



**HAL**  
open science

# Prolifération au cours de la régénération de la forme bilobée de la nageoire et de la peau lépidogène chez le zébrafish

Flavien Caraguel

► **To cite this version:**

Flavien Caraguel. Prolifération au cours de la régénération de la forme bilobée de la nageoire et de la peau lépidogène chez le zébrafish. Biotechnologies. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENS043 . tel-01559350

**HAL Id: tel-01559350**

**<https://theses.hal.science/tel-01559350>**

Submitted on 10 Jul 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Flavien CARAGUEL** »

Thèse dirigée par « **Danielle DHOUILLY** »  
codirigée par « **Françoise GIROUD** »

préparée au sein du **Laboratoire AGIM**  
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**

## **Prolifération au cours de la régénération de la forme bilobée de la nageoire et de la peau lépidogène chez le zébrafish**

Thèse soutenue publiquement le « **18 décembre 2013** »,  
devant le jury composé de :

**M. Jacques DEMONGEOT**

Professeur, Université Joseph Fourier, Président

**M. Bernard COULOMB**

Chargé de recherche, Hôpital européen Georges-Pompidou, Rapporteur

**M. Jean-Yves SIRE**

Directeur de recherche, Université Pierre et Marie Curie, Rapporteur

**M. Luis ALMEIDA**

Chargé de recherche, Laboratoire Jacques-Louis Lions, Examineur

**Mme. Françoise GIROUD**

Maître de conférences, Université Joseph Fourier, Co-encadrant

**Mme. Danielle DHOUILLY**

Professeur, Université Joseph Fourier, Directeur de thèse



## Table des matières

Table des figures & tableaux.....	1
Abréviations .....	3
I. Objectifs de la thèse .....	5
II. Introduction bibliographique .....	7
A. Le processus de régénération .....	7
1. Définition.....	7
2. Espèces et différents organes concernés.....	7
3. Les différentes phases, processus cellulaires et origine des cellules impliquées .....	10
4. Les principales voies de signalisation impliquées.....	13
5. Le poisson zèbre en tant que modèle.....	24
B. La régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre .....	27
1. La cicatrisation (0-1 jour post-amputation (jpa)) .....	27
2. La formation du blastème (1-2jpa) .....	29
3. La repousse (2-15jpa) .....	30
4. Rétablissement de la forme bilobée.....	33
C. La cicatrisation du tégument .....	34
1. Structure du tégument des vertébrés.....	34
a) La structure de la peau .....	35
b) La structure de la cornée .....	38
c) Les annexes cutanées .....	40
2. La formation embryonnaire du tégument .....	42
3. La cicatrisation du tégument chez les mammifères.....	49
4. La cicatrisation de la cornée chez les mammifères .....	56
5. La cicatrisation de la peau du poisson zèbre .....	59
III. Matériel et méthodes .....	62
IV. Résultats .....	67
A. Régénération de la nageoire caudale.....	67
1. La conservation de la forme : étude de la prolifération après la mise en place du blastème .....	67
a) Introduction.....	67
b) Résultats.....	69

c) Conclusion .....	69
2. Impact du vieillissement sur la régénération .....	74
a) Introduction.....	74
b) Résultats.....	74
c) Conclusion .....	75
3. Caractérisation de la voie Hippo dans le processus de régénération .....	76
a) Introduction.....	76
b) Résultats.....	76
c) Conclusion .....	79
B. La cicatrisation .....	82
1. Caractérisation de la cinétique de cicatrisation et impact du vieillissement. ....	82
a) Introduction.....	82
b) Résultats.....	85
c) Conclusion .....	93
V. Discussion générale et perspectives.....	100

La régénération de la nageoire caudale et de la peau chez le poisson zèbre impliquent la formation d'un tissu de remplacement, structurellement et fonctionnellement identique à celui précédant la lésion. Ces mécanismes nécessitent la mise en place et la prolifération de cellules progénitrices, capables de reformer lors d'une phase de « patterning » les tissus lésés.

Au cours de ma thèse j'ai étudié les événements prolifératifs qui permettent cette néo-formation des tissus. Dans le cas de la nageoire, mes travaux ont conduit à la mise en évidence d'un mécanisme commun entre régénération et développement de croissance saltatoire des segments osseux. Ils expliquent en partie le retour à la forme bilobée observée lors de la repousse. De la même façon, dans le cas de la peau, l'avènement de la prolifération dans le derme et dans l'épiderme précède la mise en place des signaux, communs au développement, requis pour la distribution et la formation des écailles.

De plus, j'ai effectué une caractérisation précise de l'ensemble du processus cicatriciel chez le poisson zèbre, conduisant à la formation d'une peau intégralement régénérée. Au cours de la cicatrisation, la fermeture de la blessure est complétée rapidement en quelques heures par migration épidermique. Une fois la zone lésée fermée, un mécanisme de morphogénèse de la peau est réactivé chez l'adulte. La prolifération cellulaire est présente simultanément dans le derme et l'épiderme. Elle n'est déclenchée qu'après la mise en place de l'assise basale de l'épiderme. Dans celui-ci, elle affecte d'une part des cellules éparses au sein de la couche basale et d'autre part la majorité des cellules de la couche intermédiaire. Ces derniers travaux suggèrent que chez les téléostéens, les cellules souches épidermiques sont localisées dans la couche basale, alors que la prolifération des cellules transientes a lieu dans la couche intermédiaire. D'autre part, ils mettent en évidence un processus commun de cicatrisation rapide en milieu liquide impliquant une fermeture de la blessure par néo-épithélialisation, semblable au cas de la cornée et de la muqueuse orale chez les mammifères.

Caudal fin and skin regeneration in zebrafish both require new tissues formation, structurally and functionally identical to the former ones. They imply the formation and especially the proliferation of progenitor cells, and then during a patterning phase, they differentiate into a well-organized structure.

During my PhD, I have studied in zebrafish model the proliferative events that conduct to the neoformation of caudal fin in one hand and the proliferative events implicated in the cutaneous wound healing in the other hand.

The first part of this work supports the evidences of a common saltatory growth mechanism in both regeneration and development of caudal fin bony rays, and that the bi-lobed shape restoration of the fin could be a consequence of this bony segment salutary growth.

During skin wound healing, proliferation is necessary in order to allow dermis and epidermis neo-morphogenesis and these events are over before the scale formation is initiated. In the second part of this study I characterized the entire skin wound healing process in the zebrafish model, from the wound closure to a fully regenerated skin including appendages. According to my results, the wound closure is a very fast event completed only in a few hours and it occurs only by epidermal cells migration. Cellular proliferation was detected after complete wound closure and once the epidermal basal layer differentiation is achieved. Cell proliferation appears to be restricted to a few basal cells whereas the major proliferation is detected in the intermediates layers of the epidermis.

Taken together, these results suggest that in teleosteans, the epidermal stem cells and transient cells might be respectively located in the basal and intermediate layers. Moreover, there might be a common process due to aquatic environment, leading to a fast wound closure by re-epithelialization, between teleost skin and mammal's cornea as well as oral mucosa.



## Table des figures & tableaux

### Introduction bibliographique :

Figure 1 : la régénération est un processus très conservé dans le règne animal. ....	11
Figure 2 : Voies de signalisation médiées par les Wnts. ....	14
Figure 3 : Voies de signalisations médiées par le FGF. ....	16
Figure 4: Voies de signalisation médiées par les BMPs.....	17
Figure 5 : Voie de signalisations médiées par l'Ectodysplasine. ....	19
Figure 6 : Voie de signalisation mediee par les proteines Hedgehog chez la Drosophile. ....	20
Figure 7 : La voie hippo (hpo) est au cœur de la régulation de la croissance des organes. ....	22
Figure 8 : La voie de signalisation Hippo. ....	23
Figure 9: Le poisson zèbre est aujourd'hui largement utilisé comme modèle dans le domaine de la biologie moléculaire. ....	25
Figure 10 : Le modèle poisson zèbre est également utilisé dans l'étude du développement tumoral. ..	26
Figure 11 : La régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre. ....	28
Figure 12 : Expression spatiotemporelle des principaux régulateurs impliqués lors de la phase de repousse de la nageoire.....	32
Figure 13 : Comparaison de la peau de mammifère et de téléostéen. ....	36
Figure 14 : Comparaison de la structure de la cornée chez les téléostéens et les mammifères. ....	39
Figure 15 : Les annexes cutanées chez les mammifères et les téléostéens.....	41
Figure 16 : le développement de la peau chez le poisson zèbre. ....	43
Figure 17: Le développement de l'unité pilosébacée de mammifère et de l'écaille de téléostéen. ....	45
Figure 18: Exemples de voies de signalisation identiques impliquées lors de l'initiation de la formation du poil et de l'écaille. ....	48
Figure 19 : la cicatrisation de la peau chez les mammifères. ....	50
Figure 20 : Origine des cellules lors de la re-épithélialisation chez les mammifères.....	53
Figure 21 : La cicatrisation de la cornée chez les mammifères.....	57
Figure 22 : La re-épithélialisation de la blessure chez le poisson zèbre.....	60

### Résultats :

Figure 23 : La capacité de régénération n'est impactée ni par les amputations répétées ni par le vieillissement.....	68
Figure 24 : Aire de comptage de cellules marquées par le BrdU au cours de la repousse des segments osseux de la nageoire de poisson zèbre. ....	70
Tableau 1: Les indices de prolifération sont soumis à variation au cours du temps et en fonction de la zone de la nageoire considérée.....	71
Figure 25 : Lors de la régénération de la nageoire de poisson zèbre, la croissance osseuse est saltatoire. ....	72
Figure 26 : Le gène Yap est transcrit chez le poisson zèbre, chez l'embryon et chez l'adulte, dans la nageoire intacte et en cours de régénération.....	78
Figure 27 : Chez l'embryon de poisson zèbre, la protéine Yap est localisée exclusivement dans l'épiderme.....	80
Figure 28 : Localisation de Yap pendant la phase de formation de coiffe épithéliale de la nageoire en régénération du poisson zèbre. ....	81
Figure 29 : les différentes phases de la cicatrisation de la peau de poisson zèbre .....	84



Figure 30 : La blessure induite chez le poisson zèbre par une découpe d'un carré de l'épaisseur totale de la peau (derme et épiderme) de 2 mm de côté est rapidement refermée.....	86
Figure 31 : La formation du néoépiderme primaire a lieu par migration des cellules épidermiques du bord de la blessure alors que la surimposition des couches suivantes pourrait avoir une origine plus périphérique.....	88
Figure 32 : La stratification épidermique au cours de la cicatrisation.....	89
Figure 33 : Evolution du compartiment sous épidermique : de la phase inflammatoire à la mise en place du derme. ....	91
Figure 34 : La fin du processus cicatriciel abouti à une régénération totale de la peau avec ces écailles .....	92
Figure 35 : La fermeture de la blessure de la peau de poisson zèbre est retardée par le vieillissement	94
Figure 36 : Schéma des différentes phases du processus cicatriciel conduisant à la formation d'une peau normale chez le poisson zèbre. ....	95

## Abréviations

AEC	<b>A</b> pical <b>e</b> pidermal <b>c</b> ap
APC	<b>A</b> denomatosis <b>p</b> olyposis <b>c</b> oli
bGFG	<b>B</b> asic <b>f</b> ibroblast <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
BMP	<b>B</b> one <b>m</b> orphogenetic <b>p</b> rotein
BrdU	<b>B</b> romodeoxy <b>u</b> ridine
DKK1	<b>D</b> ickkopf-related protein 1
Dsh	<b>D</b> ishevelled
EDA	<b>E</b> ctodysplasin
EDAr	<b>E</b> ctodysplasin <b>r</b> eceptor
EGF	<b>E</b> pidermal <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
ENU	<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -nitrosourea
ExDAF	<b>E</b> xtradomain <b>A</b> de la <b>f</b> ibronectine
FGF	<b>F</b> ibroblast <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
FGFr	<b>F</b> ibroblast <b>g</b> rowth <b>f</b> actor <b>r</b> eceptor
HED	Hypohidrotic ectodermal dysplasia
Hh	<b>H</b> edgehog
HIF	<b>H</b> ypoxia-inducible <b>f</b> actor
HPA	<b>H</b> eur(e)s <b>p</b> ost- <b>a</b> mputation
HPB	<b>H</b> eur(e)s <b>p</b> ost- <b>b</b> lessure
HPF	<b>H</b> eur(e)s <b>p</b> ost- <b>f</b> écondation
hsp70	<b>70</b> kilodalton <b>h</b> eat <b>s</b> hock <b>p</b> roteins
HSPG	<b>H</b> eparan sulfate <b>p</b> roteoglycan
IGF	<b>I</b> nsulin-like <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
IL	<b>I</b> nter <b>l</b> eukine
JPA	<b>J</b> our(s) <b>p</b> ost- <b>a</b> mputation
JPB	<b>J</b> our(s) <b>p</b> ost- <b>a</b> mputation

JPF	<b>J</b> our(s) <b>p</b> ost-fécondation
KGF	<b>K</b> eratinocyte <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
LEF	<b>L</b> ymphoid <b>e</b> nhancer <b>f</b> actor
LRP	<b>L</b> ipoprotein <b>r</b> eceptor-related <b>p</b> roteins
MiR	<b>M</b> icro <b>R</b> NA
MMP	<b>M</b> atrix <b>m</b> etalloproteinase
Mst	<b>M</b> ammalian <b>S</b> TE20-like kinase
NGF	<b>N</b> erve <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
PCR	<b>P</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction
PDGF	<b>P</b> latelet- <b>d</b> erived <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
PFA	<b>P</b> araformaldehyde
Ptc	<b>P</b> atched
RASSF	<b>R</b> as <b>a</b> ssociation domain <b>f</b> amily
RT-PCR	<b>R</b> everse <b>t</b> ranscriptase <b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction
SAV	<b>S</b> alvador
Shh	<b>S</b> onic <b>h</b> edgehog
SPL	<b>S</b> cale <b>p</b> ocket <b>l</b> ine
TAZ	<b>T</b> ranscriptional co- <b>a</b> ctivator with <b>P</b> D <b>Z</b> -binding motif
TCF	<b>T</b> -cell <b>f</b> actor
TERT	<b>T</b> elomerase <b>r</b> everse <b>t</b> ranscriptase
TGF	<b>T</b> ransforming <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
TNF	<b>T</b> umor <b>n</b> ecrosis <b>f</b> actor
TRBP	<b>T</b> ransactivating response <b>R</b> NA- <b>b</b> inding <b>p</b> rotein
TUNEL	<b>T</b> erminal deoxynucleotidyl transferase d <b>U</b> TP <b>n</b> ick <b>e</b> nd <b>l</b> abeling
VEGF	<b>V</b> ascular <b>e</b> ndothelial <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
Wnt	<b>W</b> ingless <b>t</b> ype
YAP	<b>Y</b> es <b>a</b> ssociated <b>p</b> rotein

## I. Objectifs de la thèse

La régénération est un phénomène relativement marginal dans l'espèce humaine. En dehors de l'exemple bien connu du foie, de nombreux organes sont incapables de régénérer pour conserver l'intégralité de leur fonctionnalité. Ainsi on observe un intérêt grandissant pour la recherche de nouvelles thérapies de médecine régénérative. Deux axes principaux sont actuellement développés autour de ce thème : l'étude des cellules souches et de leur mécanisme de différenciation, et l'étude de modèles biologiques capables de régénérer. Cette dernière approche présente l'avantage de pouvoir observer et caractériser le processus régénératif dans son ensemble, en englobant à la fois les mécanismes en jeu, tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, et les voies de signalisation qui les gouvernent.

L'objectif initial de cette thèse était l'étude de l'impact potentiel de la sénescence sur la régénération de la nageoire caudale de poisson zèbre. Le vieillissement est responsable de nombreux troubles fonctionnels dans les organes d'un individu, et impacte également les mécanismes de réparation et de prolifération cellulaire. Une des causes généralement admise du vieillissement est l'accumulation de dégât à l'ADN, pouvant notamment induire le développement de cancers. Le processus de régénération nécessite une importante multiplication cellulaire, impliquant un contrôle strict de la prolifération. Ainsi, il était naturel de s'interroger une éventuelle altération de la capacité à régénérer chez le poisson zèbre vieillissant.

Le contrôle de la prolifération cellulaire observé lors de la régénération de la nageoire est également intimement lié au contrôle de la forme. De ce fait, parallèlement à l'étude de la sénescence sur la régénération de la nageoire, j'ai réalisé l'étude de la prolifération lors de la phase de repousse de la nageoire et sa contribution à la restauration de la forme bilobée de celle-ci après amputation.

Lors de mon travail j'ai pu observer que l'âge n'avait aucun effet sur la capacité de régénération mais qu'il pouvait induire un ralentissement, la forme finale de la nageoire n'étant cependant pas modifiée. Malheureusement, des résultats semblables ont été publiés par deux autres équipes (Azevedo *et al.*, 2011; Itou *et al.*, 2012). Nous avons alors décidé de recentrer mon objectif de thèse.

La cicatrisation est l'étape initiale de toute régénération. Chez la plupart des mammifères, le processus cicatriciel ne permet pas l'aboutissement à un tissu de réparation semblable au tissu initial, on observe ainsi la formation d'une cicatrice fibreuse. De plus, les différents problèmes liés à la cicatrisation dans la population humaine sénior sont indéniables. Les dysfonctionnements observés sont généralement une augmentation du risque de blessure, un retard dans la re-épithélialisation et dans le dépôt de matrice extracellulaire ainsi que le développement de blessures chroniques.

La nageoire du poisson zèbre est une structure très fine d'environ 100µm d'épaisseur. Dans cette structure, la cicatrisation est un phénomène très rapide et donc difficilement analysable. Afin de pouvoir l'étudier, j'ai réalisé des plaies de 4mm<sup>2</sup> sur les flancs du poisson. J'ai pu déterminer les rôles respectifs de la prolifération et de la migration cellulaire lors de fermeture de la blessure et de la régénération de la peau, comprenant la néoformation de l'épiderme et du derme. J'ai pu ainsi comparer la cicatrisation de la peau chez le poisson zèbre, qui aboutit à une peau recouverte d'écailles, à celle de la peau humaine qui produit une cicatrice dépourvue d'annexes cutanées.

## **II. Introduction bibliographique**

### **A. Le processus de régénération**

#### **1. Définition**

Le processus de régénération est induit par une blessure et désigne l'ensemble des événements conduisant à la restauration d'un organe présentant un état structurel et fonctionnel identique à la condition initiale. La régénération correspond donc à un processus de morphogénèse post-embryonnaire. Ces événements sont régis par un ensemble de voies de signalisation qui interviennent lors du développement embryonnaire, établi chez la *Drosophile*, puis chez les vertébrés (Pires-daSilva et Sommer, 2003).

#### **2. Espèces et différents organes concernés**

La plupart des espèces possèdent la faculté de régénération, de façon plus ou moins complète (Fig. 1, A). Chez l'Homme, cette propriété est présente lors de la phase de développement prénatal mais disparaît à l'âge adulte, à l'exception du foie (Colwell *et al.*, 2003). Parmi les espèces présentant les capacités régénératrices les plus impressionnantes on compte les représentants des groupes des cnidaires, avec l'exemple de l'hydre (Galliot, 2012) et des plathelminthes. Les planaires asexuées se reproduisant par fission, la régénération fait partie de leur cycle de vie ; chez les planaires sexuées, la transplantation d'un seul néoblaste chez un hôte irradié permet de remplacer l'ensemble des cellules de l'individu (Knapp et Tanaka, 2012). Certains chordés affichent un potentiel régénératif moindre, mais tout aussi impressionnant, en dépit de la complexité plus importante de leurs organismes. Les premières études portèrent sur des amphibiens urodèles, capables de régénérer des membres complets, à partir d'un moignon, ou le cristallin, à partir de cellules de l'iris (Brockes et Kumar, 2008).

**La régénération des membres** a été particulièrement étudiée. C'est un processus dit épimorphique, qui nécessite la mise en place d'un blastème, une masse de cellules indifférenciées, semblable au bourgeon de membre chez l'embryon et qui permet la repousse complète du membre amputé. Cette régénération implique trois phases distinctes : la cicatrisation, la mise en place d'un blastème, puis la repousse de la structure proprement dite. Ces trois étapes séquentielles sont indispensables à la régénération complète d'un organe. En effet, on ne peut l'observer si l'une de ces 3 étapes est altérée. La cicatrisation est le préambule indispensable à l'initiation de la régénération. C'est un phénomène rapide qui se déroule généralement en quelques heures et ne fait pas intervenir de prolifération cellulaire. Le blastème formé après la cicatrisation est constitué d'une masse cellulaire mésenchymateuse qui prolifère et assure ainsi une source de cellules progénitrices. Ces cellules expriment bon nombre de facteurs de croissance et de transcription. La phase d'organisation qui suit la mise en place du blastème permet la repousse proprement dite de l'organe ; les cellules migrent et se différencient pour restaurer l'intégrité de la structure en cours de régénération.

**Lors d'un infarctus** on observe chez la plupart des espèces une réparation de la lésion du cœur par une cicatrice composée de tissu fibreux riche en collagène. Cela permet au cœur de continuer d'assurer sa fonction, mais entraîne une baisse de la capacité cardiaque et peut conduire à une arythmie.

Les tritons sont les seuls vertébrés avec les téléostéens capables de **régénérer le cristallin** à l'âge adulte. L'évènement responsable du déclenchement de cette régénération est la réponse immunitaire spontanée (une ablation de la rate empêche toute régénération du cristallin). Lors d'une blessure du cristallin chez le triton, la zone lésée est enveloppée puis détruite par le système immunitaire. Un nouveau cristallin est néoformé directement à partir de cellules de l'iris dorsal. Ces cellules se dédifférencient, perdent leurs pigments, prolifèrent, reforment la vésicule du cristallin, et se redifférencient ensuite en cellules du cristallin (Tsonis *et al.*, 2004).

**La régénération de la rétine** est possible au cours du développement chez de nombreuses espèces telles que les mammifères, les oiseaux, les poissons et les amphibiens. A ce jour, on ne connaît que certains urodèles capables de reformer leur rétine neurale à partir des cellules pigmentées de la rétine après lésion à l'âge adulte. Les autres individus concernés (oiseaux, poissons et amphibiens) ne régénèrent que partiellement la rétine (Del Rio-Tsonis et Tsonis, 2003).

**Le muscle squelettique** est capable de régénérer après une blessure d'origine mécanique ou pathologique. Ce processus comporte deux grandes étapes. En premier lieu, on observe une phase dégénérative caractérisée par la nécrose des tissus endommagés et la mise en place de la réponse inflammatoire. Ensuite, la phase de réparation débute par la phagocytose des débris nécrotiques. Les cellules satellites, des cellules souches musculaires localisées sous la lame basale des fibres musculaires, suite à leur activation consécutive à la blessure, prolifèrent puis se différencient en myoblastes. Les myoblastes nouvellement formés fusionnent ensuite entre eux (ce mécanisme est identique chez l'embryon), ou avec des myofibres endommagées, pour reformer des myofibres fonctionnelles (Chargé et Rudnicki, 2004).

**La peau** est l'organe qui recouvre l'ensemble du corps et forme la zone de contact avec l'environnement ; elle est formée de deux tissus, l'épiderme et le derme et comporte des annexes cutanées. Elle est naturellement soumise à un ensemble de contraintes et d'abrasions qui impliquent l'existence de mécanismes de réparation en cas de lésion, et un renouvellement perpétuel (homéostasie) des tissus et annexes qui la composent. Après une lésion profonde de la peau, on observe chez les mammifères la formation d'un caillot sanguin suivie de la ré-épithélialisation de la zone blessée après la mise en place d'une matrice provisoire qui assure le rôle de support de migration des cellules épithéliales. Le processus de réparation conduit dans l'espèce humaine à la formation d'une cicatrice qui ne comporte ni poils ni glandes. Il s'agit donc d'un processus de réparation interrompu, aboutissant à la fermeture de la plaie, sans reconstitution intégrale de l'organe.



A partir des années 80, l'intérêt s'est porté sur le **danio rerio**, communément appelé **poisson zèbre**, capable de régénérer bon nombre d'organes. Il est à ce jour l'exemple le plus frappant d'une régénération cardiaque parfaite. Après avoir formé un caillot puis un tissu fibreux pour combler la blessure, la zone lésée est entièrement repeuplée par des cardiomyocytes, contrairement aux autres vertébrés, y compris les urodèles, chez lesquels le processus de réparation implique la mise en place d'un tissu fibreux pour remplacer les cardiomyocytes perdus (Poss *et al.*, 2002). Le poisson zèbre est capable de régénérer l'ensemble de son apex ventriculaire après une amputation de 20%. A la suite de la lésion, un caillot sanguin est rapidement formé. Il permet au cœur de continuer à fonctionner, un dépôt de fibrine est produit, mais on n'observe pas de formation de cicatrice : les cardiomyocytes se dédifférencient et prolifèrent à nouveau (Poss, 2007). Cette dédifférenciation n'est pas limitée aux cellules en bordure de la blessure, elles sont recrutées dans l'ensemble de l'organe (Jopling *et al.*, 2010). Tous les cardiomyocytes perdus sont remplacés et le cœur récupère l'ensemble de son potentiel fonctionnel.

Les études les plus nombreuses concernant la régénération chez le poisson zèbre ont porté sur la régénération de la **nageoire caudale** : 134 articles parus durant les dix dernières années. Dans cette revue bibliographique, elle fait l'objet d'un chapitre entier (**B La régénération de la nageoire caudale de poisson zèbre**, page 27.)

### **3. Les différentes phases, processus cellulaires et origine des cellules impliquées**

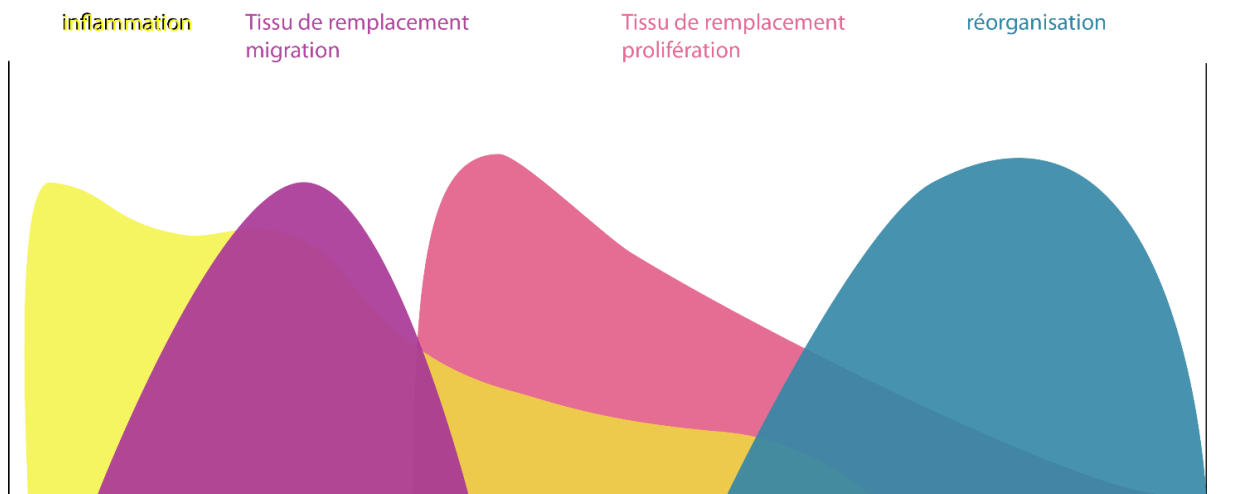
A la suite d'une blessure, le premier évènement mis en place est le rétablissement de l'intégrité de la barrière détruite par la lésion. Selon l'organe concerné, cette fermeture est assurée par une migration de cellules épithéliales (Brockes et Kumar, 2008) ou la mise en place d'un caillot sanguin. A la suite de cela, l'organe est intégralement reformé (dans le cas de la régénération) ou bien la lésion est comblée par une formation de tissus fibreux.

Cette réparation s'organise, de façon générale, en trois phases : l'inflammation, la formation d'un tissu de remplacement, puis sa réorganisation (Fig. 1). Après une première phase

**A**



**B**



**Figure 1 : la régénération est un processus très conservé dans le règne animal.**

De nombreuses espèces possèdent la faculté de régénération, de façon plus ou moins complète **(A)**. Dans la plupart des cas le processus de régénération implique une inflammation, une mise en place d'un tissu de remplacement, puis sa réorganisation pour aboutir à la mise en place d'un nouvel organe structurellement et fonctionnellement identique au précédent **(B)**.

inflammatoire, la néo-synthèse du tissu est assurée par la migration, puis la prolifération de cellules progénitrices formant un blastème, et leur différenciation pendant la phase de réorganisation. La migration cellulaire implique un changement de conformation au niveau des jonctions cellulaires ainsi que des protéines du cytosquelette. Toute cellule qui migre ne peut en même temps proliférer, ces deux phénomènes sont donc toujours séparés dans le temps. Plusieurs hypothèses existent quant à l'origine de ces cellules. Elles peuvent être la résultante d'une activation des cellules souches préexistantes ou d'un processus de dédifférenciation cellulaire, permettant le retour à l'état de cellules souches, ou résulter des deux processus, de manière complémentaire (Knapp et Tanaka, 2012). L'hypothèse actuellement privilégiée pour la formation du blastème est celle de la dédifférenciation cellulaire. Lors d'une dédifférenciation cellulaire, les cellules perdent leurs caractéristiques de cellules adultes. L'expression de protéines clés et la structure cellulaire sont modifiées, entraînant souvent un arrêt de progression dans le cycle cellulaire ainsi qu'une désorganisation tissulaire (Stewart et Stankunas, 2012). Cette dédifférenciation, suivie d'une re-différenciation pose le problème de la continuité ou non des lignages. Les études montrent qu'en général on observe une dédifférenciation partielle, les cellules ne reviennent pas à un stade complètement dédifférencié capable de donner n'importe quel type cellulaire, mais sont restreintes à certain(s) lignage(s). Dans le cas de la transdifférenciation, le passage vers un lignage totalement différent du point de vue des trois feuilletts embryonnaires serait possible. On observerait alors une différenciation en un autre type cellulaire en passant par un stade intermédiaire totalement dédifférencié (Tsonis *et al.*, 2004). Enfin, une troisième et dernière phase de remodelage prend place lorsque les tissus se réorganisent pour reformer un organe. Selon le type de structure lésée, les acteurs moléculaires et les mécanismes qui conduisent à la régénération varient, mais ces trois étapes sont conservées quel que soit le tissu ou l'organe atteint.

Les voies de signalisation qui gouvernent bon nombre des processus embryonnaires se retrouvent impliquées au cours de la régénération, je présente ci-après les principales.

#### 4. Les principales voies de signalisation impliquées

Tout processus de réparation d'un tissu requiert la production de nouvelles cellules, donc l'intervention de la prolifération. La reconstruction d'un organe nécessite des interactions cellulaires entre les différents tissus qui le constituent. Ces deux processus dépendent souvent de voies similaires, dont l'action a été bien caractérisée au cours de l'embryogenèse.

**Les voies Wnts** sont connues pour être à la base de la formation de la peau chez l'embryon (Olivera-Martinez *et al.*, 2004) et sont également impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire pendant la cicatrisation et la régénération. Les molécules de la famille Wnt sont des protéines sécrétées. Leurs récepteurs constituent la famille des Frizzled. Trois voies de signalisation Wnt sont connues (Fig. 2) : la voie canonique, médiée par la  $\beta$ -caténine, la voie calcique, impliquant des protéines calcium dépendantes, et la voie de polarité planaire médiée par les jun kinases. La voie la plus classique est la voie canonique. La  $\beta$ -caténine, principal acteur de cette voie joue un double rôle dans la cellule. En tant que composant des jonctions adhérentes, cette protéine s'associe au domaine intracellulaire de la E-cadhérine et remplit également le rôle de facteur de transcription nucléaire (Aberle *et al.*, 1994; McCrea *et al.*, 1991). Tant que la voie Wnt est inactive, la  $\beta$ -caténine libre, localisée dans le cytoplasme, s'associe avec le complexe APC phosphorylé/GSK-3, complexe qui est ensuite dégradé par le protéasome. L'activation de la voie par la fixation des ligands Wnt à leurs récepteurs entraîne l'inhibition de la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Dsh inhibe la GSK-3 responsable de la phosphorylation et de la dégradation de la  $\beta$ -caténine, ce qui conduit à une accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, et permet sa translocation nucléaire. La  $\beta$ -caténine forme alors un complexe transcriptionnel avec les facteurs T-cell Factor (TCF) et Lymphoid Enhancer Factor (LEF). Ce complexe hétérodimérique stimule la transcription des gènes cibles de la voie. Notons que la  $\beta$ -caténine peut également être activée par des mécanismes indépendants des Wnt (Papkoff, 1997; Papkoff et Aikawa, 1998). Parmi les principaux gènes cibles on peut citer c-myc, Cyclin D, Tcf-1 LEF1, c-jun, MMP-7 (pour une liste complète voir [http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target\\_genes](http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes)).

