, apparaissant dans l'ordre 4-2-5-3, ce qui s'avère à être l'ordre normal du début de la condensation du cartilage des doigts [345]. Chez l'axolotl, il est peu probable que la perte des doigts vienne d'un problème de chondrogenèse. À 0,2µM de LDN193189, il y a au moins un doigt qui se forme complètement chez presque tous les embryons. Or, aucune chondrogenèse n'est déjà observée dans le membre au stade auquel le traitement est commencé (stade 45) [238]. Les traitements que l'on a faits durant le développement embryonnaire n'affectent presque pas le carpe, indiquant que le patron morphologique est déjà partiellement établi à ce stade.

4.1.3.2 Traitements aux LDN193189 durant la régénération

Les traitements au LDN193189 faits durant la régénération se traduisent généralement par l'absence de plusieurs éléments osseux dans le membre régénéré. La quantité et l'identité de ceux qui manquent dépendent de la concentration de drogue utilisée ainsi que la période du traitement (Figures 15, 18-21). Lors de traitements à 0,2µM qui couvrent la période de croissance du blastème, un os du zeugopode et quelques-uns de l'autopode sont généralement

présents, mais le traitement doit commencer après EB pour avoir plus d'un os sur l'axe AP. La formation de nouveaux os est complètement inhibée aux concentrations plus élevées, à moins que le traitement ne soit retardé. Dans ce cas, les axes AP et PD sont retrouvés presque simultanément (Figure 20 M, N, R, S). Les essais faits durant le développement à partir du stade 45 donnent des phénotypes qui ressemblent à ceux obtenus durant la régénération lors de traitements commençant au stade Pal. La forme du stade Pal ressemble cependant plus à un stade de développement 47, ce qui montre que la forme des bourgeons en développement n'est pas une homologie entre le développement et la régénération.

Chez la souris, certains gènes ne peuvent être mutés que sous le contrôle de promoteurs dont l'activité est restreinte à certains tissus du membre, puisqu'une mutation dans tout l'animal serait létale tôt dans le développement embryonnaire, comme dans les cas de *Bmp2*^{-/-} et *Bmp4*^{-/-}. [250, 268]. Ceci implique que les cellules des tissus non-touchés par les mutations peuvent continuer à exprimer le Bmp en question. Le niveau de protéine dans la patte est cependant réduit. Sa signalisation devrait donc être réduite partiellement, un peu comme lors de nos traitements avec une concentration modérée de LDN193189 (Figure 20). Il y a cependant peu de ressemblance entre les phénotypes des deux contextes. Lorsque *Bmp2* et *Bmp4* sont mutés dans les chondrocytes seulement, le patron osseux est formé normalement, mais la taille des os est grandement réduite [346]. Si ces mêmes gènes sont mutés dans tout le mésenchyme de la patte antérieure avant la chondrogenèse, les os sont sévèrement raccourcis et il manque un des os du zeugopode et les deux doigts postérieurs [275]. Les souris *Bmp7*^{-/-}, ou dont seulement *Bmp4* est muté dans le mésenchyme du membre, ont une polydactylie mineure [275, 331, 347]. La triple mutation de *Bmp2*, *Bmp4* et *Bmp7* dans l'AER seulement cause un phénotype semblable dans les pattes antérieures, en plus d'un raccourcissement des phalanges. Dans les pattes postérieures de ces animaux, la perte du doigt central est fréquente et le tibia est parfois tronqué [348]. Dans tous ces cas, il reste des régions de la patte où les Bmp visés demeurent exprimés. De plus, d'autres Bmp ne sont tout simplement pas mutés chez ces souris, par exemple *Bmp5*. Considérant la redondance entre les Bmp, il n'est pas surprenant que la mutation d'un seul d'entre eux dans un tissu spécifique ne cause que des anomalies mineures. Quant au LDN193189, il agit au niveau des récepteurs. Il affecte donc la signalisation de tous les Bmp qui passent par ceux-ci, et ce, dans tous les types cellulaires. Ceci pourrait expliquer

la sévérité des phénotypes, même avec 0,2µM de LDN193189, qui ne réduit la phosphorylation de Smad1/5 que de 40%.

La régénération des os sur l'axe PD, mais avec un axe AP déficient (Figure 19 F à H) ressemble plutôt à ce qui est observé chez les animaux qui ont un problème d'expression de *Shh* ou des *Fgf*. Effectivement, les souris dont *Fgf4* et *Fgf8* sont inactivés dans l'AER, ainsi que les poulets *ozd* (*SHH* n'est pas exprimé dans leurs membres), ne forment qu'un os complet du zeugopode et qu'un ou deux doigts raccourcis [349-351]. Chez l'axolotl, l'inhibition de la signalisation de la protéine Shh durant la régénération cause également la perte de l'axe AP de façon dose-dépendante [150]. Nos résultats de RT-qPCR montrent d'ailleurs que les traitements au LDN193189 réduisent l'expression de *Fgf8* et *Shh* durant la régénération, bien que l'effet significatif soit limité à EB pour *Shh* (Figure 24). L'injection de Fgf8 recombinant dans des blastèmes d'animaux traités au LDN193189 aide d'ailleurs à rétablir une morphologie normale de la patte régénérée. Ceci va à l'encontre de l'effet non-spécifique sur les récepteurs des Fgf vu dans les essais *in vitro* [324]. Il est donc probable que la perte de l'axe AP passe par la réduction d'expression de ces gènes.

4.1.4 L'inhibition de la voie canonique des Bmp durant la régénération affecte l'expression de plusieurs gènes à des périodes spécifiques

Les gènes examinés ici ont été choisis en fonction de rôles déjà identifiés dans le développement et la régénération. Les changements dans leur niveau d'expression varient selon le gène. Ils peuvent être séparés en trois groupes. Les gènes associés à la prolifération et au maintien de l'état non différencié (*Msx1*, *Msx2*, *Id3*) ont une forte augmentation de leur expression dès EB, mais elle atteint son sommet vers LB-Pal. Ceux responsables du patron de développement (*Fgf8*, *Fgf10*, *Shh*) sont le plus fortement exprimés autour de MB. Quant aux gènes impliqués dans l'ostéogenèse (*Sox9*, *Col2a1*, *Cbfa1*), leur expression est plus tardive, ce qui correspond à la phase de formation des nouveaux os. Ces résultats sont en accord avec le fait que les stades de régénération spécifiques sont associés avec des patrons d'expression distincts, ainsi qu'avec des changements aux niveaux de la prolifération, de la différenciation et de la morphogénèse [352, 353].

Le choix de gènes à examiner a également été fait en fonction de leur position en aval de la signalisation des Bmp. L'expression de la plupart d'entre eux est effectivement affectée par les traitements au LDN193189, généralement de façon dépendante à la concentration utilisée. Par contre, le niveau de changement et les stades affectés varient selon le gène spécifique. Par exemple, le LDN193189 réduit l'expression de *Msx1* de jusqu'à 85% fois au stade LB, mais ne l'affecte presque pas au stade Pal. Le niveau d'expression de *Shh* n'est diminué par le LDN193189 qu'au stade EB, indiquant qu'il devient ensuite indépendant de la signalisation des Bmp. La dépendance aux Bmp peut aussi venir plus tard dans la régénération, comme dans le cas de *Col2a1*, dont l'expression n'est réduite de façon significative par le LDN193189 qu'au stade Pal. Ces résultats confirment que ces gènes sont en aval de la signalisation des Bmp, mais que cette relation est spécifique à certaines étapes de la régénération. Ceci reflète le caractère progressif du processus de régénération des tissus, tel la prolifération, l'induction de patron et formation de l'os [267].

Il est intéressant de voir que l'expression des Bmp eux-mêmes est affectée par l'inhibition de leur voie de signalisation : l'expression de *Bmp5* est réduite à EB et celle de *Bmp2* augmente à LB et Pal. C'est un phénomène qui a déjà été observé dans d'autres contextes. Par exemple, les chondrocytes primaires dérivés de souris *Bmp2*^{CKO} voient une réduction d'expression de *Bmp5*, *Bmp7*, *Bmp8b* et *Bmp9* par rapport à ceux provenant des souris contrôles [346]. Quant à *Bmp2*, des boucles de rétroaction négative qui diminuent son niveau d'ARNm sont déjà identifiées dans les cellules stromales de la moelle osseuse et durant le développement du cœur. Dans ces contextes, bloquer sa voie de signalisation prévient l'activation des mécanismes de rétroaction qui répriment l'expression de *Bmp2*. Le résultat est une augmentation de la quantité d'ARNm et de protéine détectée [354, 355]. Considérant que chez l'axolotl, l'effet du LDN193189 sur l'expression de *Bmp2* et *Bmp5* dépend du stade examiné, le contexte est important, mais les expériences faites ici ne permettent pas de préciser quels mécanismes spécifiques sont en action.

4.1.5 La voie de signalisation canonique des Bmp participe à plusieurs étapes de la régénération

4.1.5.1 Fermeture de la plaie et formation initiale du blastème

Les résultats présentés ici ne montrent pas d'effet du LDN193189 sur la fermeture de la plaie, la formation de l'épithélium de guérison, ou sur la formation initiale du blastème. Les traitements faits seulement durant les 48h précédant l'amputation n'ont aucun effet sur la régénération (résultats non-montrés). Ceux fait durant toute la régénération permettent à la plaie de se fermer et n'empêchent pas la formation initiale du blastème (Figure 16). Ces phénomènes sont même observés lors de traitements avec 5 μ M de LDN193189 (résultats non montrés). Au stade EB, il n'y a pas de différence significative de prolifération cellulaire entre les animaux traités et les contrôles (Figure 17 J). Par contre, une augmentation de l'apoptose est observée et l'expression de plusieurs gènes est déjà réduite. Or, le LDN193189 ne peut pas inhiber une voie de signalisation si elle n'est pas déjà active. Ces résultats d'inhibition suggèrent que les niveaux d'expression des Bmp et de phosphorylation de Smad1/5 deviennent élevés avant EB. L'augmentation doit donc commencer quelque part durant la période entre 48h post-amputation et ce stade.

La signalisation des Tgf- β est requise pour la migration de cellules vers le blastème et leur prolifération initiale [240]. De plus, la phosphorylation de ses transducteurs est observée de 6h à 48h après l'amputation pour Smad2 et de 3h à 24h pour Smad3 [151]. Ils ne sont pas phosphorylés à EB mais, encore une fois, le moment exact de la transition n'a pas été déterminé pour Smad2. Ces résultats nous permettent néanmoins de conclure que durant la régénération, il y a une séparation entre la voie canonique des Bmp et celle des Tgf- β , à la fois dans leurs fonctions et dans la période de leur activité. La transition entre les deux n'est cependant pas connue avec précision.

4.1.5.2 Croissance du blastème

Après le stade EB, une différence apparaît rapidement entre les tailles des blastèmes des animaux contrôles et des animaux traités. La croissance des blastèmes est retardée et arrête

même complètement aux plus hautes concentrations de LDN193189. Au stade LB, le nombre réduit de cellules de blastème est visible en H&E et est accompagné d'une diminution du nombre de cellules en prolifération, ainsi que d'une augmentation de la mort cellulaire. Les gènes associés à la prolifération et au maintien de l'état non-différencié (*Msx1*, *Msx2*, *Id3*) voient une diminution d'expression en fonction de la concentration de drogue utilisée, et ce, du stade EB à LB.

Ces résultats sont entièrement en accord avec la littérature. Effectivement, chez certains animaux (p.ex. le poisson-zèbre), la régénération dépend de la signalisation normale des Bmp. Son inhibition mène à une réduction de la prolifération et de l'expression de *Msx1* [302, 303, 309]. En contrepartie, l'activation de la signalisation des Bmp ou la surexpression de *msx1* peuvent améliorer la capacité de régénération chez *Xenopus* [299, 304, 310, 356], mais pas chez l'axolotl [239]. Les Bmp ne sont cependant pas les seuls responsables de la prolifération, puisque même les fibres musculaires qui surexpriment des récepteurs dominants négatifs (Alk2, Alk3 ou Alk6) intègrent le EdU à 60% de la normale [317]. De façon similaire, au stade de régénération LB, l'incorporation du BrdU est observée à toutes les concentrations de LND193189 utilisées, même à 5 μ M (quoi qu'à un moindre niveau, résultats non montrés).

Les tissus régénérés sont constitués de cellules et il en faut évidemment un nombre adéquat. Un rôle majeur de la voie de signalisation canonique des Bmp est d'induire et de maintenir une prolifération suffisante des cellules du blastème, pour que celui-ci atteigne une masse cellulaire appropriée. Sans ce rôle, aucune des étapes suivantes de la régénération ne peut mener à un membre complet.

4.1.5.3 Formation du patron de redéveloppement de la patte

Il est montré ici que la signalisation des Bmp durant la période entre EB et LB est cruciale à la régénération d'une nouvelle patte, et ce, non seulement au niveau de la prolifération cellulaire. C'est durant cette période que se forme le patron de redéveloppement de la patte. Nos résultats montrent que les Bmp influencent ce patron possiblement à travers le niveau d'expression de *Fgf8* et *Shh*.

Comme dans le développement, le membre en régénération exprime *Fgf8* et *Fgf10* durant la formation du blastème (Figure 24). Durant le développement de la patte de poulet, ceux-ci maintiennent mutuellement leur expression pour promouvoir l'élongation du membre [209]. Chez la souris, une expression déficiente de *Fgf8* cause une réduction de la survie cellulaire, qui mène à des membres raccourcis et où manquent souvent certains os [357, 358]. Si l'expression de *Fgf8* est complètement éliminée de l'AER chez la souris, les pattes antérieures sont formées avec la majorité de leurs doigts, quoique certains manquent une phalange [359]. La réduction d'expression de *Fgf8* suite à l'inhibition de la voie de signalisation des Bmp n'explique donc que partiellement les phénotypes que l'on observe durant la régénération.

Lorsque des pattes en régénération sont traitées avec le LDN193189, une diminution d'expression de *Fgf8* est observée mais celle de *Fgf10* est à peine affectée. Ceci indique que dans ce contexte, les Bmp sont au moins partiellement responsables de l'induction et du maintien de l'expression de *Fgf8*. De plus, dans le contexte de la régénération du membre, *Fgf8* ne semble pas être responsable du maintien de l'expression de *Fgf10*. Par contre, les traitements faits sur les animaux dont l'ARN est recueilli pour les RT-qPCR ne durent que 48h. Il est donc possible que ce soit trop court pour observer un effet sur *Fgf10* (bien que les effets au niveau transcriptionnel, si directs, devraient être apparents en 48h). Par exemple, dans l'aile de poulet, l'expression ectopique de *Fgf8* n'est observée qu'entre 17 et 36 heures après la surexpression de *Fgf10*. Celle de *Fgf10* par *Fgf8* est observée après 10 heures [209]. De plus, les processus développementaux prennent jusqu'au double du temps chez l'axolotl, comparé au poulet [238, 360]. Il est donc possible que des traitements plus longs soient nécessaires pour affecter l'expression *Fgf10*.

Chez le poulet et la souris, l'action des Bmp est requise pour l'induction des Fgf de l'AER, et ce, tôt dans le développement du bourgeon du membre. Il a aussi été montré que durant la croissance de ces bourgeons, Bmp4 devient un inhibiteur de l'expression de *Fgf8*, mais que la signalisation des Bmp est temporairement réprimée à travers la boucle de rétroaction Shh-Grem1-Fgf [210, 281, 361]. Chez la souris, la triple mutation de *Bmp2/Bmp4/Bmp7* dans l'AER provoque une expansion du domaine d'expression de *Fgf8*, suivi d'un arrêt précoce de cette expression, menant à une polydactylie avec des doigts

raccourcis [348]. Cet exemple montre que malgré que les Bmp servent temporairement d'inhibiteur de *Fgf8*, ils sont nécessaires à son expression prolongée. Dans les pattes d'axolotls en régénération traitées avec le LDN193189, aucun des phénotypes morphologiques ne contient de structures qui pourraient être considérées comme des duplications. De plus, aucun des stades testés ne voit d'augmentation de l'expression de *Fgf8* lors de l'inhibition des Bmp. Ceci suggère que le rôle d'activation de *Fgf8* par les Bmp est également présent durant la régénération chez l'axolotl mais que celui d'inhibition ne l'est pas. Cette absence d'inhibition pourrait expliquer pourquoi chez l'axolotl, le patron l'expression de *Fgf8* est diffus dans les pattes en régénération (Figure 24 D, E) et en développement [207], au lieu d'être restreint à la région distale. Elle expliquerait aussi pourquoi chez des animaux traités au LDN193189, l'injection de *Fgf8* est suffisante pour augmenter la fréquence des pattes qui ont une morphologie plus ou moins normale (Figure 27).

Les déficiences de l'axe AP sont souvent causées par un changement du niveau de signalisation de Shh [150, 154, 350]. Durant la régénération, l'expression de ce gène est à son plus fort à MB et LB. Par contre, sa réponse au LDN193189 n'est observée qu'à EB, principalement avec des concentrations de drogue de 0,5 μ M et 1 μ M (Figure 24 C, C'). Du côté des phénotypes morphologiques, nous voyons des cas où l'axe PD est partiellement ou entièrement régénéré, mais où l'axe AP est complètement déficient. La plupart d'entre eux se trouvent parmi les animaux traités avec 0,2 μ M de LDN193189 à partir de l'amputation, de EB ou MB, et ce, jusqu'à la fin de la régénération (Figure 19 F, G, H). Étrangement, les phénotypes obtenus dans ces cas ne ressemblent pas tout à fait à ceux causés par un inhibiteur de signalisation de Shh, la cyclopamine. Celui-ci va également causer des anomalies sur l'axe AP, mais il permet aux deux os du zeugopodes de régénérer. Les extrémités distales de ces derniers vont cependant fusionner et seulement 1 ou 2 doigts sont complétés [150, 311]. Avec le LDN193189, un des os n'est pas régénéré (habituellement le radius) et une série d'os est formée distalement à partir de l'ulna (Figure 19 F, G). Ce phénotype ressemble plutôt à ce qui est observé dans les membres de souris où *Fgf4* et *Fgf8* sont mutés dans l'AER [349]. D'ailleurs, c'est l'axe AP qui est rétabli chez les animaux traités au LDN193189, mais dont le blastème est injecté avec la protéine *Fgf8* du stade EB à LB (Figure 27).

Il existe une autre possibilité pour expliquer un axe AP déficient malgré la complétion de l'axe PD. Chez le poulet, l'inhibiteur mitotique TSA cause également des phénotypes où seule la portion postérieure du membre se développe. Dans ce cas-ci le TSA retarde l'expression de *SHH* et si le traitement est continué jusqu'à la formation des os, les os antérieurs ne se forment simplement pas [362]. Il semble que le simple nombre de cellules disponibles détermine en grande partie la quantité de structures osseuses qui peuvent se former. Chez la souris, le manque de cellule peut aussi être causé en inactivant l'expression de *Shh*, ce qui cause des vagues d'apoptose dans la région antérieure [345]. La même chose est observée dans les pattes où l'AER n'exprime pas *Fgf4* et *Fgf8*, cette fois-ci dans la région proximale du membre [349]. Dans le cas de la régénération chez l'axolotl, l'expression des gènes impliqués dans la prolifération (*Msx1*, *Msx2* et *Id3*) est déjà réduite par le LDN193189 au stade EB et elle demeure réduite à tous les stades mesurés. Bien qu'il y ait peu de différence dans la prolifération à EB et qu'elle n'ait pas été mesurée à MB, elle est 35% plus basse rendu au stade LB, lorsque l'animal est traité avec 0,2µM de LDN193189 (Figure 17). À 11JPA (entre MB et LB), ceci se reflète par des blastèmes de longueurs comparables aux contrôles, mais qui sont plus étroits (Figure 15 F-I, U). Une réduction de la prolifération pourrait donc également contribuer à l'axe AP non-rétabli.

Dans ce cas-ci, il est difficile de mettre en lien le contexte de la régénération chez l'axolotl avec celui du développement de la souris ou du poulet. Par exemple, la souris double mutante *Msx1^{-/-};Msx2^{-/-}* ne développe pas son radius et manque des phalanges, mais est parfois polydactyle [363]. La mutation de *Shh*, ou de la combinaison de *Fgf4* et *Fgf8* chez la souris cause une augmentation de l'apoptose et une perte sur l'axe AP [345, 349]. Pour avoir un phénotype similaire à ces deux derniers mutants durant la régénération de l'axolotl, 0,2µM de LDN19389 est suffisant. Cette concentration ne mène cependant pas à une augmentation notable de l'apoptose. Chez le poulet, l'expression de *Fgf8* corrèle directement avec l'expansion locale du membre [280]. Durant la régénération de l'axolotl, ce gène est exprimé dans le mésenchyme du blastème. Il est possible que même avec le traitement au LDN193189, il maintienne un rôle anti-apoptotique, mais que son rôle prolifératif ne soit que partiellement accompli. Dans ce cas, le rétablissement de l'axe AP par l'injection de *Fgf8* (Figure 27) pourrait simplement être une compensation au niveau de la prolifération.

HoxA11 et *HoxA13* sont associés à la formation du zeugopode et de l'autopode, respectivement. Les souris mutantes *HoxA13*^{-/-} n'ont cependant qu'un phénotype mineur : perte d'un doigt et des phalanges raccourcies [364, 365]. Quant aux mutantes *HoxA11*^{-/-}, ce sont les os du zeugopode qui sont plus courts. Ces souris ont aussi une expression réduite de *Fgf8* et *Fgf10* [366]. Durant la régénération chez la grenouille, *HoxA11* et *HoxA13* sont réexprimés, mais à différents niveaux selon le stade développemental des animaux. Sept jours après l'amputation, la patte d'une grenouille post-métamorphique a un niveau de *HoxA11* à seulement 40% de ce qu'il est si la patte amputée vient d'un têtard (5% pour *HoxA13*). Or, la grenouille post-métamorphique peut quand même régénérer des éléments cartilagineux. Durant la régénération chez l'axolotl, nous montrons que lors de traitements au LDN193189, ces deux gènes ont une expression qui diminue respectivement à 62% et 42% de celle des contrôles. Il est donc peu probable que leur expression réduite soit un facteur majeur dans la perte des éléments osseux causée par cette drogue. Il faut cependant tenir compte que *HoxA13* régule l'adhésion cellulaire des cellules du mésenchyme à travers EphA4 et affecte donc la chondrogenèse (sa surexpression provoque la formation d'os ectopiques) [367, 368]. Par conséquent, un rôle mineur des HoxA ne devrait pas être exclu.

4.1.5.4 Formation osseuse

Parmi les gènes étudiés, *Sox9* est un de ceux les plus directement impliqués dans la formation osseuse. Il a aussi été identifié comme une cible de Bmp2 chez les amniotes [288, 369]. Durant la régénération, son expression augmente à partir de EB et est à son plus élevée à partir de LB. Il est sensible à une inhibition (dépendante de la dose) par les traitements aux LDN193189, et ce, à tous les temps testés. Ceci indique que *Sox9* est également en aval des Bmp durant la régénération. L'inhibition de l'expression *Sox9* est probablement une des causes de l'absence de certains os, mais seulement aux concentrations plus élevées. Effectivement, à 0,2µM de drogue, son expression doit encore être suffisante à la différenciation et la prolifération des chondrocytes puisque toutes les périodes de traitements permettent la régénération de quelques os dans plus de 50% des pattes. L'absence complète de nouvelles

formations osseuses est cependant vue avec les traitements à 1,0 μ M de LDN193189 fait durant toute la régénération.

Les gènes *Sox9* et *Col2a1* sont tous les deux déjà exprimés à LB (Figure 25), ce qui indique que la voie de différenciation en cartilage est déjà entamée [290, 292]. Il y a cependant peu de condensation visible à ce stade (Figure 16 B). Peu importe la concentration, les traitements au LDN193189 commencés à LB permettent quand même la formation de quelques éléments osseux (Figure 19 I, N, S). Ceci indique qu'une fois la chondrogenèse commencée, la signalisation des Bmp devient moins importante. Il a été suggéré qu'une fois l'os formé, la signalisation des Bmp aide à réguler sa croissance [284], mais aucune indication que ce soit le cas n'est observée ici. Chez la souris en développement, l'élimination complète de *Sox9* dans les membres y prévient la formation d'os, tandis qu'une délétion *Col2a1-Cre* (spécifique aux cellules déjà différenciées en chondrocytes) la permet. Ces os sont cependant beaucoup plus courts que chez la souris de type sauvage. Ces résultats s'expliquent par les rôles séquentiels de *Sox9* dans la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes, puis dans leur prolifération [292]. Chez l'axolotl, ce type de rôle séquentiel pourrait s'accompagner d'une dépendance amoindrie à la signalisation des Bmp, ce qui expliquerait pourquoi la chondrogenèse peut être complétée lors de traitements à 1,0 μ M de LDN193189, mais qu'elle ne peut pas être commencée.

4.1.6 Régénération par intercalation versus régénération par spécification progressive

La spécification des régions proximo-distales durant le développement, et surtout durant la régénération, est un processus dont les mécanismes demeurent controversés. Contrairement au bourgeon en développement, le blastème de régénération comporte la particularité de pouvoir recréer cette spécification à partir de n'importe quel niveau de départ. L'étude de la spécification proximo-distale durant la régénération a jusqu'à maintenant surtout passé par l'évaluation de patrons d'expressions ou par des expériences de greffes [212, 218, 370]. La conclusion de ces expériences a longtemps été que la spécification s'effectue par intercalation. Par contre, des publications plus récentes apportent une interprétation plus

ambigüe. Par exemple, les groupes de Gardiner et Tanaka ont tous les deux effectué des greffes de blastèmes d'un animal GFP+ vers le moignon d'un animal GFP- [213, 227]. Dans les deux cas, si le blastème greffé est au stade EB, des cellules GFP+ sont retrouvées dans toutes les sections régénérées. S'il est à un stade plus avancé (LB pour Gardiner, MB-LB pour Tanaka), le résultat dépend de sa section proximo-distale d'origine et de la portion (basale ou apicale) du blastème qui est transplantée. Dans le cas de la portion apicale, le groupe de Gardiner observe que le membre hôte régénère normalement et contient des cellules GFP+ dans toute la section régénérée. Le groupe de Tanaka voit seulement des cellules GFP+ dans la section distale du membre régénéré, mais les voit dans tout le membre si c'est la portion basale du blastème qui est greffée. Quand le groupe de Gardiner greffe la portion basale d'un blastème de stylo-pode sur un moignon de zeugopode, il observe la régénération d'un coude et d'un radius/ulna supplémentaires. La combinaison de ces résultats fait que le groupe de Gardiner préserve l'assomption qu'il y a intercalation durant la régénération, tandis que le groupe de Tanaka conclut une spécification progressive. La différence dans les résultats de ces groupes pourrait venir du stade exact où les blastèmes ont été recueillis et de comment sont définies les portions basales et distales de blastème par ces groupes.