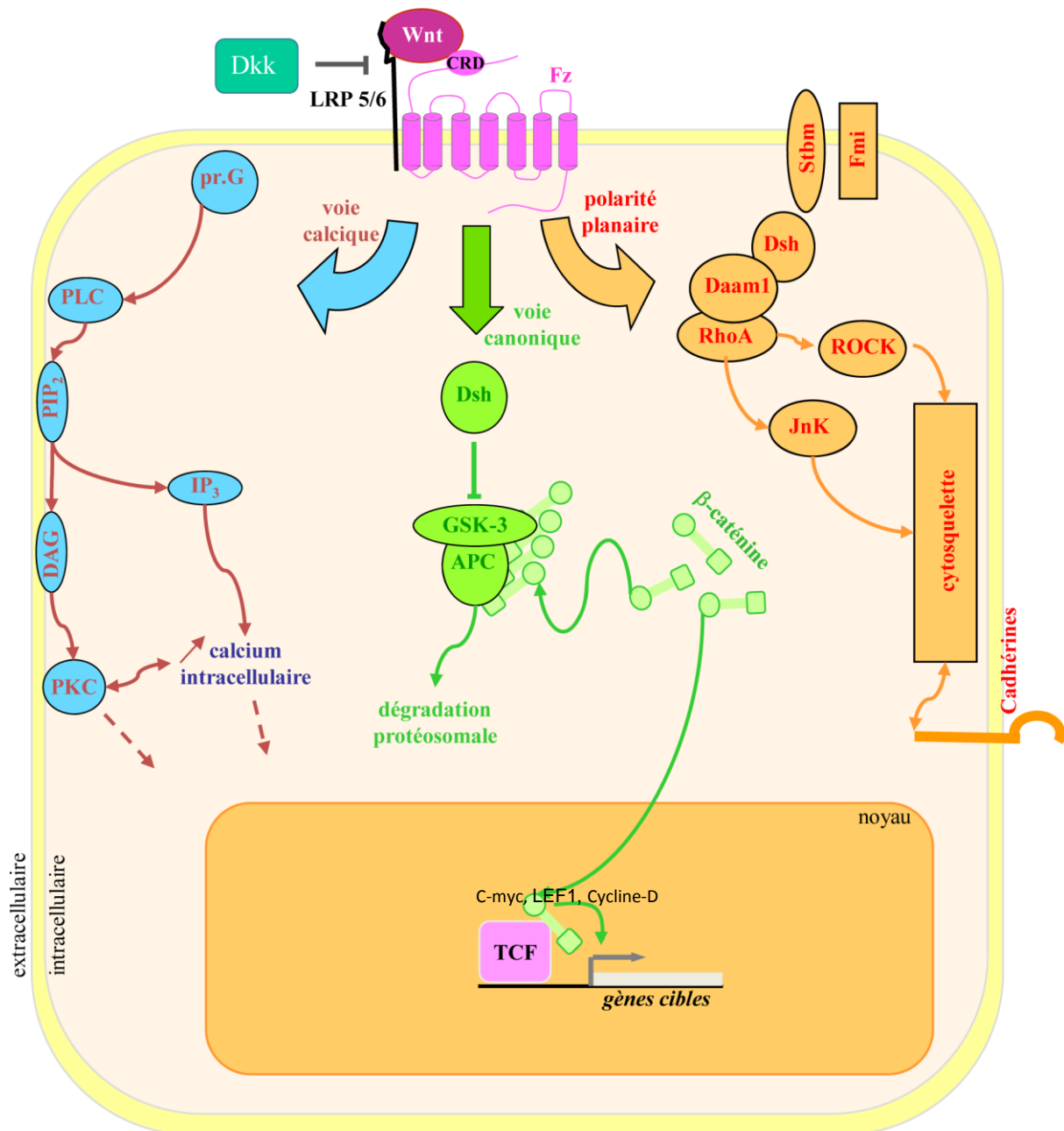
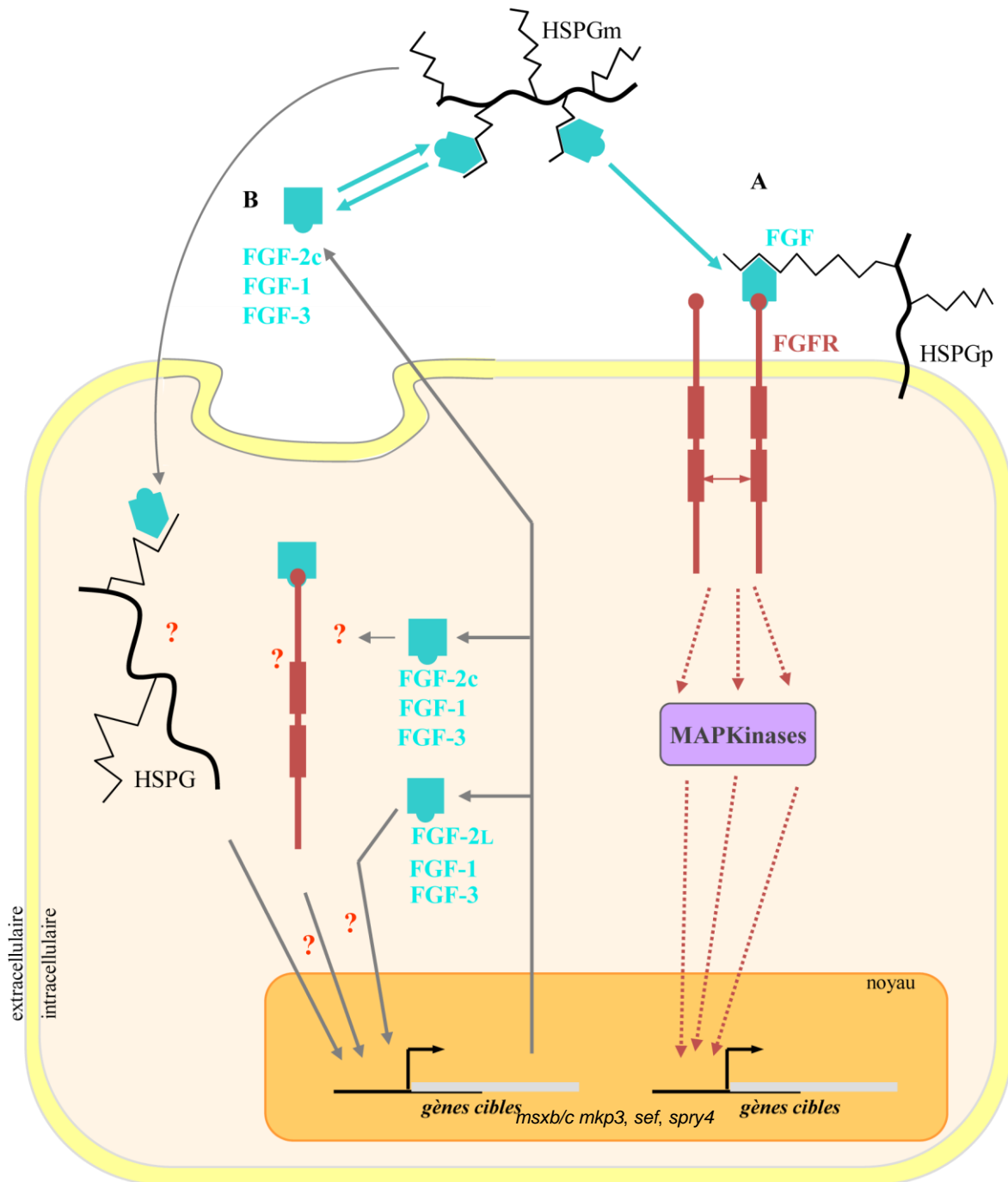


Figure 2 : Voies de signalisation médiées par les Wnts.

- **La voie canonique.** Sans activation du récepteur Frizzled (Fz), la Glycogène Synthase Kinase-3 (GSK-3) phosphoryle la  $\beta$ -caténine et un complexe  $\beta$ -caténine phosphorylée/GSK-3/APC se forme qui est dégradé par voie protéosomale. La fixation d'une protéine Wnt au récepteur Fz, sur le Cystein-Rich Domain (CRD) et au co-récepteur LRP active la protéine Dishevelled (Dsh) qui inhibe GSK-3. La  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme et peut être transloquée vers le noyau où elle s'associe au TCell Factor (TCF), ce complexe joue un rôle actif sur la transcription.
- **La voie calcique.** Les récepteurs Fz, peuvent aussi activer une protéine G à laquelle ils sont associés. Celle-ci active la Phospholipase C (PLC), à l'aide de messagers secondaires (IP<sub>3</sub>, inositol triphosphate, DAG, diacylglycérol PKC, protéine kinase C) la concentration calcique intracellulaire augmentera fortement, modifiant le transcriptome et le comportement cellulaires.
- **La polarité planaire cellulaire (PCP).** Les récepteurs Fz peuvent aussi activer la formation d'un complexe Dsh/Daam1/RhoA qui pourra interagir directement sur les protéines dites «Cadherin-like» telles que Strabismus (Stbm) ou Flamingo (Fmi) ainsi qu'avec le cytosquelette par le biais de RhoA ou des Jun Kinases (JnK).
- **Parmi les principaux gènes cibles,** C-myc et Cycline-D, tous deux nécessaires à la prolifération, ainsi que lef1, sont impliqués dans les processus de morphogenèse et de régénération (Gamba 2010, Stoick-Cooper 2007).

**Les voies FGFs** (Fig. 3) sont impliquées notamment dans la formation des bourgeons de membre (Fallon *et al.*, 1994; Niswander *et al.*, 1993; Sun *et al.*, 2002) et la formation des condensations dermiques du poil (Huh *et al.*, 2013; Viallet *et al.*, 1998). Les protéines FGF appartiennent à une grande famille de peptides sécrétés qui induisent la dimérisation et l'activation du récepteur tyrosine kinase auquel ils se lient. Cette activation induit l'autophosphorylation intra-moléculaire et/ou intermoléculaire de plusieurs de leurs résidus tyrosine, cela permet l'association aux récepteurs ou la phosphorylation directe de plusieurs protéines effectrices. L'activité des FGFs est régulée par la présence de protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG) associés à la matrice extracellulaire ou à la membrane (Lin *et al.*, 1999). Les HSPG ont une grande capacité de fixation aux FGFs et à leurs récepteurs (Fig. 3). Les HSPG associés à la matrice jouent un rôle de stockage des FGFs, en ne procédant à leur libération qu'après un clivage protéolytique, tandis que les HSPG associés à la membrane plasmique facilitent les interactions ligand-récepteurs, assurant alors un rôle de cofacteurs.

Les protéines de la famille « **Bone Morphogenetic Proteins** » (**BMPs**) ont d'abord été identifiées par leur implication dans la formation ectopique d'os et de cartilage. A l'exception de BMP1, tous les BMPs font partie de la superfamille des « transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Chez les vertébrés, les BMPs jouent un rôle dans la régionalisation dorso-ventrale du mésoderme embryonnaire et dans la spécification de l'épiderme (Harland et Gerhart, 1997; Hemmati-Brivanlou et Thomsen, 1995). Ils sont également impliqués dans le développement du membre, des dents, des poils et des plumes ainsi que dans la régulation de l'apoptose (Hogan, 1996). La famille des TGF-Beta est subdivisée en trois grands groupes : Les TGF-Beta, les activines et les BMPs. La transduction des signaux TGF-Beta implique les récepteurs transmembranaires sérine/thréonine kinase de type I et II. Les TGF-Betas se lient au récepteur de type II, ils permettent le recrutement du récepteur de type I, ce qui entraîne la formation d'un complexe ternaire. Les Smads peuvent être classés en deux familles : les Smad2, Smad3 qui transduisent les signaux des TGF-Betas et des activines, et les Smad1, 5 et 8 qui transduisent les signaux BMPs. La transduction du signal (Fig. 4) est ensuite assurée par la phosphorylation, médiée par le récepteur de type II, de résidus sérine et thréonine du domaine intracellulaire GS du récepteur de type I (Wrana *et al.*, 1994). Le récepteur de type I peut alors à son tour phosphoryler des protéines de la famille Smad, les R-Smads (Receptor-regulated Smads). Après leur activation, les R-Smads sont libérés du récepteur et interagissent avec



**Figure 3 : Voies de signalisations médiées par le FGF** (Modifié d'après Blanquet, 1995).

- **Activation indirecte.** Les HSPGp stockent et déstockent les FGFs. Les HSPG pourraient agir en modifiant la conformation des FGFs. Cette activation peut entraîner l'activation d'une ou plusieurs cascades interdépendantes de transmission du signal et de messagers secondaires comprenant les MAPKinases (A).
- **Activation directe.** Certaines formes de FGFs sont sécrétées, d'autres restent dans le cytoplasme et agissent sur des cibles inconnues. Certaines formes sont directement transférées dans le noyau. Les formes extracellulaires sont, soit stockées par les HSPGm, soit internalisées, probablement par les FGFR et les HSPG, et transportées dans le noyau (B).
- **Parmi les principaux gènes cibles,** msxb et msxc ont été montrés comme impliqués dans les processus de morphogenèse et de régénération (Poss 2000).

*FGF-2c, forme courte du FGF-2 ; FGF-2L, forme longue du FGF-2 ; HSPGm, protéoglycannes à sulfate d'héparane de la matrice extracellulaire ; HSPGp, protéoglycannes à sulfate d'héparane membranaires.*

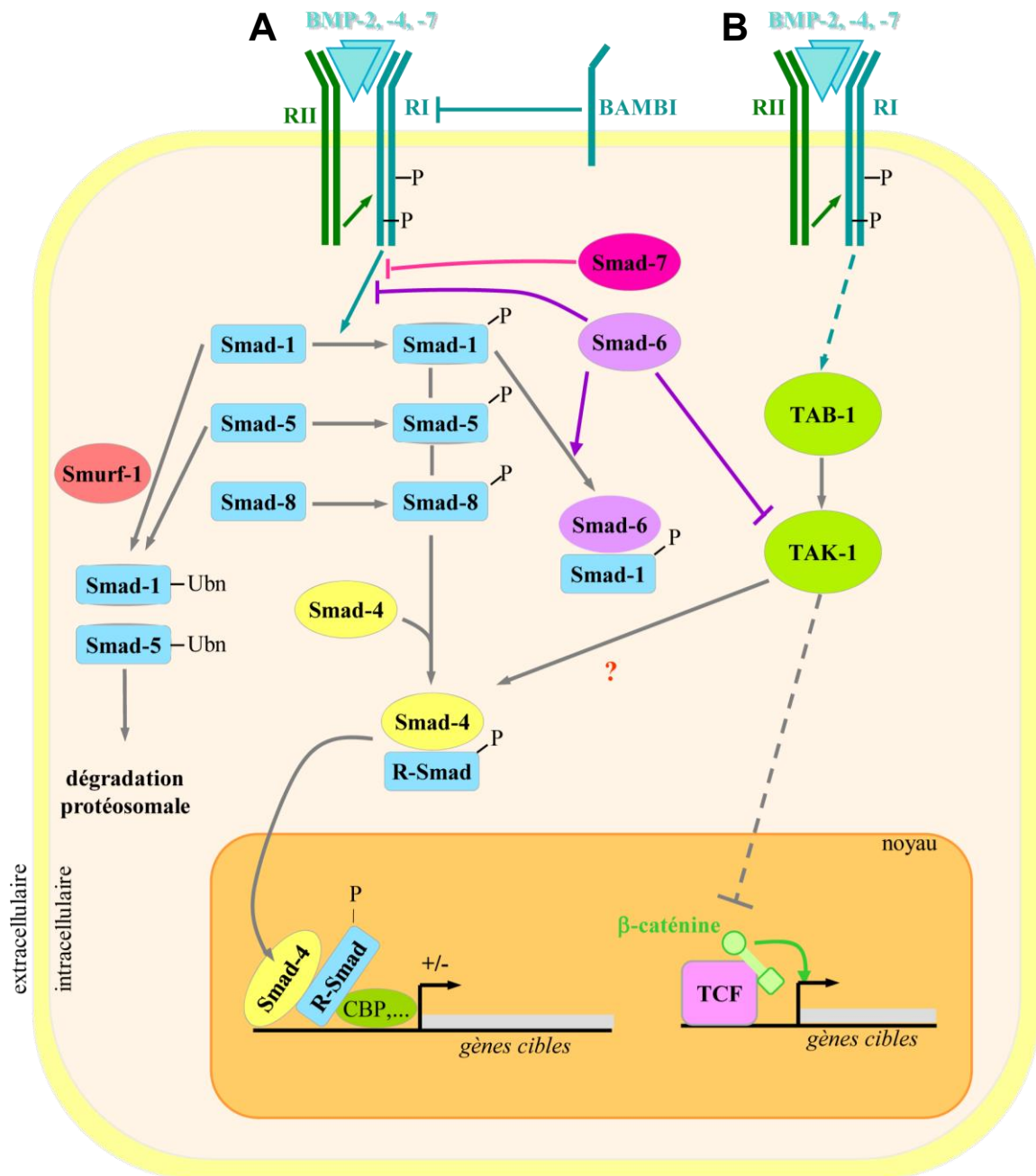


Figure 4: Voies de signalisation médiées par les BMPs (Modifié d'après von Bubnoff, 2001).

- **Voie canonique.** Un dimère de BMP se lie aux récepteurs, induisant la phosphorylation du récepteur de type I (RI) par le récepteur de type II (RII). Le RI phosphoryle alors les R-Smads (1, 5, 8) qui s'associent à Smad-4. Le complexe R-Smad/Smad-4 est transloqué dans le noyau où il s'associe à des régulateurs de transcription tels que p300 ou CBP, ce qui conduit à l'activation ou à la répression de la transcription de gènes cibles (A).

- **Voie des MAP Kinases.** L'engagement de RI et RII active la MAPKKK TAK-1 via l'activation de TAB-1, ce qui déclenche une cascade d'activations conduisant à l'inhibition de la capacité de liaison à l'ADN du complexe TCF/ $\beta$ -caténine. TAK-1 activée pourrait interagir avec la voie BMP-Smads (point d'interrogation). Smad-6 et Smad-7 peuvent s'associer à RI et empêcher la phosphorylation des R-Smads et l'activation de TAK-1. Smad-6 peut également entrer en compétition avec Smad-4 et s'associer à Smad-1 phosphorylé pour l'inactiver. Smurf-1 conduit à l'ubiquitination et la dégradation de Smad-1 et Smad-5 (B). BAMBI a la même structure que les récepteurs des BMPs mais n'est pas capable de transduire le signal.

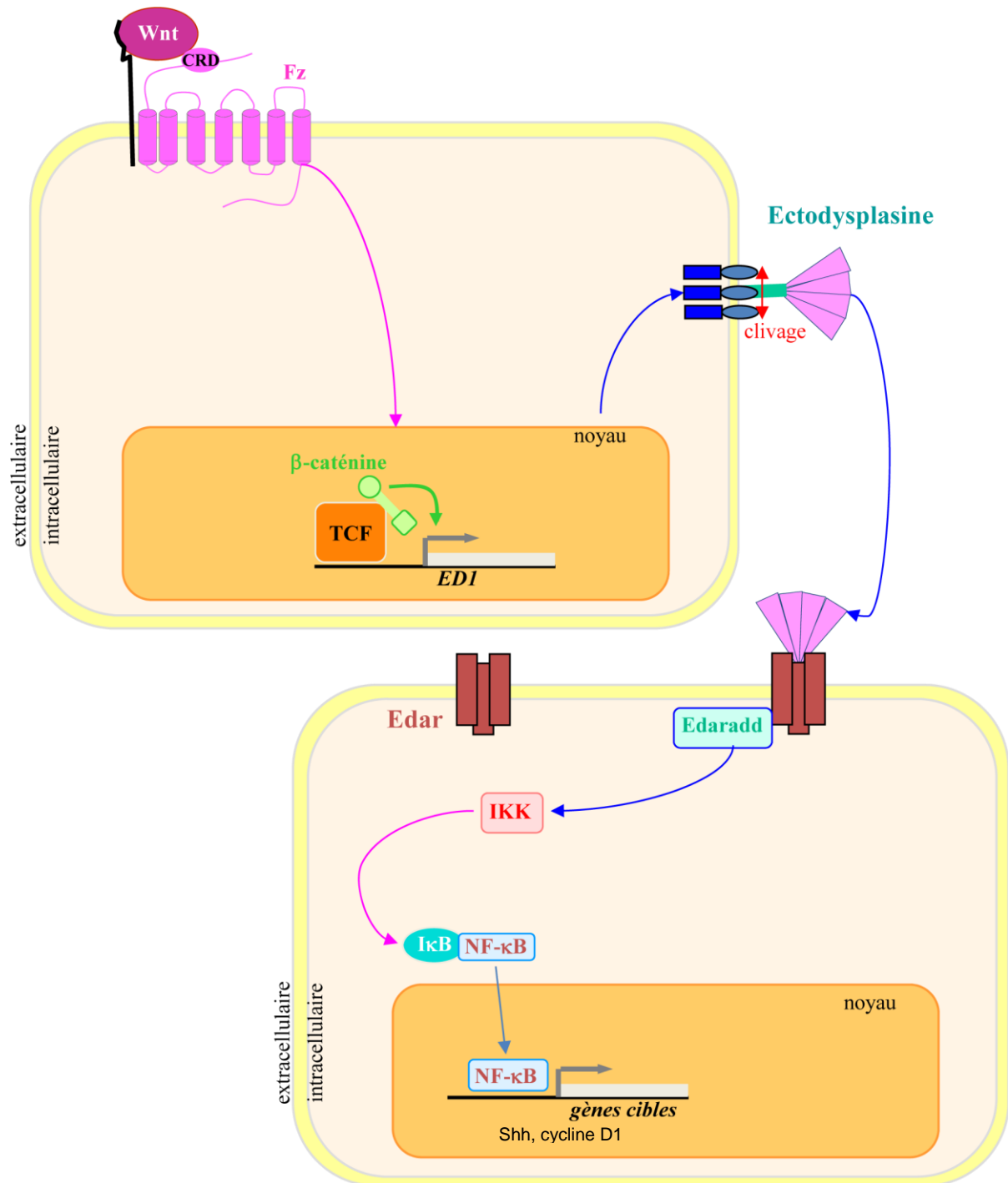
- **Gènes cibles :** Bien que ces voies de signalisation soient bien connues et que Les BMPs ont été montrés comme ayant de nombreuses fonctions au cours de la morphogenèse et de la régénération, paradoxalement on connaît très peu de choses à propos des gènes cibles des Smads (Fei et al. 2010)



Smad4 (aussi appelé co-Smad). Le complexe formé peut alors se transloquer dans le noyau et s'associer à d'autres facteurs de transcription pour réguler l'expression de gènes cibles (Lagna *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996).

La voie de l'**ectodysplasine (EDA)** fait partie des voies TNF (Fig. 5). Elle joue un rôle important dans le développement embryonnaire, notamment dans le développement de tous les organes qui dérivent de l'ectoderme. Elle a été mise en évidence par la découverte de mutations qui entraînent un syndrome appelé dysplasie ectodermique hypohidrotique (HED). Les individus porteurs de cette mutation présentent une absence ou une répartition éparse de poils (Fig. 18, A2), des cheveux, des dents, et des glandes sudoripares. Le transcrit Eda passe par des phases complexes de « splicing » alternatif à l'origine d'une grande variété de transcrits (Bayés *et al.*, 1998). Les deux isoformes les plus longs, Eda-A1 et Eda-A2 ne diffèrent que de deux acides aminés situés dans le domaine TNF. Cette différence entraîne la fixation sur deux récepteurs distincts, EdaR et XedaR. Le relargage d'Eda se fait par un clivage du domaine extracellulaire impliquant la Furine.

Les protéines **Hedgehog (Hh)** sont des glycoprotéines sécrétées (Fig. 6) qui jouent un rôle central dans la régulation de la prolifération. Chez les mammifères et chez les oiseaux, on dénombre trois types de protéines Hh : Sonic, Indian et Desert hedgehog (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Sonic Hedgehog (Shh) peut empêcher l'inhibition de la protéine transmembranaire Smoothened par Patched, en se fixant à cette dernière. Smoothened peut alors activer la voie de transduction médiée par les protéines Gli-1 et Gli-3. Ces deux protéines activent et répriment respectivement la transcription de gènes cibles (Wang *et al.*, 2000). Certaines études suggèrent que la voie Shh est sous contrôle de la voie Wnt. Ainsi des souris KO pour le gène de la  $\beta$ -caténine n'expriment pas Shh au niveau des follicules pileux (Huelsken *et al.*, 2001). Lors de la morphogénèse, Shh joue un rôle dans la formation du primordium pileux, on retrouve en effet son expression au centre de la placode (Fig. 18, C1, C2) (Nohno *et al.*, 1995). Son rôle serait d'induire la prolifération cellulaire conduisant à la formation du bourgeon pileux ou plumaire (McKinnell *et al.*, 2004).



**Figure 5 : Voie de signalisations médiées par l'Ectodysplasine** (Modifiée d'après Thesleff, 2002).

L'expression du gène ED-1 est induite par la signalisation Wnt. Ce gène code pour un facteur membranaire, l'Ectodysplasine (Eda). Son clivage est requis pour son activité. Une fois sous forme diffusible, Eda pourra se fixer sur son récepteur (Edar). Cette fixation permet le recrutement intracellulaire de la protéine adaptatrice Edaradd. Celle-ci activera la protéine IKK nécessaire à la déséquestration du facteur de transcription NF-κB par I-κB. NF-κB pourra alors se transloquer vers le noyau.

**Les gènes cibles** de NF-κB comprennent Shh et la cycline D1 (Schmidt-Ulrich et al., 2006).

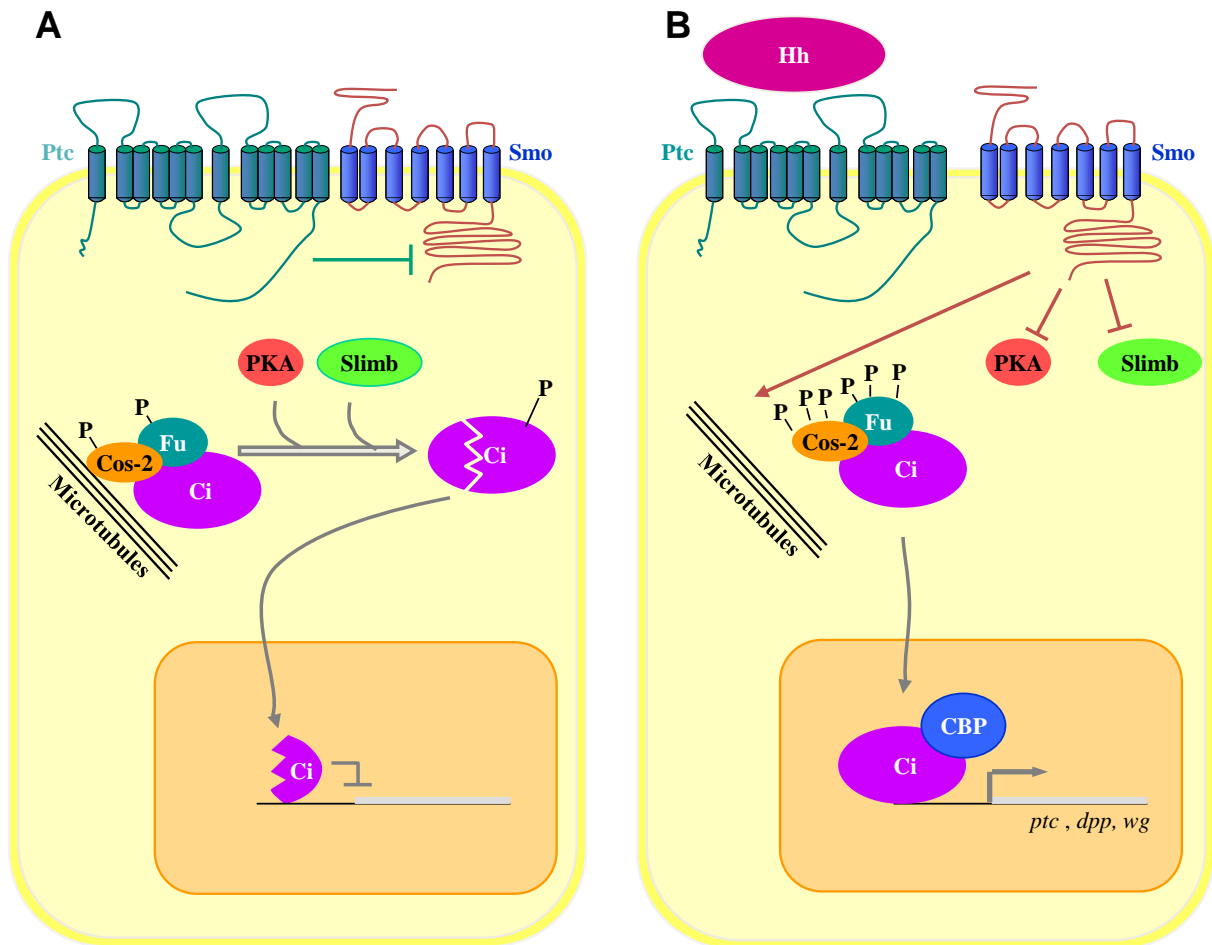


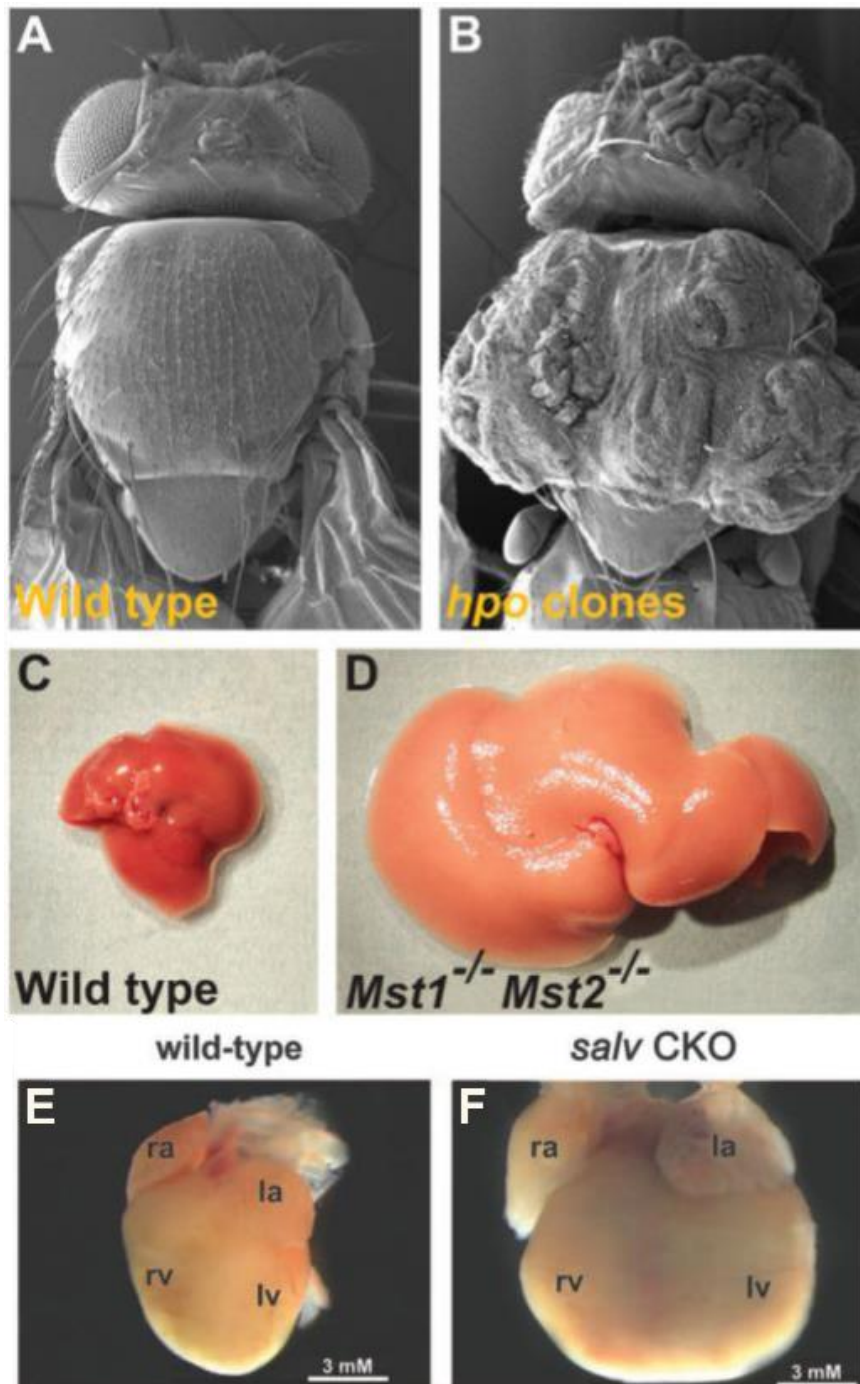
Figure 6 : Voie de signalisation mediee par les proteines Hedgehog chez la Drosophile.

Le recepteur Patched (Ptc) inhibe la proteine transmembranaire Smoothened (Smo). Dans le cytoplasme, la proteine Cubitus interruptus (Ci) forme un complexe proteique attache aux microtubules comprenant Costal-2 (Cos-2) et Fused (Fu). Ci peut etre clive par la Proteine Kinase A (PKA) et ubiquitine par la proteine Slimb. Le domaine N-terminal est transloque dans le noyau et agit comme represser de transcription de genes cibles comprenant *hh* lui-meme et *decapentaplegic (dpp)* (A).

Lorsque Hedgehog (Hh) se lie au recepteur transmembranaire Ptc, la proteine Smo n'est plus inhibee. Smo induit la dissociation du complexe associe aux microtubules, et reprime l'action de la PKA et de Slimb. Ci est transloque entier dans le noyau ou il s'associe a CREB Binding Protein (CBP) et agit comme un activateur de transcription de **gènes cibles** comprenant notamment *ptc*, *dpp* et *wingless (wg)* (B).

**La voie Hippo**, découverte en 2003 chez la Drosophile (Udan *et al.*, 2003), est impliquée notamment dans la régulation de la taille des organes et le contrôle de l'inhibition de contact (Fig. 7, A, B). C'est une voie très conservée chez tous les mammifères : son implication dans le contrôle de la taille du foie (Lu *et al.*, 2010) et du cœur (Heallen *et al.*, 2011) a été récemment démontrée chez la souris (Fig. 7, C-F). Elle est impliquée dans le contrôle de la prolifération, dans la régénération du vers plat *macrostomum lignano* (Demircan et Berezikov, 2013) et dans le maintien des cellules souches assurant l'homéostasie de l'épithélium intestinal (Chen *et al.*, 2012). Elle a également été caractérisée chez l'embryon de poisson zèbre et elle est suspectée de jouer un rôle dans le développement de plusieurs organes et tissus, notamment la notochorde, le cerveau, les yeux, l'arc branchial et les nageoires pectorales (Jiang *et al.*, 2009).

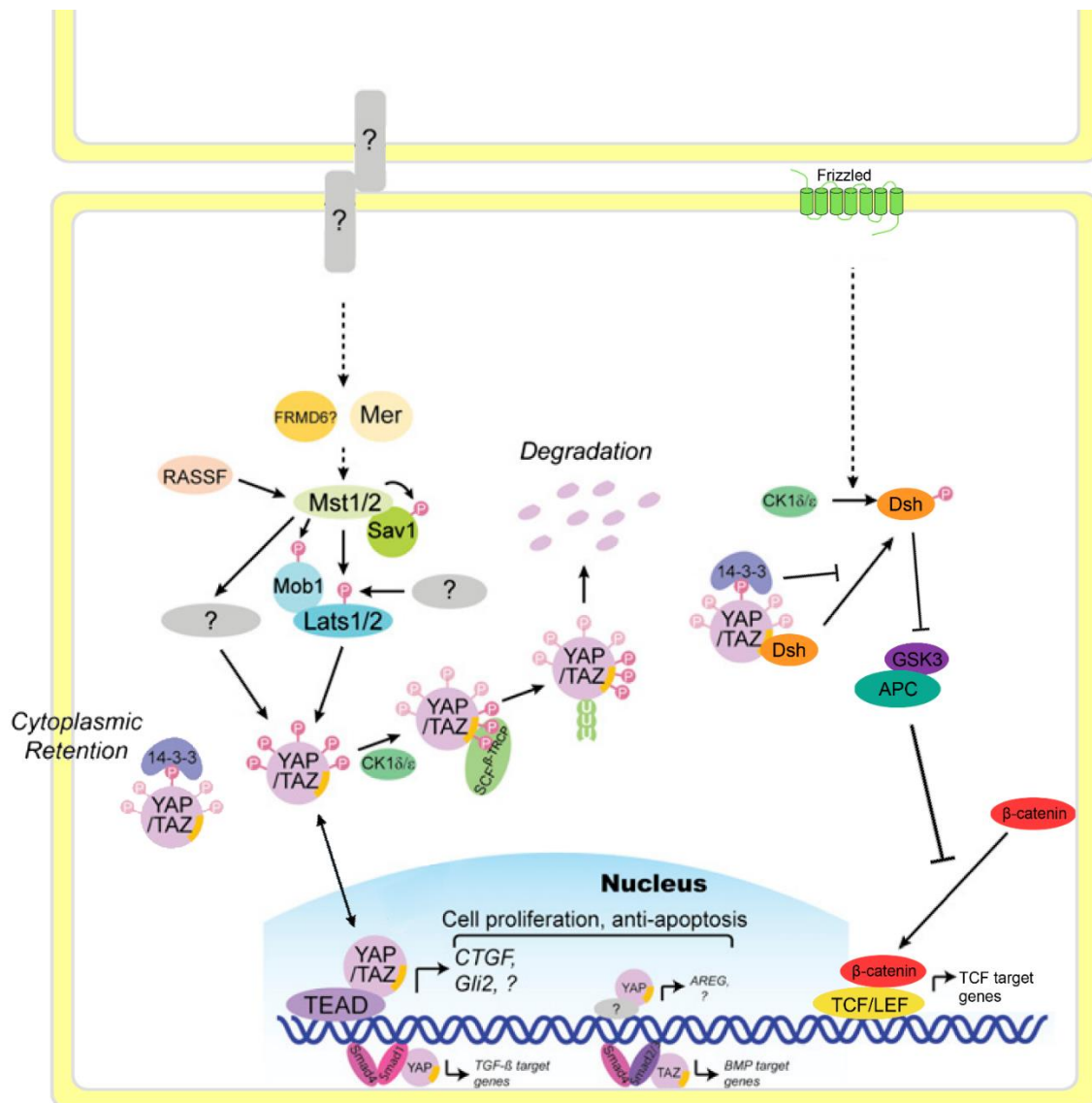
La voie Hippo (Fig 8) comprend une cascade de kinases Mst et Lats. L'effecteur principal YAP/TAZ, de cette voie, peut être localisé dans le cytoplasme ou dans le noyau selon qu'il ait été phosphorylé par Lats ou non. La localisation nucléaire de YAP permet la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire (Halder et Johnson, 2011). L'activation de cette voie de signalisation est déclenchée par une activation du récepteur membranaire FAT1. RASSF, un sous-groupe de protéines Ras ainsi que Merlin activent également la voie Hippo par le biais de la protéine Mst1/2 qui phosphoryle Sav1, une protéine scaffold. Mst1/2 et Sav1 phosphorylent la kinase Lats1/2 et sa protéine associée Mob1. Lats1/2 phosphoryle par la suite un co-activateur transcriptionnel nommé YAP (ou TAZ, qui ne diffère que par le nombre de motifs peptidiques phosphorylés). La localisation de YAP/TAZ dépend des sites phosphorylés. Une phosphorylation de YAP/TAZ sur la sérine127 permet la liaison à la protéine 14-3-3 et la rétention cytoplasmique de YAP/TAZ (et donc son inhibition) (Halder et Johnson, 2011). YAP peut être également inhibé par une phosphorylation sur S381 qui induit une phosphorylation par CK1 $\delta/\epsilon$  de S384 et S387. Ces sérines phosphorylées permettent la dégradation de YAP/TAZ par un mécanisme d'ubiquitination médiée par SCF  $\beta$ -TRCP. Lorsque YAP/TAZ n'est pas inhibé par les protéines 14-3-3 et SCF  $\beta$ -TRCP, il se transloque dans le noyau où il peut s'associer avec le facteur de transcription TEAD. Les facteurs de la famille des TEAD permettent l'expression de CTGF et Gli2 (McNeill et Woodgett, 2010).



**Figure 7 : La voie hippo (*hpo*) est au cœur de la régulation de la croissance des organes.**

Chez la *Drosophile*, la perte de la fonctionnalité du gène *hpo* entraîne une hypertrophie des tissus (**B**) en comparaison de l'individu sauvage (**A**). (Halder & Johnson, 2011)

Chez la souris, le double mutant *mst1/2*, une kinase de la voie hippo, présente un foie beaucoup plus grand (**D**) que son homologue non muté (**C**). De même, une inactivation de la protéine Salvador (*sav1*), associée à *mst1/2* pour faciliter la phosphorylation de *lats1/2*, elle-même responsable de la phosphorylation de Yap, entraîne une augmentation du volume du cœur (**F**) par rapport au témoin (**E**) (Heallen et al. 2011).



**Figure 8 : La voie de signalisation Hippo (modifié d'après Zhao et al. 2010).**

L'activation d'un récepteur membranaire n'a pas encore été démontrée et son identité reste inconnue. Il a été démontré que Merlin (Mer) et RASSF sont capables d'activer Mst1/2 qui entraîne la phosphorylation de Mob1, Sav1 et Lats1/2. Une fois activé, Lats1/2 phosphoryle à son tour la protéine YAP. Selon les sites phosphorylés, YAP est retenu dans le cytoplasme par sa liaison à la protéine 14-3-3 ou dégradé par le biais de SCF $\beta$ -TRCP.

En absence de phosphorylation, YAP est transloqué dans le noyau et s'associe au co-facteur TEAD pour initier la transcription de gènes cibles tels que CTGF, Gli2, etc ... L'inactivation de la voie entraîne donc la localisation nucléaire de YAP et son activité transcriptionnelle concernant les gènes impliqués dans la prolifération et l'anti-apoptose.

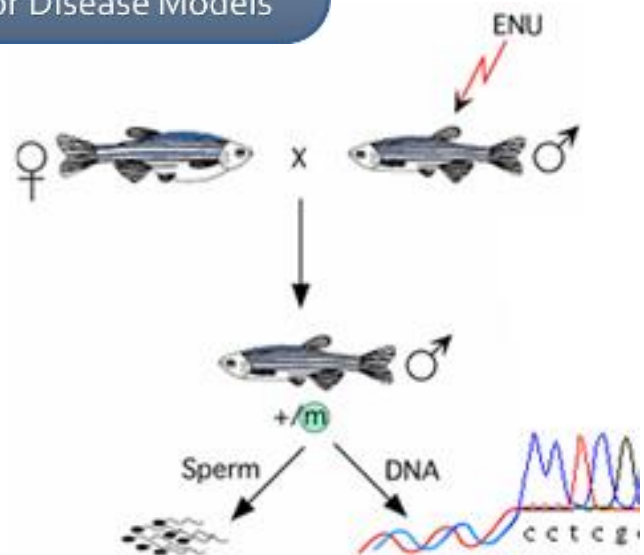
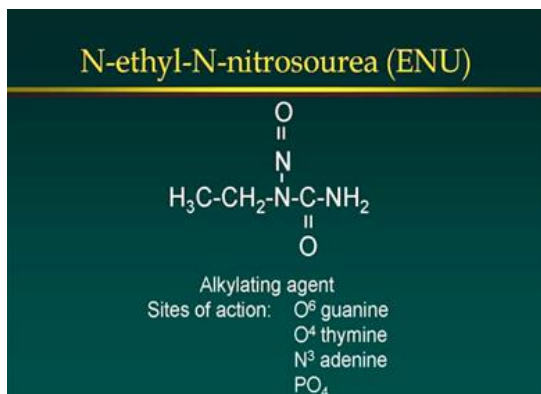
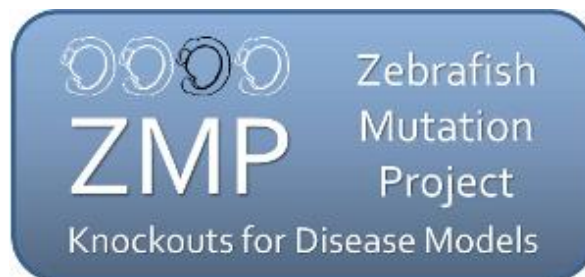
Notons que la forme cytoplasmique de YAP peut interagir avec Dsh et entraîner une baisse de la signalisation Wnt, voie primordiale dans de nombreux mécanismes d'organogénèse.

La voie hippo interagit également avec la voie Wnt (Fig. 8). En effet, une des fonctions connues du TAZ cytoplasmique est d'inhiber la phosphorylation de dishevelled (DVL) induite par CK1 $\delta/\epsilon$  (voie Wnt). DVL reste donc au stade inactif et ne peut plus inhiber le complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine, induisant une baisse de l'activité de la voie Wnt canonique (Alarcón *et al.*, 2009).

Les **microRNAs**, présents chez les plantes et les animaux, représentent environ 0,5 à 1,5% du génome. Chez l'homme, environ 20 à 30 % des gènes sont régulés par les microRNAs. Les microRNAs subissent une série de clivages avant d'atteindre leur maturation. Ils sont initialement transcrits par l'ARN polymérase II, sous forme d'un transcrit primaire contenant une structure en épingle à cheveux. La région de l'épingle à cheveux est ensuite clivée par le complexe Drosha-DGCR8. Le fragment résultant est ensuite exporté vers le cytoplasme où il subit un dernier clivage : la boucle de l'épingle à cheveux est alors éliminée par un complexe formé de Dicer et de TRBP. Le microRNA mature est ainsi formé d'un simple brin, issu d'un des bras de la structure d'épingle à cheveux de chacun de ses précurseurs, et s'incorpore dans un complexe ribonucléoprotéique (appelé RISC, pour RNA-induced silencing complex) qui assure sa fonction de répression d'expression génique (Carthew, 2006). A ce jour, de nombreux microRNAs sont connus pour leur implication dans certains mélanomes (Kunz, 2013) et leur impact sur la cicatrisation de la peau (Banerjee et Sen, 2013).

## 5. Le poisson zèbre en tant que modèle

Parmi les vertébrés, les amphibiens et les téléostéens sont donc ceux qui présentent la plus grande capacité de régénération portant sur de nombreux organes. Le modèle des téléostéens est de plus en plus utilisé dans les laboratoires de biologie fondamentale, ceci pour plusieurs raisons : le *danio rerio* (le poisson zèbre) présente un avantage sur le plan génétique indiscutable, son génome a été entièrement séquencé et de nombreux outils de biologie moléculaire sont disponibles (Fig. 9). De plus, son élevage est facile et demande peu de place. Son intérêt en tant que modèle alternatif a déjà été démontré, notamment du point de vue de la recherche en cancérologie. A titre d'exemple le mutant Casper, dépourvu de pigmentation, permet un suivi aisé de la croissance tumorale et du processus métastatique. Le poisson zèbre



**Figure 9: Le poisson zèbre est aujourd’hui largement utilisé comme modèle dans le domaine de la biologie moléculaire.**

Parmi les projets de grande envergure, le Zebrafish Mutation Project (ZMP) a pour ambition de muter l’ensemble des gènes du poisson zèbre, par des approches de mutagenèse à l’ENU, et de documenter les phénotypes correspondants. Les données récoltées sont librement à disposition de l’ensemble de la communauté scientifique. A ce jour, 11 892 gènes mutés ont été répertoriés, soit 45% de la totalité du génome.



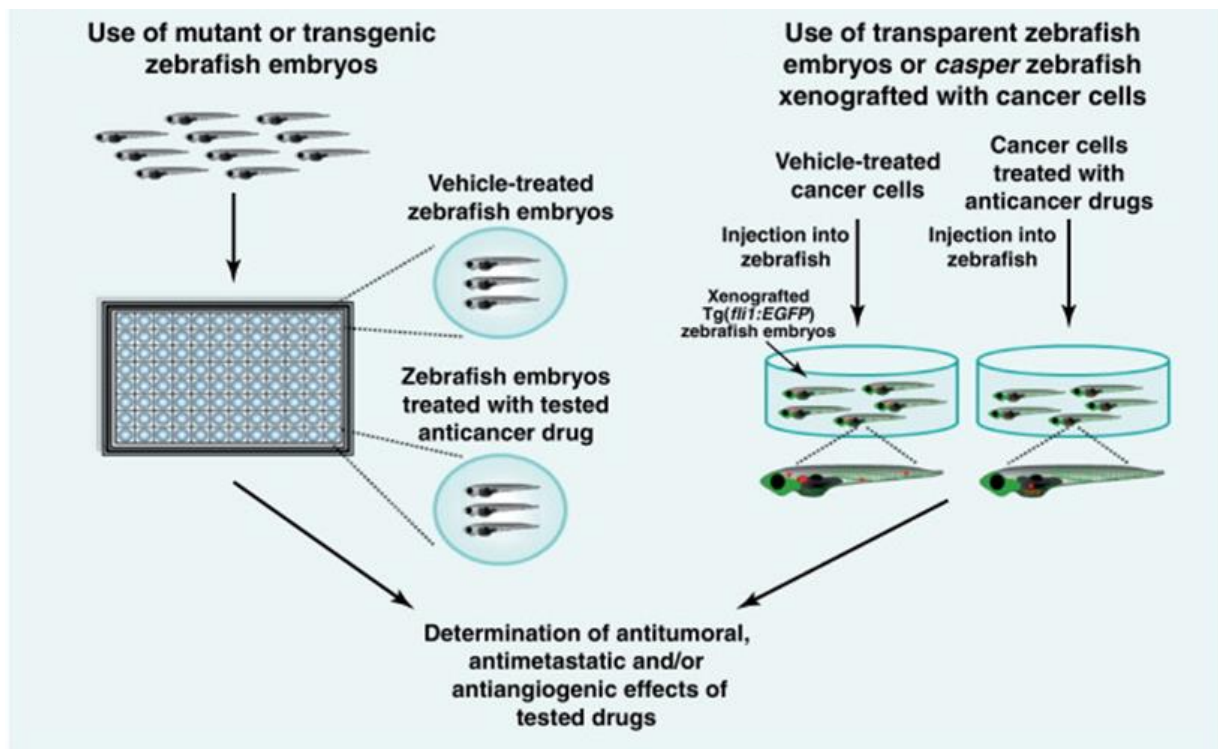
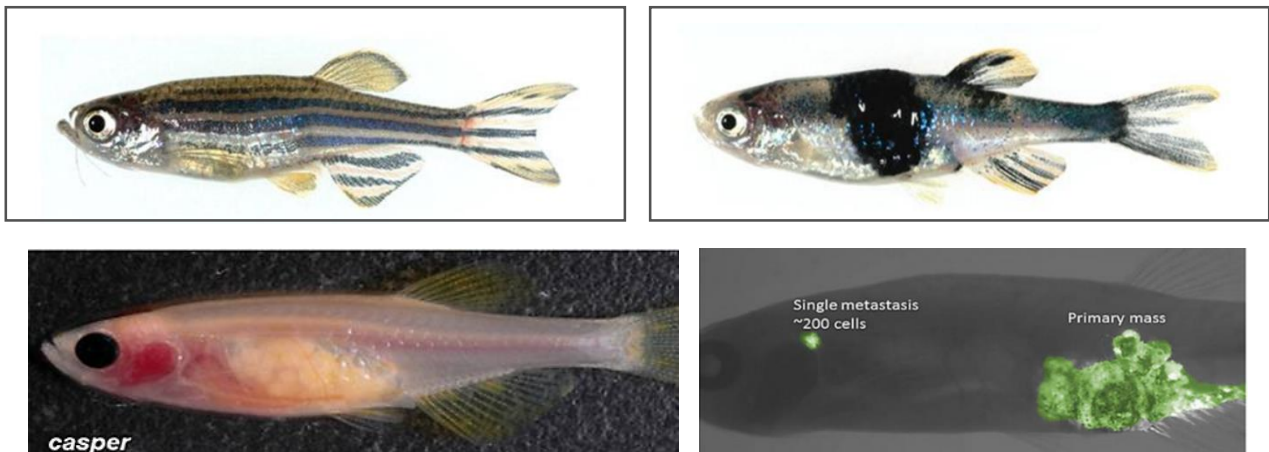


Figure 10 : Le modèle poisson zèbre est également utilisé dans l'étude du développement tumoral.

Les techniques de xéno greffe de tumeurs sont applicables au poisson zèbre. L'utilisation du mutant casper, dépourvu de pigmentation, permet un suivi aisé de la croissance tumorale par fluorescence (A).

L'impact de molécules thérapeutique sur la progression tumorale peut également être évalué à grande échelle, et dans des volumes restreints (25µl) par l'utilisation d'embryons dans une plaque Elisa à 96 puits (B).

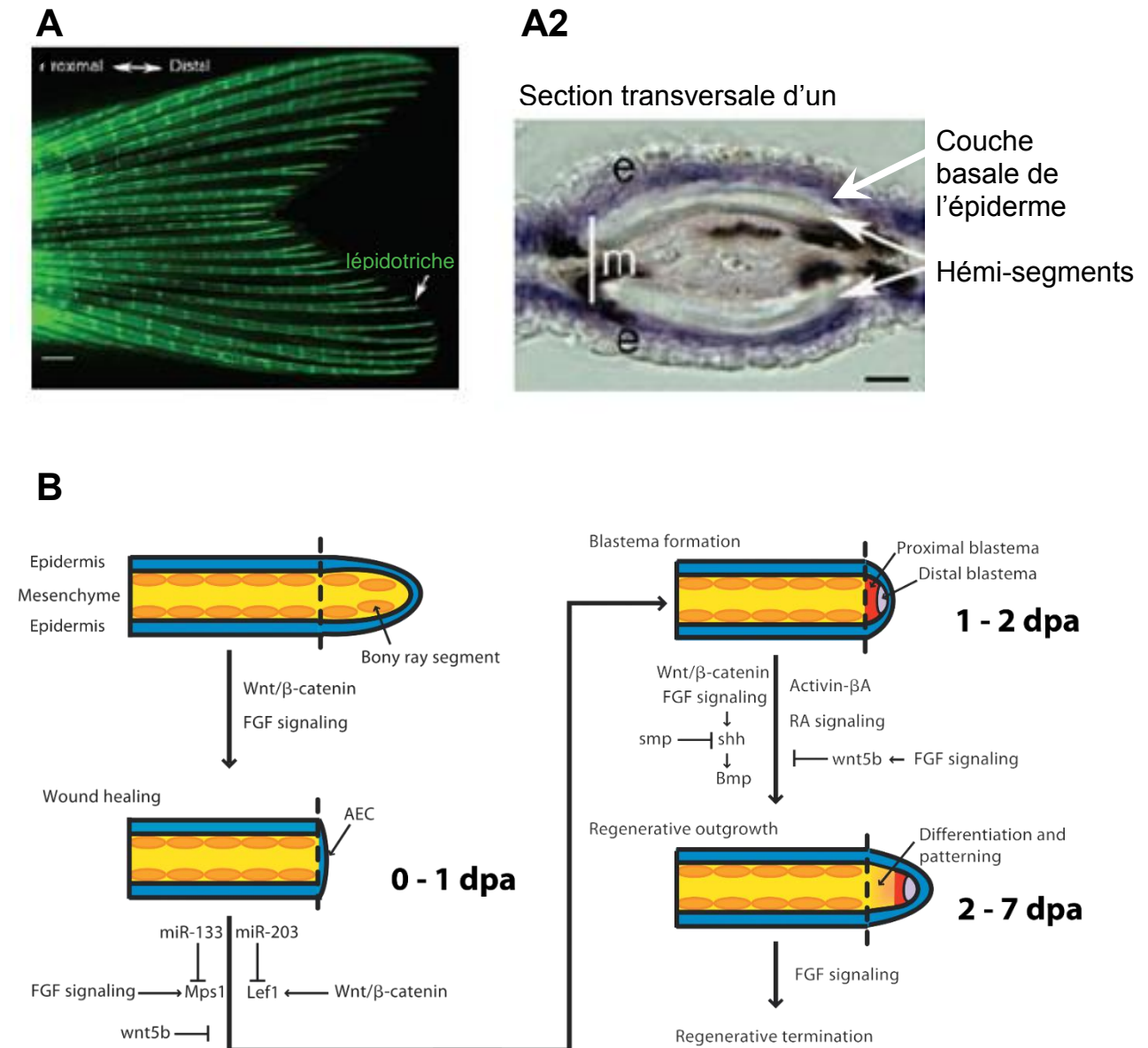
est de plus parfaitement adapté aux méthodes de criblage à grande échelle pour évaluer l'impact de drogues anti-cancéreuses (Fig. 10). Enfin la vie relativement courte de cette espèce (2 à 3 ans) devrait permettre d'étudier la sénescence ainsi que son implication sur les capacités régénératives. Enfin, la nageoire, comme la peau, étant des structures externes, il est aisé de procéder à une section. Le poisson récupère en quelques minutes de l'anesthésie réalisée par addition de tricaine méthanesulfonate dans l'eau et il n'est pas handicapé dans sa locomotion. Ces animaux aquatiques ont la peau protégée par du mucus, qui contient de nombreux peptides antimicrobiens (démontré du moins chez les amphibiens (Erspamer et Cei, 1970)), ce qui facilite l'expérimentation.

## **B. La régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre**

La nageoire caudale du poisson zèbre est constituée de 16 à 18 segments osseux appelés lépidotriches (Fig. 11, A). Ils sont formés de deux héli-segments, qui encapsulent le tissu mésenchymateux, entourées d'un tissu épithélial. Les lépidotriches sont assemblés par des jonctions le long de la nageoire, et tendent à être raccourcis et dichotomiques dans les zones les plus distales. La régénération de la nageoire caudale s'effectue en 3 grandes étapes : La cicatrisation, la formation du blastème et la repousse régénérative (Fig. 11, B). A l'issue de ce processus, on observe une restauration complète des structures osseuses, des vaisseaux sanguins, des nerfs, des tissus de soutien et de la pigmentation de la peau.

### **1. La cicatrisation (0-1 jour post-amputation (jpa))**

La phase de cicatrisation est initiée directement après amputation. Une coiffe épithéliale (Apical Epidermal Cap – AEC) se forme au niveau de la zone de coupure par migration de cellules épithéliales non-prolifératives. L'AEC s'épaissit ensuite et les tissus mésenchymateux situés côté proximal à la découpe se désorganisent et migrent du côté proximal de l'AEC. A cette étape, seuls des phénomènes migratoires sont observés. La nécessité de l'expression de la voie Wnt n'a pas été démontrée à ce stade, puisque son inhibition n'empêche pas la formation



**Figure 11 : La régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre.**

La nageoire du poisson zèbre est composée de 16 à 18 lépidotriches (marquage à la calcéine) (A1). Chaque lépidotriche est composée de deux hémiraies qui encapsulent le mésenchyme et sont entourées par l'épiderme (illustrations : Iovine, Nat Chem Biol 2007) (A2).

À la suite d'une amputation, le processus de régénération suit la même organisation autour de chaque lépidotriche. La régénération s'effectue en trois grandes étapes, la fermeture rapide (inférieure à 1 jour) de la blessure par la coiffe épithéliale (AEC), la formation d'un blastème au cours du deuxième jour et la repousse pendant laquelle les cellules se différencient et s'organisent (B). La repousse est achevée à 14 jpa (Tal et al. Gerontology, 2010)

*e* Epiderme ; *m* mesenchyme ; *dpa* : day post-amputation

de l'AEC. Cependant dès 6 heures post-amputation (hpa) une augmentation du taux d'expression du transcrit de *Wnt10a* est détectée, traduisant l'activation et le rôle précoce de cette voie lors du processus régénératif (Stoick-Cooper *et al.*, 2007). La  $\beta$ -caténine, protéine cœur de la voie canonique Wnt, est détectée quelques heures après l'amputation lors de la phase de cicatrisation. A ce stade on n'observe pas de prolifération cellulaire, mais une migration de couches de cellules épithéliales vers la zone de la blessure. La  $\beta$ -caténine a également un autre rôle plus tardif : elle permet l'activation d'un facteur de transcription de la famille des TCF (un co-effecteur de la voie Wnt canonique). Ce facteur appelé *lef1* (connu pour son rôle dans le « *patterning* » et la prolifération lors du développement (Gamba *et al.*, 2010)) est détecté à 12 hpa au niveau de l'épithélium, il est soupçonné de jouer un rôle dans l'induction du « *patterning* » osseux des héli-segments (Poss *et al.*, 2000a).

Le transcrit de l'activine- $\beta$ A, un des ligands du récepteur de type I ActBIB (aussi appelé Alk4, un récepteur serine- thréonine kinase de la voie Nodal, est détecté très tôt lors de la régénération (dès 1 hpa,). Il atteint un pic d'expression à 6 hpa, puis décline légèrement à partir de 24 hpa. L'expression spatiale de l'activine- $\beta$ A est modulée au cours du temps : les premiers signaux détectés en hybridation *in situ*, entre 6 et 12 hpa, montrent une expression au niveau des cellules mésenchymateuses présentes au niveau des inter-segments (entre les héli-segments). Une inhibition du récepteur Alk4 ne perturbe pas la migration de cellules épithéliales vers la zone de la blessure : la cicatrisation se fait toujours normalement. La prolifération des cellules mésenchymateuses est très fortement réduite (75%) en présence d'inhibiteurs d'Alk4 alors que la prolifération des cellules épidermiques est augmentée. Le blastème étant formé à partir de cellules d'origines mésenchymateuses, on observe une absence de blastème chez les individus traités et un arrêt du processus régénératif (Jazwinska *et al.*, 2007).

## **2. La formation du blastème (1-2jpa)**

Des blastèmes unitaires primitifs se forment à l'extrémité de chaque section de lepidotriche. La prolifération au sein de ce blastème immature est relativement lente (temps moyen d'entrée en G2 >6h). Vingt-quatre heures après l'amputation le blastème se scinde en deux populations cellulaires (morphologiquement identiques, mais fonctionnellement distinctes) : un blastème distal (contenant des cellules exprimant *msxb*, *msxb* étant un

répresseur transcriptionnel à homéodomaine considéré comme un marqueur de cellules indifférenciées) à la prolifération lente ; un blastème proximal (contenant des cellules qui n'expriment pas *msxb*) proliférant rapidement (temps moyen de la phase G2 <60 min) (Nechiporuk et Keating, 2002). La voie Wnt est requise pour la mise en place du blastème. Une inhibition de la voie Wnt canonique par la surexpression induite de DKK1, qui provoque l'internalisation des récepteurs LRP5/6 (ce qui rend donc impossible l'activation de la voie par les ligands Wnt), empêche l'expression de *lef1* et plus tardivement l'expression du gène *msxb* ainsi que la formation du blastème (Stoick-Cooper *et al.*, 2007).

Dès 18h après amputation de la nageoire caudale l'expression de *fgfr1*, un récepteur de la voie FGF, est détecté au niveau du blastème, puis plus tardivement dans les portions distales et proximales du régénérat (Poss *et al.*, 2000b). Un traitement au SU5402, un inhibiteur de la voie FGF qui se lie au domaine tyrosine kinase de *fgfr1*, empêche la formation du blastème et réduit l'expression des gènes *msxb/c* (considérés comme des marqueurs de cellules indifférenciées et proliférantes des tissus en cours de régénération). Cela suggère que la voie FGF participe à la formation du blastème conjointement à la voie Wnt en stimulant l'expression des gènes *msx*.

A 24 hpa, l'activine- $\beta$ A est exprimée à la frontière du mésenchyme et de l'épithélium, zone de formation du blastème. A partir de 72 hpa, les transcrits de l'activine restent présents au niveau de la zone du blastème, mais on observe leur absence dans les zones inter-segments (Jazwinska *et al.*, 2007). Si l'inhibition d'Alk4 a lieu après la mise en place du blastème et pour des durées d'expositions supérieures à 12 heures, on constate une expression diminuée des gènes de l'homéodomaine *msx* et une forte diminution de la prolifération au sein du blastème (aucune apoptose n'est cependant constatée). L'activine- $\beta$ A est donc requise pour permettre le maintien de la prolifération des cellules du blastème (Jazwinska *et al.*, 2007).

### **3. La repousse (2-15jpa)**

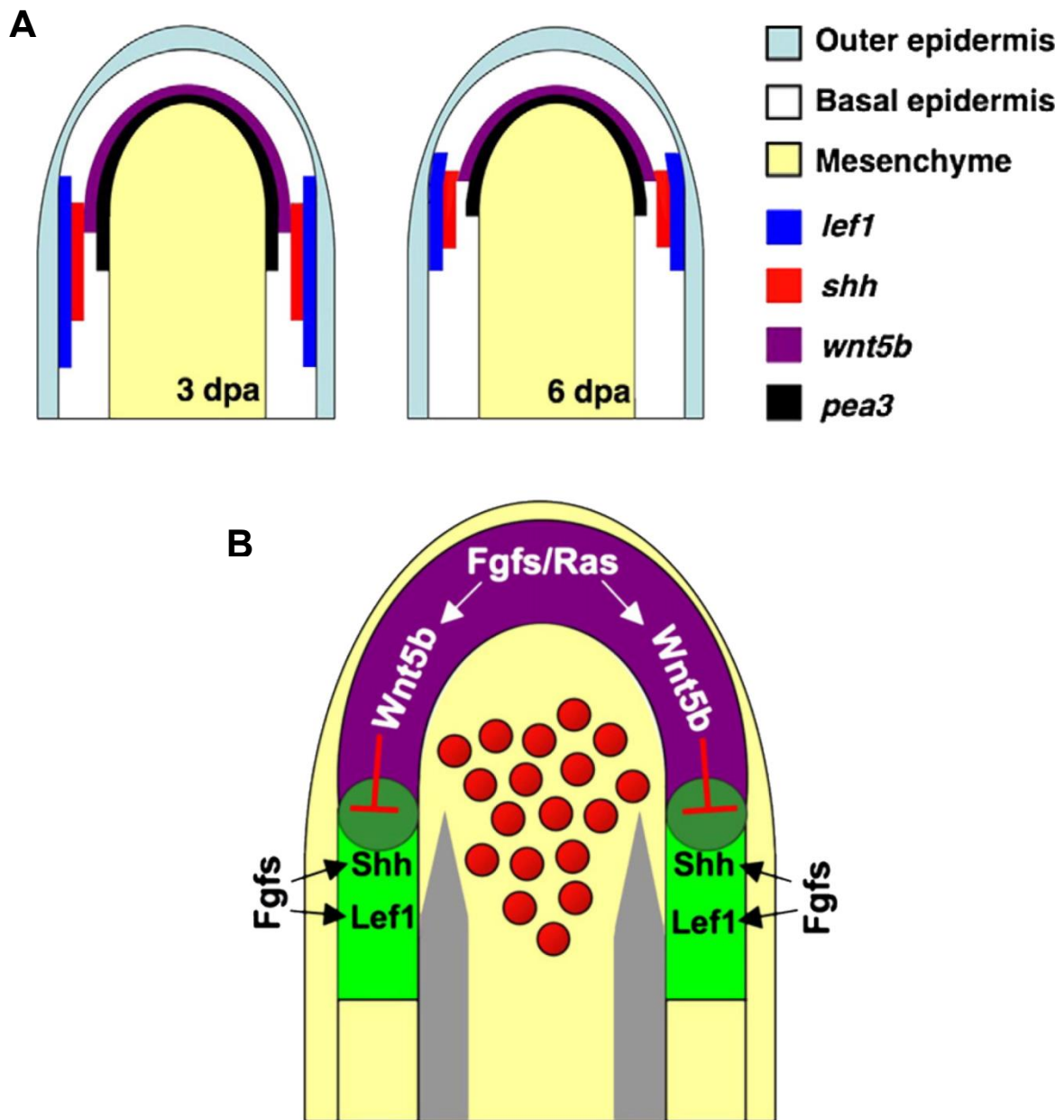
La phase de la repousse est caractérisée par une prolifération dans le blastème proximal et un début de « *patterning* » par l'intermédiaire de migrations cellulaires issues d'une zone proximale au blastème. Les cellules migrantes se différencient ensuite et peuplent le tissu régénérant constitué de cellules mésenchymateuses. Seule la mise en place des mélanocytes est

plus tardive et n'est pas toujours complète au stade où la repousse s'achève (15 jours à 28°C, la vitesse de régénération augmentant avec la température).

Lors de la phase de repousse, la voie Wnt est également requise. L'inhibition de cette voie par une surexpression d'une version de Tcf3a tronqué du côté N-terminal, qui agit comme un répresseur des transcriptions médiées par Wnt, bloque le processus de régénération (Lewis *et al.*, 2004). Le même résultat est obtenu en surexprimant DKK1, un inhibiteur de la voie Wnt, après la mise en place du blastème. La voie Wnt n'est cependant pas uniquement un activateur de la phase de la repousse. En effet, une série de surexpressions de différents ligands de cette voie a démontré les effets antagonistes des protéines Wnt sur ce stade de la régénération. Alors que l'activation de la voie Wnt canonique est requise pour la repousse, la surexpression de Wnt5b, un ligand activant la voie Wnt-non canonique, résulte en un arrêt de la repousse et une forte diminution de la prolifération des cellules épithéliales et mésenchymateuses. Wnt5b semble avoir un rôle dans la régulation de la régénération (Fig. 12). En effet, en l'absence du ligand Wnt5b (chez une lignée de poisson zèbre piptail), la régénération a lieu plus rapidement et la surface régénérée de la nageoire est plus importante que chez une lignée sauvage (Stoick-Cooper *et al.*, 2007).

Un traitement au SU5402, un inhibiteur de la voie FGF, survenant après la mise en place du blastème (entre 24 et 72h) inhibe la repousse de la nageoire, mais n'empêche pas la migration de mélanocytes ni la sécrétion de matrice osseuse (Poss *et al.*, 2000b) (ce qui sous-entend que les voies Bmp/Nodal/Hh, responsables des processus d'ossifications, ne dépendent pas uniquement de FGF).

Pendant la phase de repousse, la voie FGF semble être impliquée dans la régulation de la vitesse de croissance du régénérat. Une inhibition graduelle de cette voie par l'usage d'une lignée transgénique exprimant, sous contrôle d'un promoteur heatshock (hsp70), une version mutée de fgfr1, qui rend inaccessible les récepteurs fgfr et induit un ralentissement du processus de régénération (Lee *et al.*, 2005). La voie FGF régulerait à la fois positivement et négativement l'activité de la voie Wnt, permettant le contrôle de la prolifération au niveau du blastème. En effet, il a été démontré que FGF induisait l'expression de Shh et de lef1 au niveau des cellules épidermiques proximales (zone de forte prolifération) ainsi que de Wnt5b (conjointement à la voie Ras). Ce dernier réduit l'activité de la voie Wnt canonique et entraîne une baisse



**Figure 12 : Expression spatiotemporelle des principaux régulateurs impliqués lors de la phase de repousse de la nageoire (modifié d'après Lee et al. 2009).**

Représentations schématiques de l'extrémité d'un lépidotriche en coupe longitudinale.

Territoires d'expression des principaux régulateurs connus en cours de régénération de la nageoire (à 33°C, usuellement la température est de 28°C) **(A)**.

Interactions au niveau de la couche basale de l'épiderme entre les voies impliquées dans la repousse de la nageoire. La voie Fgf aide à l'établissement de l'expression de *lef1* et *Shh* dans la région proximale du blastème. La voie Fgf stimule également l'expression de *wnt5b* qui inhibe l'expression de *lef1* et *Shh* dans les régions plus distales du blastème **(B)**.

Gris = segment osseux; cercles rouges = cellules mésenchymateuses du blastème.

d'expression de Shh et *lefl* au niveau des zones les plus distales de l'épiderme (zone de faible prolifération) (Lee *et al.*, 2009) (Fig. 12).

Pendant la régénération de la nageoire caudale, Shh, son récepteur membranaire Ptc1 et les protéines Bmp2b, Bmp4 et Bmp6 (des protéines de la voie BMP impliquées notamment dans la mise en place des structures osseuses) sont localisées sur les parties distales de chaque lépidotriche. Les cellules à la frontière de la couche basale de l'épiderme et le mésenchyme se différencient en sclérobastes qui formeront de nouvelles structures osseuses (les sclérobastes synthétisent et relarguent la matrice osseuse) (Quint *et al.*, 2002). Une dérégulation des voies Hh et Bmp par une surexpression de Shh ou de Bmp2 dans le blastème conduit à un excès de dépôt osseux et un « *patterning* » anormal de la régénération. Une injection de Chordin, un antagoniste de la voie BMP, n'empêche pas l'expression de Shh et de Ptc1. L'activation de Shh se fait donc en amont de la voie BMP pendant la phase de « *patterning* » lors de la repousse (Smith *et al.*, 2006).