Les expériences faites pour cette thèse nous informent sur la spécification proximo-distale par d'autres voies. En pratique, la spécification d'une région de membre est d'ailleurs reconnue par l'apparition de marqueurs tels les gènes *Hox*, ou plus tard par le patron osseux qu'elle forme (une forme de différenciation dans les deux cas). Effectivement, tant que le tissu ne commence pas à se différencier, sa spécification peut encore changer, ce qui fut déjà observé avec des agents pharmacologiques [371, 372]. Ceci rend le terme "spécification" plutôt flou comparé à "détermination" (expression des *Hox*) ou "différenciation" (chondrogenèse).

Les patrons d'expression de *Shh* et *Fgf8* indiquent que les axes PD et AP sont largement déterminés durant les stades de EB à LB. En hybridation *in situ*, nous détectons l'expression de *HoxA13* dès le stade EB, ce qui est en accord avec les résultats du groupe de Bryant au lieu de ceux du groupe de Tanaka [212, 213]. Par contre, ces deux groupes font des amputations à travers le stylo-pode ou l'autopode, ce qui pourrait influencer le moment d'apparition de ce gène. De plus, le RT-qPCR nous indique que l'expression de ce gène est

8,5X plus élevée à LB qu'à EB. La différence entre les résultats des groupes de Bryant et Tanaka pourrait donc être due à une différence de sensibilité de la sonde. Comparé à l'augmentation observée chez *HoxA13*, le niveau de *HoxA11* varie relativement peu aux stades mesurés, mais les deux sont à leur plus fort à LB (Figure 26). Ceci pourrait être interprété de deux façons : soit leur spécification est simultanée, soit celle de *HoxA13* est plus tardive.

La concentration de 1 μ M de LDN193189 bloque complètement la régénération de groupes d'os, comme observé avec les colorations au Victoria Blue (Figure 19). Plus le traitement est retardé, plus le nombre d'os régénérés est grand. De plus, les éléments osseux sont ajoutés dans l'ordre proximal vers distal : radius/ulna, carpe, métacarpes et finalement les phalanges. À l'intérieur d'une région antéro-postérieure définie, aucun élément distal n'est régénéré sans ses éléments de support proximaux, ce qui va à l'encontre du modèle d'intercalation. Chaque section régénérée semble aussi influencer l'état de la section qui suit. L'impact se voit à la fois sur l'axe proximo-distal et l'axe antéro-postérieur, ce qui peut être observé lorsqu'un traitement avec 0,5 μ M de LDN193189 est arrêté à LB (Figure 27) et qu'un seul doigt est régénéré. Un traitement à 0,5 μ M qui commence à ce même stade ne permet pas la formation de doigts, indiquant qu'ils ne sont pas encore définis (Figure 19). L'expression de *HoxA11* et *HoxA13* est à son plus fort à LB, mais les traitements qui commencent à ce stade ne permettent pas à beaucoup d'os de l'autopode de se régénérer, malgré que ceux du zeugopode sont pratiquement toujours présents. Dans ce cas-ci, la cause probable peut venir d'une prolifération réduite ou l'absence de chondrogenèse, qui est une différenciation plus tardive que l'apparition des HoxA.

Nos résultats vont clairement à l'encontre du modèle de spécification par intercalation. S'il s'appliquait ici, les pattes traitées de 0h à MB auraient des défauts dans les éléments distaux de la patte, au lieu d'être régénérées en tout ou rien. De plus, à 0,2 μ M de LDN193189, retarder les traitements causerait d'abord le rétablissement des doigts, au lieu du rétablissement du zeugopode que l'on observe.

Les résultats montrent donc que durant la régénération des membres chez l'axolotl, la formation du patron proximo-distal est déterminée de façon progressive ou simultanée durant la croissance du blastème et qu'à partir du stade LB, elle se fait définitivement de façon progressive.

4.2 Conclusions

Cette thèse apporte pour la première fois un regard exhaustif sur la voie canonique de la signalisation des Bmp durant la régénération épimorphique chez l'axolotl. Bien que nous ne puissions pas tester le LDN193189 sur tous les récepteurs kinases existants, les concentrations utilisées montrent une préférence marquée pour l'inhibition *in vivo* de la phosphorylation de Smad1/5, comparée à celles de Smad2 et Erk1/2. Ceci nous a permis de distinguer entre la voie canonique des Bmp et la voie canonique des Tgf- β . La comparaison entre ces voies révèle qu'elles agissent durant des périodes différentes de la régénération chez l'axolotl. De plus, la voie des Tgf- β est impliquée dans la guérison de la plaie et la formation initiale du blastème, tandis que celle des Bmp influence la prolifération cellulaire, la formation du patron morphogénétique et la chondrogenèse. Nous pouvons donc confirmer notre première hypothèse : durant la régénération épimorphique chez l'axolotl, la voie de signalisation canonique des Bmp a des rôles distincts de celle de la voie des Tgf- β . Cependant la séparation temporelle n'est pas précisément connue. Dans le futur, il pourrait donc être intéressant de faire des tests entre le temps 48h post-amputation et le stade EB.

Nos résultats supportent très fortement notre deuxième hypothèse : la formation du patron de régénération se fait de façon progressive. Effectivement, retarder le blocage de la régénération du membre avec une concentration élevée de LDN193189 permet de retrouver de plus en plus d'os. Avec une basse concentration, où l'axe PD est présent, l'axe AP est également retrouvé progressivement, du proximal au distal. Ces résultats portent un coup dur au concept de régénération par intercalation, un dogme qui persiste depuis plus de 40 ans. Les résultats pourraient cependant être critiqués, puisqu'on regarde principalement la formation des os, qui sont une conséquence de la spécification. L'autre aspect indicateur de la spécification est l'expression génique. Un projet intéressant serait donc de faire des amputations au niveau du stylo-pode, du zeugopode et de l'autopode, puis de comparer l'expression de marqueurs positionnels. L'ARNm serait prélevé à chaque jour jusqu'à LB et l'expression de *HoxA13*, *HoxA11*, *Hox9* et *Meis1* (marqueur du stylo-pode) serait mesurée. Ceci donnerait une idée précise du moment d'apparition de chaque gène. Si l'ordre d'apparition

est le même peu importe le site d'amputation, elle indiquerait définitivement que la spécification est progressive.

Nos résultats qui portent sur le lien entre les Bmp et leurs cibles montrent que la régénération de l'axolotl comporte de nombreux processus qui fonctionnent de façon similaire à ce qui est observé dans les contextes de développement. Ceci suggère que ces processus sont conservés entre les espèces et donne espoir que la régénération pourra un jour être transférée chez l'humain. Par contre, nous voyons aussi des différences entre la régénération et ce qui est vu dans la guérison et le développement chez d'autres espèces (p. ex. le patron d'expression de *Fgf8* et l'absence de période où la signalisation des Bmp l'inhibe). C'est peut-être dans ces différences que se trouve la clé de la régénération humaine.

Bibliographie

1. Kusumi, K., et al., *Developing a community-based genetic nomenclature for anole lizards*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 554.
2. Amaya, E., et al. *Gene Nomenclature Guidelines*. 2013 [cited 2013; Available from: <http://www.xenbase.org/gene/static/geneNomenclature.jsp>.
3. HGNC. *HUGO gene nomenclature committee*. 2018; Available from: <https://www.genenames.org/>.
4. Burt, D.W., et al., *The chicken gene nomenclature committee report*. BMC Genomics, 2009. **10**(2): p. S5.
5. Hesiod, *Theogony*. c. 700BC.
6. Tiniakos, D.G., A. Kandilis, and S.A. Geller, *Tityus: A forgotten myth of liver regeneration*. Journal of Hepatology, 2010. **53**(2): p. 357-361.
7. Apollodorus, *The Library*, ed. S.J.G. Frazer. 1921, Cambridge, MA: Harvard University Press; London, William Heinemann Ltd.
8. Power, C. and J.J. Rasko, *Whither Prometheus' liver? greek myth and the science of regeneration*. Annals of Internal Medicine, 2008. **149**(6): p. 421-426.
9. Dante, *La Divine Comédie*, ed. É.A. Michel. Trad. 1995. 862.
10. Aristote, *The History of Animals*. trad. 1910.
11. Milne, L.S., *The histology of liver tissue regeneration*. The Journal of Pathology and Bacteriology, 1909. **13**(1): p. 127-160.
12. Barroux, G., *Lorsque Tremblay et Réaumur parlaient de « régénération »*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(6-7): p. 761-762.
13. Dinsmore, C.E., *A History of Regeneration Research: Milestones in the Evolution of a Science*. 2008: Cambridge University Press.
14. de Réaumur, R.-A.F., *Sur les diverses reproductions qui se font dans les Ecrevisse, les Omars, les Crabes, etc. et entr'autres sur celles de leurs Jambes et de leurs Ecailles*. Mem Acad Royal Sci 1712: p. 223-245.
15. Trembley, A., et al., *Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, à bras en forme de cornes*. Vol. c.1. 1744, A Leide :: Chez Jean & Herman Verbeek.
16. Okada, T.S., *A brief history of regeneration research—For admiring Professor Niazi's discovery of the effect of vitamin A on regeneration*. Journal of Biosciences, 1996. **21**(3): p. 261-271.
17. Bonnet, C. and P.H. Z., *An Abstract of Some New Observations upon Insects: By M. Charles Bonnet of Geneva. Communicated in a Letter to Sir Hans Sloane, Bart. Late President of the Royal Society, &c. Translated from the French by P. H. Z. Esq; F. R. S.* Philosophical Transactions, 1742. **42**(462-471): p. 458-488.
18. Pallas, P.S., *Spicilegia zoologica : quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur*. Vol. fasc. 1-10. 1767: Berolini : Prostant apud Gottl. August. Lange.
19. Reddien, P.W. and A. Sanchez Alvarado, *Fundamentals of planarian regeneration*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 725-57.

20. Spallanzani, L., *An essay on animal reproductions*. 1769, London: Becket and de Hondt.
21. Morgan, T.H., *Experimental studies of the regeneration of Planaria maculata*. Roux's archives of developmental biology, 1898. **7**(2): p. 364-397.
22. Morgan, T.H., *Regeneration, by Thomas Hunt Morgan*. 1901, New York: The Macmillan Company;
23. Child, C.M., *Individuality in organisms, by Charles Manning Child*. 1915, Chicago, Ill.: The University of Chicago Press.
24. Lenhoff, H.M., *Ethel Browne, Hans Spemann, and the Discovery of the Organizer Phenomenon*. Biol Bull, 1991. **181**: p. 72--80.
25. Tsonis, P.A., *Limb Regeneration*. 1996: Cambridge University Press 255.
26. Butler, E.G., *The effects of X-radiation on the regeneration of the fore limb of Amblystoma larvae*. Journal of Experimental Zoology, 1933. **65**(3): p. 271-315.
27. Rose, S.M., *Epidermal dedifferentiation during blastema formation in regenerating limbs of Triturus viridescens*. Journal of Experimental Zoology, 1948. **108**(3): p. 337-361.
28. Hay, E.D., *Electron microscopic observations of muscle dedifferentiation in regenerating Amblystoma limbs*. Developmental Biology, 1959. **1**(6): p. 555-585.
29. Echeverri, K., J.D. Clarke, and E.M. Tanaka, *In vivo imaging indicates muscle fiber dedifferentiation is a major contributor to the regenerating tail blastema*. Dev Biol, 2001. **236**(1): p. 151-64.
30. Kragl, M., et al., *Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration*. Nature, 2009. **460**(7251): p. 60-65.
31. Wang, H. and A. Simon, *Skeletal muscle dedifferentiation during salamander limb regeneration*. Current Opinion in Genetics & Development, 2016. **40**: p. 108-112.
32. Dinsmore, C.E., *Conceptual foundations of metamorphosis and regeneration: from historical links to common mechanisms*. Wound Repair Regen, 1998. **6**(4): p. 291-301.
33. Kim, D., et al., *Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 472-476.
34. Agata, K., et al., *Intercalary regeneration in planarians*. Dev Dyn, 2003. **226**(2): p. 308-16.
35. Schnytzer, Y., et al., *Boxer crabs induce asexual reproduction of their associated sea anemones by splitting and intraspecific theft*. PeerJ, 2017. **5**: p. e2954.
36. Vidal, P. and M.G. Dickson, *Regeneration of the distal phalanx*. The Journal of Hand Surgery: British & European Volume, 1993. **18**(2): p. 230-233.
37. Morgan, T.H., *Regeneration of Proportionate Structures in Stentor*. Biological Bulletin, 1901. **2**(6): p. 311-328.
38. Slabodnick, M.M. and W.F. Marshall, *Stentor coeruleus*. Current Biology, 2014. **24**(17): p. R783-R784.
39. Slabodnick, M., et al., *Visualizing Cytoplasmic Flow During Single-cell Wound Healing in Stentor coeruleus*. 2013(82): p. e50848.
40. Kim, G.H., T.A. Klotchkova, and Y.-M. Kang, *Life without a cell membrane: regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the marine green alga *Bryopsis plumosa**. Journal of Cell Science, 2001. **114**(11): p. 2009-2014.
41. Ikeuchi, M., et al., *Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms*. Development, 2016. **143**(9): p. 1442-1451.