Deux microRNAs sont actuellement connus pour jouer un rôle pendant le déroulement du processus régénératif chez le poisson zèbre. MiR-133, un microRNA dont l'expression est contrôlée par la voie FGF, est un régulateur du transcrite du gène *mps1*. Ce gène code pour une kinase régulant de nombreux aspects de la prolifération cellulaire, notamment la duplication des centrosomes et la progression dans le processus mitotique, est détecté dans la zone du blastème ; il est requis pour une régénération normale (Yin *et al.*, 2008). Une cible de la voie Wnt, *lefl*, est elle aussi régulée par l'action d'un MicroRNA miR-203. MiR-203 est uniquement détecté dans des nageoires de poisson zèbre adulte mais il n'est plus présent lors de la régénération, suggérant une régulation transcriptionnelle du microRNA pendant ce processus (Thatcher *et al.*, 2008). Ces découvertes ajoutent donc un niveau de régulation et de complexité supplémentaire dans la régulation des voies de signalisation impliquées dans la régénération.

#### **4. Rétablissement de la forme bilobée**

Une des caractéristiques frappantes de la régénération des membres est la conservation de la forme et de la taille. Ce mécanisme implique une régulation particulièrement fine de la



prolifération et du « *patterning* » lors de la phase de repousse. Lors de la régénération de la nageoire caudale du poisson zèbre, les segments des lobes régénèrent plus vite que les segments centraux, ce qui permet un retour à la forme bilobée de la nageoire. Même si de nombreuses voies régulant la prolifération lors de la phase de la repousse sont suspectées d'avoir un rôle dans la régénération différentielle de la nageoire, aucune n'a pu être impliquée directement (Rolland-Lagan *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

## **C. La cicatrisation du tégument**

Avant de parler de la cicatrisation du tégument, je présenterai sa structure et sa formation embryonnaire. Le tégument ainsi que sa cicatrisation ont été particulièrement étudiés chez les mammifères et sa formation embryonnaire chez les oiseaux. Dans ce chapitre, je ferai d'abord référence à ces données afin de comparer ensuite avec ce que l'on connaît chez les téléostéens.

### **1. Structure du tégument des vertébrés**

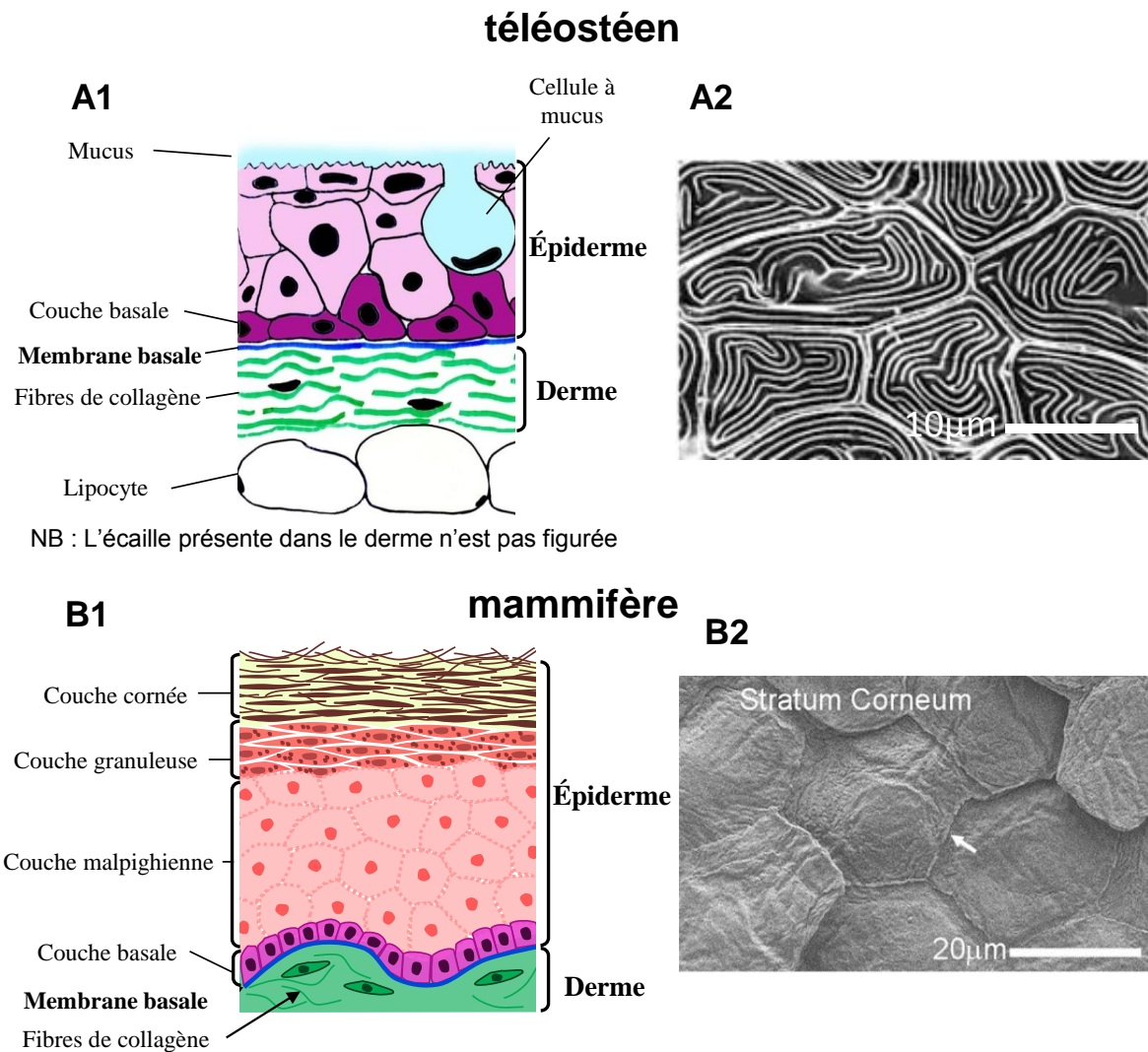
Le tégument forme le revêtement externe du corps, il a un rôle de protection contre le milieu extérieur. Il est composé de la peau et de la cornée, cette dernière étant sa partie transparente. La peau est l'organe le plus grand du corps quant à sa surface et son poids. En plus de son rôle de barrière, elle est également le siège de processus de thermorégulation, et assure la fonction d'organe sensoriel. La peau comprend deux couches distinctes : le derme qui est essentiellement formé de tissu conjonctif et l'épiderme, un épithélium pluristratifié, principalement composé de kératinocytes. De même, la cornée est constituée d'un épithélium pluristratifié et d'un tissu conjonctif, le stroma.

## a) La structure de la peau

### (1) L'épiderme

**Chez les mammifères** l'épiderme comprend 4 couches distinctes (Fig. 13, B1). Le stratum basal est composé d'une monocouche de cellules qui adhèrent à la lame basale via des hémidesmosomes. La lame basale peut lier de nombreux facteurs de croissance et cytokines, et assurer un rôle de stockage transitoire de ces molécules en les relarguant pour médier des processus de remodelage ou lors des processus de réparation. Elle est formée principalement par des laminines, du collagène de type IV, des nidogènes et du perlecan, un protéoglycane héparane sulfate. La lame basale contient également de l'agrénine, un autre type de protéoglycane héparane sulfate, de la fibuline, de la fibronectine et des collagènes de type XV, XVIII et XIX. La lame basale présente également de nombreux récepteurs de surface, qui contribuent à l'adhésion cellulaire. Parmi les plus représentés, on retrouve les intégrines. Les cellules de l'assise basale, dont la principale fonction est d'assurer le renouvellement de l'épiderme, forment le lien avec la membrane basale anhiste par l'intermédiaire des hémidesmosomes, puis le derme sous-jacent. Elles expriment la paire de kératines K14 et K5. Les cellules suprabasales expriment la paire de kératine K1-2/K10, spécifiques de leur état différencié (O'Guin *et al.*, 1987). La couche granuleuse, appelée stratum granulosum, est composée de plusieurs couches de cellules aplaties. Elle est caractérisée par la présence de granules constituées de polymères de filagrine. Le stratum corneum est la couche la plus externe. Elle est composée de cellules mortes, les cornéocytes (Fig. 13, B2), reliés entre eux par des cornéodesmosomes dont la dégradation graduelle, médiée par des enzymes lipolytiques et protéolytiques, permet le processus de desquamation.

**Chez les téléostéens**, comme chez l'ensemble des animaux aquatiques, l'épiderme est dépourvu de couche cornée et la protection est assurée par une couche de mucus. On dénombre trois couches cellulaires (Fig. 13, A1). La plus externe (stratum superficiel) est composée d'un seul feuillet cellulaire qui assure une protection contre les chocs osmotiques (Quilhac et Sire, 1999). Les cellules du stratum superficiel ne sont pas renouvelées régulièrement, elles sont remplacées individuellement lors de leur mort (Le Guellec *et al.*, 2004). Le stratum intermédiaire est composé principalement de kératinocytes, mais comprend aussi des cellules



**Figure 13 : Comparaison de la peau de mammifère et de téléostéen.**

La peau est composée d'un épithélium pluristratifié, l'épiderme, et d'un tissu mésenchymateux, le derme. L'épiderme de téléostéen (**A1**) comprend des cellules à mucus et un plus petit nombre de couches que l'épiderme des mammifères (**B1**). Une vue en surface au microscope à balayage, montre que la dernière couche de l'épiderme de téléostéen présente des microvillosités (**A2**) donc le rôle présumé et d'accroître la rétention du mucus recouvrant l'ensemble de l'épiderme. Par contraste, la surface de l'épiderme de mammifère est composée de cellules mortes, cornifiées (**B2**).

spécialisées : cellules à mucus, cellules club, cellules sensorielles. Les kératinocytes en fin de différenciation donnent les cellules superficielles à microvillies du stratum superficiel (Fig. 13, A2), dont le rôle supposé est de retenir le mucus sécrété (Hawkes, 1974; Quilhac et Sire, 1999). La composition du mucus, doit sans doute, comme celui des amphibiens qui cicatrisent vite et sans infection, inclure des peptides antimicrobiens lui conférant un rôle protecteur contre les champignons, les bactéries et les parasites (Erspamer et Cei, 1970; Gottler et Ramamoorthy, 2009; Zasloff, 1987). Enfin, l'assise basale assure le renouvellement de l'épiderme. La composition des kératines épidermiques des téléostéens n'a pas été étudiée, et devrait vraisemblablement comprendre les mêmes types que l'on retrouve non seulement chez les mammifères, mais aussi chez les oiseaux (O'Guin *et al.*, 1987) ; l'épithélium cornéen exprimant, quant à lui, les mêmes kératines K3 et K12 que dans les autres classes (Chaloin-Dufau *et al.*, 1993).

## (2) Le derme

Le derme est un tissu conjonctif contenant des fibroblastes, qui secrètent les éléments de la matrice extra cellulaire.

Chez les **mammifères**, le derme est extrêmement riche en collagène. Les plus représentés sont les collagènes I, III, et V assemblés en larges paquets de fibrilles parallèles qui forment des stries caractéristiques observées en microscopie électronique. Ces fibrilles sont composées à 90 % de collagène de type I et 10 % de collagène de type III. Le collagène V est minoritaire et représente environ 2 %. Ce réseau joue le rôle de structure d'ancrage pour de nombreuses protéines, en particulier pour le collagène XII et XIV (collagènes associés à des fibrilles avec une triple hélice interrompue). On retrouve également d'autres protéines associées, des protéoglycanes tels que decorine, tenascine X, fibromoduline et lumican. Le rôle présumé de ces protéines est de réguler la formation des fibrilles, en contrôlant leur diamètre et leur espacement. Un autre type de collagène relativement présent est le collagène VI, qui forme de fines microfibrilles, assurant un pont entre les fibres de collagènes ou les réseaux protéiques de la membrane basale de la jonction dermo-épidermique. (Krieg et Aumailley, 2011). Outre le réseau de collagène, un réseau de fibres composé d'élastines et de microfibrilles est présent dans le derme. Les microfibrilles sont composées par plusieurs protéines, des fibrillines, des fibulines et des glycoprotéines. Ce réseau assure l'élasticité et la résilience du tissu (Krieg et Aumailley,

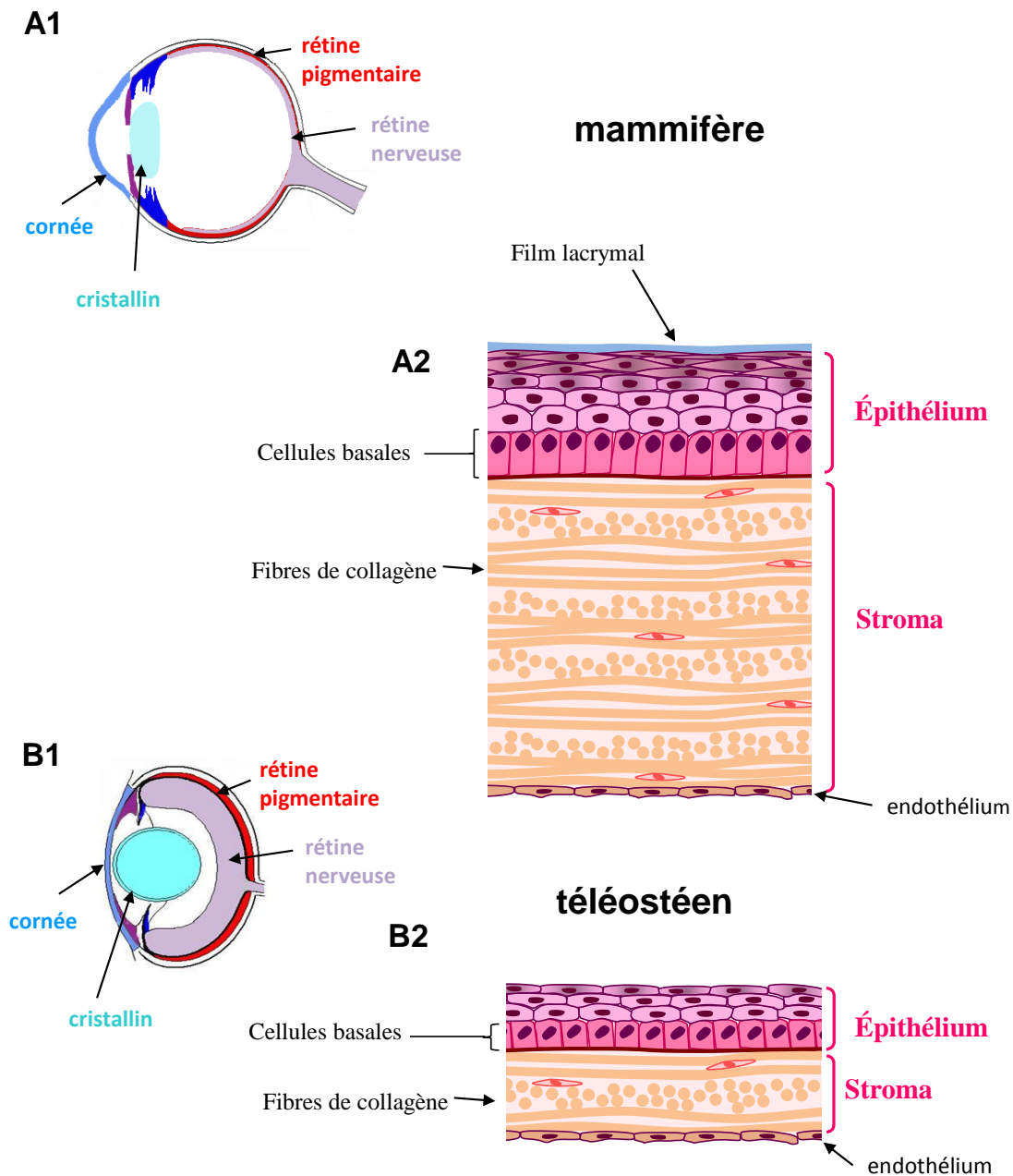
2011). Immédiatement sous le derme se trouve l'hypoderme, dont la partie superficielle comprend des amas de cellules adipeuses.

**Chez les téléostéens**, le derme présente plusieurs particularités. Il est limité sur sa face inférieure par un endothélium. Il se compose de deux régions. La région superficielle, le stratum laxum, est composée d'une matrice de collagène lâche regroupant des fibroblastes, des nerfs, les cellules pigmentées ainsi que les écailles. La seconde région, le stratum compactum, est caractérisée par un assemblage compact des fibres de collagènes semblable à un « contreplaqué ». En dehors de quelques fibrocytes, aucune cellule n'est présente au milieu des fibres. Par endroit cette région est rejointe par de larges fibrilles verticales de collagène traversant les tissus musculaires et constituant les septa. Plusieurs types de collagènes ont été identifiés chez les téléostéens, le type II, II V/XI et XVIII. A l'instar des mammifères, on retrouve majoritairement le collagène de type I, le collagène V étant minoritaire (Le Guellec *et al.*, 2004). L'hypoderme sépare les tissus musculaires du derme. Il est constitué d'une seule couche de grandes cellules adipeuses surmontant une région fibreuse lâche et de nombreux vaisseaux sanguins. Les chromatophores (xanthophores, mélanophores et iridophores) sont situés au-dessus de cette couche graisseuse.

#### **b) La structure de la cornée**

La cornée transparente, située dans la partie antérieure de l'œil, est la « fenêtre du corps ». C'est une région avasculaire, en continuité avec la peau par une zone intermédiaire, le limbe, qui est vascularisé.

**Chez les mammifères** (Fig. 14, A1-A2), la cornée est composée d'un épithélium pluristratifié, squameux donc non kératinisé, caractérisé par l'expression des kératines K3 et K12. Notons que l'assise basale de l'épithélium cornéen central exprime également cette paire de kératines, propre aux cellules en différenciation, alors que les cellules basales du limbe expriment la paire de kératines K5/K14, ce qui est le propre des cellules capables de mitoses comme les cellules de l'assise basale de tous les autres épithéliums pluristratifiés. Cet épithélium cornéen repose sur un stroma dense, les fibres de collagène formant une structure



**Figure 14 : Comparaison de la structure de la cornée chez les téléostéens et les mammifères.**

La cornée, zone la plus antérieure de l'œil est la partie transparente du tégument (**A1, B1**).

La cornée des mammifères (**A2**) et celle des téléostéens (**B2**) sont similaires en termes de structure. Elles comprennent un épithélium pluristratifié muqueux recouvrant un stroma et est limitée du côté intérieur par un endothélium. Seule l'épaisseur de l'épithélium et du stroma est moindre chez les téléostéens. Chez les mammifères l'épithélium cornéen baigne dans un milieu liquide formé par le film lacrymal.

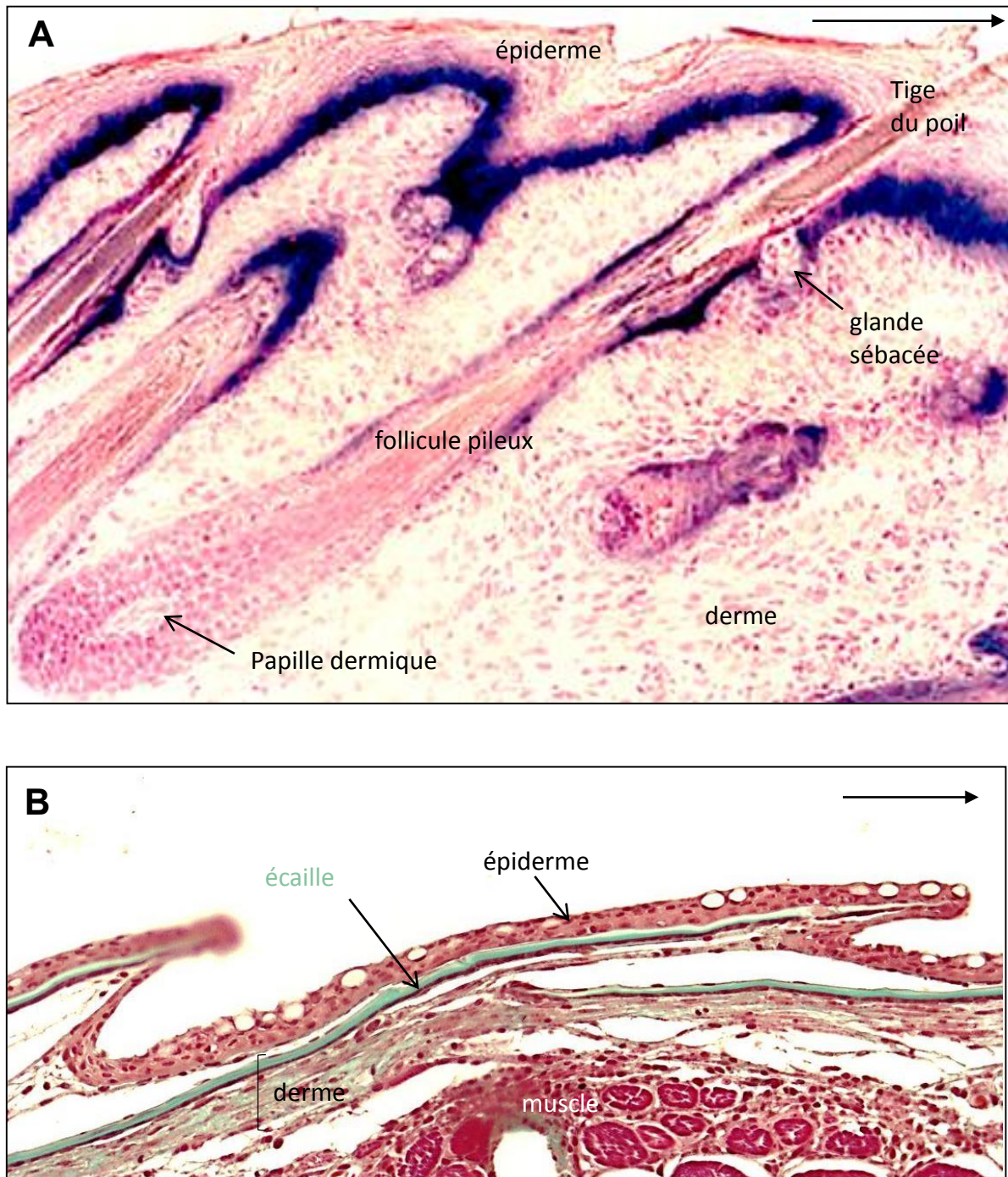
extrêmement régulière (Kinoshita *et al.*, 2001). Pour remplir sa fonction optique la cornée doit rester humide en permanence, ceci est assuré par les glandes lacrymales.

**Chez les téléostéens**, l'épithélium cornéen est également caractérisé par la même paire de kératines K3/K12 (Chaloin-Dufau *et al.*, 1993), et le stroma cornéen présente également une organisation de fibres de collagène très régulière, mais son épaisseur est moindre (Fig. 14 , B1-B2).

### c) Les annexes cutanées

Les annexes cutanées des **mammifères** (glandes et poils) (Fig. 15, A), des **reptiles** (écailles kératinisées) et des **oiseaux** (plumes et écailles kératinisées) sont formées par l'**épiderme** et sont ancrées dans le derme. Leur développement et leur renouvellement sont assurés par des interactions cellulaires épiderme/derme (Dhouailly, 1977) qui requièrent des acteurs moléculaires désormais établis (pour revue : Millar, 2002; Olivera-Martinez *et al.*, 2004). Les plumes des oiseaux et les poils des mammifères sont disposés les uns par rapport aux autres selon des « patterns » réguliers, qui varient d'une région à l'autre du corps (Dhouailly, 1977; Sengel et Mauger, 1976). Notons le « *pattern* » simple des plumes du dos ou des écailles épidermiques de la face plantaire du poulet, un « *pattern* » hexagonal régulier, qui représente la plus simple occupation d'une surface par des structures dont la base est ronde.

Les annexes cutanées des **téléostéens** sont des écailles dermiques de type élasmoïde (Fig. 15 B). Elles sont composées de trois zones (Sire et Akimenko, 2004) : une plaque basale formée d'une fine couche partiellement minéralisée composée d'élasmodine (plusieurs couches de fibrilles de collagène organisées selon un motif « contreplaqué »), une couche externe formée par un tissu minéralisé composé d'un réseau inter-croisé de fibrilles de collagène, enfin la couche superficielle, située à la surface de l'écaille, entre la couche externe et l'épiderme, qui est très minéralisée et dépourvue de fibrilles de collagène. Cette dernière couche permet d'amplifier le rôle protecteur de l'écaille et d'assurer une meilleure adhérence avec l'épiderme. (Sire et Akimenko, 2004). Ces écailles ont une distribution régulière, simplement hexagonale, au moment de leur formation. Suite à leur croissance, elles se recouvrent les unes les autres, le bord distal étant en position supérieure par rapport à l'écaille suivante.



**Figure 15 : Les annexes cutanées chez les mammifères et les téléostéens.**

Sections longitudinales (l'extrémité caudale est indiquée par une flèche) de peau dorsale de souris et de poisson zèbre.

La peau trichogène de souris comprend de nombreux follicules pileux associés à des glandes sébacées (coloration hémalun éosine) (A).

La peau lépidogène de zébrafish est formée d'une succession d'écailles dermiques, composées d'élastine qui lors de leur croissance distale repoussent l'épiderme (coloration au trichrome de Masson) (B).

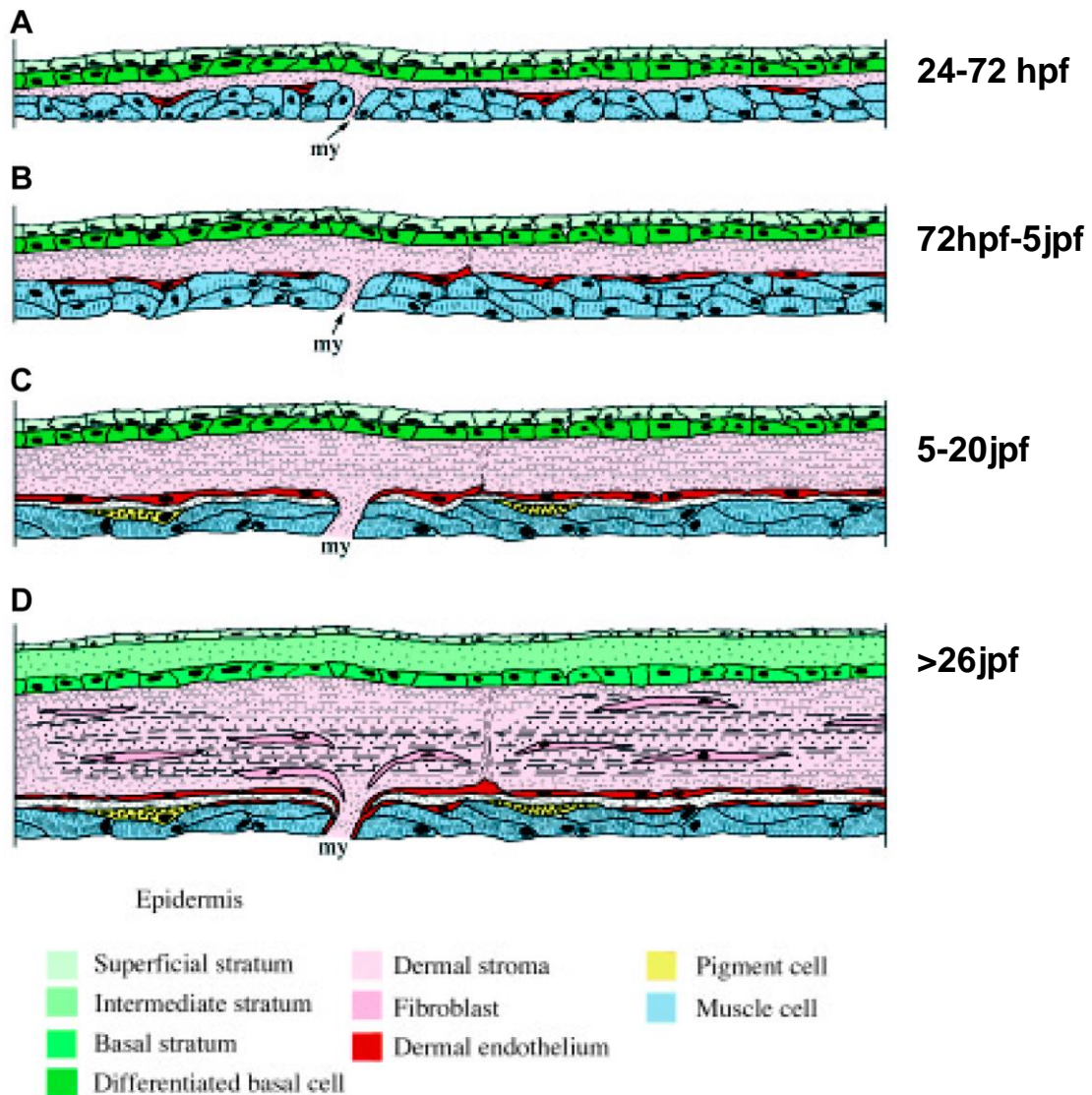


## 2. La formation embryonnaire du tégument

L'origine embryonnaire de la peau a été particulièrement étudiée chez le poulet.

A l'issue de la gastrulation la surface de l'embryon est recouverte par le feuillet ectodermique. L'épiderme embryonnaire est directement issu de ce feuillet, il se développe en une monocouche de cellules épithéliales, recouvert par le périoderme qui disparaît dès que l'épiderme se stratifie et se différencie. L'origine des cellules dermiques est différente selon leur localisation. Dans la région dorsale, le derme dérive du dermomyotome des somites (Mauger, 1972), plus exactement de sa partie médiane (Olivera-Martinez *et al.*, 2000), tandis que dans la région ventrale il provient du mésoderme somatopleural (Fliniaux *et al.*, 2004). Enfin le derme du cou et de la tête est issu des cellules des crêtes neurales (Couly et Le Douarin, 1988). L'origine du derme dorsal et de la tête est identique chez les **téléostéens**, la distinction entre les origines du derme ventral et dorsal n'a cependant pas été mise en évidence (Le Guellec *et al.*, 2004).

**Chez le téléostéen**, la différenciation de la peau est initiée dans la région du pédoncule caudal à 24 heures post-fécondation (hpf). La peau de l'embryon n'est alors composée que de deux couches de cellules épithéliales recouvrant quelques cellules mésenchymateuses non différenciées (Fig 16, A). A 24 hpf, l'épithélium, d'une épaisseur de 4µm est composé de deux couches : une couche superficielle, le périoderme et une couche basale. Une première matrice acellulaire de collagène lâche est déposée à ce stade, constituant un fin espace sous épidermique situé immédiatement sous la couche des cellules basales de l'épiderme. Quelques cellules mésenchymateuses, précurseurs de l'endothélium dermique, sont présentes à la surface des muscles. Jusqu'à 72 hpf, l'espace sous épidermique s'étend, les fibrilles de collagène qui le composent apparaissent plus organisées et forment le stroma dermique primaire (Fig 16, A). A partir de 72hpf, le nombre de cellules endothéliales dermiques augmente et l'épaississement du stroma dermique primaire est maintenu (Fig. 16, B). Jusqu'à ce stade les cellules basales de l'épiderme sont suspectées d'être responsables du dépôt de la matrice acellulaire. Entre 5 et 10 jours post-fécondation (jpf), les fibrilles de collagène composant le stroma dermique s'organisent en réseau et le stroma dermique apparaît plus dense. A partir de 15 jpf, l'épiderme de l'alevin s'épaissit et une 3<sup>ème</sup> couche est formée. Jusqu'à 20-26 jpf, les cellules basales de l'épiderme et les cellules endothéliales dermiques semblent être responsables de la formation



**Figure 16 : le développement de la peau chez le poisson zèbre** (Le Guellec et al., 2004).

De 24 à 72 hpf: la peau est composée de deux compartiments, un épithélium lui-même composé de deux couches cellulaires : le périderme externe et l'épiderme basal et d'un espace sous-épidermique collagénique. Les cellules de l'épiderme basal produisent du collagène de type I **(A)**.

De 72 hpf à 5jpf: la matrice de collagène est produite conjointement par les cellules de la couche basale de l'épiderme et par des cellules de l'endothelium dermique qui progressivement remplissent l'espace sous épidermique qui est encore acellulaire **(B)**.

De 5 à 20 jpf: les fibrilles de collagène s'organisent pour donner la structure en « contre-plaqué » du derme; le stroma s'épaissit et l'hypoderme se forme **(C)**.

Au-delà de 26 jpf: la couche intermédiaire de l'épiderme se différencie et des fibroblastes, probablement originaires des myosepta, envahissent le stroma dermique; à partir de ce stade, seuls les fibroblastes continuent à produire le collagène **(D)**.

*My* : myoseptum

de la matrice de collagène (Fig. 16, C). A partir de 26 jpf, l'épiderme se compose de 4 couches cellulaires, les cellules de la couche superficielle et de la couche basale sont clairement distinctes des autres couches cellulaires. Il est supposé qu'à partir de ce moment les cellules basales de l'épiderme arrêtent de déposer du collagène. Le derme primaire s'est épaissi et le stroma dermique secondaire, appelé stratum compactum est formé. Il est caractérisé par la présence de nombreux fibroblastes entre les lamelles de collagène (Fig. 16, D). Ainsi à ce stade, seuls les fibroblastes et les cellules endothéliales dermiques contribueraient à la production de collagène. A partir de 30 jpf, la formation des écailles est initiée par la migration de fibroblastes, qui se différencieront en cellules formatrices d'écailles, à proximité des cellules épidermiques (Le Guellec *et al.*, 2004).

La morphogénèse des phanères a été très étudiée chez la souris et chez le poulet. Bien que les follicules pileux et plumaires soient très différents du point de vue de la structure, les premiers événements de leur morphogénèse sont tout à fait comparables. Tous deux nécessitent la mise en place d'un primordium qui correspond à l'association d'une placode, de morphologie variable, qui est un épaississement de l'épiderme, et d'une condensation dermique. Dans le cas des mammifères (Fig 17, A), la prolifération des cellules de la placode forme un bourgeon pileux qui s'enfonce dans le derme, alors que la placode plumaire forme une élévation de l'épiderme, le bourgeon plumaire. Dans les deux cas, le regroupement des cellules du derme, par migration et non par prolifération (Michon *et al.*, 2008; Sengel et Mauger, 1976), forme les condensations qui se différencient en papilles dermiques. Du point de vue moléculaire, la formation des placodes plumaires et pilaires, implique les mêmes voies de signalisation, principalement les voies Wnt, Eda, FGF, et Shh. La voie de signalisation de l'ectodysplasine (EDA) (Pummila *et al.*, 2007), en réponse à un premier message dermique ubiquitaire médié par la voie Wnt, aboutit à la mise en place des placodes. Ces dernières expriment FGF20 qui permet l'attraction des fibroblastes et conduit à la formation des condensations dermiques (Huh *et al.*, 2013). Shh contrôle ensuite la prolifération des placodes et la morphogénèse des follicules pileux ou plumaires (St-Jacques *et al.*, 1998).