42. Malik, M.R., et al., *Isolation of an embryogenic line from non-embryogenic Brassica napus cv. Westar through microspore embryogenesis*. Journal of Experimental Botany, 2008. **59**(10): p. 2857-2873.
43. Pulianmackal, A.J., et al., *Competence and regulatory interactions during regeneration in plants*. Frontiers in Plant Science, 2014. **5**(142).
44. Birnbaum, K.D. and A.S. Alvarado, *Slicing across Kingdoms: Regeneration in Plants and Animals*. Cell, 2008. **132**(4): p. 697-710.
45. Melnyk, C.W. and E.M. Meyerowitz, *Plant grafting*. Current Biology, 2015. **25**(5): p. R183-R188.
46. Wulff, J., *Regeneration of Sponges in Ecological Context: Is Regeneration an Integral Part of Life History and Morphological Strategies?* Integrative and Comparative Biology, 2010. **50**(4): p. 494-505.
47. Leys, S.P., D.S. Rohksar, and B.M. Degnan, *Sponges*. Current Biology, 2005. **15**(4): p. R114-R115.
48. Degnan, B.M., et al., *Porifera*, in *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 1: Introduction, Non-Bilateria, Acoelomorpha, Xenoturbellida, Chaetognatha*, A. Wanninger, Editor. 2015, Springer Vienna: Vienna. p. 65-106.
49. Wilson, H.V., *On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges*. Journal of Experimental Zoology, 1907. **5**(2): p. 245-258.
50. Osinga, R., J. Tramper, and R.H. Wijffels, *Cultivation of Marine Sponges*. Marine Biotechnology, 1999. **1**(6): p. 509-532.
51. Ereskovsky, A.V., et al., *Oscarella lobularis (Homoscleromorpha, Porifera) Regeneration: Epithelial Morphogenesis and Metaplasia*. PLOS ONE, 2015. **10**(8): p. e0134566.
52. Borisenko, I.E., et al., *Transdifferentiation is a driving force of regeneration in Halisarca dujardini (Demospongiae, Porifera)*. PeerJ, 2015. **3**: p. e1211.
53. Roudabush, R.L., *Phenomenon of Regeneration in Everted Hydra*. Biological Bulletin, 1933. **64**(2): p. 253-258.
54. Shimizu, H., Y. Sawada, and T. Sugiyama, *Minimum Tissue Size Required for Hydra Regeneration*. Developmental Biology, 1993. **155**(2): p. 287-296.
55. Gierer, A., et al., *Regeneration of hydra from reaggregated cells*. Nat New Biol, 1972. **239**(91): p. 98-101.
56. Bosch, T.C., *Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration*. Dev Biol, 2007. **303**(2): p. 421-33.
57. Galliot, B. and L. Ghila, *Cell plasticity in homeostasis and regeneration*. Molecular Reproduction and Development, 2010. **77**(10): p. 837-855.
58. Miljkovic-Licina, M., et al., *Head regeneration in wild-type hydra requires de novo neurogenesis*. Development, 2007. **134**(6): p. 1191-1201.
59. Singer, I.I. and J.D. Palmer, *Tentacular and oral-disc regeneration in the sea anemone, Aiptasia diaphana. I. Sequential morphological events in distal-end restitution*. Journal of Morphology, 1969. **127**(3): p. 373-381.
60. Passamaneck, Y.J. and M.Q. Martindale, *Cell proliferation is necessary for the regeneration of oral structures in the anthozoan cnidarian Nematostella vectensis*. BMC Developmental Biology, 2012. **12**: p. 34-34.
61. Stewart, Z.K., et al., *Transcriptomic investigation of wound healing and regeneration in the cnidarian Calliactis polypus*. Scientific Reports, 2017. **7**: p. 41458.

62. Schmid, V. and P. Tardent, *The reconstitutive performances of the Leptomedusa Campanularia jonstoni*. Marine Biology, 1971. **8**(2): p. 99-104.
63. Abrams, M.J., et al., *Self-repairing symmetry in jellyfish through mechanically driven reorganization*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015. **112**(26): p. E3365-E3373.
64. Abrams, M.J. and L. Goentoro, *Symmetrization in jellyfish: reorganization to regain function, and not lost parts*. Zoology, 2016. **119**(1): p. 1-3.
65. Weber, C., *Structure, histochemistry, ontogenetic development, and regeneration of the ocellus of Cladonema radiatum dujardin (cnidaria, hydrozoa, anthomedusae)*. Journal of Morphology, 1981. **167**(3): p. 313-331.
66. Stierwald, M., et al., *The Six class family of homeobox genes in jellyfish with and without eyes: development and eye regeneration*. Developmental Biology, 2004. **274**(1): p. 70-81.
67. Candia Carnevali, M.D., *Regeneration in Echinoderms: Repair, regrowth, cloning*. Invertebrate Survival Journal, 2006. **3**(1): p. 64-76.
68. Candia Carnevali, M.D., *Regenerative Response and Endocrine Disrupters in Crinoid Echinoderms: An Old Experimental Model, a New Ecotoxicological Test*, in *Echinodermata*, V. Matranga, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 167-200.
69. VandenSpiegel, D., M. Jangoux, and P. Flammang, *Maintaining the line of defense: regeneration of Cuvierian tubules in the sea cucumber Holothuria forskali (Echinodermata, Holothuroidea)*. The Biological Bulletin, 2000. **198**(1): p. 34-49.
70. Byrne, M., *Evisceration behaviour and the seasonal incidence of evisceration in the holothurian Eupentacta quinquesemita (Selenka)*. Ophelia, 1985. **24**(2): p. 75-90.
71. Dolmatov, I.Y., *Asexual Reproduction in Holothurians*. The Scientific World Journal, 2014. **2014**: p. 13.
72. Bonasoro, F., et al., *Regenerative potential of echinoid test*, in *Echinoderms: Munchen - Proceedings of the 11th International Echinoderm Conference, 6-10 October 2003, Munich, Germany*, J.H.N.a.T. Heinzeller, Editor. 2004: Munich, Germany. p. 97-103.
73. Reinardy, H.C., et al., *Tissue regeneration and biomineralization in sea urchins: role of Notch signaling and presence of stem cell markers*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0133860.
74. Edgecombe, G.D., et al., *Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions*. Organisms Diversity & Evolution, 2011. **11**(2): p. 151-172.
75. Malakhov, V.V., *Embryological and histological peculiarities of the order Enoplida, a primitive group of nematodes*. Russian Journal of Nematology, 1998. **6**: p. 41-46.
76. Wu, Z., et al., *Caenorhabditis elegans neuronal regeneration is influenced by life stage, ephrin signaling, and synaptic branching*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(38): p. 15132-15137.
77. Bely, A.E., *Evolutionary Loss of Animal Regeneration: Pattern and Process*. Integrative and Comparative Biology, 2010. **50**(4): p. 515-527.
78. Sánchez Alvarado, A., *Planarian Regeneration: Its End Is Its Beginning*. Cell, 2006. **124**(2): p. 241-245.
79. Elliott, S.A. and A. Sánchez Alvarado, *The history and enduring contributions of planarians to the study of animal regeneration*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 2013. **2**(3): p. 301-326.

80. Sánchez Alvarado, A., *Q&A: What is regeneration, and why look to planarians for answers?* BMC Biology, 2012. **10**(1): p. 88.
81. Pellettieri, J., et al., *Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration.* Developmental Biology, 2010. **338**(1): p. 76-85.
82. Wagner, D.E., I.E. Wang, and P.W. Reddien, *Clonogenic Neoblasts Are Pluripotent Adult Stem Cells That Underlie Planarian Regeneration.* Science, 2011. **332**(6031): p. 811-816.
83. Newmark, P.A. and A. Sánchez Alvarado, *Bromodeoxyuridine Specifically Labels the Regenerative Stem Cells of Planarians.* Developmental Biology, 2000. **220**(2): p. 142-153.
84. Kaneto, S. and H. Wada, *Regeneration of amphioxus oral cirri and its skeletal rods: implications for the origin of the vertebrate skeleton.* Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2011. **316B**(6): p. 409-417.
85. Somorjai, I.M.L., et al., *Vertebrate-like regeneration in the invertebrate chordate amphioxus.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(2): p. 517-522.
86. Somorjai, I.M., H. Escriva, and J. Garcia-Fernandez, *Amphioxus makes the cut-Again.* Commun Integr Biol, 2012. **5**(5): p. 499-502.
87. Tiozzo, S., F.D. Brown, and A.W. De Tomaso, *Regeneration and Stem Cells in Ascidians,* in *Stem Cells: From Hydra to Man*, T.C.G. Bosch, Editor. 2008, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 95-112.
88. Kürn, U., et al., *Asexual Propagation and Regeneration in Colonial Ascidians.* The Biological Bulletin, 2011. **221**(1): p. 43-61.
89. Brown, F.D., et al., *Whole body regeneration in a colonial ascidian, Botrylloides violaceus.* Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2009. **312B**(8): p. 885-900.
90. Delsuc, F., et al., *Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates.* Nature, 2006. **439**(7079): p. 965-968.
91. Goss, R.J., *Principles of regeneration.* 1969, New York: Academic Press. 287.
92. Rasch, L.J., et al., *An ancient dental gene set governs development and continuous regeneration of teeth in sharks.* Developmental Biology, 2016. **415**(2): p. 347-370.
93. Gemberling, M., et al., *The zebrafish as a model for complex tissue regeneration.* Trends in Genetics, 2013. **29**(11): p. 611-620.
94. Azevedo, A.S., et al., *The Regenerative Capacity of the Zebrafish Caudal Fin Is Not Affected by Repeated Amputations.* PLOS ONE, 2011. **6**(7): p. e22820.
95. Pfefferli, C. and A. Jaźwińska, *The art of fin regeneration in zebrafish.* Regeneration, 2015. **2**(2): p. 72-83.
96. Johnson, S.L. and P. Bennett, *Growth control in the ontogenetic and regenerating zebrafish fin.* Methods Cell Biol, 1999. **59**: p. 301-11.
97. Bernhardt, R.R., et al., *Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish.* The Journal of Comparative Neurology, 1996. **376**(2): p. 253-264.
98. Becker, T., et al., *Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish.* J Comp Neurol, 1997. **377**(4): p. 577-95.

99. Poss, K.D., L.G. Wilson, and M.T. Keating, *Heart Regeneration in Zebrafish*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2188-2190.
100. Vieira, F.A., et al., *Skin healing and scale regeneration in fed and unfed sea bream, Sparus auratus*. BMC Genomics, 2011. **12**(1): p. 490.
101. Freeman, G., *Lens regeneration from the cornea in Xenopus laevis*. Journal of Experimental Zoology, 1963. **154**(1): p. 39-65.
102. Dent, J.N., *Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad*. J Morphol, 1962. **110**: p. 61-77.
103. Muneoka, K., G. Holler-Dinsmore, and S.V. Bryant, *Intrinsic control of regenerative loss in Xenopus laevis limbs*. Journal of Experimental Zoology, 1986. **240**(1): p. 47-54.
104. Wolfe, A.D., H.L.D. Nye, and J.A. Cameron, *Extent of ossification at the amputation plane is correlated with the decline of blastema formation and regeneration in Xenopus laevis hindlimbs*. Developmental Dynamics, 2000. **218**(4): p. 681-697.
105. Wallace, H., *Vertebrate limb regeneration*. 1981, Chichester Eng. ; New York: Wiley. 276.
106. Armstrong, J.B. and G.M. Malacinski, *Developmental Biology of the Axolotl*. 1989: Oxford University Press.
107. Suetsugu-Maki, R., et al., *Lens regeneration in axolotl: new evidence of developmental plasticity*. BMC Biology, 2012. **10**(1): p. 103.
108. Tsonis, P.A. and K. Del Rio-Tsonis, *Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications*. Experimental Eye Research, 2004. **78**(2): p. 161-172.
109. Clause, A.R. and E.A. Capaldi, *Caudal autotomy and regeneration in lizards*. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, 2006. **305A**(12): p. 965-973.
110. Delorme, S.L., I.M. Lungu, and M.K. Vickaryous, *Scar-Free Wound Healing and Regeneration Following Tail Loss in the Leopard Gecko, Eublepharis macularius*. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 2012. **295**(10): p. 1575-1595.
111. Alibardi, L., *Limb Regeneration: Ultrastructural and Cytological Aspects*, in *Morphological and Cellular Aspects of Tail and Limb Regeneration in Lizards: A Model System With Implications for Tissue Regeneration in Mammals*. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 89-93.
112. McLean, K.E. and M.K. Vickaryous, *A novel amniote model of epimorphic regeneration: the leopard gecko, Eublepharis macularius*. BMC Developmental Biology, 2011. **11**(1): p. 50.
113. Alibardi, L., *Histochemical, Biochemical and Cell Biological aspects of tail regeneration in lizard, an amniote model for studies on tissue regeneration*. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 2014. **48**(4): p. 143-244.
114. Carlson, B.M., *Chapter 1 - An Introduction to Regeneration*, in *Principles of Regenerative Biology*. 2007, Academic Press: Burlington. p. 1-29.
115. Stone, J.S. and E.W. Rubel, *Cellular studies of auditory hair cell regeneration in birds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 11714-21.
116. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**.
117. Carlson, B.M., *Muscle regeneration in amphibians and mammals: Passing the torch*. Developmental Dynamics, 2003. **226**(2): p. 167-181.

118. Carlson, M.E., et al., *Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells*. EMBO Molecular Medicine, 2009. **1**(8-9): p. 381-391.
119. Suttie, J.M. and P.F. Fennessy, *Regrowth of amputated velvet antlers with and without innervation*. Journal of Experimental Zoology, 1985. **234**(3): p. 359-366.
120. Li, C., et al., *Deer antler – A novel model for studying organ regeneration in mammals*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014. **56**: p. 111-122.
121. Williams-Boyce, P.K. and J.C. Daniel, *Regeneration of rabbit ear tissue*. Journal of Experimental Zoology, 1980. **212**(2): p. 243-253.
122. Seifert, A.W., et al., *Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (Acomys)*. Nature, 2012. **489**(7417): p. 561-565.
123. Dubost, G. and J.-P. Gasc, *The process of total tail autotomy in the South-American rodent, Proechimys*. Journal of Zoology, 1987. **212**(3): p. 563-572.
124. Gawriluk, T.R., et al., *Comparative analysis of ear-hole closure identifies epimorphic regeneration as a discrete trait in mammals*. 2016. **7**: p. 11164.
125. Douglas, B.S., *CONSERVATIVE MANAGEMENT OF GUILLOTINE AMPUTATION OF THE FINGER IN CHILDREN*. Journal of Paediatrics and Child Health, 1972. **8**(2): p. 86-89.
126. Illingworth, C.M., *Trapped fingers and amputated finger tips in children*. J Pediatr Surg, 1974. **9**(6): p. 853-58.
127. Rosenthal, L.J., M.A. Reiner, and M.A. Bleicher, *Nonoperative Management of Distal Fingertip Amputations in Children*. Pediatrics, 1979. **64**(1): p. 1-3.
128. Borgens, R.B., *Mice regrow the tips of their foretoes*. Science, 1982. **217**(4561): p. 747-50.
129. Stocum, D.L., *Vertebrate regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(5): p. 325-6.
130. Sidorova, V.F., *Liver regeneration in birds*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 1962. **52**(6): p. 1426-1429.
131. Zhou, F., et al., *Construction and characterization of a cDNA library from shark regenerated hepatic tissue*. Fish & Shellfish Immunology, 2011. **30**(4-5): p. 1170-1177.
132. Chu, J. and K.C. Sadler, *New school in liver development: Lessons from zebrafish*. Hepatology, 2009. **50**(5): p. 1656-1663.
133. Hayslett, J.P., M. Kashgarian, and F.H. Epstein, *Functional correlates of compensatory renal hypertrophy*. J Clin Invest, 1968. **47**(4): p. 774-99.
134. Funahashi, Y., et al., *Relationship Between Renal Parenchymal Volume and Single Kidney Glomerular Filtration Rate Before and After Unilateral Nephrectomy*. Urology, 2011. **77**(6): p. 1404-1408.
135. Hohmann, N., et al., *How Does a Single Cell Know When the Liver Has Reached Its Correct Size?* PLOS ONE, 2014. **9**(4): p. e93207.
136. Nguyen, Q.T., J.R. Sanes, and J.W. Lichtman, *Pre-existing pathways promote precise projection patterns*. Nat Neurosci, 2002. **5**(9): p. 861-7.
137. Smith, H.M., *Discovery of the axolotl and its early history in biological research*, in *Developmental Biology of the Axolotl*, J.B. Armstrong and G.M. Malacinski, Editors. 1989, Oxford University Press Inc. : New York. p. 3-12.

138. Reiß, C., L. Olsson, and U. Hoßfeld, *The history of the oldest self-sustaining laboratory animal: 150 years of axolotl research*. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2015. **324**(5): p. 393-404.
139. Voss, S.R., M.R. Woodcock, and L. Zambrano, *A Tale of Two Axolotls*. BioScience, 2015. **65**(12): p. 1134-1140.
140. Nye, H.L., et al., *Regeneration of the urodele limb: a review*. Dev Dyn, 2003. **226**(2): p. 280-94.
141. Schnapp, E., et al., *Hedgehog signaling controls dorsoventral patterning, blastema cell proliferation and cartilage induction during axolotl tail regeneration*. Development, 2005. **132**(14): p. 3243-3253.
142. Charbonneau, A.M., S. Roy, and S.D. Tran, *Oral-Facial Tissue Reconstruction in the Regenerative Axolotl*. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2016. **326**(8): p. 489-502.
143. Eycleshymer, A.C., *The Growth and Regeneration of the Gills in the Young Necturus*. Biological Bulletin, 1906. **10**(4): p. 171-175.
144. Lévesque, M., É. Villiard, and S. Roy, *Skin wound healing in axolotls: a scarless process*. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2010. **314B**(8): p. 684-697.
145. O'Steen, W.K., *Regeneration of the intestine in adult urodeles*. Journal of Morphology, 1958. **103**(3): p. 435-477.
146. Cano-Martinez, A., et al., *Functional and structural regeneration in the axolotl heart (Ambystoma mexicanum) after partial ventricular amputation*. Arch Cardiol Mex, 2010. **80**(2): p. 79-86.
147. Mchedlishvili, L., et al., *A clonal analysis of neural progenitors during axolotl spinal cord regeneration reveals evidence for both spatially restricted and multipotent progenitors*. Development, 2007. **134**(11): p. 2083-2093.
148. Maden, M., L.A. Manwell, and B.K. Ormerod, *Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon*. Neural Development, 2013. **8**(1): p. 1.
149. Harty, M., et al., *Regeneration or scarring: An immunologic perspective*. Developmental Dynamics, 2003. **226**(2): p. 268-279.
150. Roy, S. and D.M. Gardiner, *Cyclopamine induces digit loss in regenerating axolotl limbs*. J Exp Zool, 2002. **293**(2): p. 186-90.
151. Denis, J.F., et al., *Activation of Smad2 but not Smad3 is required for mediating TGF-beta signaling during limb regeneration in axolotls*. Development, 2016.
152. Voss, S.R. and H.B. Shaffer, *Evolutionary genetics of metamorphic failure using wild-caught vs. laboratory axolotls (Ambystoma mexicanum)*. Molecular Ecology, 2000. **9**(9): p. 1401-1407.
153. Echeverri, K. and E.M. Tanaka, *Electroporation as a tool to study in vivo spinal cord regeneration*. Dev Dyn, 2003. **226**(2): p. 418-25.
154. Roy, S., D.M. Gardiner, and S.V. Bryant, *Vaccinia as a tool for functional analysis in regenerating limbs: ectopic expression of Shh*. Dev Biol, 2000. **218**(2): p. 199-205.
155. Flowers, G.P., et al., *Highly efficient targeted mutagenesis in axolotl using Cas9 RNA-guided nuclease*. Development, 2014. **141**(10): p. 2165-2171.
156. Khattak, S., et al., *Optimized axolotl (Ambystoma mexicanum) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination*. Nat. Protocols, 2014. **9**(3): p. 529-540.

157. Keinath, M.C., et al., *Initial characterization of the large genome of the salamander *Ambystoma mexicanum* using shotgun and laser capture chromosome sequencing*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 16413.
158. Voss, S.R. *Sal-Site*. 2017; Available from: <http://www.ambystoma.org/>.
159. Nowoshilow, S., et al., *The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators*. Nature, 2018. **554**: p. 50.
160. Demircan, T., et al., *Detailed tail proteomic analysis of axolotl (*ambystoma mexicanum*) using an mRNA-seq reference database*. PROTEOMICS, 2016: p. n/a-n/a.
161. McCusker, C., S.V. Bryant, and D.M. Gardiner, *The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods*. Regeneration (Oxf), 2015. **2**(2): p. 54-71.
162. Schauble, M.K. and M.R. Nentwig, *Temperature and prolactin as control factors in newt forelimb regeneration*. J Exp Zool, 1974. **187**(3): p. 335-44.
163. Iten, L.E. and S.V. Bryant, *Forelimb Regeneration from Different Levels of Amputation in Newt, *Notophthalmus-Viridescens* - Length, Rate, and Stages*. Wilhelm Roux Archiv Fur Entwicklungsmechanik Der Organismen, 1973. **173**(4): p. 263-282.
164. Roy, S. and M. Levesque, *Limb regeneration in axolotl: is it superhealing?* ScientificWorldJournal, 2006. **6 Suppl 1**: p. 12-25.
165. Gardiner, D.M., M.R. Carlson, and S. Roy, *Towards a functional analysis of limb regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(4): p. 385-93.
166. Tank, P.W., B.M. Carlson, and T.G. Connelly, *A staging system for forelimb regeneration in the axolotl, *Ambystoma mexicanum**. J Morphol, 1976. **150**(1): p. 117-28.
167. Atkinson, D.L., et al., *Cellular electroporation induces dedifferentiation in intact newt limbs*. Developmental Biology, 2006. **299**(1): p. 257-271.
168. Brockes, J.P. and A. Kumar, *Comparative Aspects of Animal Regeneration*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2008. **24**(1): p. 525-549.
169. Maden, M., *Regeneration: Every Clot Has a Thrombin Lining*. Current Biology, 2003. **13**(13): p. R517-R518.
170. Tanaka, E.M., D.N. Drechsel, and J.P. Brockes, *Thrombin regulates S-phase re-entry by cultured newt myotubes*. Curr Biol, 1999. **9**.
171. Imokawa, Y., A. Simon, and J.P. Brockes, *A critical role for thrombin in vertebrate lens regeneration*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2004. **359**(1445): p. 765-776.
172. Repesh, L.A. and J.C. Oberpriller, *Ultrastructural studies on migrating epidermal cells during the wound healing stage of regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens**. Am J Anat, 1980. **159**(2): p. 187-208.
173. Norman, W.P. and A.J. Schmidt, *The fine structure of tissues in the amputated-regenerating limb of the adult newt, *Diemictylus viridescens**. Journal of Morphology, 1967. **123**(3): p. 271-311.
174. Carlson, M., S. Bryant, and D. Gardiner, *Expression of *Msx-2* during development, regeneration, and wound healing in axolotl limbs*. J Exp Zool., 1998. **282**(6): p. 715-23.
175. Singer, M., *The invasion of the epidermis of the regenerating forelimb of the urodele, *Triturus*, by nerve fibers*. Journal of Experimental Zoology, 1949. **111**(2): p. 189-209.

176. Mescher, A.L., *The cellular basis of limb regeneration in urodeles*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(4): p. 785-95.
177. Neufeld, D.A. and F.A. Day, *Perspective: A suggested role for basement membrane structures during newt limb regeneration*. The Anatomical Record, 1996. **246**(2): p. 155-161.
178. Thornton, C.S., *The effect of apical cap removal on limb regeneration in Amblystoma larvae*. J Exp Zool, 1957. **134**(2): p. 357-81.
179. Mescher, A.L., *Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface*. Journal of Experimental Zoology, 1976. **195**(1): p. 117-127.
180. Gordon, H., J.P. Brockes, and F. Wilson, *Appearance and regulation of an antigen associated with limb regeneration in Notophthalmus viridescens*. Journal of Experimental Zoology, 1988. **247**(3): p. 232-243.
181. Mescher, A.L. and A.W. Neff, *Limb Regeneration in Amphibians: Immunological Considerations*. TheScientificWorldJOURNAL, 2006. **6**: p. 1-11.
182. Hay, E.D. and D.A. Fischman, *Origin of the blastema in regenerating limbs of the newt Triturus viridescens: An autoradiographic study using tritiated thymidine to follow cell proliferation and migration*. Developmental Biology, 1961. **3**(1): p. 26-59.
183. Satoh, A., S.V. Bryant, and D.M. Gardiner, *Nerve signaling regulates basal keratinocyte proliferation in the blastema apical epithelial cap in the axolotl (Ambystoma mexicanum)*. Developmental Biology, 2012. **366**(2): p. 374-381.
184. Christensen, R.N. and R.A. Tassava, *Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs*. Developmental Dynamics, 2000. **217**(2): p. 216-224.
185. Capdevila, J. and J.C. Izpisua Belmonte, *Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 87-132.
186. Han, M., et al., *Limb regeneration in higher vertebrates: Developing a roadmap*. The Anatomical Record Part B: The New Anatomist, 2005. **287B**(1): p. 14-24.
187. Saunders, J.W., Jr., *The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm*. J Exp Zool, 1948. **108**(3): p. 363-403.
188. Tassava, R.A. and A.L. Mescher, *The Roles of Injury, Nerves, and the Wound Epidermis during the Initiation of Amphibian Limb Regeneration*. Differentiation, 1975. **4**(1-3): p. 23-24.
189. Odelberg, S.J., *Cellular plasticity in vertebrate regeneration*. The Anatomical Record Part B: The New Anatomist, 2005. **287B**(1): p. 25-35.
190. Butler, E.G. and J.P. O'Brien, *Effects of localized x-radiation on regeneration of the urodele limb*. The Anatomical Record, 1942. **84**(4): p. 407-413.
191. Brockes, J.P. and A. Kumar, *Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 566-574.
192. Bischler, V., *L'influence du squelette dans la régénération et les potentialités des divers territoires du membre chez Triton cristatus*. Revue Suisse De Zoologie, 1926. **33**: p. 431--558.
193. Dunis, D.A. and M. Namenwirth, *The role of grafted skin in the regeneration of x-irradiated axolotl limbs*. Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 97-109.
194. Holder, N., *Organization of connective tissue patterns by dermal fibroblasts in the regenerating axolotl limb*. Development, 1989. **105**(3): p. 585-593.