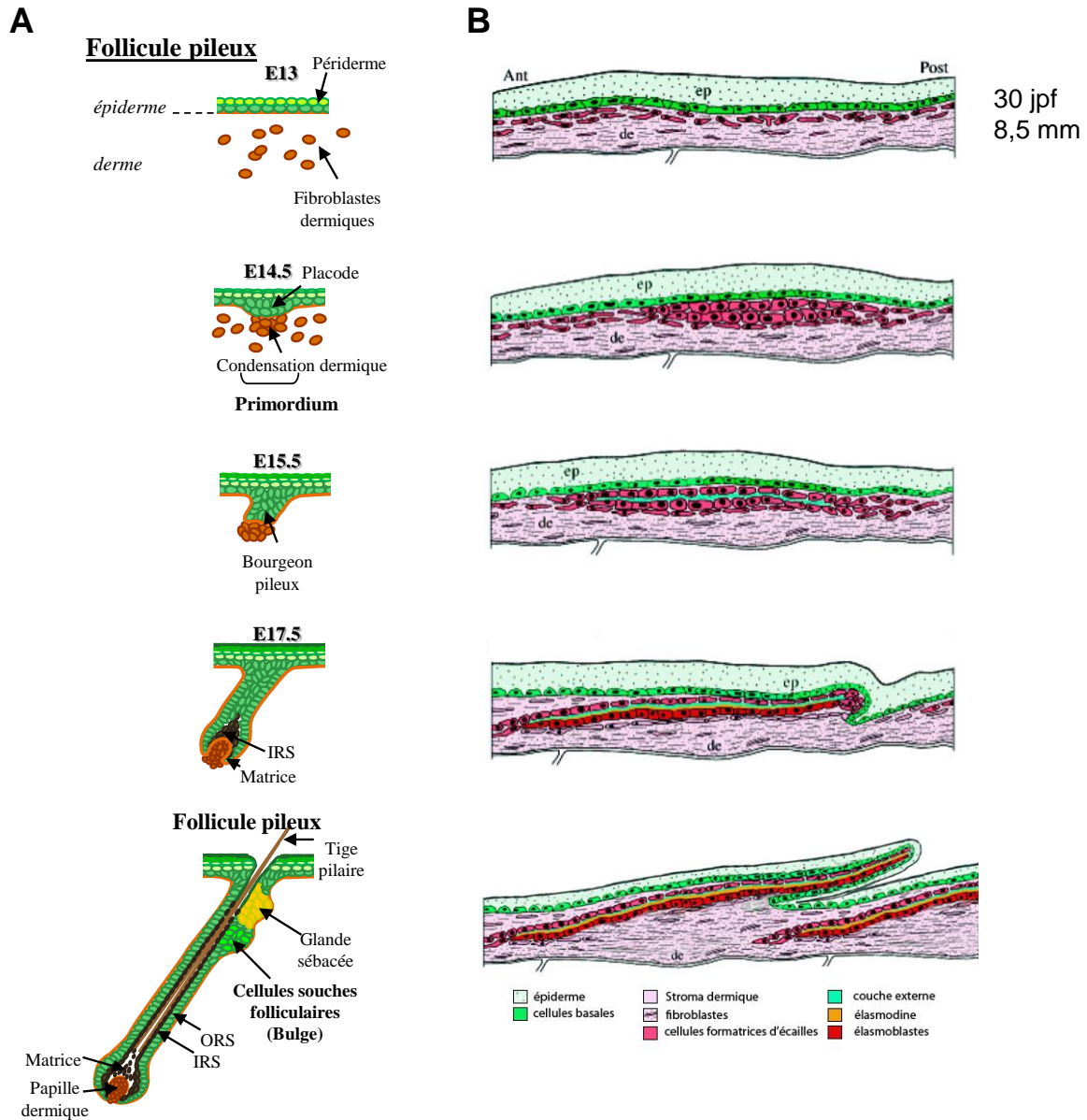


Figure 17: Le développement de l'unité pilosébacée de mammifère et de l'écaille de téléostéen.

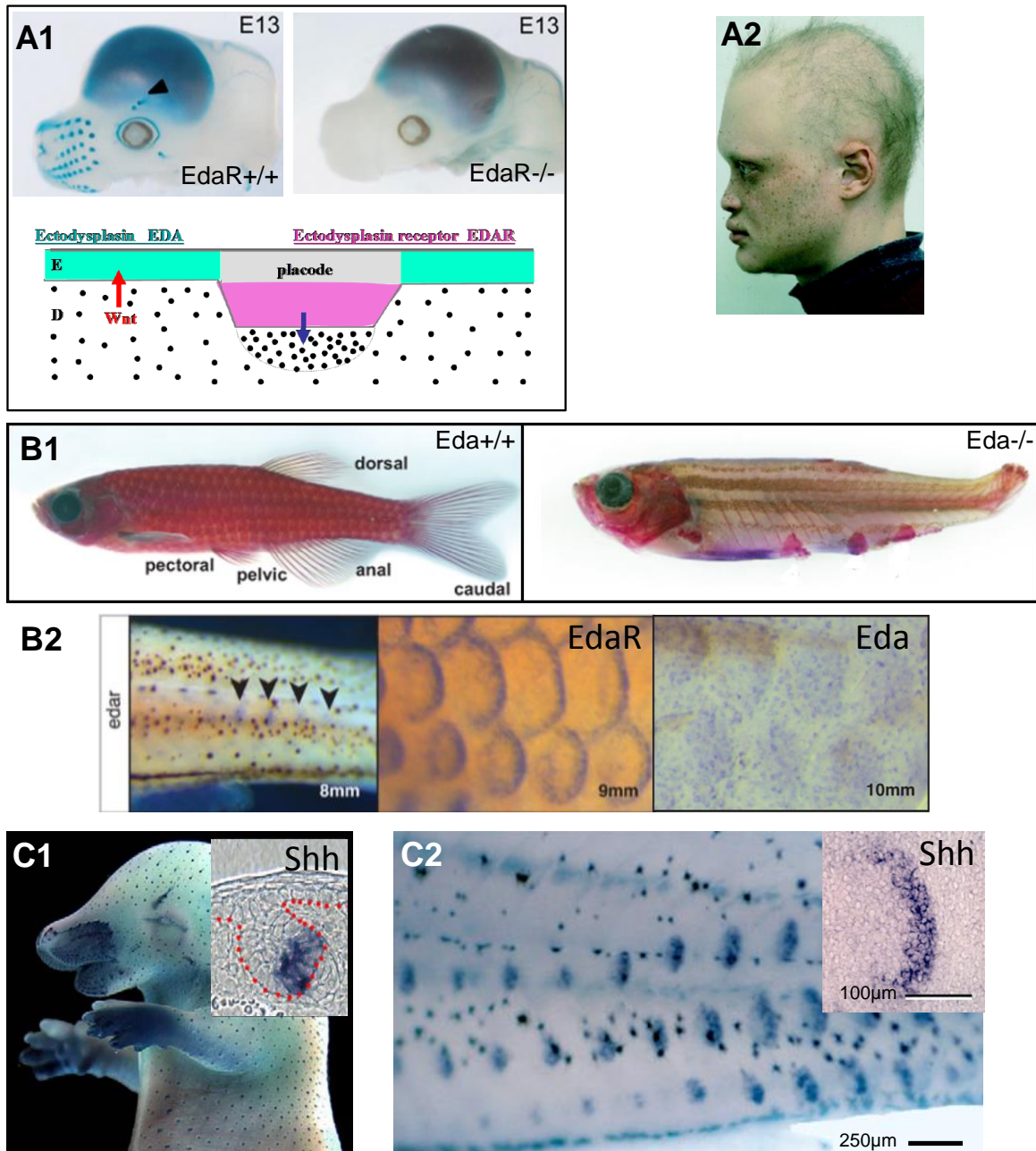
**Chez la souris**, à 14.5 jours de développement (E14.5), les premiers primordia apparaissent. Ils correspondent à l'association d'une placode et d'une condensation dermique. Les cellules de la placode prolifèrent et migrent progressivement en direction du derme. Les cellules épithéliales de l'extrémité proximale du bourgeon pileux s'organisent pour former une cavité à l'intérieur de laquelle s'engouffrent les cellules de la condensation dermique qui forment la papille dermique. Les kératinocytes du bourgeon pileux s'organisent en plusieurs couches concentriques pour former le follicule pileux mature, producteur de la tige pileuse (**A**) (thèse E. Collomb, 2010).

**Chez les téléostéens**, la formation de l'écaille est aussi initiée par la formation d'un primordium. Les fibroblastes s'accablent dans la région supérieure du derme, en dessous de l'assise basale de l'épiderme. La papille dermique se forme puis se différencie et secrète les premiers dépôts de matrice de la couche externe de l'écaille. L'élasmodine est ensuite déposée par les élasmoblastes, issus d'une différenciation des cellules de la papille dermique localisées sous le dépôt de couche externe de l'écaille. Tandis que la région antérieure de l'écaille s'ancre plus en profondeur dans le derme, la région postérieure repousse l'épiderme et entraîne la formation d'un pli (**B**) (modifié d'après Sire et Akimenko, 2004).

La formation des écailles de **téléostéens** (Fig 17, B) a été étudiée par Jean-Yves Sire (Sire et Akimenko, 2004; Sire *et al.*, 1997) chez le poisson zèbre. Elle est initiée à environ 20-25 jpf, les premières écailles étant visibles à environ 30 jpf chez un alevin d'une taille de 8,5 à 9,5 mm (le moment du début de la formation des écailles est dépendant de l'âge et de la taille). Lors de la cascade d'interactions dermo-épidermiques qui préside à la formation des annexes cutanées, dans le cas des téléostéens le dernier tissu qui répond, donc le tissu effecteur, est le derme, contrairement à ce que l'on observe chez les mammifères et les oiseaux, où le tissu effecteur est l'épiderme, plumes et poils étant constitués de kératinocytes. Dans le cas de l'écaille des téléostéens, ce sont les cellules de la papille dermique qui déposent les différentes couches minéralisées pour former l'écaille.

La formation des écailles commence (Sire et Akimenko, 2004) par l'invasion de nombreux fibroblastes dans le stroma dermique primaire. Certains de ces fibroblastes s'accumulent dans la région supérieure du derme, le long de la jonction dermo-épidermique. Ils sont dans un premier temps uniformément répartis, puis une étape de ségrégation forme un motif de répartition hexagonale. Les fibroblastes regroupés forment les papilles dermiques. Ces dernières sont en contact avec l'assise basale de l'épiderme, que l'on peut qualifier de placode. Seules les deux couches superficielles de la papille se différencient en cellules productrices de l'écaille. Ces cellules, appelées élasmoblastes, sont responsables de la déposition de l'élasmodine. Les fibroblastes de la couche inférieure de la papille stoppent leur différenciation et forment les cellules de la poche de l'écaille (Sire, 1989). La dernière étape observée de la morphogénèse de l'écaille est la formation d'un pli d'épiderme autour du bord postérieur de l'écaille correspondant à la zone où les écailles se chevauchent. Au cours de la croissance de l'écaille, les différentes couches sont déposées de façon séquentielle : la couche externe est la première à se former. La plaque basale, qui permet un épaissement de la nageoire est déposée dans un deuxième temps, puis la couche superficielle, zone de contact avec l'épiderme est mise en place. Lors de l'ensemble de ce processus la région antérieure de l'écaille descend plus profondément dans le derme, seule la région postérieure reste en contact avec l'épiderme, ce qui conduit à l'organisation oblique des écailles (Sire et Akimenko, 2004).

Les **acteurs moléculaires** responsables de la formation des écailles chez les téléostéens n'ont été que peu étudiés. Les premiers éléments découverts mettent cependant à jour de fortes similitudes avec le processus de morphogenèse des annexes cutanées chez les mammifères et chez les oiseaux, la présence de placodes étant mise en évidence par l'expression des acteurs moléculaires. A l'instar des autres vertébrés, chez le poisson zèbre la voie Eda/EdaR est impliquée dans la formation des placodes (Fig. 18, A1-B2), Eda étant exprimé par l'épiderme interplacodal, et EdaR par l'épiderme placodal. Chez des mutants des gènes codant pour l'ectodyspasin Eda ou du récepteur associé EdaR, on observe des perturbations dans la formation des annexes, allant jusqu'à l'absence quasi-totale d'écailles (Fig. 18, B1) (Harris *et al.*, 2008). L'implication de la voie Shh dans la morphogenèse de l'écaille a également été mise en évidence (Fig. 18, C2), en effet les transcrits de Shh sont détectés dans les cellules de la couche basale de l'épiderme situées au contact de la papille dermique de l'écaille (Sire et Akimenko, 2004). Notons que chez le poisson zèbre, la forme du primordium, révélée par les hybridations *in situ*, comportant la placode et la condensation dermique, est en arc de cercle.



**Figure 18: Exemples de voies de signalisation identiques impliquées lors de l'initiation de la formation du poil et de l'écaille.**

Le couple ligand-récepteur de la voie Eda est détecté dès l'initiation de la formation des vibrisses chez la souris **dans l'épiderme placodal et interplacodal** (A1, Pispa et al., 2008). La mutation de la voie Eda entraîne l'absence de formation de placodes chez la souris. Cette mutation est également connue dans l'espèce humaine, il en résulte une absence de pilosité (A2, Mikkola et Thesleff, 2003). De la même façon, les poissons zèbres dont le gène EDA est muté ne présentent que de rares écailles (B1, Harris et al., 2008) (De plus, leurs nageoires sont absentes, alors que la formation des membres n'est pas affectée chez les mammifères). Notez en B2 l'expression du gène Edar le long de la zone marginale postérieure de la future écaille qui correspond à la zone de contact placode/papille dermique.

De même, les transcrits de Shh sont détectés dans la placode et le bourgeon pileux de la souris (C1, cours M2, Dhouailly), ainsi que dans la placode de l'écaille de poisson zèbre (C2, Sire et Akimenko, 2004). Dans les deux cas ils sont localisés aux niveaux des cellules épidermiques en contact avec les papilles dermiques

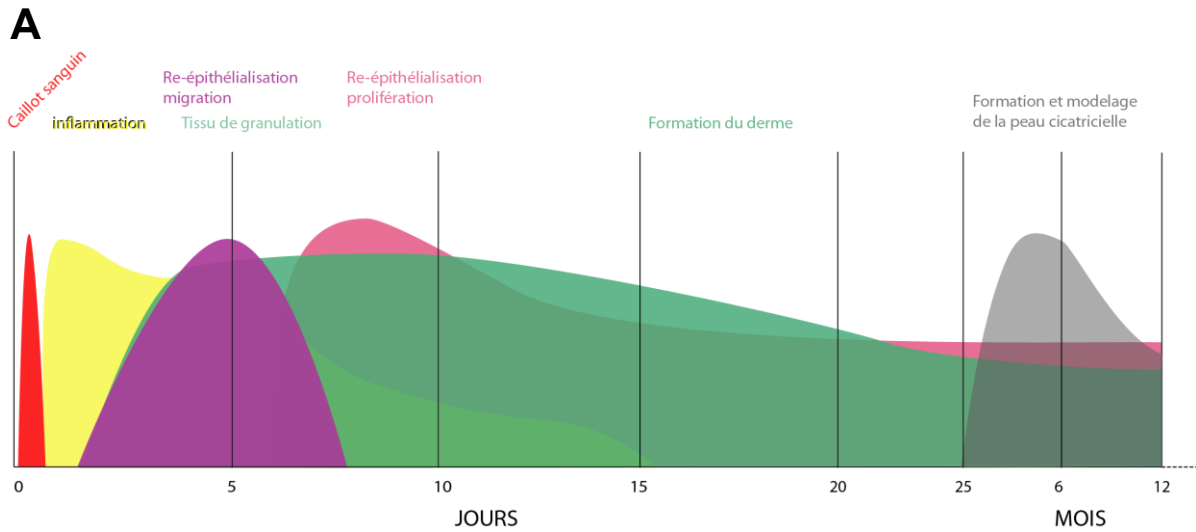
### 3. La cicatrisation du tégument chez les mammifères

La cicatrisation de la peau a été très étudiée chez les mammifères, notamment puisqu'elle débouche sur la formation d'un tissu fibreux qui entraîne l'apparition d'une cicatrice, pouvant, selon sa localisation et son étendue, engendrer un traumatisme chez l'humain. Elle ne réplique pas, en termes de structure et de fonction, le tissu d'origine. La cicatrisation se déroule en **quatre grandes étapes** : la phase de latence, la phase inflammatoire, la phase de prolifération et enfin la phase de remodelage (Fig. 19, A).

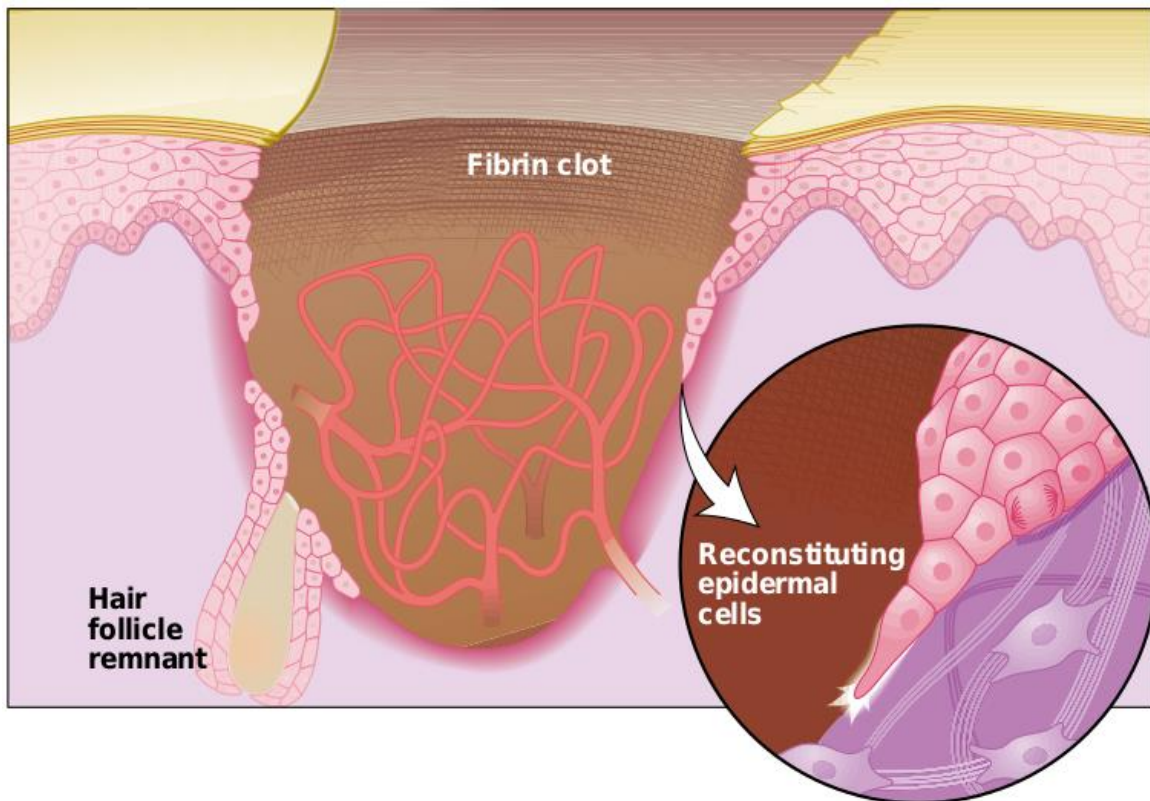
La première étape, appelée **phase de latence**, a lieu immédiatement, elle est achevée en quelques heures. Elle a pour but **d'obtenir la blessure**. Lorsque la blessure pénètre au-delà de la couche épidermique, les vaisseaux sanguins et lymphatiques sont touchés. Le contact avec le milieu environnant est donc rapidement empêché par la formation d'une matrice provisoire : le caillot sanguin par agrégation des thrombocytes (Fig. 19, B). Les vaisseaux sanguins subissent ensuite une brève vasoconstriction, déclenchée par les plaquettes pour réduire la perte de sang (Martin, 1997). Le caillot contient des molécules de fibrine, de fibronectine, de vitronectine et de trombospondine qui assurent le rôle de matrice provisoire, ainsi que des cytokines et des facteurs de croissance. Pendant cette phase, l'organisme recrute les différentes cellules et facteurs nécessaires à la mise en place du processus de cicatrisation. La matrice provisoire permet la migration des leucocytes, des kératinocytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales, et sert également de réservoir de facteurs de croissance. La vasoconstriction des vaisseaux est suivie par une vasodilatation permettant l'accumulation de thrombocytes dans cette matrice provisoire. Les plaquettes sécrètent des facteurs chimiotactiques facilitant l'invasion des leucocytes dans la zone lésée.

Les plaquettes et les leucocytes sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance qui activent la réponse inflammatoire, stimulent la synthèse de collagène et la transformation des fibroblastes en myofibroblastes (TGF- $\beta$ ), l'angiogenèse (FGF-2, VEGF-A, HIF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ ), ainsi que le processus de re-épithélialisation (EGF, FGF-2, IGF-1 et TGF- $\alpha$ ) (Werner et Grose, 2003). Cette première phase initie par la suite la réponse inflammatoire. Les protéines de la famille des TGF- $\beta$ s sont connues pour jouer un rôle important dans la cicatrisation. Elles sont sécrétées par différents types de cellules, notamment par les macrophages et les fibroblastes, mais sont aussi relarguées à partir de sites de stockage de la matrice extracellulaire (Margadant et Sonnenberg, 2010; Schultz et Wysocki, 2009). Elles sont sécrétées sous leur





**B**



**Figure 19 : la cicatrisation de la peau chez les mammifères.**

La cicatrisation chez les mammifères est un processus long qui conduit à la formation d'une cicatrice.

Graphique représentant les différentes phases du processus cicatriciel : caillot sanguin, inflammation, re-épithélialisation par migration, puis prolifération, suivi de la reformation d'un derme et du remodelage de la cicatrice. On n'observe pas, chez l'homme tout du moins, de re-formation des annexes cutanées (**A**).

La fermeture de la blessure s'effectue après la formation d'un caillot sanguin et l'établissement d'une matrice provisoire permettant la migration des kératinocytes (**B**, modifié d'après Martin, 1997).

forme inactive et nécessitent une activation par l'action de protéases ou un changement de conformation induit par les intégrines. Parmi les membres de la famille des TGF- $\beta$ s, TGF-B1 est connu pour être un facteur activateur de fibrose et de cicatrice, tandis que TGF-B3 aurait un rôle anti-cicatrice. Chez des rats âgés une application topique de TGF- $\beta$ 1 augmente le dépôt de matrice extracellulaire, ainsi que la migration et la prolifération des fibroblastes (Puolakkainen *et al.*, 1995) ; on constate également une augmentation de l'angiogenèse, de l'infiltration de cellules inflammatoires et une fermeture épithéliale plus rapide.

**La phase inflammatoire** est déclenchée au cours de la mise en place du caillot sanguin. Elle se décompose en deux parties ; une première réponse rapide correspondant à un recrutement des neutrophiles et une deuxième phase plus lente consistant en l'apparition et la différenciation des monocytes en macrophages. Les **neutrophiles** sont généralement présents pendant 2 à 5 jours et sont la conséquence de l'activation du système du complément. Ils assurent le nettoyage de la zone cicatricielle, notamment par leur capacité de phagocytose et de sécrétion de protéases qui permettent d'éliminer les bactéries et de dégrader les tissus nécrotiques consécutifs à la blessure. Ils ont également un rôle chimio attractant pour d'autres types cellulaires impliqués dans la suite de la phase inflammatoire (Eming *et al.*, 2007). Les neutrophiles relarguent des médiateurs tels que les TNF-alpha, IL-1B et IL-6 qui amplifient la réponse inflammatoire. De plus, ils sécrètent des substances antibactériennes (peptides cationique, eicosanoïdes) et des protéases. Environ 3 jours après la blessure, les **macrophages** envahissent la zone cicatricielle et assurent un rôle de phagocytose des pathogènes et des débris cellulaires. Ils sécrètent également des facteurs de croissance, des chimiokines et des cytokines. La phase inflammatoire joue un rôle majeur dans la production des facteurs de croissance et des cytokines qui sont responsables des mouvements cellulaires et tissulaires impliqués dans la cicatrisation. L'inflammation semble être liée au processus de formation de cicatrices, le peu d'inflammation observée chez les embryons étant corrélée avec leur absence (Redd *et al.*, 2004).

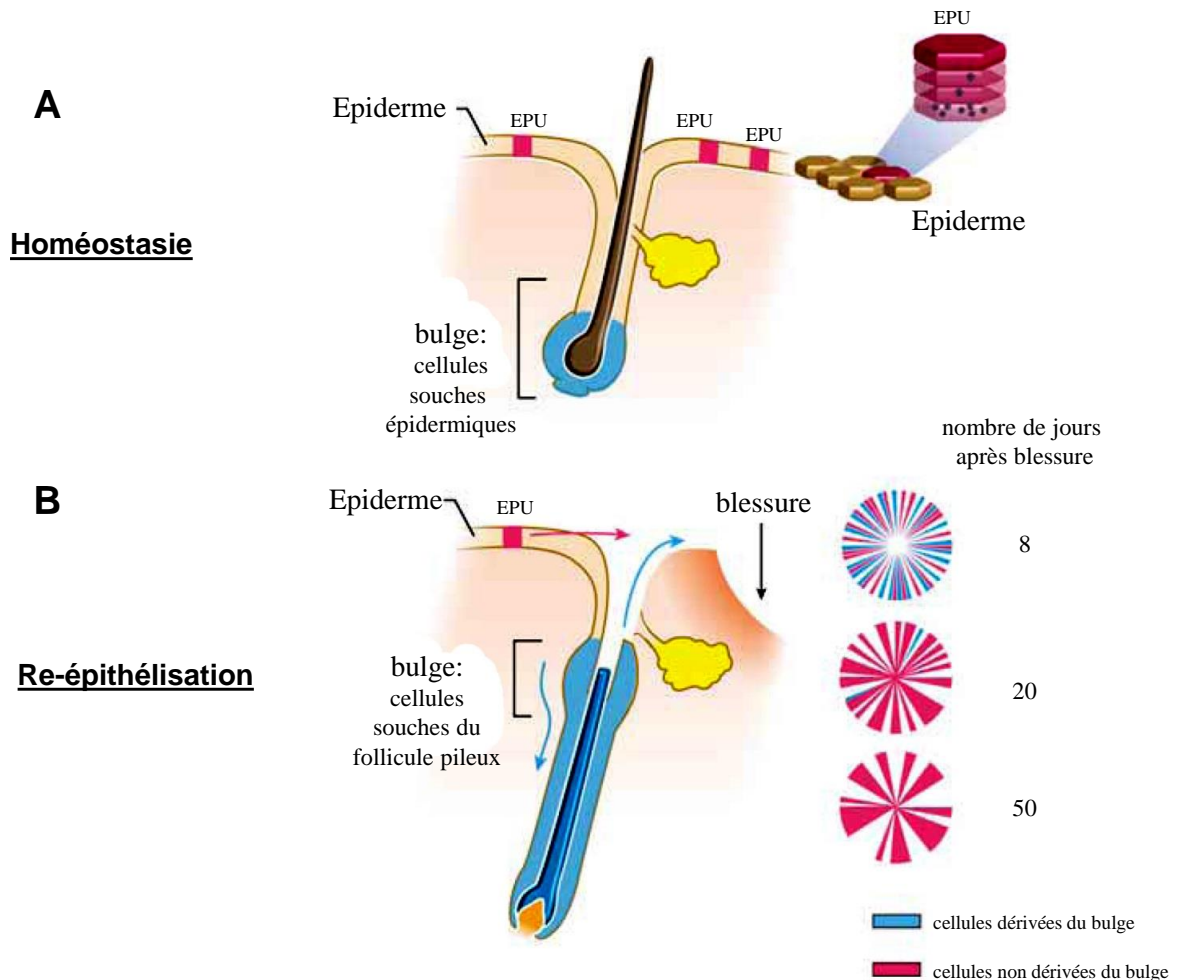
**Lors de la phase de prolifération** (3-10 jours post-blessure), on assiste à une re-épithélialisation, à la restauration du système vasculaire local, et à la formation d'un tissu de granulation.

La **re-épithélialisation** est assurée dans un premier temps par des kératinocytes proches des bords de la blessure et par les niches de cellules souches épithéliales des follicules pileux et des glandes sudoripares (Lau *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 1998). Les cellules souches des

follicules pileux sont localisées dans le bulge. Elles sont sollicitées à chaque cycle pileux pour former un nouveau follicule pileux, mais sont également capables de migrer vers la zone de lésion en cas de blessure. Elles seront ensuite remplacées par les cellules souches épidermiques (Cotsarelis, 2006) qui migrent depuis leur niche, située dans l'assise basale de l'épiderme inter-folliculaire, en profondeur des crêtes épidermiques (Ghazizadeh et Taichman, 2005) (Fig. 20). Ce processus est déclenché par l'activation de voies de signalisation, au niveau des cellules (épithéliales et non-épithéliales) situées à la proximité des bords de la blessure, entraînant la production de nombreux facteurs de croissance et cytokines (EGF, KGF, IGF-1 et NGF) (Werner et Grose, 2003). L'annulation de l'inhibition de contact et des tensions physiques au niveau des desmosomes et des hémidesmosomes entraîne la production de médiateurs lipidiques et active les kinases associées à la membrane (SRC kinases), induisant une augmentation de la perméabilité de la membrane pour les ions, notamment le calcium. Le changement de polarité qui en résulte joue le rôle de signal d'alerte pour les cellules en bordure de la plaie qui préparent leur migration en réorganisant leurs filaments de kératines. Les jonctions desmosomiques étant rendues plus lâches par l'action de la collagénase et de l'élastase, les keratinocytes peuvent alors migrer sous le caillot sanguin, guidés par les gradients chimiotactiques établis par des médiateurs tels que IL-1, le long d'une matrice riche en fibronectine, jusqu'aux couches superficielles du tissu de granulation (Clark *et al.*, 1982; Jacinto *et al.*, 2001). La voie Wnt semble requise lors de la phase de re-épithélialisation, en effet, Wnt10b est détecté au niveau des cellules épithéliales engagées dans le processus de migration jusqu'à 3 jours post-blessure chez la souris tandis que Wnt 4, 5a et 10b sont localisés au niveau des follicules pileux. Certains microRNAs également sont impliqués dans la régulation de la re-épithélialisation. Une surexpression de MiR-21, un microRNA fréquemment retrouvé surexprimé dans des blessures chroniques ne cicatrisant pas, empêche la re-épithélialisation d'une lésion chez le rat (insertion Pastar et al 2012).

**La restauration du système vasculaire** de la peau est initiée par des facteurs de croissance de type VEGF, PDGF, bGFG ainsi que des thrombines. La première étape dans la formation d'un nouveau vaisseau sanguin implique le déclenchement, par le biais d'une interaction entre les facteurs précédemment cités et leurs récepteurs, de cascades de signalisations au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux existants. Les cellules endothéliales activées secrètent des enzymes protéolytiques qui attaquent la lame basale. Ceci

permet aux cellules endothéliales de proliférer et de migrer vers la blessure par un processus dit de « germination ».



**EPU**= unité proliférative épidermique

**Figure 20 : Origine des cellules lors de la re-épithélialisation chez les mammifères (modifié d'après Cotsarelis 2006).**

Le renouvellement de l'épiderme ou homéostasie est assuré par les unités prolifératives épidermiques (EPU) issues des cellules souches dispersées au sein de l'assise basale de l'épiderme **(A)**.

Lors d'une blessure, les cellules qui dérivent des cellules souches du follicule pileux, situées dans le « bulge » participent largement dans un premier temps à la re-épithélialisation, puis sont progressivement remplacées par des cellules dérivées de l'assise basale de l'épiderme **(B)**.

Ces protrusions forment ensuite de petits canaux tubulaires qui s'interconnectent les uns aux autres pour former de nouveaux vaisseaux qui se différencieront par la suite en artères et en veinules. L'arrivée d'un afflux sanguin dans ces vaisseaux nouvellement formés termine le processus d'angiogenèse.

La dernière étape de la phase de prolifération est la mise en place du **tissu de granulation**. Elle permet le remplacement de la matrice provisoire mise en place au début de la cicatrisation et entraîne généralement l'apparition d'une cicatrice. L'angiogenèse n'étant pas complètement terminée à ce stade, le tissu formé est également très vascularisé. Le tissu mis en place lors de cette étape est riche en fibroblastes (qui sont majoritaires et ont pour rôle de produire du collagène de type III et les composants de la matrice extracellulaire), en granulocytes, en macrophages et en fibres de collagène éparses. La formation de la matrice extracellulaire est une étape importante puisqu'elle permet de fournir un support pour la croissance, la migration et la différenciation des cellules (Eckes *et al.*, 2010). A la fin de la phase de granulation, le nombre de fibroblastes est considérablement réduit par leur différenciation en myofibroblastes, et par un phénomène d'apoptose (Hinz, 2007).

Le rôle de la voie Wnt lors de la néoformation du derme a principalement été étudié à travers l'expression de la  $\beta$ -caténine. Son expression est en effet plus importante, aussi bien sur le plan transcriptionnel que traductionnel, dans les fibroblastes lors de la phase de prolifération du derme chez la souris et chez l'homme. Le taux d'expression de la  $\beta$ -caténine est directement corrélé au phénotype de reconstruction dermique : un haut niveau d'expression entraîne une augmentation du nombre de cellules dans le derme, avec un excès de dépôt de collagène, la formation d'une cicatrice plus importante et une augmentation de la formation de myofibroblastes. Un faible niveau d'expression provoque la formation d'un derme plus fin et plus pauvre en cellules (Cheon *et al.*, 2006). L'activité de la  $\beta$ -caténine n'est pas exclusivement régulée par les ligands de la voie Wnt pendant la cicatrisation. En effet, un traitement avec un adénovirus exprimant l'inhibiteur DKK1 chez la souris, n'entraîne pas de baisse significative du niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine lors de la cicatrisation, contrairement à ce qui a été observé lors du processus de réparation osseuse (Bielefeld *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2007). L'expression de la  $\beta$ -caténine est également régulée par des protéines de la matrice

extracellulaire, tel que la fibronectine, qui active la  $\beta$ -caténine via une voie GSK3 $\beta$ -dépendante médiée par les intégrines. Les intégrines, présentes sur les membranes cellulaires, sont un des moyens majeur de communication entre la matrice et l'intérieur de la cellule. Durant la phase proliférative de la cicatrisation, les souris mutantes pour l'extra-domaine A de la fibronectine (ExDAF) montrent une activation réduite de la  $\beta$ -caténine, avec une présence réduite de fibroblastes et une peau cicatricielle plus fragile en comparaison avec des souris de type sauvage. (Bielefeld *et al.*, 2011). Un croisement entre les souris ExDAF et des souris avec une expression conditionnelle de  $\beta$ -caténine restaure le phénotype normal. Tout ceci suggère une régulation du comportement des fibroblastes par la fibronectine à travers l'activité de la  $\beta$ -caténine. Wnt 4 est également détecté dans le derme, jusqu'à 30h à 7 jours post-blessure selon les études (Labus *et al.*, 1998; Okuse *et al.*, 2005). La voie Wnt est également nécessaire à la régénération des follicules pileux après une blessure. Ces nouveaux follicules ne sont pas formés par les cellules souches des follicules pileux (Ito *et al.*, 2007), mais probablement par des cellules souches situées au niveau des cellules basales épidermiques. La voie Shh semble également être impliquée dans la réparation du derme et dans le processus d'angiogenèse. Pendant la cicatrisation l'expression de Shh n'est détectée que dans les follicules pileux (Ito *et al.*, 2007). Cependant, chez un modèle de souris diabétique, une application topique de Shh, entraîne une amélioration dans la re-épithélialisation et la formation d'un derme plus riche en collagène. Ces souris traitées présentent également une augmentation de la vascularisation et du nombre de cellules dans la zone lésée. L'augmentation de formation de tissu fibreux est probablement la conséquence d'un excès de stimulation des fibroblastes par Shh, déjà démontrée *in vitro* (Asai *et al.*, 2006). De la même façon, chez la souris pendant 30 jours après la blessure un traitement à la cycloamine, un inhibiteur de la voie Shh, entraîne un délai dans la fermeture de la blessure, une formation réduite du tissu de granulation et de la vascularisation (Sorg *et al.*, 2007). Les microRNAs apparaissent également comme des régulateurs de la formation du tissu de granulation, ainsi miR-21, un microRNA responsable d'une inhibition de la re-épithélialisation empêche également le développement du tissu de granulation chez le rat (Pastar *et al.*, 2012).