195. Morrison, J.I., et al., *Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population*. The Journal of Cell Biology, 2006. **172**(3): p. 433-440.
196. Tanaka, H.V., et al., *A developmentally regulated switch from stem cells to dedifferentiation for limb muscle regeneration in newts*. Nature Communications, 2016. **7**: p. 11069.
197. Sandoval-Guzmán, T., et al., *Fundamental Differences in Dedifferentiation and Stem Cell Recruitment during Skeletal Muscle Regeneration in Two Salamander Species*. Cell Stem Cell, 2014. **14**(2): p. 174-187.
198. Richardson, M.K. and C.M. Chuong, *Regeneration and pattern formation - an interview with Susan Bryant*. Int. J. Dev. Biol., 2009. **53**: p. 827-833.
199. López-Martínez, A., et al., *Limb-patterning activity and restricted posterior localization of the amino-terminal product of Sonic hedgehog cleavage*. Current Biology, 1995. **5**(7): p. 791-796.
200. Riddle, R.D., et al., *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1401-1416.
201. Tickle, C., *The early history of the polarizing region: from classical embryology to molecular biology*. Int J Dev Biol, 2002. **46**(7): p. 847-52.
202. Torok, M.A., et al., *Sonic hedgehog (shh) expression in developing and regenerating axolotl limbs*. J Exp Zool, 1999. **284**(2): p. 197-206.
203. Litngtung, Y., et al., *Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 979-83.
204. Galis, F., M. Kunderát, and J.A.J. Metz, *Hox genes, digit identities and the theropod/bird transition*. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 2005. **304B**(3): p. 198-205.
205. Tickle, C. and H. Barker, *The Sonic hedgehog gradient in the developing limb*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology, 2013. **2**(2): p. 275-290.
206. Scherz, P.J., et al., *Extended exposure to Sonic hedgehog is required for patterning the posterior digits of the vertebrate limb*. Developmental Biology, 2007. **308**(2): p. 343-354.
207. Han, M.-J., J.-Y. An, and W.-S. Kim, *Expression patterns of Fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl*. Developmental Dynamics, 2001. **220**(1): p. 40-48.
208. Christensen, R.N., M. Weinstein, and R.A. Tassava, *Expression of fibroblast growth factors 4, 8, and 10 in limbs, flanks, and blastemas of Ambystoma*. Developmental Dynamics, 2002. **223**(2): p. 193-203.
209. Ohuchi, H., et al., *The mesenchymal factor, FGF10, initiates and maintains the outgrowth of the chick limb bud through interaction with FGF8, an apical ectodermal factor*. Development, 1997. **124**(11): p. 2235-44.
210. Zeller, R., J. Lopez-Rios, and A. Zuniga, *Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(12): p. 845-58.
211. Zakany, J. and D. Duboule, *The role of Hox genes during vertebrate limb development*. Current Opinion in Genetics & Development, 2007. **17**(4): p. 359-366.
212. Gardiner, D.M., et al., *Regulation of HoxA expression in developing and regenerating axolotl limbs*. Development, 1995. **121**(6): p. 1731-41.

213. Roensch, K., et al., *Progressive specification rather than intercalation of segments during limb regeneration*. Science, 2013. **342**(6164): p. 1375-9.
214. Shimokawa, T., et al., *Lmx-1b and Wnt-7a expression in axolotl limb during development and regeneration*. Okajimas Folia Anat Jpn, 2013. **89**(4): p. 119-24.
215. Christen, B. and J.M.W. Slack, *All limbs are not the same*. Nature, 1998. **395**(6699): p. 230-231.
216. Johnson, R.L. and C.J. Tabin, *Molecular Models for Vertebrate Limb Development*. Cell, 1997. **90**(6): p. 979-990.
217. Carlson, B.M., *Chapter 7 - Morphogenesis of Regenerating Structures*, in *Principles of Regenerative Biology*. 2007, Academic Press: Burlington. p. 127-163.
218. French, V., P.J. Bryant, and S.V. Bryant, *Pattern regulation in epimorphic fields*. Science, 1976. **193**(4257): p. 969-81.
219. Wolpert, L., *Positional information and patterning revisited*. Journal of Theoretical Biology, 2011. **269**(1): p. 359-365.
220. Carlson, B.M., *Morphogenetic interactions between rotated skin cuffs and underlying stump tissues in regenerating axolotl forelimbs*. Developmental Biology, 1974. **39**(2): p. 263-285.
221. Rinn, J.L., et al., *Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs*. PLOS Genetics, 2006. **2**(7): p. e119.
222. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(20): p. 12877-12882.
223. Tank, P.W., *Pattern formation following 180° rotation of regeneration blastemas in the axolotl, Ambystoma mexicanum*. Journal of Experimental Zoology, 1981. **217**(3): p. 377-387.
224. Imokawa, Y. and K. Yoshizato, *Expression of sonic hedgehog gene in regenerating newt limbs*. Wound Repair Regen, 1998. **6**(4): p. 366-70.
225. Mito, T., et al., *Involvement of hedgehog, wingless, and dpp in the initiation of proximodistal axis formation during the regeneration of insect legs, a verification of the modified boundary model*. Mechanisms of Development, 2002. **114**(1-2): p. 27-35.
226. Iten, L.E. and S.V. Bryant, *The interaction between the blastema and stump in the establishment of the anterior--posterior and proximal--distal organization of the limb regenerate*. Dev Biol, 1975. **44**(1): p. 119-47.
227. McCusker, C.D. and D.M. Gardiner, *Positional information is reprogrammed in blastema cells of the regenerating limb of the axolotl (Ambystoma mexicanum)*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e77064.
228. Todd, T.J., *On the Process of Reproduction of the Members of the Aquatic Salamander*. Quarterly Journal of Science, Literature and the Arts., 1823. **XVI**: p. 84-96.
229. Morgan, T.H., *REGENERATION AND LIABILITY TO INJURY*. Science, 1901. **14**(346): p. 235-248.
230. Kim, L.R., et al., *Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds*. Wound Repair and Regeneration, 1998. **6**(3): p. 194-201.
231. Tassava, R.A., L.L. Bennett, and G.D. Zitnik, *DNA synthesis without mitosis in amputated denervated forelimbs of larval axolotls*. Journal of Experimental Zoology, 1974. **190**(1): p. 111-116.

232. Butler, E.G. and O.E. Schotté, *Histological alterations in denervated non-regenerating limbs of urodele larvae*. Journal of Experimental Zoology, 1941. **88**(2): p. 307-341.
233. Yang, E.V., et al., *Expression of Mmp-9 and related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration*. Developmental Dynamics, 1999. **216**(1): p. 2-9.
234. Mescher, A.L., G.W. White, and J.J. Brokaw, *Apoptosis in regenerating and denervated, nonregenerating urodele forelimbs*. Wound Repair and Regeneration, 2000. **8**(2): p. 110-116.
235. Grim, M. and B.M. Carlson, *The formation of muscles in regenerating limbs of the newt after denervation of the blastema*. J Embryol Exp Morphol, 1979. **54**: p. 99-111.
236. Tomlinson, B.L. and R.A. Tassava, *Dorsal root ganglia grafts stimulate regeneration of denervated urodele forelimbs: timing of graft implantation with respect to denervation*. Development, 1987. **99**(2): p. 173-186.
237. Hutchison, C., M. Pilote, and S. Roy, *The axolotl limb: A model for bone development, regeneration and fracture healing*. Bone, 2007. **40**(1): p. 45-56.
238. Nye, H.L., et al., *Extending the table of stages of normal development of the axolotl: limb development*. Dev Dyn, 2003. **226**(3): p. 555-60.
239. Guimond, J.C., et al., *BMP-2 functions independently of SHH signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs*. BMC Dev Biol, 2010. **10**: p. 15.
240. Lévesque, M., et al., *Transforming Growth Factor: β Signaling Is Essential for Limb Regeneration in Axolotls*. PLOS ONE, 2007. **2**(11): p. e1227.
241. Urist, M.R., *Bone: Formation by Autoinduction*. Science, 1965. **150**(3698): p. 893-899.
242. Wang, E.A., et al., *Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(24): p. 9484-8.
243. Urist, M.R. and B.S. Strates, *The Classic: Bone Morphogenetic Protein*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 2009. **467**(12): p. 3051.
244. Grgurevic, L., M. Pecina, and S. Vukicevic, *Marshall R. Urist and the discovery of bone morphogenetic proteins*. International Orthopaedics, 2017. **41**(5): p. 1065-1069.
245. Reddi, A.H. and C. Huggins, *Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(6): p. 1601-5.
246. Obradovic Wagner, D., et al., *BMPs: From Bone to Body Morphogenetic Proteins*. Science Signaling, 2010. **3**(107): p. mr1-mr1.
247. Bragdon, B., et al., *Bone Morphogenetic Proteins: A critical review*. Cellular Signalling, 2011. **23**(4): p. 609-620.
248. Sieber, C., et al., *Recent advances in BMP receptor signaling*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2009. **20**(5-6): p. 343-355.
249. Sieber, C., G.K. Schwaerzer, and P. Knaus, *Bone morphogenetic protein signaling is fine-tuned on multiple levels*, in *Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics*, S. Vukicevic and K.T. Sampath, Editors. 2008, Birkhäuser Basel: Basel. p. 81-114.
250. Wang, R.N., et al., *Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases*. Genes Dis, 2014. **1**(1): p. 87-105.
251. Nohe, A., et al., *Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors*. Cellular Signalling, 2004. **16**(3): p. 291-299.

252. Dai, F., et al., *Coupling of Dephosphorylation and Nuclear Export of Smads in TGF- β Signaling*, in *Transcription Factors: Methods and Protocols*, P.J. Higgins, Editor. 2010, Humana Press: Totowa, NJ. p. 125-137.
253. Gámez, B., E. Rodríguez-Carballo, and F. Ventura, *BMP signaling in telencephalic neural cell specification and maturation*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2013. **7**(87).
254. Nelsen, S.M. and J.L. Christian, *Site-specific Cleavage of BMP4 by Furin, PC6, and PC7*. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. **284**(40): p. 27157-27166.
255. Groppe, J., et al., *Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin*. *Nature*, 2002. **420**(6916): p. 636-642.
256. Rosen, V., *BMP and BMP Inhibitors in Bone*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006. **1068**(1): p. 19-25.
257. Corradini, E., J.L. Babitt, and H.Y. Lin, *The RGM/DRAGON family of BMP co-receptors*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009. **20**(5-6): p. 389-398.
258. Imamura, T., et al., *Smad6 inhibits signalling by the TGF-[beta] superfamily*. *Nature*, 1997. **389**(6651): p. 622-626.
259. Tucker, J.A., K.A. Mintzer, and M.C. Mullins, *The BMP Signaling Gradient Patterns Dorsoventral Tissues in a Temporally Progressive Manner along the Anteroposterior Axis*. *Developmental Cell*, 2008. **14**(1): p. 108-119.
260. Ramel, M.-C. and C.S. Hill, *The ventral to dorsal BMP activity gradient in the early zebrafish embryo is determined by graded expression of BMP ligands*. *Developmental Biology*, 2013. **378**(2): p. 170-182.
261. Houston, D.W., *Vertebrate Axial Patterning: From Egg to Asymmetry*, in *Vertebrate Development: Maternal to Zygotic Control*, F. Pelegri, M. Danilchik, and A. Sutherland, Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 209-306.
262. Lapraz, F., L. Besnardeau, and T. Lepage, *Patterning of the Dorsal-Ventral Axis in Echinoderms: Insights into the Evolution of the BMP-Chordin Signaling Network*. *PLOS Biology*, 2009. **7**(11): p. e1000248.
263. Hsu, D.R., et al., *The Xenopus Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities*. *Molecular Cell*, 1998. **1**(5): p. 673-683.
264. Marom, K., et al., *Temporal analysis of the early BMP functions identifies distinct anti-organizer and mesoderm patterning phases*. *Developmental Biology*, 2005. **282**(2): p. 442-454.
265. Jones, C.M., et al., *Bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) acts during gastrula stages to cause ventralization of Xenopus embryos*. *Development*, 1996. **122**(5): p. 1545-1554.
266. Xiao, Y.-T., L.-X. Xiang, and J.-Z. Shao, *Bone morphogenetic protein*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007. **362**(3): p. 550-553.
267. Hogan, B.L., *Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development*. *Genes Dev*, 1996. **10**(13): p. 1580-94.
268. Wu, M., G. Chen, and Y.-P. Li, *TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease*. *Bone Research*, 2016. **4**: p. 16009.

269. Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura, *BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2005. **16**(3): p. 251-263.
270. Yokota, Y. and S. Mori, *Role of Id family proteins in growth control*. Journal of Cellular Physiology, 2002. **190**(1): p. 21-28.
271. Hollnagel, A., et al., *Id Genes Are Direct Targets of Bone Morphogenetic Protein Induction in Embryonic Stem Cells*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(28): p. 19838-19845.
272. Hu, G., et al., *Msx homeobox genes inhibit differentiation through upregulation of cyclin D1*. Development, 2001. **128**: p. 2373-2384.
273. Lee, H., R. Habas, and C. Abate-Shen, *Msx1 Cooperates with Histone H1b for Inhibition of Transcription and Myogenesis*. Science, 2004. **304**: p. 1675-1978.
274. Weatherbee, S.D., et al., *Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p. 15103-7.
275. Bandyopadhyay, A., et al., *Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis*. PLoS Genet, 2006. **2**(12): p. e216.
276. Pignatti, E., R. Zeller, and A. Zuniga, *To BMP or not to BMP during vertebrate limb bud development*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014. **32**: p. 119-127.
277. Geetha-Loganathan, P., et al., *Expression pattern of BMPs during chick limb development*. Anat Embryol (Berl), 2006. **211 Suppl 1**: p. 87-93.
278. Danesh, S.M., et al., *BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis*. Gene Expression Patterns, 2009. **9**(5): p. 255-265.
279. Ahn, K., et al., *BMP-1A signaling is required for the formation of the apical ectodermal ridge and dorsal-ventral patterning of the limb*. Development, 2001. **128**(22): p. 4449-4461.
280. Pizette, S., C. Abate-Shen, and L. Niswander, *BMP controls proximodistal outgrowth, via induction of the apical ectodermal ridge, and dorsoventral patterning in the vertebrate limb*. Development, 2001. **128**(22): p. 4463-74.
281. Benazet, J.D., et al., *A self-regulatory system of interlinked signaling feedback loops controls mouse limb patterning*. Science, 2009. **323**(5917): p. 1050-3.
282. Michos, O., et al., *Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis*. Development, 2004. **131**(14): p. 3401-3410.
283. Taher, L., et al., *Global Gene Expression Analysis of Murine Limb Development*. PLOS ONE, 2011. **6**(12): p. e28358.
284. Minina, E., et al., *BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation*. Development, 2001. **128**(22): p. 4523-4534.
285. Lorda-Diez, C.I., et al., *Ligand- and stage-dependent divergent functions of BMP signaling in the differentiation of embryonic skeletogenic progenitors in vitro*. J Bone Miner Res, 2014. **29**(3): p. 735-48.
286. Nilsson, O., et al., *Gradients in bone morphogenetic protein-related gene expression across the growth plate*. Journal of Endocrinology, 2007. **193**(1): p. 75-84.
287. Pizette, S. and L. Niswander, *BMPs Are Required at Two Steps of Limb Chondrogenesis: Formation of Prechondrogenic Condensations and Their Differentiation into Chondrocytes*. Developmental Biology, 2000. **219**(2): p. 237-249.