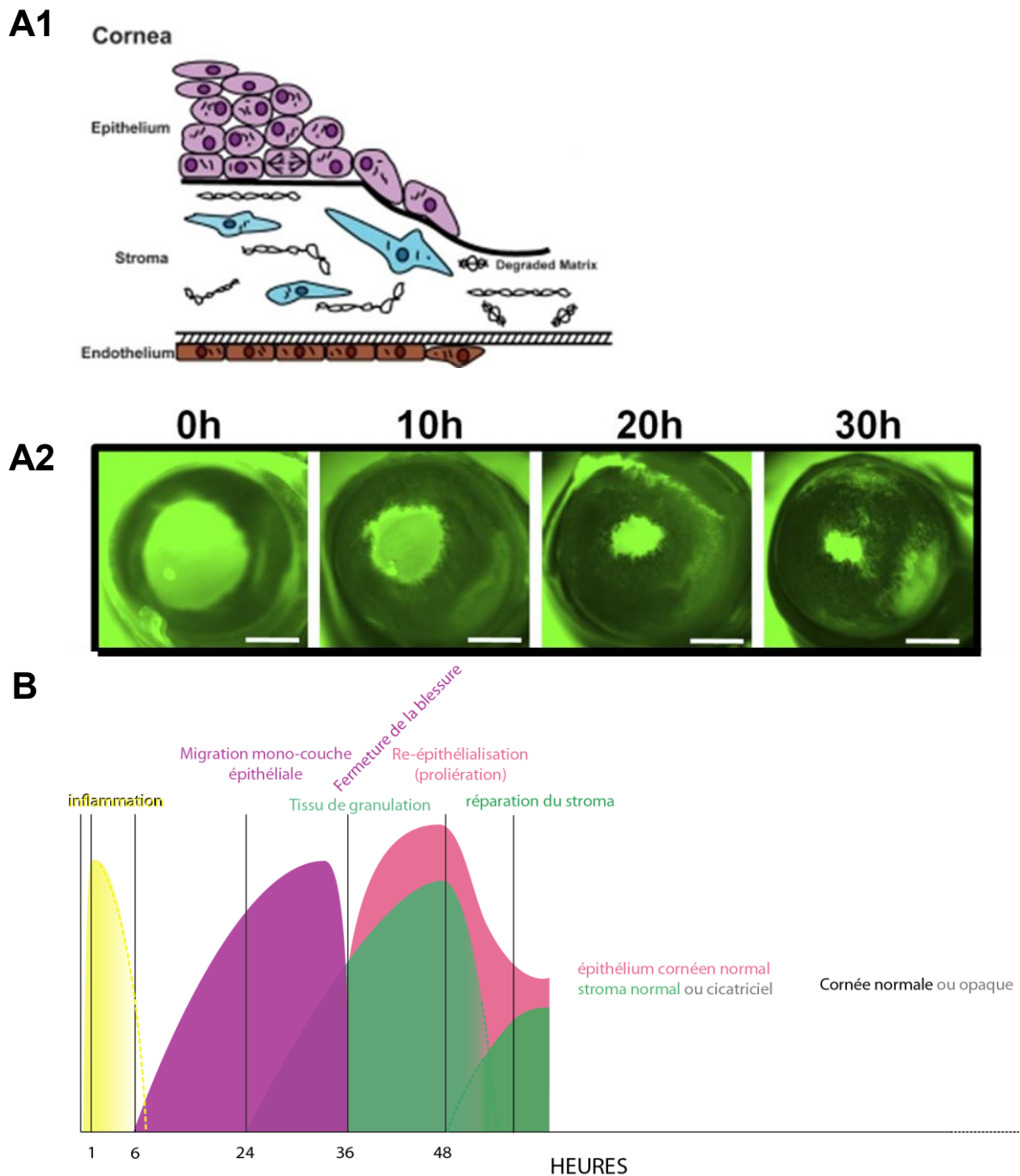
**Le remodelage est la dernière phase de la cicatrisation.** Il est observé environ 21 jours après la blessure et peut s'étendre sur une période de l'ordre d'une année. Après la fin de la phase de granulation, la zone cicatricielle est principalement avasculaire et acellulaire. Durant cette phase de maturation, de nombreux changements sont initiés dans la composition de la

matrice extracellulaire. Le collagène III, produit lors de la phase de prolifération est peu à peu remplacé par du collagène de type I, moins élastique et organisé en fibres parallèles. Les myofibroblastes présents dans la blessure se contractent, et par leurs multiples adhérences avec le collagène, induisent une déformation de la zone blessée ce qui entraîne une diminution de la surface de la cicatrice en développement (Gurtner et Evans, 2000; Tziotzios *et al.*, 2012). La formation d'une cicatrice est l'étape finale de la cicatrisation chez les mammifères. Cicatrice et inflammation semblent étroitement liées, en effet, l'embryon lors de la réparation d'une blessure, ne présente pas l'inflammation typique observée chez l'adulte et ne forme pas de cicatrice. De plus, la formation de la cicatrice s'étend sur une zone plus large lorsque l'inflammation est importante. La plupart des blessures qui ne cicatrisent pas complètement restent à un stade chronique de la phase inflammatoire, ce qui conduit à la formation de cicatrices hypertrophiques ou chéloïdes. D'une façon générale, on observe dans ce cas une expression élevée de  $\beta$ -caténine (Sato, 2006).

Notons que la formation de cicatrice normale ou anormale est le propre de l'espèce humaine. Après chirurgie vétérinaire il est courant d'observer que la peau se reconstitue parfaitement et que la zone « cicatricielle » régénère des poils. Ce fait est également, observé chez une souris africaine (*Acomys cahirinus*) capable d'autotomie de la peau pour échapper à ses prédateurs. Sa peau fait ensuite l'objet d'une régénération complète (Seifert *et al.*, 2012).

#### 4. La cicatrisation de la cornée chez les mammifères

La cicatrisation de la cornée est caractérisée par sa rapidité, elle se compte en heures par rapport à celle de la peau qui se compte en jours. Comme pour la cicatrisation cutanée, la réparation de la cornée commence par **une phase de latence** (Fig. 21, B) (pour revue : Teele, 1999). Au cours de cette phase, les leucocytes issus des larmes et des bords de la blessure envahissent la zone lésée. En même temps, les jonctions hemidesmosomiques des cellules basales de l'épithélium proches de la blessure se résorbent. Les cellules proches de la blessure s'arrondissent puis commencent à former des lamellipodes et des filopodes pour préparer le processus rapide de fermeture de la blessure par migration cellulaire. Lors de la phase migratoire, un dépôt de protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, fibrine, laminine et tenascine) apparaît très rapidement. Le rôle présumé de cette matrice est de permettre la



**Figure 21 : La cicatrisation de la cornée chez les mammifères.**

Par contraste avec le long processus cicatriciel de la peau, la fermeture d'une blessure au niveau de la cornée s'effectue en quelques dizaines d'heures.

Représentation schématique (**A1**) et observation séquentielle du processus concernant l'œil de rat (**A2, Cao et al., 2011**). Une migration concentrique d'une mono couche épithéliale s'effectue des bords de la blessure vers le centre.

*Echelle = 1 mm.*

Les différentes phases du processus rapide de cicatrisation de la cornée, schéma établi d'après les résultats de différentes publications (Steele, 1999 ; Cao et al., 2011). Lorsque le stroma a été peu affecté par la blessure, il n'y a pas de cicatrice (**B**).



migration des cellules épithéliales (Fig. 21, A1). La fibronectine est détectée moins d'une heure après la blessure, et disparaît une fois que la cicatrisation est complète. Quand la blessure est étendue, les migrations se font de plusieurs points de départ et les cellules migrent sur plusieurs fronts vers le centre de la blessure (Fig. 21, A2). Dans tous les cas cette migration est très rapide.

Cela permet l'établissement d'une monocouche de cellules épithéliales qui recouvre la totalité de la zone blessée. A partir de cette étape, les cellules s'ancrent à nouveau dans la membrane grâce aux hemidesmosomes et aux filaments d'ancrage composés de collagène VII. Le processus de formation des complexes d'ancrage n'est pas encore complètement connu. D'après les données d'expérimentation chez le lapin, la restauration de l'adhésion entre l'épithélium cornéen et le stroma prend entre 6 à 8 semaines.

La **prolifération** n'intervient que tardivement. La présence de cellules engagées dans le cycle cellulaire au niveau de l'épithélium régénéré n'apparaît qu'à partir du quatorzième jour. Les cellules épithéliales basales sont le siège de la prolifération lors de la restauration de l'épaisseur de l'épithélium. Dans des blessures relativement importantes, les bords, proche du limbe, semblent se réparer plus rapidement que le centre. Cela est en conformité avec l'hypothèse de la présence des cellules souches cornéennes dans le limbe (Lavker et Sun, 2003). D'après un travail plus récent, réalisé chez la souris, il y aurait une deuxième population de cellules souches éparses dans l'assise basale de l'épithélium cornéen (Majo *et al.*, 2008) :

la population limbique interviendrait en cas de blessure, tandis que la population de la cornée centrale serait responsable de l'homéostasie normale. Cette « deuxième population » est contestée (Dhouailly et al. sous presse) : toutes les cellules basales de l'épithélium cornéen seraient des cellules souches chez l'embryon, et selon les espèces leur ségrégation dans le limbe interviendrait à un rythme très différent : à 23 jours de vie embryonnaire chez le lapin, peu après la naissance chez l'homme et à 6 mois de vie postnatale chez la souris.

La réparation du stroma est plus longue, elle dépend d'une interaction coordonnée entre les cellules épithéliales et les kératocytes (fibroblastes cornéens). La libération de cytokines et de facteurs de croissance entraînent la migration et la prolifération des kératocytes vers la zone de la lésion. A partir de 48 heures après la blessure, on observe une augmentation de la prolifération dans le stroma, avec un pic à 4 jours et une décroissance à partir de 6 jours. Les fibroblastes secrètent les collagènes, les protéoglycanes et les glycoprotéines qui forment la nouvelle matrice extracellulaire du stroma. Il est important que la régularité de la stratification

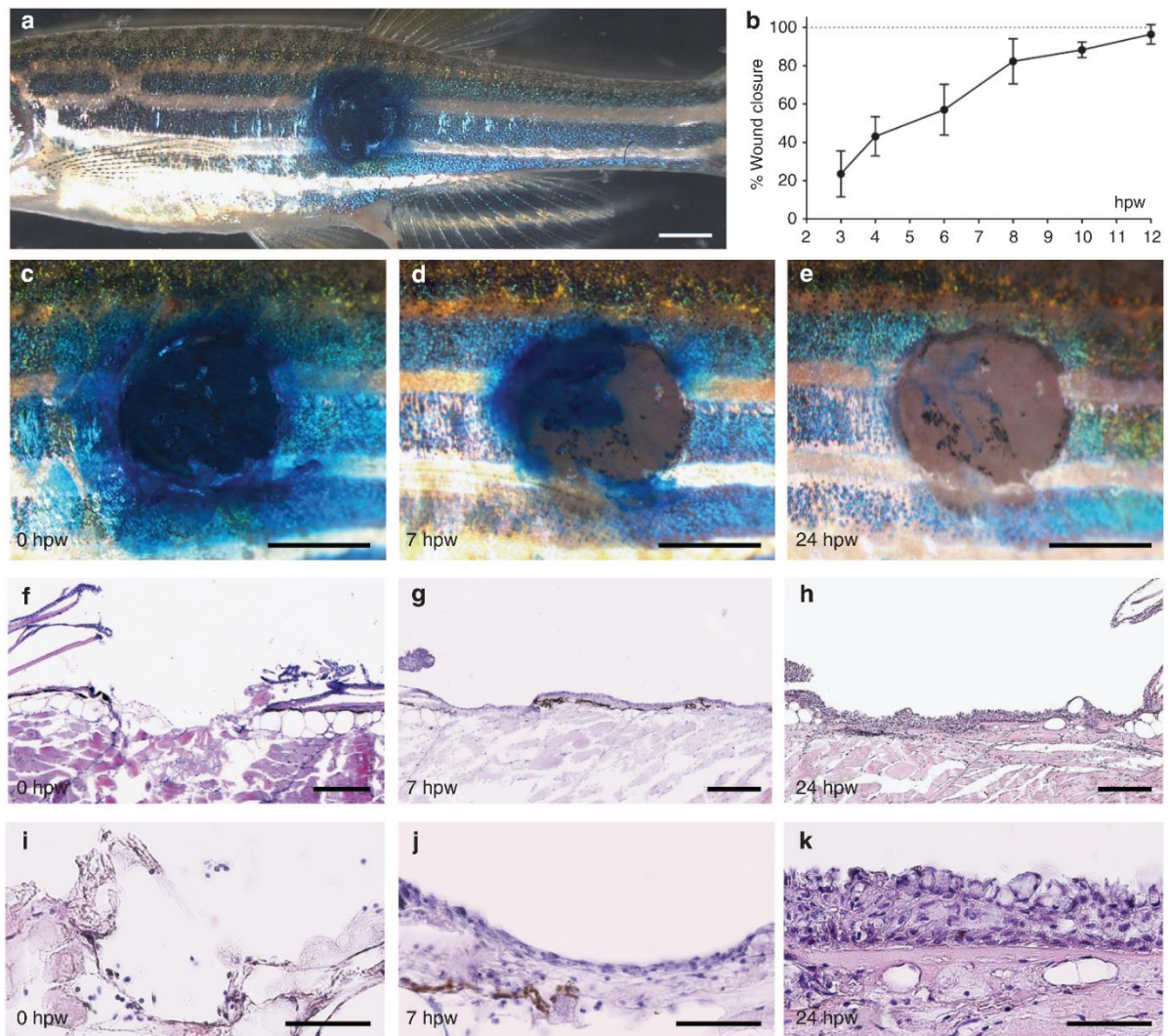
des fibres de collagène soit bien respectée. Si la cicatrisation du stroma se passe mal et qu'elle est accompagnée de l'invasion de vaisseaux sanguins, cela entraîne la perte de transparence et donc la cécité.

## 5. La cicatrisation de la peau du poisson zèbre

La cicatrisation de la peau de poisson zèbre n'avait pas encore été étudiée, éclipsée en quelque sorte par le succès de la régénération de la nageoire chez ce modèle. C'est pourtant la phase initiale de la régénération, puisque sans cicatrisation, on n'observe pas de repousse du membre. Durant la dernière année de préparation de ma thèse, alors que je travaillais sur la cinétique de la cicatrisation de la peau chez le poisson zèbre, une équipe a publié des résultats sur ce sujet.

Les résultats de cette équipe (Richardson *et al.*, 2013) montrent qu'après une blessure ronde effectuée au laser, de 2mm de diamètre (Fig. 22, a), le **rétablissement de la barrière cutanée** est très rapide. A 12 heures post-blessure, la fermeture apparaît complète (Fig. 22, b). Dès 7 heures, une fine couche d'épiderme recouvre les  $\frac{3}{4}$  de la surface de la blessure (Fig. 22, g,j) et à 24 heures, l'épiderme est déjà pluristratifié (Fig. 22, h,k). **La phase inflammatoire** semble démarrer peu après la blessure. A 4 heures post-blessure, alors que l'épiderme est encore en train de migrer pour fermer la zone de la lésion, des neutrophiles sont déjà présents derrière le front de migration. Durant les jours suivants, le nombre de cellules inflammatoires diminue progressivement, seuls les macrophages sont présents 4 jours après la blessure (jpb). La mise en place du **tissu de granulation** commence à deux jours post-blessure, et à 4 jpb il atteint son volume maximal, puis régresse progressivement à partir de 6 jpb, jusqu'à quasi disparition à 10 jpb. Au même titre que chez les mammifères, ce tissu est majoritairement formé de fibroblastes et de macrophages. La présence de collagène de type I a été confirmée mais aucune étude sur les autres types de collagène n'a été faite.

Le processus **d'angiogenèse** semble débiter peu après la mise en place du tissu de granulation (l'inverse est constaté chez les mammifères), puisque les premières protrusions de vaisseaux sont observées à partir de 4jpb. L'angiogenèse est ensuite de plus en plus marquée,



**Figure 22 : La re-épithélialisation de la blessure chez le poisson zèbre (Richardson et al. 2013).**

Vue d'ensemble du flanc droit d'un poisson zèbre adulte avec une blessure circulaire de 2 mm de diamètre réalisée au laser puis colorée au bleu de méthylène **(a)**. Cinétique de la fermeture de la blessure **(b)**. Vues superficielles de la blessure **(c-e)**. A 0 heures post-blessure (hpb) **(a, c)**, le bleu de méthylène pénètre la totalité de la blessure, alors qu' à 7 hpb la barrière épidermique est partiellement reformée **(d)** et complètement reformée à 24 hpb **(e)**.

Une coloration hématoxyline/éosine de sections longitudinales de la zone lésée permet la visualisation de la reformation de l'épiderme (f-k). T0 : (f, i). A 7 hpb, un fin néo épiderme est observé à la surface de la blessure **(g,j)**. A 24 hpb l'épiderme est pluristratifié **(h,k)**.

*Echelles: a,c : 1mm; f-h 200µm, i-k 50µm*

les auteurs de l'étude ne précisant pas si une néovascularisation continue au-delà de 8 jours post-blessure.

Le poisson zèbre ne forme aucune cicatrice, notamment grâce à la disparition complète du tissu de granulation, responsable de la formation de cicatrices par dépôt excessif de matrice extracellulaire chez les mammifères. Lorsque le processus de réparation est entièrement terminé, à 28 jpb, la zone cicatricielle est indistinguishable de la peau non blessée, la pigmentation est à nouveau présente et de nouvelles écailles se sont formées. D'un point de vue histologique, l'épiderme et le derme ne présentent aucune différence avec une peau qui n'a pas subi de blessure. Un éventuel dépôt de collagène peut perdurer au niveau des couches musculaires superficielles, mais cette observation n'est pas systématique. La cicatrisation chez le poisson zèbre, aboutissant à la reconstitution complète de l'organe peau est donc une régénération.

D'après Jean Yves Sire (communication personnelle), la repousse des écailles serait médiée par des cellules souches localisées dans la poche dermique, située au niveau de la zone d'ancrage antérieure aux écailles. Ces cellules, appelées cellules de la poche de l'écaille (Scale Pocket Line), sont situées dans les couches profondes de la peau comme c'est le cas pour les cellules souches épidermiques et folliculaires chez les mammifères, et sont donc protégées lors d'une lésion superficielle (Sire, 1989).

### III. Matériel et méthodes

#### *Animaux*

Dans l'ensemble des expérimentations sur sujet adulte « jeune », des individus de 10 mois ont été utilisés. L'étude de l'impact du vieillissement sur la régénération de la nageoire caudale porte sur des sujets âgés de 18 mois et 40 mois. L'étude de l'impact du vieillissement sur la cicatrisation porte sur des sujets âgés de 34 mois.

Les poissons zèbres sont anesthésiés dans une solution de 0.16 mg/ml de tricaine méthanesulfonate avant toute intervention chirurgicale. Durant l'ensemble des expérimentations les poissons sont maintenus une température de 28°C.

#### *Amputation de la nageoire*

L'amputation des nageoires a été réalisée à l'aide d'une lame de scalpel. La moitié de la nageoire est ainsi amputée lors de la découpe (Fig. 23, A2).

#### *Etude de la prolifération lors de la régénération de la nageoire caudale*

Les poissons reçoivent, 3 heures avant l'amputation de la nageoire, une injection intra-péritonéale d'une solution de BrdU à 2,5 mg/ml. Les nageoires de 24 poissons zèbres ont été amputées (temps initial  $t_0$ ). La cinétique effectuée couvre l'intervalle 48 – 69 hpa, par incréments de 3 heures (exemple : à  $t+45h$  le premier groupe de poissons zèbres reçoit une injection intra-péritonéale de BrdU, puis leur nageoire est amputée 3 heures après à  $t = 48h$ ). Ces différents pas de temps sont réalisés en triplicata. Les nageoires sont fixées dans une solution de PFA à 4% pendant la nuit puis sont conservées dans du méthanol à -20°C. La détection du BrdU est effectuée en « whole-mount » par procédé immunohistochimique à l'aide d'un anticorps anti-BrdU couplé au FITC (Abcam) selon le protocole établi par Nechiporuk et Keating (Nechiporuk et Keating, 2002). Les noyaux sont marqués par iodure de propidium (Sigma) après un traitement RNase à 2 mg/ml (Invitrogen) à 37°C pendant 30 minutes. Les images sont acquises avec un microscope confocal Zeiss LSM 710. L'indice de marquage est calculé en divisant le nombre de cellules BrdU-positives par le nombre de cellules totales dans

une zone délimitée par le dernier segment osseux proximal des lépidotriches des lobes et de la partie médiane (Fig. 24, B1-B3, B1'-B3'). Pour cette étude, j'ai considéré que les lobes de la nageoire sont équivalents selon l'axe dorso-ventral, je ne fais donc pas de distinction entre les lépidotriches des lobes ventraux et dorsaux : ils appartiennent tous deux à des zones latérales, par opposition à la zone médiane de la nageoire. J'ai procédé au comptage des cellules positives, c'est-à-dire des cellules qui sont passées par une phase de synthèse d'ADN pendant la période de disponibilité du BrdU. Le calcul de l'indice de marquage (appelé indice de prolifération) est réalisé dans les zones latérales et médianes sur 3 plans de profondeur différents espacés de 20µm.

#### *Impact du vieillissement sur la régénération de la nageoire caudale*

Deux types d'expérimentations sur la régénération ont été menées : 1-une étude après une série de 10 amputations répétées tous les 21 jours, chez 10 individus âgés au départ de 18 mois et donc de 24 mois à la fin de l'expérimentation. 2-Une étude de la régénération après une seule découpe de la nageoire de 2 poissons survivants âgés de 40 mois (sur un lot de 30 poissons au départ âgés de 8 mois). La longueur de la nageoire est mesurée avant et après découpe, afin d'estimer si la taille de la nageoire demeure conservée après régénération. L'ensemble des mesures de longueurs de nageoires a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ.

#### *Mise en évidence du transcrite de Yap*

Les extractions d'ARN totaux ont été réalisées à partir de broyats de 10 nageoires de poissons (n=3 pour chaque cas) de 12 mois aux stades suivant : non régénérant, 2 jpa et 4 jpa. Des séries (n=3) de 100 embryons à 30 jpf ont également été utilisées en tant que témoin. L'ensemble des extractions d'ARN a été réalisé à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Quiagen). La RT-PCR a été réalisée à partir des ARN totaux extraits, selon le protocole du fabricant (Superscript III, Invitrogen). L'amplification de l'ADN codant pour le gène YAP a été obtenue par PCR, avec la polymérase Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), en utilisant 3 jeux d'amorces différents (couple primer 1 : Forward : TGTGCAGCAACAGAACATCA ; Reverse : TGACTCCATGTCGTTGAGGA ; couple primer 2 : Forward : AGTCCTCTTACGAGATACCTGATGAC ;

Reverse : GTGCTCTCGTCTCTAGAGTGATATGT ; couple primer 3 : Forward : GACAGAGATACTTCCTAAACCATAATGACC ; Reverse : TAGAAAGTTCTCCTTGTCGATCTTG).

J'ai axé le début de mon travail sur la détection du transcrit par Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) sur les ARNs totaux, complétée par une Polymerase Chain Reaction (PCR) spécifique à l'aide de 3 jeux d'amorces différents. La taille des fragments amplifiés par les jeux d'amorces à disposition correspond à celle attendue dans tous les cas (Fig. 26, A). Afin de lever toute incertitude liée à une éventuelle aspécificité des amorces, les séquences des fragments d'ADN amplifiés ont été confirmées par séquençage.

#### *Détection immunohistochimie de l'activité de Yap*

Nous avons fait produire par Advanced Biodesign (Archamps – 74, France) un anticorps spécifique anti-Yap afin de caractériser la localisation de Yap. Cet anticorps a été produit chez le lapin et cible spécifiquement le peptide CMNPKNTIVPPSVPMRLRKL. Les immunohistochimies ont été réalisées en « whole-mount » après fixation des échantillons dans du PFA 4% à 4°C sur la nuit et déshydratation progressive dans le méthanol. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C en attendant la suite du traitement. Une réhydratation progressive est ensuite effectuée, suivie d'une série de lavages au PBS Tween 1% et d'une phase de saturation de 4 heures dans du PBS Tween 1% 10% BSA. Les immunomarquages ont été réalisés avec l'anticorps primaire anti-Yap à une concentration de 1:200ème, la détection de cet anticorps a été effectuée à l'aide d'un anticorps secondaire Alexa 488 anti-lapin (Invitrogen) à une concentration de 1:200ème. La coloration des noyaux cellulaires a été faite à l'iodure de propidium (250µg/ml) après un traitement à la RNase A (Invitrogen) à 2mg/ml pendant 30 min à 37°C. Après rinçage et montage, les échantillons ont été observés par microscopie confocale sur un Zeiss LSM 710.

#### *Réalisation de la plaie et observation de sa fermeture*

Afin de pouvoir effectuer une large blessure sur la peau des flancs du poisson zèbre, il convient dans un premier temps de retirer les écailles de la zone à opérer, car elles sont relativement dures à sectionner. Il est important de limiter au maximum le nombre d'écailles enlevées afin de ne pas retirer d'épiderme sur une zone trop large (cela peut entraîner un biais expérimental).

Une incision en boutonnière est ensuite réalisée aux ciseaux de Pascheff dans un coin puis le derme et l'épiderme résiduel sont retirés sur une zone carrée de 2 mm x 2mm, laissant les adipocytes ou les muscles en contact direct avec le milieu extérieur (Fig. 30, A). Le derme étant faiblement vascularisé, aucun saignement ne survient généralement lors de cette intervention.

Afin d'observer la progression de la cicatrisation, j'ai utilisé une méthode de coloration au bleu de méthylène. Après application d'une solution à 0,05 %: seule la zone non recouverte par l'épiderme est colorée, le bleu de méthylène ne pouvant pas pénétrer les cellules dont la membrane est intacte.

### *Histologie*

Après leur fixation dans une solution de PFA à 4% pendant la nuit à 4°C, les échantillons de peau cicatricielle subissent une déshydratation progressive et un passage dans le butanol. Ils sont ensuite inclus dans la paraffine. Les coupes des blocs sont réalisées au microtome à une épaisseur de 7 µm.

Les coupes sont ensuite colorées au trichrome de Masson. Les noyaux apparaissent colorés en brun, le cytoplasme en rose, les fibres de collagène en vert, les fibres musculaires en rouge.

### *Etude de la migration cellulaire*

Le nocodazole est bien connu pour entrainer la dépolymérisation des microtubules, ces derniers étant notamment impliqués dans la migration cellulaire et la polarisation, deux notions indissociables. Deux modes d'application du traitement au nocodazole ont été effectués : 1- Une application topique de 5 minutes sur la future zone cicatricielle du flanc de poisson zèbre, suivie de l'intervention classique de découpe de peau (derme et épiderme). 2- Une application topique, réalisée après la découpe et l'enlèvement du carré de peau, sur le pourtour de la blessure pendant 5 minutes en utilisant un cadre d'1 mm de largeur d'espace interne de 3mm<sup>2</sup> imbibé d'une solution de nocodazole (Fig. 31, B1). Dans les deux cas, le nocodazole a été utilisé à une concentration de 1mg/ml dans du DMSO.



*Etude de la prolifération cellulaire dans la peau*

L'étude de prolifération a été effectuée sur des individus adultes âgés de 10 mois aux stades 0, 6, 24, 48, 72, et 96 heures post blessure (hpb), ainsi qu'à 5 jours post blessure (jpb). Pour chaque pas de temps considéré, les animaux ont reçu une injection de solution de Brdu à 25mg/ml 6 heures avant le prélèvement de la zone cicatricielle et sa fixation (dans le cas du T0, l'injection de BrdU est réalisée 6 heures avant la chirurgie et l'échantillon est fixé immédiatement après découpe de peau).

Les échantillons de peau ont été inclus et découpés selon le même protocole que précédemment. Les lames ont ensuite été déparaffinées et ont subi un traitement de restauration antigénique au micro-onde dans du tampon sodium citrate (10mM sodium citrate, 0,05% Tween 20, pH 6.0). La détection immunohistochimique a été réalisée à l'aide d'un anticorps primaire monoclonal anti-BrdU (monoclonal mouse antiBrdU clone 20a, Dako) à une concentration au 1:50ème et d'un anticorps secondaire anti-souris couplé à une peroxydase (Goat anti-mouse-peroxydase, Interchim) dilué au 1:30ème. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope Olympus équipé d'un système SAMBA.

## IV. Résultats

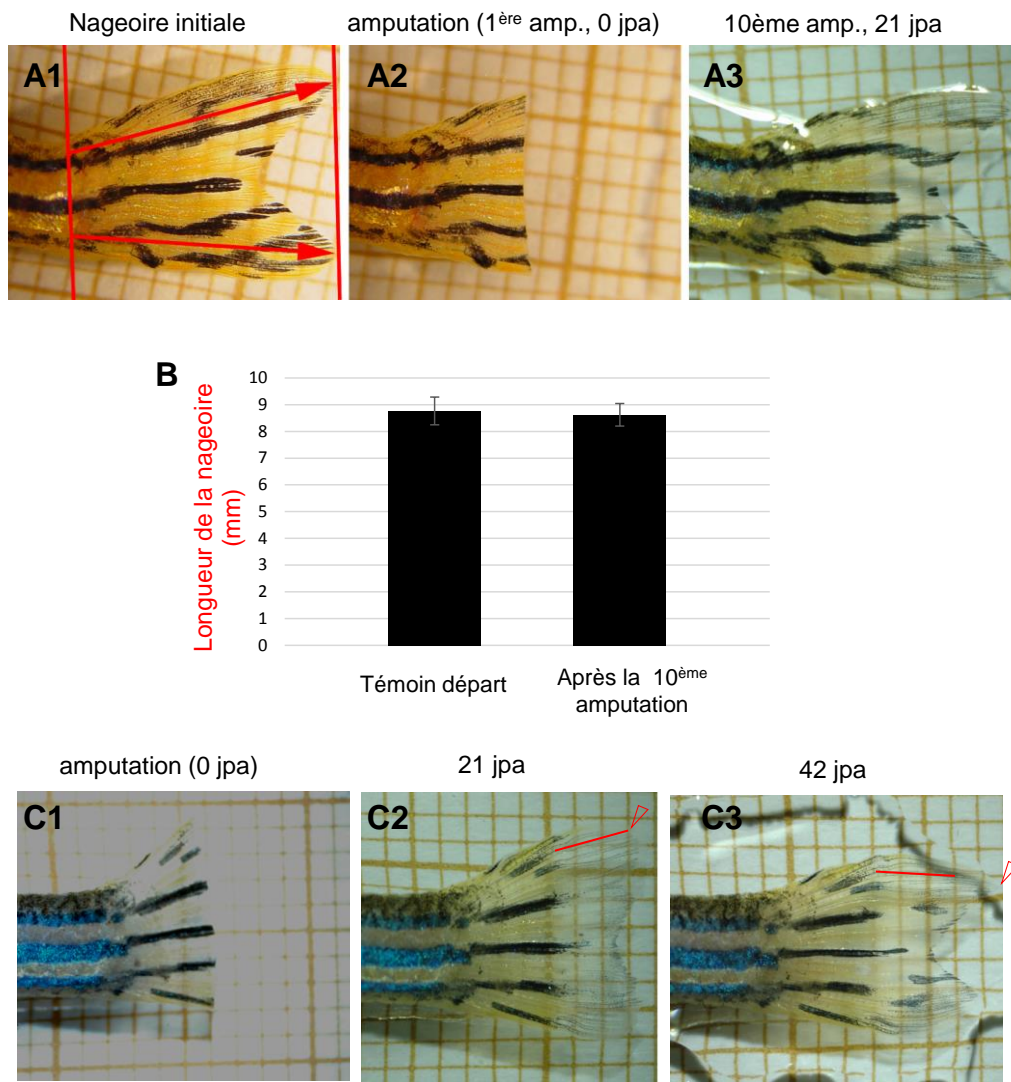
### A. Régénération de la nageoire caudale

#### 1. La conservation de la forme : étude de la prolifération après la mise en place du blastème

##### a) Introduction

La régénération de la nageoire, comme expliqué dans la première partie de cette thèse, est un processus qui s'organise selon trois grandes étapes : la cicatrisation, la formation d'un blastème et la repousse. Un des aspects le plus frappant de cette réparation est la conservation de la forme et de la taille de la nageoire à l'issue de la repousse. Lors des nombreuses études portant sur la régénération, le lépidotriche a toujours été considéré comme « l'unité régénérante ». Ce que j'entends par là, c'est que l'ensemble de ces travaux a porté sur la régénération réduite à l'environnement d'un segment osseux. Or, si l'on veut comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de la forme, il est nécessaire de s'intéresser à l'ensemble de la structure en croissance.

La nageoire du poisson zèbre est composée de deux lobes et d'une partie centrale plus courte (Fig. 23, A1). Lorsque l'on pratique une amputation de nageoire, la section se fait au niveau du milieu de la longueur totale de la nageoire : on crée donc un bord droit sur la zone de coupure (Fig. 23, A2). Une fois les phases de cicatrisation et de mise en place du blastème effectuées, la nageoire reprend peu à peu une forme bilobée pendant la phase de repousse. Le processus continue jusqu'à l'obtention d'une nageoire de forme et de taille identique à celle en place avant l'amputation. Pour mieux comprendre ce phénomène de conservation de forme, j'ai donc choisi d'étudier **la cinétique de prolifération au cours du début de la phase de la repousse**, stade au cours duquel la nageoire commence à reprendre une forme bilobée, en comparant ce processus dans les régions médianes et latérales de la nageoire.



**Figure 23 : La capacité de régénération n'est impactée ni par les amputations répétées ni par le vieillissement.**

Chez des sujets de poisson zèbre vieillissants (18 mois à la première découpe, 24 mois à la dixième) : aucun changement perceptible dans la forme (**A1-3**) ni dans la taille (**B**) de la nageoire.

Après découpe (**C1**), chez des individus très âgés (40 mois), la régénération de la nageoire s'effectue toujours, mais est ralentie : à 21 jpa (**C2**, tête de flèche rouge), 83% de la nageoire est régénérée alors que la longueur initiale n'est rétablie qu'à 42 jpa (**C3**, tête de flèche rouge).