288. Healy, C., D. Uwanogho, and P.T. Sharpe, *Regulation and role of Sox9 in cartilage formation*. Developmental Dynamics, 1999. **215**(1): p. 69-78.
289. Bi, W., et al., *Sox9 is required for cartilage formation*. Nat Genet, 1999. **22**(1): p. 85-9.
290. de Crombrughe, B., et al., *Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation*. Matrix Biology, 2000. **19**(5): p. 389-394.
291. Chimal-Monroy, J., et al., *Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: sox genes and BMP signaling*. Developmental Biology, 2003. **257**(2): p. 292-301.
292. Akiyama, H., et al., *The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6*. Genes Dev, 2002. **16**(21): p. 2813-28.
293. Salazar, V.S., L.W. Gamer, and V. Rosen, *BMP signalling in skeletal development, disease and repair*. Nat Rev Endocrinol, 2016. **12**(4): p. 203-21.
294. Brunet, L.J., et al., *Noggin, Cartilage Morphogenesis, and Joint Formation in the Mammalian Skeleton*. Science, 1998. **280**(5368): p. 1455-1457.
295. Logan, M., et al., *Expression of Cre recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer*. genesis, 2002. **33**(2): p. 77-80.
296. Retting, K.N., et al., *BMP canonical Smad signaling through Smad1 and Smad5 is required for endochondral bone formation*. Development, 2009. **136**(7): p. 1093-1104.
297. Cooper, K.L., et al., *Patterning and post-patterning modes of evolutionary digit loss in mammals*. Nature, 2014. **511**(7507): p. 41-45.
298. Wang, Y.-H., et al., *Gremlin1 induces anterior–posterior limb bifurcations in developing Xenopus limbs but does not enhance limb regeneration*. Mechanisms of Development, 2015. **138, Part 3**: p. 256-267.
299. Yu, L., et al., *BMP signaling induces digit regeneration in neonatal mice*. Development and Stem Cells, 2010. **137**: p. 551-559.
300. Price, J.S., et al., *Deer antlers: a zoological curiosity or the key to understanding organ regeneration in mammals?* Journal of Anatomy, 2005. **207**(5): p. 603-618.
301. Patruno, M., et al., *Anbmp2/4 is a new member of the transforming growth factor- β superfamily isolated from a crinoid and involved in regeneration*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2003. **270**(1522): p. 1341-1347.
302. Smith, A., et al., *Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblasts differentiation and function*. Dev Biol, 2006. **299**(2): p. 438-54.
303. Beck, C.W., et al., *Temporal requirement for bone morphogenetic proteins in regeneration of the tail and limb of Xenopus tadpoles*. Mech Dev, 2006. **123**(9): p. 674-88.
304. Beck, C.W., B. Christen, and J.M.W. Slack, *Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate*. Deve Cell, 2003. **5**.
305. Torok, M.A., et al., *Expression of HoxD genes in developing and regenerating axolotl limbs*. Dev Biol, 1998. **200**(2): p. 225-33.
306. Reinhardt, B., et al., *HyBMP5-8b, a BMP5-8 orthologue, acts during axial patterning and tentacle formation in hydra*. Developmental Biology, 2004. **267**(1): p. 43-59.
307. Gardiner, D.M. and S.V. Bryant, *Molecular mechanisms in the control of limb regeneration: the role of homeobox genes*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(4): p. 797-805.

308. Reginelli, A., et al., *Digit tip regeneration correlates with regions of Msx1 (Hox7) expression in fetal and newborn mice*. *Development*, 1995. **1221**: p. 1065-1076.
309. Han, M., et al., *Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice*. *Development*, 2003. **130**(21): p. 5123-32.
310. Yu, L., et al., *BMP2 induces segment-specific skeletal regeneration from digit and limb amputations by establishing a new endochondral ossification center*. *Developmental biology*, 2012. **372**(2): p. 263-273.
311. Guimond, J.-C., *Analyse fonctionnelle du gène BMP-2 lors de la régénération du membre chez l'axolotl*, in *Département de biochimie*. 2010, Université de Montréal. p. 280.
312. Slack, J.M., et al., *Cellular and molecular mechanisms of regeneration in Xenopus*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2004. **359**(1445): p. 745-51.
313. Pearl, E.J., et al., *Identification of genes associated with regenerative success of Xenopus laevis hindlimbs*. *BMC Developmental Biology*, 2008. **8**(1): p. 66.
314. Song, K., Y. Wang, and D. Sassoon, *Expression of Hox-7.1 in myoblasts inhibits terminal differentiation and induces cell transformation*. *Nature*, 1992. **360**(6403): p. 477-481.
315. Odelberg, S.J., A. Kollhoff, and M.T. Keating, *Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1*. *Cell*, 2000. **103**(7): p. 1099-109.
316. McGann, C.J., S.J. Odelberg, and M.T. Keating, *Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. **98**(24): p. 13699-13704.
317. Wagner, I., et al., *Serum Proteases Potentiate BMP-Induced Cell Cycle Re-entry of Dedifferentiating Muscle Cells during Newt Limb Regeneration*. *Developmental Cell*, 2017. **40**(6): p. 608-617.e6.
318. Vascotto, S.G., et al., *Nvbeta-actin and NvGAPDH as normalization factors for gene expression analysis in limb regenerates and cultured blastema cells of the adult newt, Notophthalmus viridescens*. *Int J Dev Biol*, 2005. **49**(7): p. 833-42.
319. Matz, M., et al., *Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(6): p. 1558-60.
320. Schmidt, W.M. and M.W. Mueller, *CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(21): p. e31.
321. Schauble, M.K., *Seasonal variation of newt forelimb regeneration under controlled environmental conditions*. *J Exp Zool*, 1972. **181**(2): p. 281-6.
322. Feng, J.Q., et al., *Structure and sequence of mouse bone morphogenetic protein-2 gene (BMP-2): comparison of the structures and promoter regions of BMP-2 and BMP-4 genes*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1218**(2): p. 221-4.
323. Cuny, G.D., et al., *Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008. **18**(15): p. 4388-92.
324. Vogt, J., R. Traynor, and G.P. Sapkota, *The specificities of small molecule inhibitors of the TGFs and BMP pathways*. *Cell Signal*, 2011. **23**(11): p. 1831-42.
325. Cannon, J.E., et al., *Intersegmental vessel formation in zebrafish: requirement for VEGF but not BMP signalling revealed by selective and non-selective BMP antagonists*. *Br J Pharmacol*, 2010. **161**(1): p. 140-9.

326. Jie, C., et al., *BMP signaling in vascular diseases*. FEBS Letters, 2012. **586**(14): p. 1993-2002.
327. Takahashi, H. and M. Shibuya, *The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions*. Clinical Science, 2005. **109**(3): p. 227-241.
328. Dorey, K. and E. Amaya, *FGF signalling: diverse roles during early vertebrate embryogenesis*. Development, 2010. **137**(22): p. 3731-3742.
329. Bayramov, A.V., et al., *Novel functions of Noggin proteins: inhibition of Activin/Nodal and Wnt signaling*. Development, 2011. **138**(24): p. 5345-5356.
330. Wong, K.A., et al., *Efficient retina formation requires suppression of both Activin and BMP signaling pathways in pluripotent cells*. Biology Open, 2015. **4**(4): p. 573-583.
331. Luo, G., et al., *BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning*. Genes Dev, 1995. **9**(22): p. 2808-20.
332. Knowles, H.J., et al., *Chondroclasts are mature osteoclasts which are capable of cartilage matrix resorption*. Virchows Archiv, 2012. **461**(2): p. 205-210.
333. Wlodkowic, D., et al., *Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death*. Methods Cell Biol, 2011. **103**: p. 55-98.
334. Bendall, A.J. and C. Abate-Shen, *Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development*. Gene, 2000. **247**(1-2): p. 17-31.
335. Bendall, A.J., et al., *Msx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors*. Development, 1999. **126**: p. 4965-4976.
336. Xu, X., et al., *Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction*. Development, 1998. **125**(4): p. 753-65.
337. Crossley, P.H., Minowada, G., MacArthur, C.A., Martin, G.R., *Roles for FGF8 in the induction, initiation, and maintenance of chick limb development*. Cell, 1996. **84**(1): p. 127-36.
338. Jarial, M.S., *Fine structure of the epidermal Leydig cells in the axolotl Ambystoma mexicanum in relation to their function*. J Anat, 1989. **167**: p. 95-102.
339. Riddle, R.D., et al., *Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1401-16.
340. Pan, Q., et al., *Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter*. J Cell Physiol, 2008. **217**(1): p. 228-41.
341. Abarca-Buis, R.F., et al., *Smad8 is expressed in the anterior necrotic zone: Evidence for a role of bone morphogenetic proteins/SMAD signaling in the activation of a molecular cascade that culminates in cell death*. Development, Growth & Differentiation, 2011. **53**(6): p. 780-792.
342. Derynck, R. and Y.E. Zhang, *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling*. Nature, 2003. **425**(6958): p. 577-584.
343. Boergermann, J.H., et al., *Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2010. **42**(11): p. 1802-1807.
344. Yu, P.B., et al., *BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic ossification*. Nat Med, 2008. **14**(12): p. 1363-1369.

345. Zhu, J., et al., *Uncoupling Sonic Hedgehog Control of Pattern and Expansion of the Developing Limb Bud*. *Developmental Cell*, 2008. **14**(4): p. 624-632.
346. Shu, B., et al., *BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development*. *Journal of Cell Science*, 2011. **124**(20): p. 3428-3440.
347. Selever, J., et al., *Bmp4 in limb bud mesoderm regulates digit pattern by controlling AER development*. *Dev Biol*, 2004. **276**(2): p. 268-79.
348. Choi, K.S., et al., *Bmp2, Bmp4 and Bmp7 are co-required in the mouse AER for normal digit patterning but not limb outgrowth*. *PLoS One*, 2012. **7**(5): p. e37826.
349. Sun, X., F.V. Mariani, and G.R. Martin, *Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development*. *Nature*, 2002. **418**(6897): p. 501-508.
350. Ros, M.A., et al., *The chick oligozeugodactyly (ozd) mutant lacks sonic hedgehog function in the limb*. *Development*, 2003. **130**(3): p. 527-37.
351. Maas, S.A., T. Suzuki, and J.F. Fallon, *Identification of spontaneous mutations within the long-range limb-specific Sonic hedgehog enhancer (ZRS) that alter Sonic hedgehog expression in the chicken limb mutants oligozeugodactyly and silkie breed*. *Developmental Dynamics*, 2011. **240**(5): p. 1212-1222.
352. Knapp, D., et al., *Comparative transcriptional profiling of the axolotl limb identifies a tripartite regeneration-specific gene program*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e61352.
353. Voss, S.R., et al., *Gene expression during the first 28 days of axolotl limb regeneration I: Experimental design and global analysis of gene expression*. *Regeneration (Oxf)*, 2015. **2**(3): p. 120-136.
354. Guo, F.J., et al., *IRE1a constitutes a negative feedback loop with BMP2 and acts as a novel mediator in modulating osteogenic differentiation*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1239.
355. Prall, O.W.J., et al., *An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 Negative Feedback Loop Controls Heart Progenitor Specification and Proliferation*. *Cell*, 2007. **128**(5): p. 947-959.
356. Barker, D.M. and C.W. Beck, *Overexpression of the transcription factor Msx1 is insufficient to drive complete regeneration of refractory stage Xenopus laevis hindlimbs*. *Developmental Dynamics*, 2009. **238**(6): p. 1366-1378.
357. Moon, A.M. and M.R. Capecchi, *Fgf8 is required for outgrowth and patterning of the limbs*. *Nat Genet*, 2000. **26**(4): p. 455-9.
358. Delgado, I., et al., *The incomplete inactivation of Fgf8 in the limb ectoderm affects the morphogenesis of the anterior autopod through BMP-mediated cell death*. *Developmental Dynamics*, 2008. **237**(3): p. 649-658.
359. Lewandoski, M., X. Sun, and G.R. Martin, *Fgf8 signalling from the AER is essential for normal limb development*. *Nature Genetics*, 2000. **26**: p. 460.
360. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. *Developmental Dynamics*, 1992. **195**(4): p. 231-272.
361. Fernandez-Teran, M. and M.A. Ros, *The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways*. *Int J Dev Biol*, 2008. **52**(7): p. 857-71.
362. Towers, M., et al., *Integration of growth and specification in chick wing digit-patterning*. *Nature*, 2008. **452**(7189): p. 882-886.
363. Lallemand, Y., et al., *Analysis of Msx1; Msx2 double mutants reveals multiple roles for Msx genes in limb development*. *Development*, 2005. **132**(13): p. 3003-14.