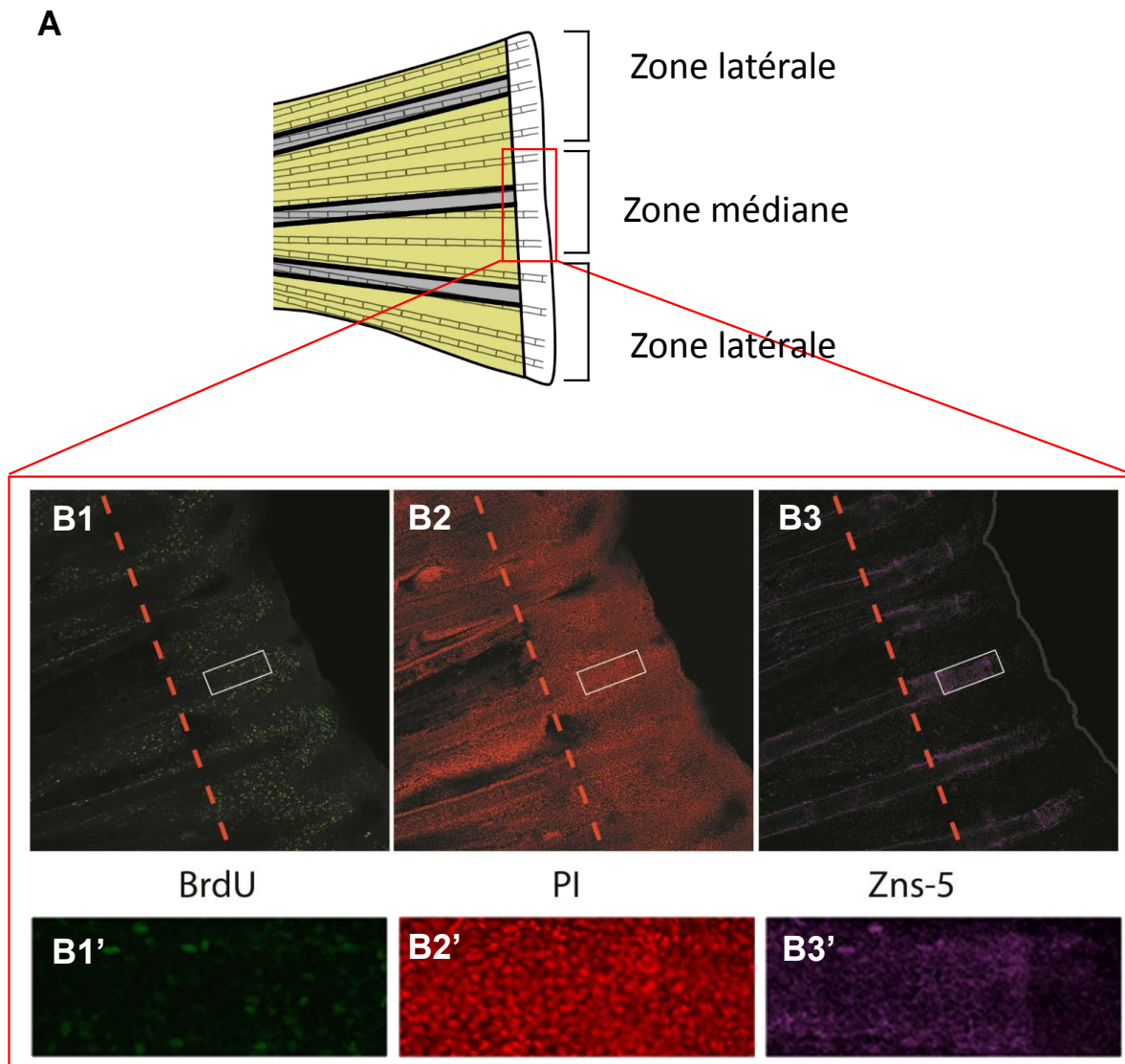
J'ai utilisé un marquage au BrdU, un analogue de la thymidine qui s'incorpore au niveau des fourches de réplifications pendant la phase de synthèse de l'ADN. Ce type de marquage permet donc la détection des cellules en cours de prolifération. Mes résultats montrent que l'indice de marquage des populations impliquées a un comportement cyclique au cours de la repousse avec des fréquences différentes entre la zone médiane et les parties latérales (Fig.24).

### **b) Résultats**

Les indices de prolifération ont été déterminés au niveau du dernier segment osseux en croissance des lépidotriches des lobes (zones latérales) et de la partie médiane (zone médiane) (Fig. 24), pendant la phase de la repousse de la nageoire caudale. Ces indices varient en fonction de la progression dans la repousse et de la zone de la nageoire considérée (Tableau. 1). Ils représentent la proportion moyenne de cellules qui sont passées par une phase de synthèse d'ADN pendant la période de disponibilité du BrdU, soit un maximum de 3 heures. Les cellules appartenant au blastème sont volontairement exclues du comptage, dans le but de ne comptabiliser que les cellules contribuant à la croissance du dernier segment osseux. Si on considère les indices de prolifération des parties médianes et latérales de la nageoire, on observe un signal qui oscille au cours du temps (Fig. 25). Le signal temporel observé a été traité en le « matchant » sur le rythme de relaxation d'un système de Van der Pol, dans le cadre de la mise au point d'une nouvelle méthode d'approximation du signal, nommée Dynalet, développée pour cette application. Cette méthode peut également avoir un usage plus large, notamment dans le cadre des ondes de relaxation biologique (Demongeot *et al.*, 2013; Demongeot *et al.*, 2011). Les données qui résultent de ce traitement montrent un temps de 15h entre deux vagues de migration de cellules issues du blastème au niveau de la zone médiane de la nageoire et un temps de 12h pour les parties latérales de la nageoire (Fig. 25).

### **c) Conclusion**

Les variations que j'ai pu observer dans mes données d'indices de prolifération, bien que possédant un caractère oscillatoire, ne présentent pas le même profil que celles induites par le cycle circadien (Idda *et al.*, 2012). Ainsi, je n'observe aucune corrélation entre les variations



**Figure 24 : Aire de comptage de cellules marquées par le BrdU au cours de la repousse des segments osseux de la nageoire de poisson zèbre.**

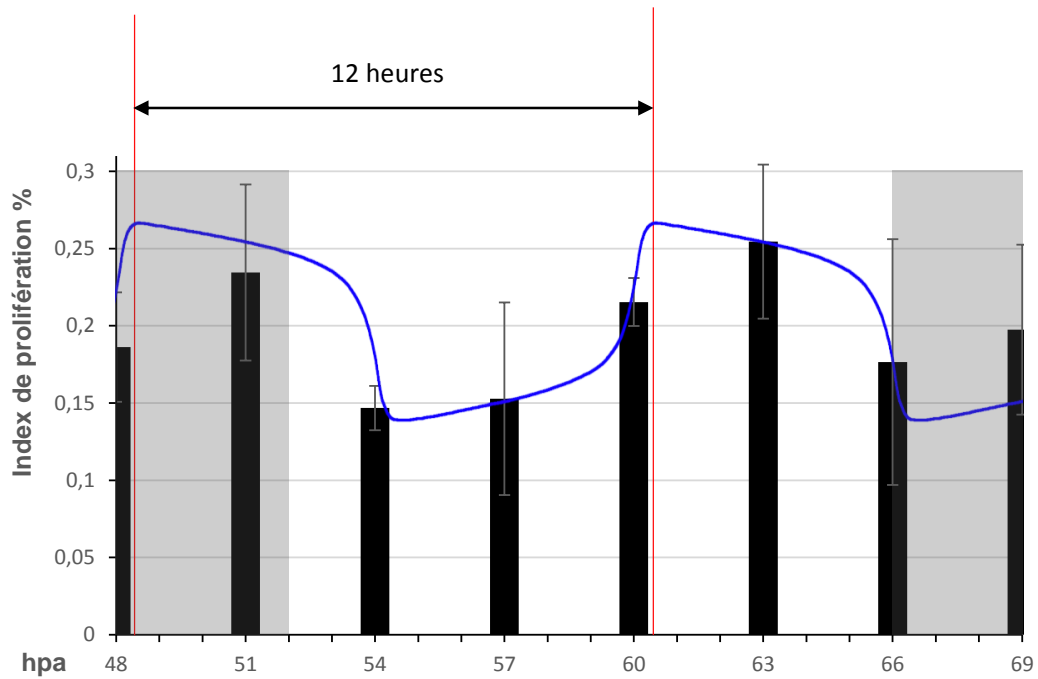
Mise en place de la repousse et délimitation des 2 zones : latérales à l'origine des lobes et médiane à l'origine de l'échancrure (**A**). Technique de quantification de cellules en phases S dans la zone médiane de la nageoire par marquage au BrdU (**B1, B1'**) et détection immunohistochimique. Les noyaux sont marqués à l'iodure de propidium (PI) (**B2, B2'**), les ostéoblastes des segments osseux sont marqués au Zns-5 (Zfin) (**B3, B3'**)

Heures post-amputation	Indices de prolifération moyens (%)	
	Zone médiane	Zone latérale
48	0.1873 ± 0.0861	0.1863 ± 0.0355
51	0.2711 ± 0.0516	0.2345 ± 0.0570
54	0.2691 ± 0.0352	0.1468 ± 0.0144
57	0.2305 ± 0.0773	0.1527 ± 0.0623
60	0.1765 ± 0.0360	0.2154 ± 0.0156
63	0.1611 ± 0.0532	0.2545 ± 0.0449
66	0.2056 ± 0.0839	0.1766 ± 0.0796
69	0.2347 ± 0.0157	0.1976 ± 0.0550

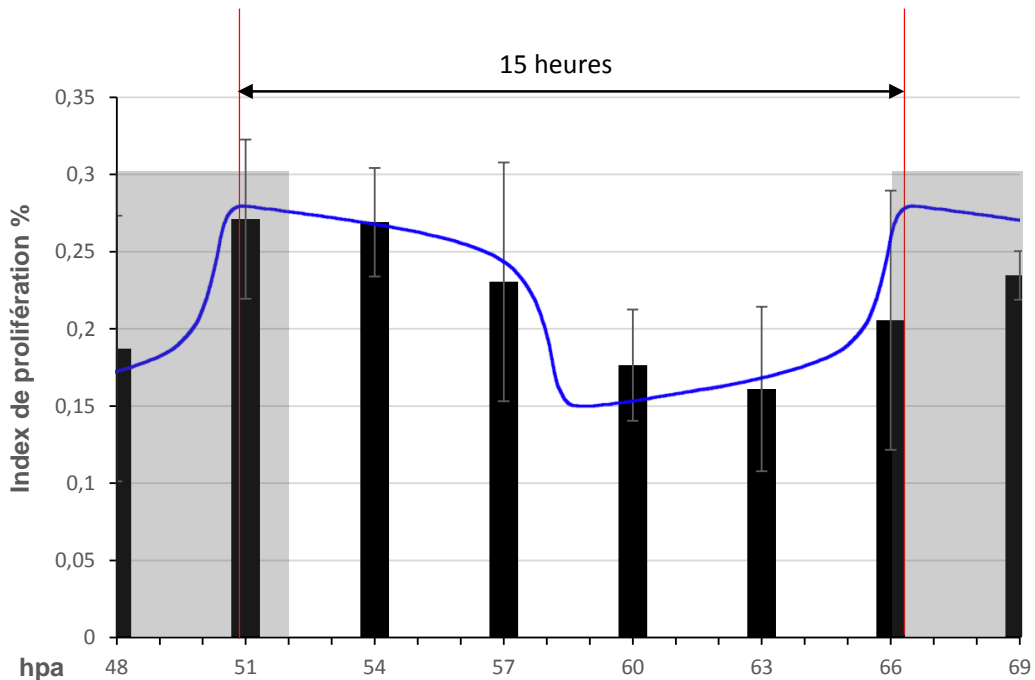
**Tableau 1: Les indices de prolifération sont soumis à variation au cours du temps et en fonction de la zone de la nageoire considérée.**

Les indices de prolifération sont calculés en rapportant le nombre de cellules BrdU positives au nombre de cellules totales, ceci sur 3 plans différents espacées de 20 µm.

## A Zone latérale



## B Zone médiane



**Figure 25 : Lors de la régénération de la nageoire de poisson zèbre, la croissance osseuse est saltatoire.**

La proportion de cellules proliférantes qui ont migré dans le dernier segment osseux en formation diffère selon la localisation dans la nageoire. L'intervalle de temps entre deux flux migratoires sont respectivement de 12 heures et 15 heures pour les zones latérales (lobes, **A**) et la zone médiane (**B**).

*Trame grise : période correspondant à la nuit*

des indices de prolifération et l'alternance des phases de jour et de nuit (Fig. 25). Les oscillations observées ne sont donc pas imputables à un contrôle du cycle cellulaire par le cycle circadien. Lors de mon étude sur la prolifération, j'ai considéré uniquement des zones situées à l'intérieur du dernier segment osseux en cours de croissance, et donc proximales au blastème (Fig. 24, B1-B3). Dans le cadre de la régénération, les cellules prolifèrent au niveau du blastème, puis migrent vers leur destination et se différencient. De ce fait, les cellules marquées par le BrdU et observées dans les zones de croissance de segments osseux sont des cellules issues du blastème, passées par une phase de synthèse de l'ADN pendant la période de disponibilité du BrdU, qui ont migrées au niveau des segments osseux pour se différencier par la suite en ostéoblastes. Les périodes des oscillations observées dans les zones médianes et latérales de la nageoire décrivent alors des fréquences de migration. D'après ces résultats, la croissance des segments osseux s'effectue donc par migrations successives de cellules provenant du blastème.

Les fréquences différentielles de ces migrations observées au sein des lépidotriches des zones des lobes et de la partie médiane de la nageoire permettent d'expliquer le retour à la forme bilobée de la nageoire. En effet, sur une même période de temps, l'afflux migratoire des futurs ostéoblastes (sécrétant la matrice osseuse des héli-segments) est plus conséquent au niveau des segments osseux situés dans les parties latérales de la nageoire que dans ceux de la partie centrale. Il en résulte donc théoriquement que la croissance des héli-segments situés au niveau des lobes est plus importante au regard de celles qui sont situées dans la partie centrale de la nageoire.

Au même titre que lors de la croissance « normale » (Jain *et al.*, 2007), la régénération des segments osseux se fait de façon saltatoire. Les mêmes mécanismes sont donc en jeu lors de la conservation de la forme de la nageoire caudale au cours de la croissance continue de l'individu et de la régénération, mais la fréquence des vagues de migration cellulaires est beaucoup plus rapide dans ce dernier cas.

Un modèle mathématique de croissance de nageoire en cours de régénération sur la base de ces données peut être mis en place. Se pose le problème de l'arrêt de la croissance de la nageoire. Dans leur article de 2012, Rolland-Lagan et collaborateurs proposent un modèle de régénération de nageoire basé sur l'interaction de trois morphogènes diffusibles. Pour expliquer le retour à la forme bilobée ils utilisent un morphogène « X » qui possède un taux de production,



bimodal sur l'axe dorso-ventral, centré sur la zone médiane de la nageoire. Ce modèle simple décrit relativement bien la réalité observée, cependant il ne tient pas compte de la forme évasée de la nageoire, ni de la dichotomie des segments osseux. L'établissement d'un modèle alternatif, décrivant plus fidèlement le retour à la forme bilobée, est donc à envisager.

## **2. Impact du vieillissement sur la régénération**

### **a) Introduction**

Le vieillissement est caractérisé par une perte progressive des fonctions d'un organe au cours de la vie d'un individu. Au cours du vieillissement, l'instabilité génomique, liée à l'accumulation de dégâts sur l'ADN, augmente. Elle peut être notamment causée par des mutations, des translocations chromosomiques ou encore par un raccourcissement progressif des télomères. Ces régions chromosomiques sont souvent associées au vieillissement (Lopez-Otin *et al.*, 2013). Au fil des mitoses, les télomères sont raccourcis et la cellule atteint une limite qui l'empêche de se diviser à nouveau (principe établi par la loi de Hayflick). Ce raccourcissement a lieu à chaque division. La télomérase, une transcriptase inverse, contrecarre le raccourcissement des télomères grâce à l'action de son unité catalytique. Les pathologies impliquant des déficiences de la télomérase sont souvent associées avec un vieillissement prématuré et une baisse de la prolifération (Armanios et Blackburn, 2012). La régénération étant un processus qui requiert de nombreuses divisions cellulaires, on peut ainsi se demander si la conservation de la forme ou encore la vitesse de la régénération sont affectées lors du vieillissement ? Afin de répondre à cette question, j'ai réalisé des expériences de régénération de la nageoire caudale en utilisant des poissons d'âge croissant, soumis ou non à des amputations répétées.

### **b) Résultats**

Sur les 10 poissons zèbres âgés de 18 mois lors de la première découpe, six ont survécu à 24 mois au protocole des 10 découpes répétées. Dans l'ensemble des six cas, il n'a été constaté aucun changement de forme ou de taille majeure à l'issue de l'expérience (Fig. 23, A1-A3). Si

l'on considère l'ensemble de l'expérimentation, les nageoires amputées ont régénéré à hauteur d'une moyenne de 98% (+/- 1,5) de leur taille initiale (Fig. 23, B).

Chez les poissons âgés de 40 mois (n=2), la régénération apparaît incomplète 21 jours après la découpe (Fig. 23, C2). Les nageoires régénérées n'atteignent respectivement à ce stade que 83 et 93 % de leur taille initiale. Cependant, 42 jours après la réalisation de l'amputation, les nageoires ont régénéré respectivement à hauteur de 96 et 98 %. La régénération semble donc être moins rapide chez le poisson âgé, mais au final la taille de la nageoire est sensiblement la même qu'avant l'amputation. De même, bien que la forme varie légèrement, l'aspect bilobé de la nageoire demeure conservé (Fig. 23, C3).

### c) Conclusion

Les résultats que j'ai obtenus démontrent que le vieillissement, concomitant avec des découpes répétées, n'a pas d'impact sur la faculté de régénération. Ces résultats ont été confirmés au cours de ma thèse par la publication d'un article d'Azevedo et al. (Azevedo *et al.*, 2011). Bien que cet article ne traite que de l'impact des découpes répétées, les amputations sont réalisées sur des individus de 12 mois, pendant une période de 11 mois, et aucune perturbation dans la régénération n'est observée en fin d'expérimentation chez les poissons zèbres alors âgés de 23 mois.

Cependant mes résultats soulignent que même si la régénération se fait toujours chez le poisson zèbre âgé (40 mois), elle pourrait être moins rapide en dépit de conditions expérimentales similaires. La qualité de la régénération ne serait pas altérée mais simplement ralentie par le vieillissement (Fig. 23, C1-C3). Ceci n'est qu'une supposition et demande bien entendu à être vérifié. Le groupe initial de 30 poissons affecté à cette étude et entretenu durant 32 mois s'est malheureusement considérablement amoindri au fil du temps, je n'ai donc pas pu valider cette observation sur un échantillon d'individus plus large.

*Remarque* : Je n'ai jamais pu constater chez des sujets vieillissants qui ne présentaient pas de pathologies, âgés de 24 à 40 mois, une déficience partielle ou totale de la capacité à régénérer. Les seules observations d'une régénération imparfaite concernaient des individus malades et moribonds. Cependant il reste possible, dans les conditions normales d'élevage qui ne sont pas exemptes d'agents infectieux, que les agressions provoquées par les virus, bactéries

et parasites aient raison de l'individu avant qu'il n'atteigne un certain stade limite qui pourrait être caractérisé par la perte de la faculté à régénérer.

### **3. Caractérisation de la voie Hippo dans le processus de régénération**

#### **a) Introduction**

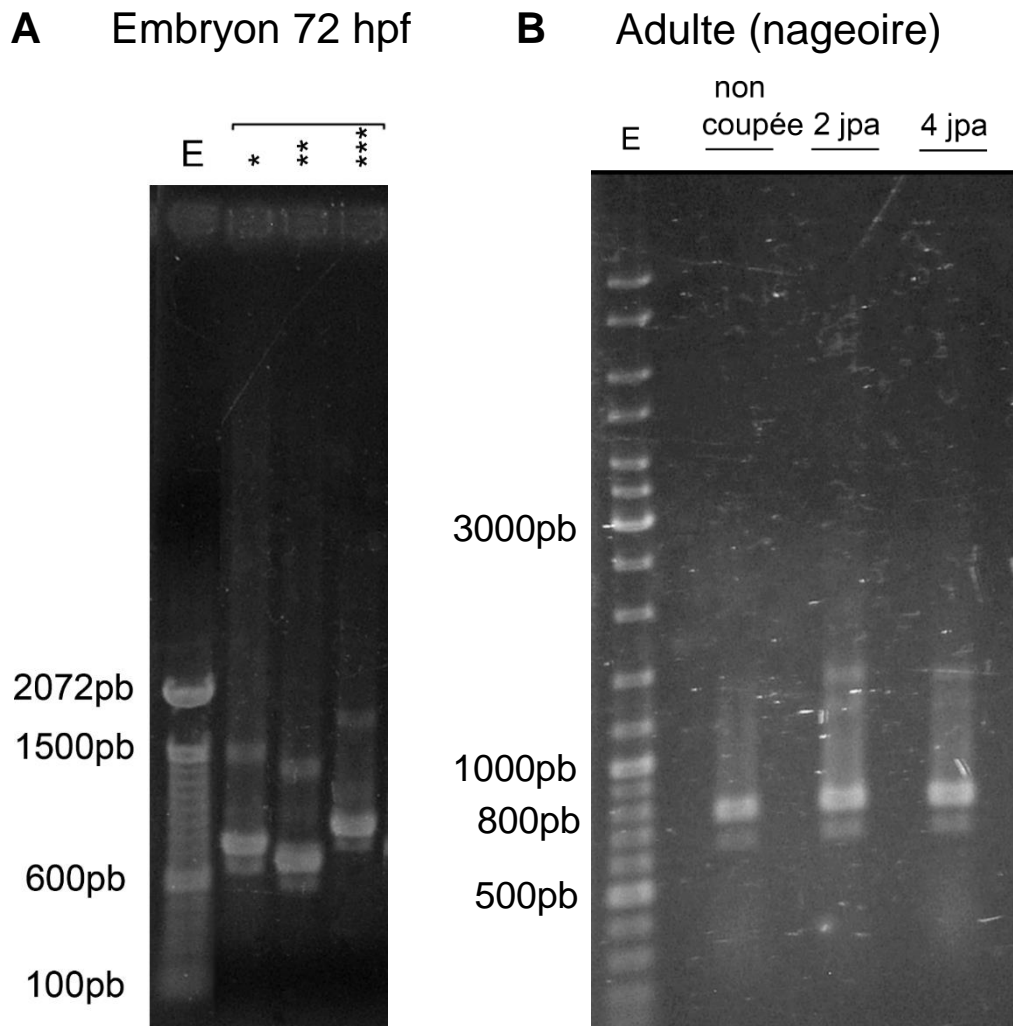
La voie Hippo est connue pour son rôle dans la régulation de la prolifération et plus précisément dans le contrôle de la croissance des organes (pour une revue : Halder et Johnson, 2011). Elle a été par exemple impliquée dans l'homéostasie de l'intestin (Chen *et al.*, 2012) et le contrôle de la prolifération lors de la régénération du vers plat *macrostomum lignano* (Demircan et Berezikov, 2013). L'implication de Yap, protéine effectrice de la voie Hippo, a récemment été démontrée lors du développement embryonnaire du poisson zèbre, dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose. Elle est requise pour la gastrulation, la formation de l'axe dorso-ventral, la somitogenèse ainsi que lors de la cardiogenèse (Hu *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2009). La voie Hippo est également impliquée dans de nombreux carcinomes tels que le cancer colorectal, celui du poumon, du foie et de la prostate, où elle apparaît dérégulée (Harvey *et al.*, 2013).

Malgré son implication dans de nombreux mécanismes requis lors du processus régénératif (migration, prolifération et apoptose), la voie Hippo n'a cependant jamais été étudiée chez les vertébrés dans ce contexte. Lors de ma thèse, j'ai cherché à démontrer l'implication de la protéine Yap dans la régénération de la nageoire caudale. J'ai tout d'abord mis en évidence son transcrite dans la nageoire de poisson zèbre adulte, et dans un deuxième temps essayé d'étudier sa localisation cytoplasmique ou nucléaire dans la nageoire en cours de régénération.

#### **b) Résultats**

Les résultats démontrent la présence du transcrite de Yap chez le poisson zèbre, aussi bien chez l'embryon de 72 hpf que chez l'adulte (Fig. 26, A-B). L'ARN de Yap a été détecté aussi bien dans des nageoires non amputées que dans des nageoires engagées dans le processus de régénération (Fig. 26, B), ce qui suggère que la transcription de Yap n'est pas déclenchée





**Figure 26 : Le gène Yap est transcrit chez le poisson zèbre, chez l'embryon et chez l'adulte, dans la nageoire intacte et en cours de régénération.**

L'expression du transcrite de YAP est détectée chez l'embryon de 72hpf (**A**) et chez l'adulte dans la nageoire intacte et en cours de régénération (**B**). Trois couples d'amorces différentes ont été utilisés.

\* : couple primer 1 : Forward : TGTGCAGCAACAGAACATCA ; Reverse : TGACTCCATGTCGTTGAGGA

\*\* couple primer 2 : Forward : AGTCCTCTTACGAGATACCTGATGAC ; Reverse : GTGCTCTCGTCTCTAGAGTGATATGT

\*\*\* couple primer 3 : Forward : GACAGAGATACTTCCTAAACCATAATGACC ; Reverse : TAGAAAGTTCTCCTTGTCGATCTTG

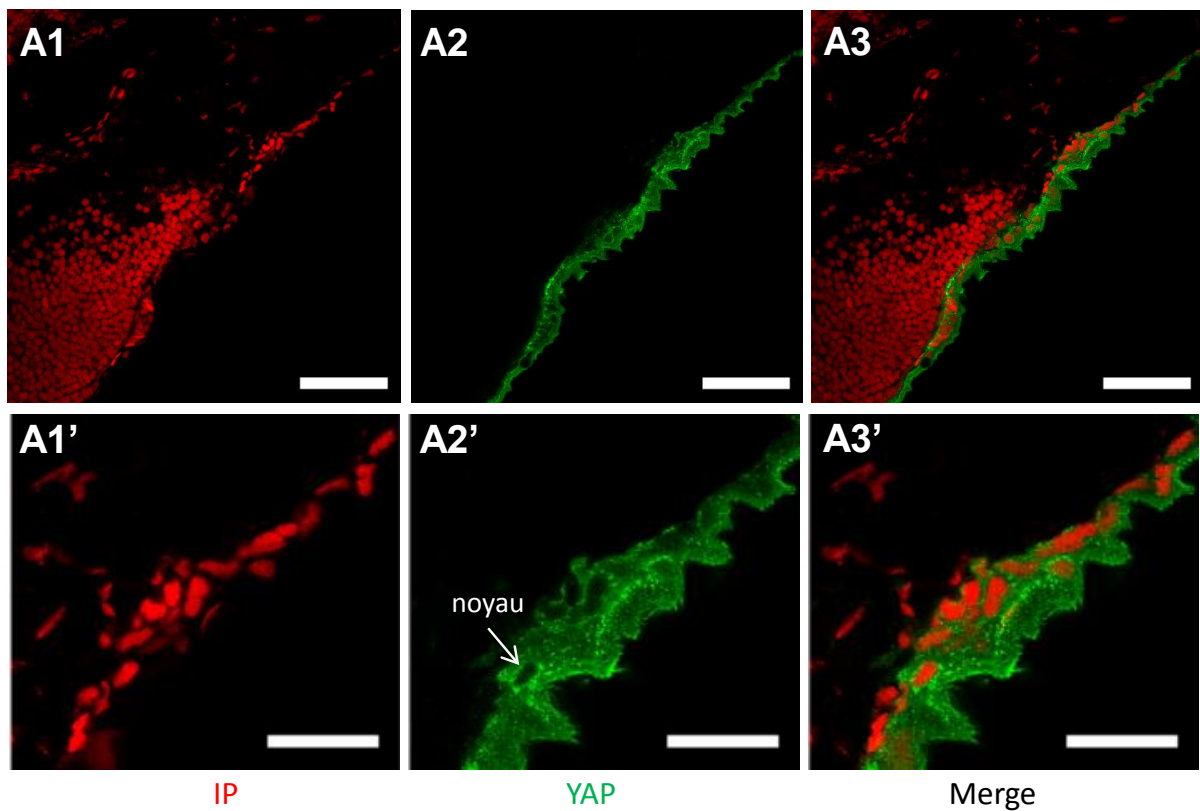
E : échelle moléculaire

par l'initiation du processus de régénération. La régulation de l'expression de Yap lors de la régénération, si elle existe, ne semble donc pas être d'ordre transcriptionnel.

La localisation de Yap dans la cellule traduisant directement son activité, j'ai donc procédé, par des méthodes d'immunomarquage, à la caractérisation de la localisation de la protéine Yap lors du processus régénératif. Les immunofluorescences obtenues montrent une localisation restreinte à l'épiderme et majoritairement cytoplasmique de Yap que ce soit chez l'embryon de 72 jpf (Fig. 27) ou dans une nageoire à 2 jpa (non montré). J'ai pu observer dans un cas expérimental de régénération de la nageoire à 12 hpa, la localisation nucléaire de Yap dans l'épiderme apical et sous apical, après l'établissement de la coiffe apicale épidermique au moment de la phase de cicatrisation (Fig. 28). Ce cas a été unique et impossible de reproduire.

### **c) Conclusion**

J'ai apporté la preuve de la présence de l'ARN de Yap et de sa protéine dans la nageoire du poisson zèbre, ainsi que sa localisation, exclusivement épidermique. L'absence de reproductibilité de la localisation nucléaire de Yap, témoignant de son activité pendant le phénomène de régénération, ne permet pas de démontrer sa réelle implication. On peut supposer que le passage dans le noyau se réalise dans une très courte fenêtre temporelle à un moment précis et que malgré mon souci de garder des conditions d'élevage identiques, ces dernières peuvent varier légèrement, et donc influencer sur la vitesse du processus de cicatrisation de l'épiderme.



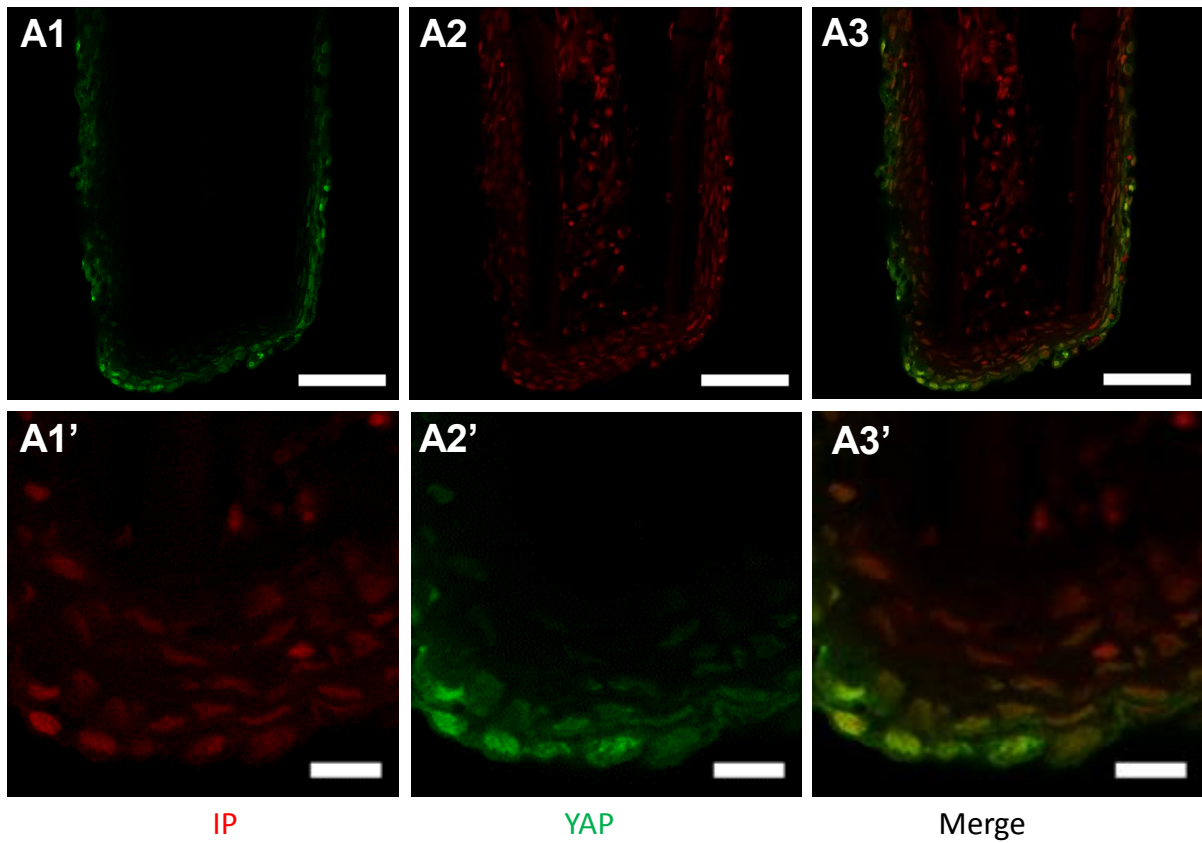
**Figure 27 : Chez l'embryon de poisson zèbre, la protéine Yap est localisée exclusivement dans l'épiderme.**

Dans le tégument de l'embryon au stade 72 hpf, l'expression de la protéine Yap est restreinte aux cellules épidermiques. La protéine Yap est localisée dans le cytoplasme.

*Marquage de Yap avec l'anticorps polyclonal produit chez le lapin sur notre demande par Advanced Biodesign.*

*coloration des noyaux à l'iodure de propidium.*

*échelle : A1-A3 : 50 $\mu$ m ; A1'-A3' : 20 $\mu$ m.*



**Figure 28 : Localisation de Yap pendant la phase de formation de coiffe épithéliale de la nageoire en régénération du poisson zèbre.**

Douze heures après l'amputation de la nageoire, la protéine Yap apparait transloquée dans le noyau des cellules épidermiques fermant la blessure.