364. Post, L.C. and J.W. Innis, *Altered Hox expression and increased cell death distinguish Hypodactyly from Hoxa13 null mice*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(4): p. 287-94.
365. Fromental-Ramain, C., et al., *Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod*. Development, 1996. **122**(10): p. 2997-3011.
366. Boulet, A.M. and M.R. Capecchi, *Multiple roles of *Hoxa11* and *Hoxd11* in the formation of the mammalian forelimb zeugopod*. Development, 2004. **131**(2): p. 299-309.
367. Yokouchi, Y., et al., *Misexpression of Hoxa-13 induces cartilage homeotic transformation and changes cell adhesiveness in chick limb buds*. Genes & Development, 1995. **9**(20): p. 2509-2522.
368. Stadler, H.S., K.M. Higgins, and M.R. Capecchi, *Loss of *Eph-receptor* expression correlates with loss of cell adhesion and chondrogenic capacity in *Hoxa13* mutant limbs*. Development, 2001. **128**(21): p. 4177-4188.
369. Zehentner, B.K., C. Dony, and H. Burtscher, *The Transcription Factor Sox9 Is Involved in BMP-2 Signaling*. Journal of Bone and Mineral Research, 1999. **14**(10): p. 1734-1741.
370. French, V., *Pattern regulation and regeneration*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1981. **295**(1078): p. 601-17.
371. Maden, M., *Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb*. Nature, 1982. **295**(5851): p. 672-5.
372. Roselló-Díez, A., et al., *Diffusible signals and epigenetic timing cooperate in late proximo-distal limb patterning*. Development, 2014. **141**(7): p. 1534-1543.

Annexe I - Tableaux supplémentaires

Tableau VI. Ratio de la longueur du blastème, versus la largeur du membre, chez les animaux traités au LDN193189 durant toute la régénération

n=8

8 jours post-amputation				11 jours post-amputation			
	Ratio	±	p-value		Ratio	±	p-value
DMSO	55%	11%		DMSO	79%	12%	
0,2µM	43%	28%	0,063758	0,2µM	81%	26%	0,722
0,5µM	41%	23%	0,036913	0,5µM	54%	40%	0,025
1,0µM	26%	18%	8,74E-05	1,0µM	37%	42%	0,001

Tableau VII. État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 : Animaux traités de 24 heures avant l'amputation jusqu'à la fin de la régénération

Concentration LDN193189	Nombre de membres	Régénération normale/quasi normale	Description des pattes régénérées
Contrôle DMSO	14	93%	La plupart des membres régénèrent les deux os du zeugopode, les 8 os carpiens et les 4 doigts au complet. Chez certains animaux, les éléments osseux du doigt postérieur sont incomplets (typique des petits animaux). Un des membres est divisé et manque un doigt. De telles anomalies arrivent à l'occasion (<5% des amputations).
0,2 µM	12	0%	Aucune régénération normale. Chez 7/12 pattes, un des os du zeugopode régénère partiellement (l'ulna dans 6 cas sur 7, l'autre os régresse dans 3 de ces cas), avec 1-3 os carpiens et 0-3 éléments osseux des doigts. Chez 2/12 pattes, les os du zeugopode ne changent pas suite à l'amputation. Chez 3/12 pattes, seule une régression est observée.
0,5 µM	8	0%	Seuls 2/8 membres ne subissent pas de régression osseuse par rapport au niveau d'amputation. Au total, 6/8 membres montrent une régression, mais dans 2 de ceux-ci, il y a aussi la croissance d'un os d'identité inconnue.
1,0 µM	6	0%	Aucun membre ne régénère de nouveaux os. Dans 1/6 membre, il n'y a pas de changement dans l'os du moignon suite à l'amputation. Une régression osseuse est observée chez les 5/6 autres membres.

Tableau VIII. Cellules positives pour le BrdU

n=3

	Blastème				Peau		
	Moyenne	SEM	p-value		Moyenne	SEM	p-value
Early Bud							
DMSO	32,64%	4,69%	1,000		14,33%	1,96%	1,000
0,2µM	41,10%	6,96%	0,457		15,16%	1,86%	0,814
0,5µM	35,60%	2,27%	0,668		18,32%	1,48%	0,255
1µM	41,41%	8,68%	0,508		23,20%	7,98%	0,428
Late Bud							
DMSO	52,19%	9,51%	1,000		31,68%	6,36%	1,000
0,2µM	35,85%	6,81%	0,318		17,65%	2,65%	0,172
0,5µM	31,48%	5,04%	0,191		17,07%	4,56%	0,202
1µM	16,11%	1,35%	0,037		11,43%	2,38%	0,072

Tableau IX. Cellules positives pour le TUNEL

n=3

	Blastème				Peau		
	Moyenne	SEM	p-value		Moyenne	SEM	p-value
Early Bud							
DMSO	0,32%	0,02%	1,000		0,11%	0,09%	1,000
0,2µM	0,28%	0,13%	0,812		0,16%	0,07%	0,707
0,5µM	0,85%	0,13%	0,027		1,63%	0,32%	0,020
1µM	1,27%	0,38%	0,111		2,05%	0,21%	0,002
Late Bud							
DMSO	0,89%	0,08%	1,000		0,16%	0,09%	1,000
0,2µM	1,24%	0,13%	0,140		0,51%	0,17%	0,209
0,5µM	0,96%	0,28%	0,848		0,46%	0,27%	0,430
1µM	2,27%	0,54%	0,110		2,27%	0,12%	0,000

Tableau X. État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de 24h avant l'amputation jusqu'à MB

Concentration de LDN193189	Nombre de membres	Régénération normale/quasi normale	Description des pattes régénérées
Contrôle DMSO	12	83%	10/12 membres régénèrent parfaitement. 2/12 (sur le même animal) ont deux doigts et 1-2 os du carpe manquant.
0,2 μ M	8	88%	7/8 pattes sont régénérées parfaitement ou presque, mais il manque un os du carpe chez 2 d'entre elles (sur le même animal). 1/8 patte manque un doigt.
0,5 μ M	8	0%	1/8 patte régénère parfaitement. 5/8 pattes ne régénèrent rien. 2/8 pattes ont une régression du zeugopode
1,0 μ M	8	0%	2/8 pattes régénèrent 1-2 os du zeugopode, 1-2 os du carpe et 2 doigts plus ou moins normaux. 4/8 pattes ne régénèrent rien ou ont une faible régression des os du zeugopode. 2/8 pattes ont une régression important du zeugopode.

Tableau XI. État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de EB jusqu'à la fin de la régénération

Concentration de LDN193189	Nombre de membres	Régénération normale/quasi normale	Description des pattes régénérées
Contrôle DMSO	6	100%	6/6 membres régénèrent normalement.
0,2 μ M	8	13%	Dans 1/8 membre, il ne manque qu'un seul doigt et la partie antérieure du carpe. Dans 5/8 membres, au moins une partie de la moitié postérieure du membre est régénérée, dont 3 incluent des doigts et dont 4 ont le radius complètement absent. 1/8 membre change peu suite à l'amputation et 1/8 membre a une régression presque complète des os du zeugopode.
0,5 μ M	8	0%	Chez 2/8 membres, le radius est absent et au moins une partie de la moitié postérieure du membre est régénérée, dont 1 membre contient un doigt presque complet. 6/8 membres subissent une régression complète ou presque des os du zeugopode.
1,0 μ M	6	0%	6/6 membres ont une régression majeure des os du zeugopode.

Tableau XII. État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de **MB jusqu'à la fin de la régénération**

Concentration de LDN193189	Nombre de membres	Régénération normale/quasi normale	Description des pattes régénérées
Contrôle DMSO	6	100%	5 membres sur 6 sont complètement normaux. Chez 1/6 membre, 2 des os carpiens sont fusionnés, mais le reste du membre est complètement normal.
0,2 μ M	8	0%	Dans 5/8 membres, les deux os du zeugopode sont régénérés avec une partie du carpe, et 4 de ces membres ont une partie d'un doigt. Dans 3/8 membres, un seul os du zeugopode est complété (l'autre ne change pas suite à l'amputation) et jusqu'à 4 os carpiens.
0,5 μ M	6	0%	1/6 membre a un zeugopode complet et 4 os carpiens. 3/6 membres ont une régression mineure du zeugopode mais régénèrent 1 ou 2 os non identifiables. 2/6 membres ont une régression du radius et une absence complète du radius.
1,0 μ M	6	0%	2/6 membres régénèrent 1-2 os non-identifiables. Dans 2/6 membres, les os ne repoussent pas ou régressent légèrement. 2/6 membres ont une régression modérée ou sévère.

Tableau XIII. État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de **LB jusqu'à la fin de la régénération**

Concentration de LDN193189	Nombre de membres	Régénération normale/quasi normale	Description des pattes régénérées
Contrôle DMSO	6	83%	4/6 membres sont complètement normaux. Les deux autres (du même animal) ont soit un doigt incomplet, soit 2 doigts manquants et des anomalies dans le carpe.
0,2 μ M	8	50%	1/8 membre est complètement normal. 1/8 membre manque une partie d'un doigt. 2/8 membres (du même animal) ont la plupart des os normaux, mais certaines phalanges sont plus courtes/minces et connectées à des angles inhabituels. 4/8 ont un zeugopode complet, jusqu'à 6 os carpiens et 1-2 éléments osseux des doigts.
0,5 μ M	8	0%	2/8 membres ont un zeugopode et carpe complet, avec 3 ou 5 éléments osseux digitaux. 5/8 membres ont un zeugopode complet, 2-4 os carpiens et 1 de ces membres a un élément osseux digital. Chez 1/8 membre, les os du zeugopode ont presque complètement régressé.
1,0 μ M	8	0%	8/8 membres ont un zeugopode complet, 3-7 éléments osseux du carpe. 3 d'entre eux ont 1 élément osseux digital.

Tableau XIV. État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de **Palette jusqu'à la fin de la régénération**

Concentration de LDN193189	Nombre de membres	Régénération normale/quasi normale	Description des pattes régénérées
Contrôle DMSO	8	100%	8/8 membres sont complètement normaux
0,2 μ M	8	0%	8/8 membres ont un zeugopode complet, tous les 8 os carpiens et 2-3 doigts partiels.
0,5 μ M	7	0%	7/7 membres ont un zeugopode complet, 6-7 os carpiens et 1-3 doigts incomplets.
1,0 μ M	8	0%	8/8 membres ont un zeugopode complet, 4-8 os carpiens et 2-3 doigts incomplets

Tableau XV. État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux **amputés à travers l'humérus** - 0,5 μ M de LDN193189, débuts à différents stades

Début du traitement	Nombre de membres	Régénération normale/quasi normale	Description des pattes régénérées
EB (Contrôle DMSO)	6	100%	6/6 membres régénèrent normalement
EB	6	0%	4/6 membres régénèrent un bout de l'humérus ainsi que 1 ou 5 os ronds d'identités inconnues. 2/6 membres n'ont pas de nouvelle croissance de l'humérus, mais ont 1 morceau d'os non identifié qui régénère.
MB	6	0%	Tous les membres régénèrent une partie de l'humérus, ainsi qu'entre 2 et 6 os d'identités inconnues.
LB	6	0%	6/6 pattes ont un stylopode et zeugopode régénéré (zeugopode semble légèrement raccourci), ainsi que 4-8 os du carpe.
Pal	6	0%	6/6 pattes ont un stylopode, zeugopode et carpe régénéré normalement, 2 de ces pattes ont régénéré 1-2 métacarpe partiel.

Tableau XVI. État des membres régénérés avec le traitement au LDN193189 - Animaux traités de JPA 5 à JPA 12, rétablissement avec Fgf8

Concentration de LDN193189	Patte et type d'injection	Nombre de membres	Régénération normale/quasi normale	Description des pattes régénérées
Contrôle DMSO	Patte <u>Gauche</u> , Non-Injectée	4	75%	3/4 membres sont normaux, à part un qui manque une phalange. 1/4 membre manque 1 doigt postérieur (l'autre patte de cet animal manque un doigt).
Contrôle DMSO	Patte <u>Droite</u> , Injectée PBS	4	75%	3/4 membres sont normaux. 1/4 membre a les deux doigts postérieurs manquants (l'autre patte de cet animal manque un doigt).
0,5 µM	Patte <u>Gauche</u> , Non-Injectée	5	0%	2/5 membres ont un zeugopode complet, 5-6 os carpiens et 2 doigts complets. 1/5 membre régénère l'ulna, 1 os carpien et 1 doigt. 2/5 membres ne régénèrent rien.
0,5 µM	Patte <u>Droite</u> , Injectée PBS	5	0%	2/5 membres ont un zeugopode complet, tous les os carpiens (mais de forme anormale) et 2-3 doigts complets. 2/5 membres régénèrent l'ulna et l'un de ceux-ci régénère aussi un os carpien et un doigt. 1/5 membre ne régénère rien.
0,5 µM	Patte <u>Gauche</u> , Non-Injectée	5	20%	1/5 membre est normal. 1/5 membre a un zeugopode complet, 3 os carpiens et 2 doigts complets. 2/5 membres ont un ulna complet, un radius partiel, 2 ou 4 os carpiens et l'un d'eux a 2 doigts complets. 1/5 membre ne régénère rien.
0,5 µM	Patte <u>Droite</u> , Injectée Fgf8	5	60%	3/5 membres sont presque normaux, 2 d'entre eux ont seulement 5-6 os carpiens, 2 d'entre eux ont une jointure supplémentaire dans le doigt #2. 1/5 membre a un zeugopode complet, 5 os carpiens et 2 doigts complets. 1/5 membre ne régénère qu'un petit os non identifiable.