*Marquage de Yap avec l'anticorps polyclonal produit sur notre demande par Advanced Biodesign coloration des noyaux à l'iodure de propidium.*

*échelle : A1-A3 : 50 $\mu$ m ; A1'-A3' : 10 $\mu$ m.*



## **B. La cicatrisation**

### **1. Caractérisation de la cinétique de cicatrisation et impact du vieillissement.**

#### **a) Introduction**

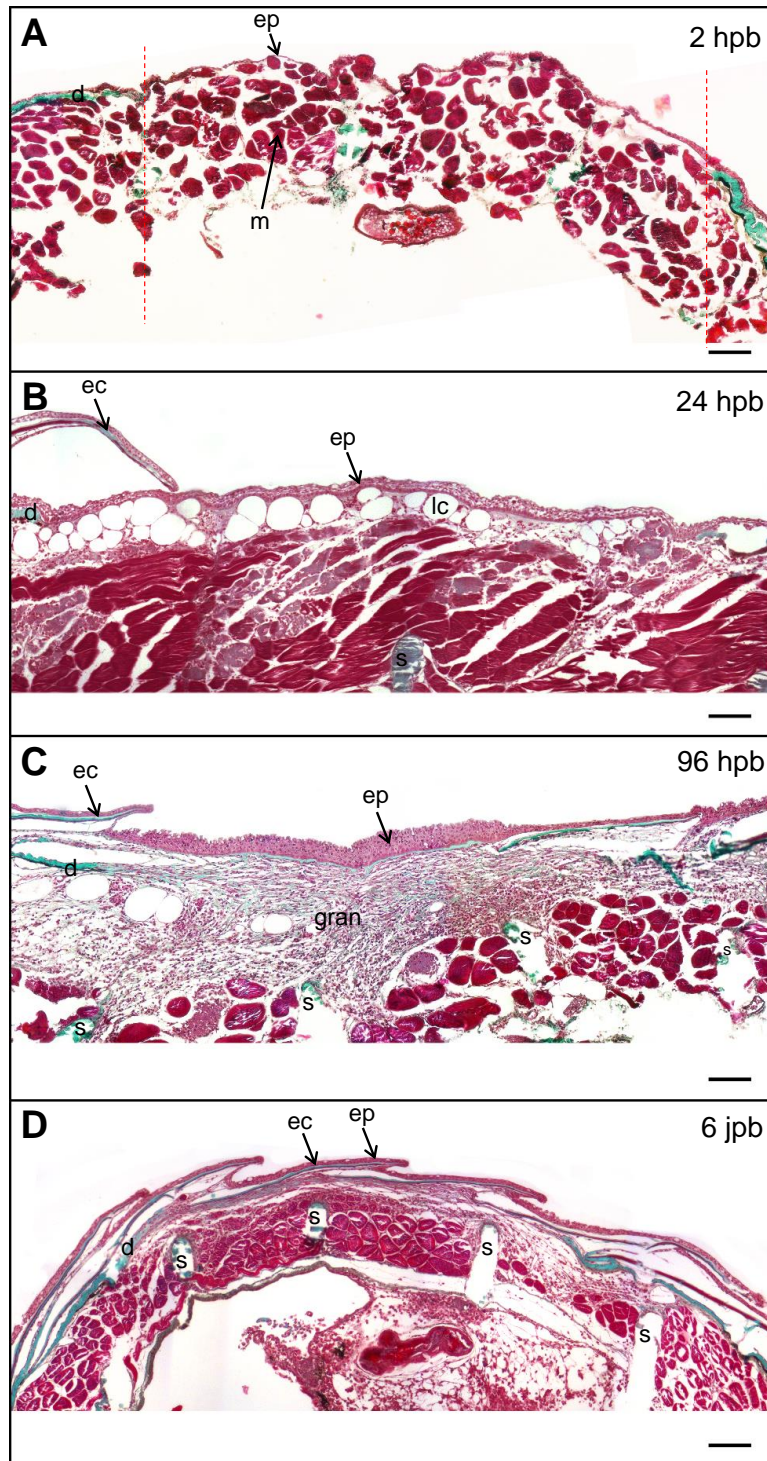
Lors de mon travail sur la régénération de la nageoire, mon intérêt s'est porté sur la phase de cicatrisation au cours de laquelle il semblait exister une implication de la localisation nucléaire de Yap. Sur cette structure d'une épaisseur d'environ 200 $\mu$ m, la fermeture de la blessure par la formation de la coiffe épithéliale est très rapide. Afin de pouvoir mieux apprécier la cinétique de la cicatrisation, j'ai donc choisi d'observer ce processus sur les flancs du poisson zèbre, en pratiquant une plaie de l'épaisseur totale de la peau de 2mm<sup>2</sup> de côté. De plus, lorsque j'ai entamé ce travail, personne ne s'était encore intéressé au processus de cicatrisation chez le poisson zèbre. Les moyens d'étude de ce modèle devaient permettre d'approfondir nos connaissances sur la cicatrisation, notamment en ce qui concerne les gènes impliqués. Toute étude préalable devait donc porter sur les modalités de la cicatrisation dans cette espèce.

La cicatrisation n'avait jusqu'alors été étudiée de façon intensive que chez les mammifères, vu son intérêt pour l'espèce humaine (voir introduction bibliographique page 49). Chez ces derniers, de nombreuses études ont montré que la cicatrisation implique la formation d'un caillot et la mise en place d'une matrice provisoire pour permettre la migration des cellules épidermiques. Une seule étude avait porté sur une autre classe de vertébrés, un amphibien aquatique au stade juvénile, l'Axolotl (Seifert *et al.*, 2012b). L'étude de la cicatrisation réalisée chez cet amphibien était donc intéressante pour une comparaison avec ce même processus chez le poisson zèbre. Outre les qualités de ce dernier modèle, dont nous avons déjà discuté, en particulier sur le plan génétique (introduction bibliographique, page 24), la structure cutanée est comparable à celle des mammifères. En effet, la peau des amphibiens est pourvue de glandes, mais dépourvue d'annexes cutanées « dures ». Or, les écailles du poisson zèbre sont comparables du point de vue de leur formation aux follicules pileux (Harris *et al.*, 2008; Sire et Akimenko, 2004) (voir introduction bibliographique, Fig 15). Après une blessure de la peau

dans l'espèce humaine, les follicules pileux ne sont pas remplacés et on observe la mise en place d'une cicatrice. Le poisson zèbre étant capable de régénérer bon nombre d'organes tels que nageoires, cœur, cristallin, etc... Peut-il non seulement cicatriser mais régénérer intégralement dans le cas de la peau un organe complet comprenant des écailles ? Si oui, leur distribution à la surface de la peau sera-t-elle ou non perturbée ? La régénération de la peau et des écailles se fera-t-elle selon des étapes comparables à celles observées lors du développement de l'alevin de poisson zèbre ? Très récemment (septembre 2013), vient de paraître un article rapportant les différentes étapes de la formation de la peau chez l'alevin de poisson zèbre (Guzman *et al.*, 2013). La formation des écailles chez l'alevin de 30 jpf (de taille de 8,5 à 9,5 mm) avait, quant à elle, été étudiée précédemment (Sire et Akimenko, 2004).

Les premiers éléments à étudier étaient donc la cinétique de la cicatrisation, la balance entre migration cellulaire et prolifération, la progression dans l'espace des languettes épidermiques, ainsi que la néoformation du derme et la distribution des éventuelles écailles. Autrement dit une large blessure, enlevant une pièce de peau totale, épiderme et derme, est-elle suivie d'une simple cicatrisation ? Quelles en sont alors les étapes ? Donne-t-elle bien lieu à un processus de régénération ? Et dans ce cas quelles en seraient les différences et similitudes avec la morphogenèse normale de la peau dans cette espèce ?

La cicatrisation pose également un certain nombre de problèmes dans le cadre du vieillissement. Parmi les pathologies les plus souvent retrouvées chez les personnes âgées, on retrouve les escarres, susceptibles d'engendrer des blessures profondes allant jusqu'au tissu osseux. La formation des escarres est d'autant plus préoccupante du fait d'une cicatrisation moins rapide chez les personnes âgées, notamment à cause d'altérations morphologiques des kératinocytes induisant entre autre une re-épithélialisation moins rapide (Sgonc et Gruber, 2013). La cicatrisation de la peau sera-t-elle retardée dans le cas du vieillissement chez le poisson zèbre ?



**Figure 29 : les différentes phases de la cicatrisation de la peau de poisson zèbre**

Deux heures après une découpe du derme et de l'épiderme, un néo-épiderme primaire est formé **(A)**.

A 24h post-blessure, les cellules épidermiques continuent d'affluer vers la zone de blessure formant un épiderme pluristratifié. Les premiers fibroblastes affluent dans la zone sous épidermique **(B)**.

A 96 hpb, les fibroblastes forment le tissu de granulation qui atteint un pic de présence. Notez l'hyperplasie de l'épiderme à ce stade **(C)**.

A 6jpb, la reformation des écailles apparaît quasiment complète **(D)**.

*Coloration Trichrome de Masson*

*ep : épiderme ; d : derme ; h : hypoderme ; m : muscle ; s : septum musculaire ; ec : écaille ; tg : tissu de granulation.*

*échelle : 100 µm*

## **b) Résultats**

### (1) Les grandes étapes de la cicatrisation

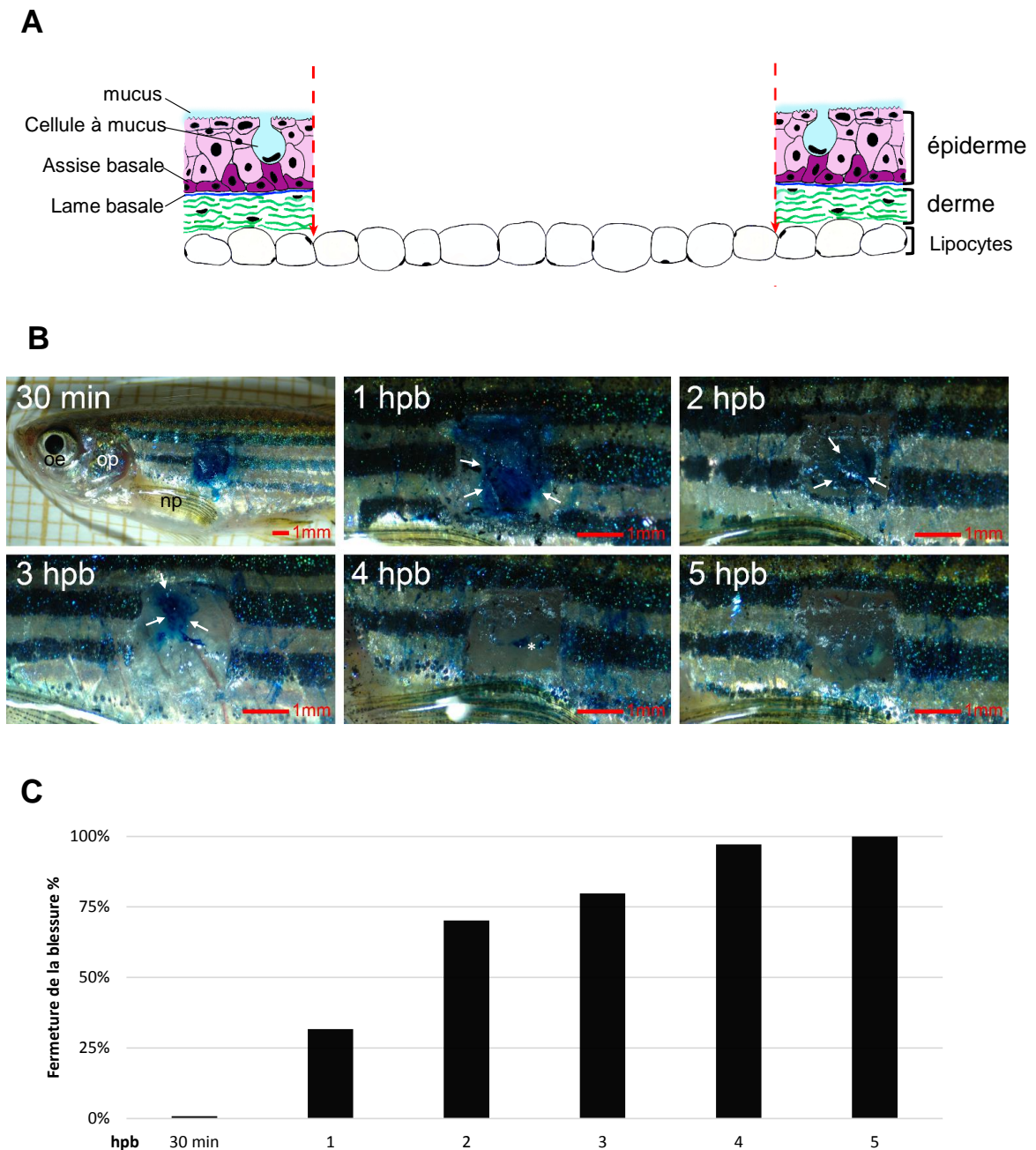
La cicatrisation de la peau est suivie de la régénération d'une peau couverte d'écailles donc lépidogène (Fig. 29, A- D). Au cours du processus cicatriciel, on assiste consécutivement à la fermeture de la blessure par reconstitution d'un épiderme en moins de 6 hpb (Fig. 29, A), puis à la stratification de l'épiderme et à la mise en place de l'assise basale à 24 hpb (Fig. 29, B). La formation du tissu de granulation est ensuite initiée et évolue jusqu'à un pic de présence de fibroblastes à 96hpb (Fig. 29, C). Enfin la cicatrisation se termine par la régénération des écailles, encore en cours de formation à 6jpb (Fig. 29, D).

### (2) La fermeture de la blessure

La fermeture de la blessure est un phénomène très rapide chez le poisson zèbre. Les résultats que j'ai obtenus par coloration au bleu de méthylène montrent une fermeture de la blessure en moins de 5 heures (Fig. 30, B). Les cellules épidermiques progressent en formant un front migratoire qui avance depuis les différents bords de la lésion. La migration des cellules épithéliales est déclenchée moins d'une heure post-blessure (hpb). En effet, une heure après la blessure l'épiderme a déjà recouvert 30% de la zone cicatricielle. Dès 2 hpb, il couvre 70% de la blessure et à 4 hpb, la totalité de la zone lésée est recouverte (Fig. 30, B). J'ai réalisé des mesures précises de la surface recouverte, reportées dans un graphique (Fig. 30, C).

### (3) Evolution de la stratification de l'épiderme

La stratification de l'épiderme évolue au cours de la cicatrisation (Fig. 29) et les mécanismes qui conduisent à l'épaississement de l'épiderme diffèrent selon la phase de cicatrisation. Lors des deux premières heures consécutives à la blessure, un néo-épiderme primaire, composé d'une monocouche de cellules épidermiques (Fig. 31, A3) est rapidement établi. L'espace de temps étant bien inférieur à la durée d'une division cellulaire, ce néo-épiderme ne peut provenir que d'une migration. Cette interprétation est confirmée par le résultat



**Figure 30 : La blessure induite chez le poisson zèbre par une découpe d'un carré de l'épaisseur totale de la peau (derme et épiderme) de 2 mm de côté est rapidement refermée.**

Section schématique de la découpe de peau effectuée sur le flanc du poisson zèbre, les zones d'incision sont représentées par des pointillés rouges (**A**, NB : l'écaille présente dans le derme n'est pas figurée).

Coloration au bleu de méthylène (**B**). Dès 4 heures post-blessure (hpb), 97% de la blessure est recouverte et à 5 heures elle est fermée (**C**).

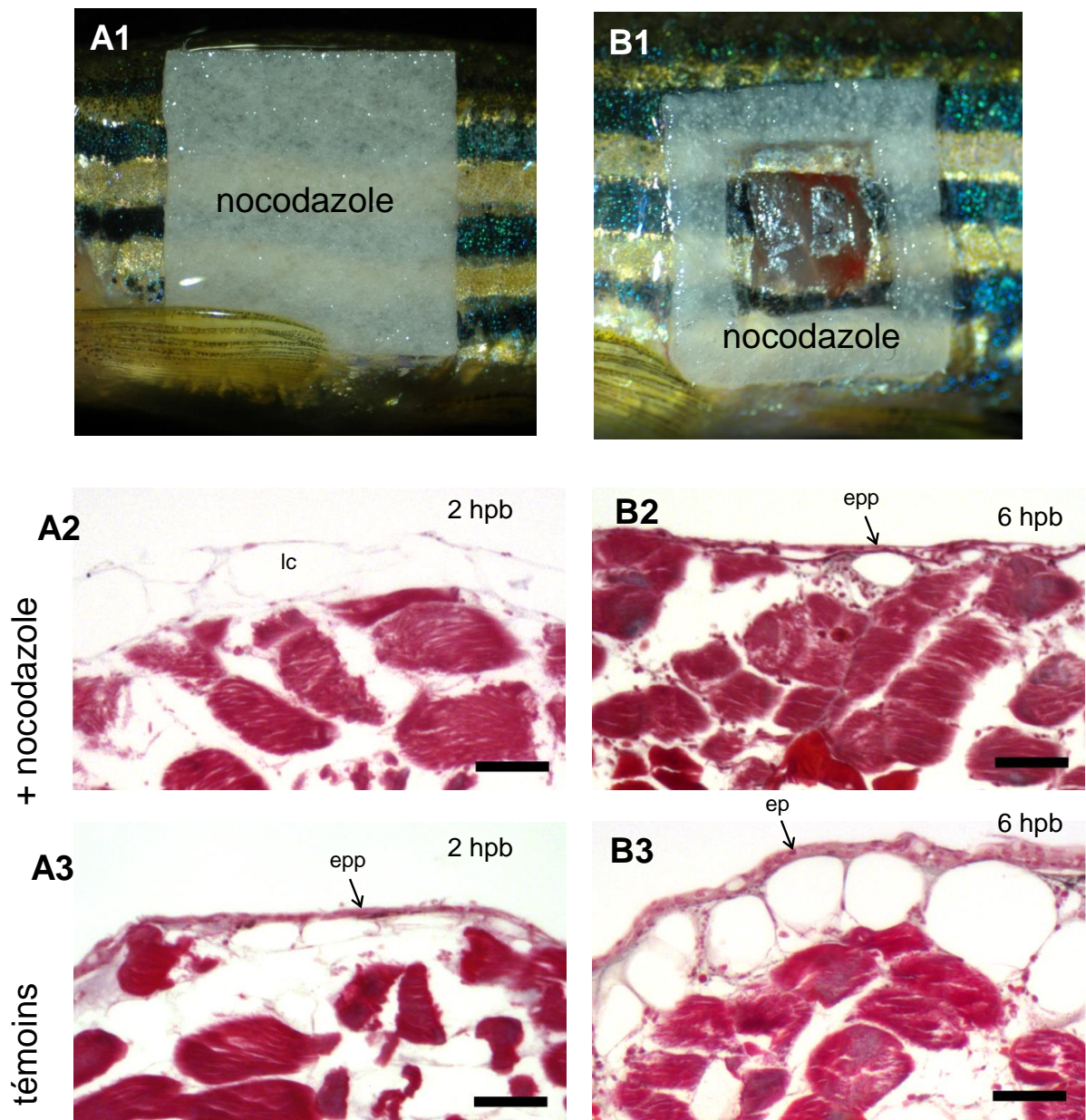
*oe* : œil ; *op* : opercule ; *np* : nageoire pectorale.

d'une application topique de nocodazole sur une large zone avant la découpe de peau (Fig. 31, A1), qui empêche la fermeture de la blessure (Fig. 31, A2).

La migration continue jusqu'à la formation à 6 hpb d'un épiderme pluristratifié, comportant 3 couches de cellules, sur l'ensemble de la surface lésée (Fig. 29, A). Une application topique de nocodazole selon un motif de cadre autour de la zone lésée (Fig. 31, B1), laissant environ 500  $\mu\text{m}$  d'espace non traité sur chaque bord, semble empêcher cette pluristratification. En effet, suite à ce traitement, seule une monocouche cellulaire est présente à 6hpb (Fig. 31, B2), contrairement au témoin (Fig. 31, B3).

A 12 hpb, l'affluence des cellules ralentit, on dénombre dans l'épiderme 4 couches de cellules (Fig. 32, A1). A ce stade, l'épiderme n'est pas encore hiérarchisé et organisé, et aucune prolifération (Fig. 32, A2) n'est détectée dans la zone cicatricielle, indiquant que la présence d'une quatrième couche de cellules épidermiques est toujours d'origine migratoire.

Autour de 24 hpb, un changement radical s'opère dans l'organisation de l'épiderme, l'assise basale est mise en place (Fig. 32, B1). A ce stade la prolifération cellulaire est encore un phénomène marginal dans la zone cicatricielle (Fig. 32, B2). A 48 hpb (Fig. 32, C1 et C2), la prolifération est détectée dans quelques rares cellules éparses de l'assise basale, alors qu'au contraire de nombreuses cellules proliférantes sont situées dans les couches supra-basales (Fig. 32, C2). Lors de cette étape, la stratification de l'épiderme ne se fait donc plus par migration, mais par prolifération. L'épiderme continue par la suite de se stratifier pour atteindre un pic hyperplasique correspondant à une épaisseur de 8 couches cellulaires à 72 hpb (Fig. 32, D1). A compter de ce stade la proportion de cellules proliférantes commence à diminuer (Fig. 32, D2). A partir de 96 hpb, on observe un désépaississement progressif de l'épiderme (Fig. 32, E1) et de très rares cellules marquées par le BrdU (Fig. 32, E2), jusqu'à un retour à 6-8jpb d'une stratification normale de 3 couches cellulaires sur l'ensemble de la zone lésée. A ce stade, les différentes étapes de reformation d'un derme et des écailles ont eu lieu, et cet épiderme d'épaisseur « normale » recouvre donc celles-ci (Fig. 34, B-B').



**Figure 31 : La formation du néoépiderme primaire a lieu par migration des cellules épidermiques du bord de la blessure alors que la surimposition des couches suivantes pourrait avoir une origine plus périphérique.**

Avant découpe du derme et de l'épiderme, pose d'un carré de papier filtre imbibé d'une solution de nocodazole (**A1**).

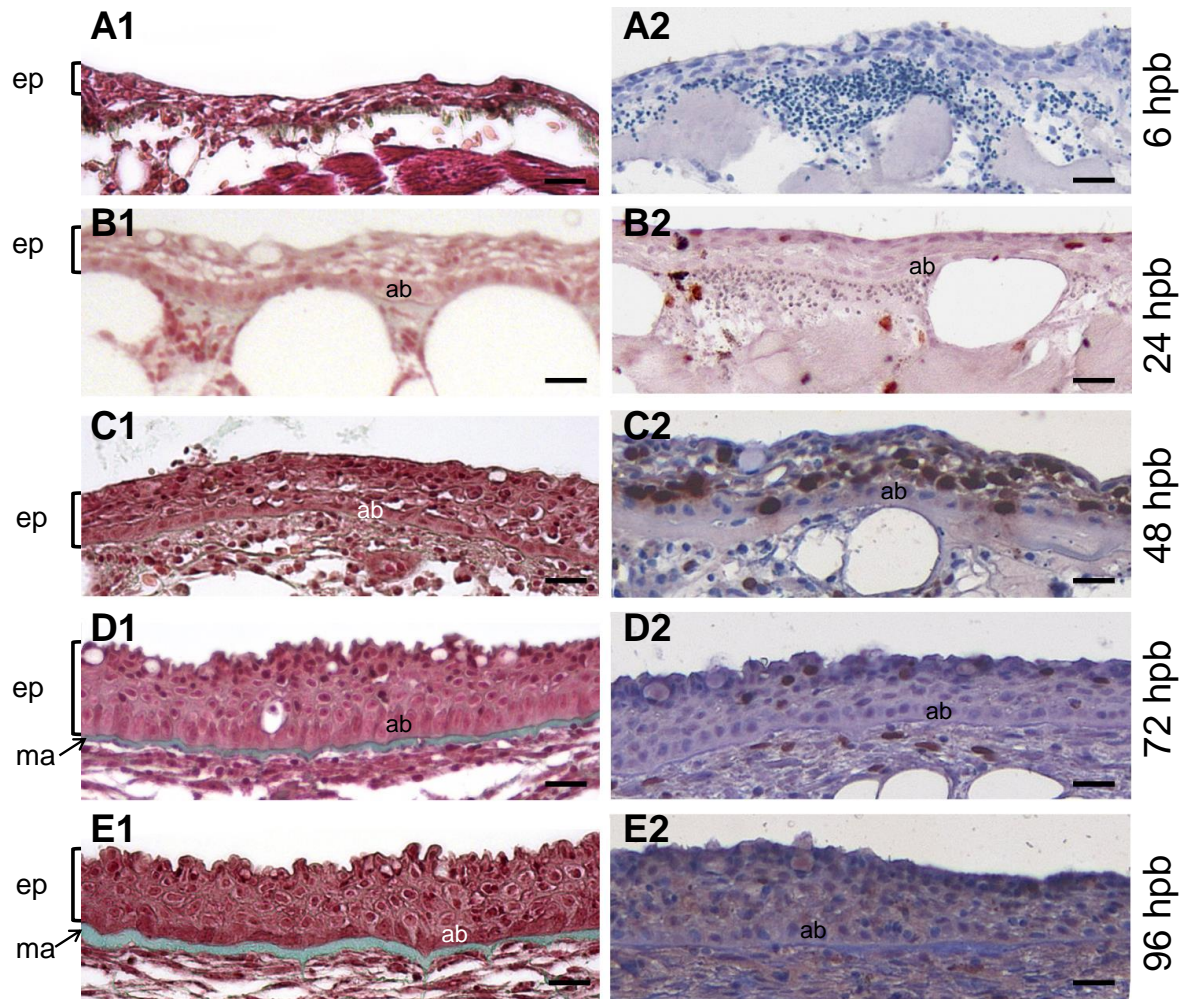
Dans le cas du traitement au nocodazole, 2 hpb la blessure n'est pas refermée (**A2**) alors que chez le témoin, en moins de 2 heures, un néo-épiderme primaire s'est formé (**A3**).

Après découpe du derme et de l'épiderme, pose d'un cadre de papier filtre imbibé d'une solution de nocodazole (**B1**).

Six heures plus tard, on constate la présence du néo-épiderme primaire (**B2**) tandis que chez le témoins l'épiderme apparaît déjà formé de 2 à 3 couches (**B3**).

échelle : 50  $\mu$ m

coloration Trichrome de Masson



**Figure 32 : La stratification épidermique au cours de la cicatrisation.**

Dès 6 hpb, l'épiderme compte 3 couches cellulaires sur l'intégralité de la zone blessée. Notez l'absence d'organisation et de hiérarchisation des couches épidermiques (**A1**). A ce stade l'origine des cellules est uniquement migratoire, car aucune prolifération n'est détectée (**A2**). A partir de 24 hpb, on observe l'apparition d'un épiderme hyperplasique et organisé comprenant 4 à 5 couches de cellules, l'assise basale (ab) et les couches suprabasales sont clairement identifiables (**B1**). On dénombre peu de cellules en prolifération, dans l'épiderme seules quelques cellules sont marquées (**B2**). A 48 hpb, la stratification de l'épiderme continue (**C1**) et le nombre de cellules en prolifération augmente considérablement dans les couches suprabasales de l'épiderme. Notez que peu de cellules de l'assise basale sont en prolifération (**C2**). A partir de 72-96 hpb l'épiderme atteint un pic d'hyperplasie (**D1**, **E1**), alors que le nombre de cellules proliférantes diminue fortement (**D2**, **E2**).

**A1-E1** : Coloration Trichrome de Masson; **A2-E2** : Marquage au Brdu, contre coloration hématoxyline de Mayer.

échelle 20  $\mu$ m

ep : épiderme; ma : matrice extracellulaire



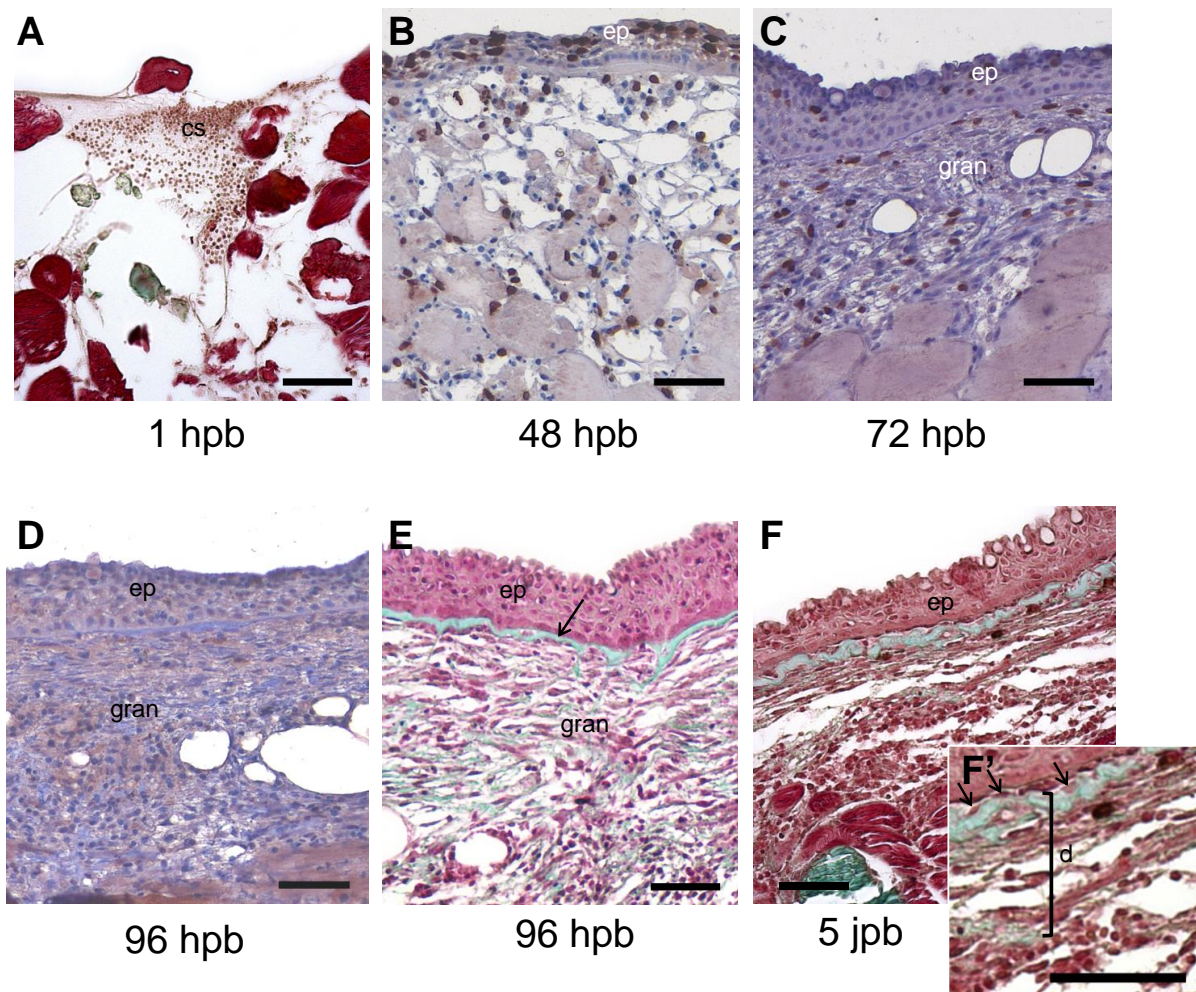
(4) Evolution de l'espace sous-épidermique et néoformation du derme

L'inflammation est déclenchée très tôt dans la cicatrisation, les premières cellules sanguines inflammatoires apparaissent 1 heure après la blessure (Fig. 33, A).

La formation du tissu de granulation est initiée à 24hpb, dès la mise en place de l'assise basale de l'épiderme. Elle est marquée par l'affluence des premiers fibroblastes qui envahissent la zone sous-épidermique. A partir de 48 hpb, ces derniers prolifèrent très rapidement (Fig. 33, B) et colonisent l'ensemble de la zone sous-épidermique pour former à 72 hpb, le tissu de granulation (Fig. 33, C). Pendant toute la phase de présence du tissu de granulation, les fibroblastes assurent la sécrétion du collagène qui formera le derme. Dès 72 hpb une couche de matrice extracellulaire acellulaire, de 2 à 3  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, est présente directement sous l'assise basale de l'épiderme (Fig. 32, D1). La prolifération des fibroblastes est ensuite maintenue (Fig. 33, C) jusqu'à ce que ceux-ci atteignent un pic de présence à 96 hpb (Fig. 33, D, E). A partir de ce stade, la proportion de cellules engagées dans le cycle cellulaire au niveau du tissu de granulation est très marginale (Fig. 33, D). A partir de 5 jours post-blessure, le tissu de granulation disparaît peu à peu, remplacé par le derme en cours de formation (Fig. 33, F). Quelques fibroblastes de plus envahissent la matrice sous-épidermique primitivement acellulaire, d'une épaisseur d'environ 5 à 7  $\mu\text{m}$  (Fig. 33, F').

(5) La reformation des écailles

La régénération des écailles intervient avant l'invasion par les fibroblastes de la matrice acellulaire déposée sous l'assise basale de l'épiderme. Elle suit la même succession d'évènement que lors de la morphogénèse. Elle est initiée au plus tôt dès 72 hpb par la formation de condensations dermiques directement sous l'assise basale épidermique qui forme donc la placode (Fig. 34, A). Les tissus étant plus matures à proximité des bords de la blessure, les premières condensations dermiques sont naturellement observées préférentiellement dans ces zones. Les écailles sont ensuite formées par dépôt de la couche externe puis de la couche basale composée d'élasmodine, contenant des fibrilles de collagène (Fig. 34, B) et croissent progressivement pour atteindre leur taille définitive. Au cours de la maturation de l'écaille, la

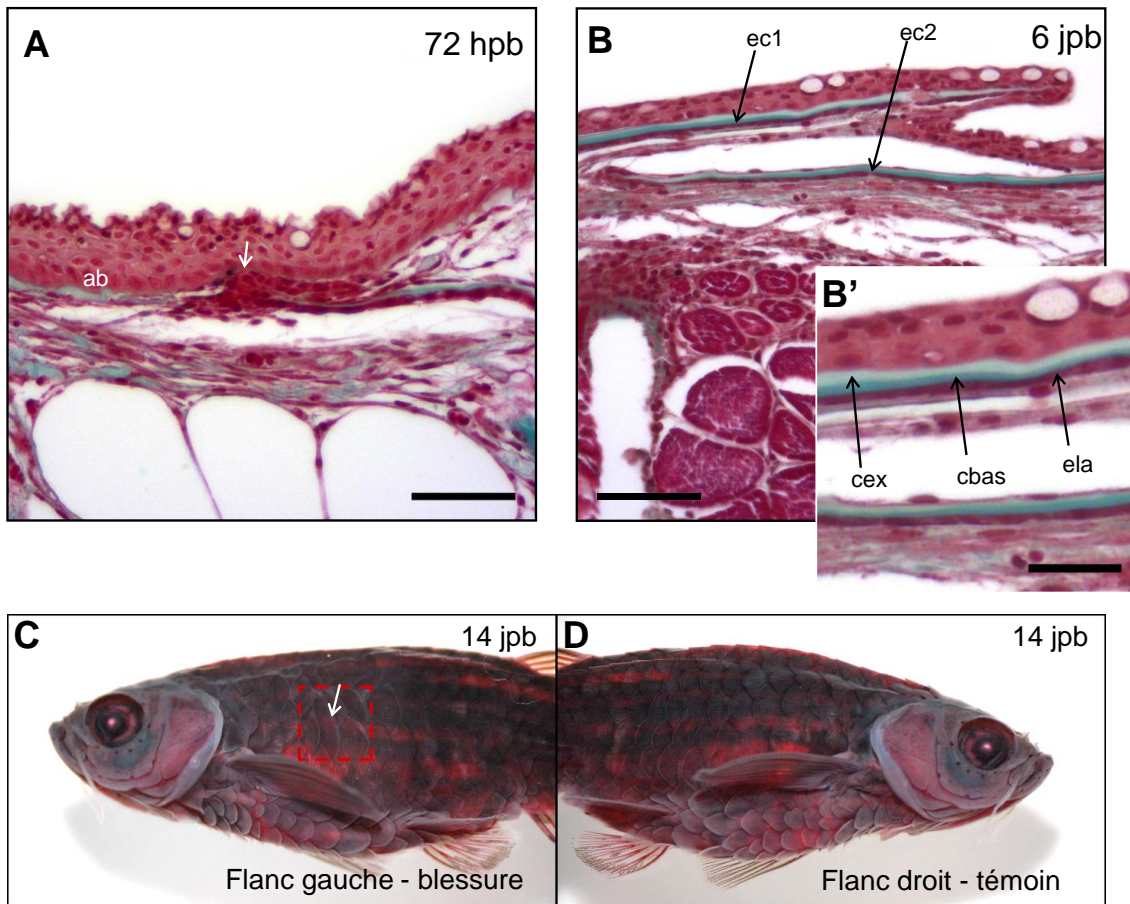


**Figure 33 : Evolution du compartiment sous épidermique : de la phase inflammatoire à la mise en place du derme.**

L'inflammation débute dès les premières heures de la blessure, elle est marquée par l'affluence de cellules sanguines inflammatoires (cs) dans le compartiment sous-épidermique (**A**). A partir de 48 hpb, les fibroblastes ont envahi la zone sous-épidermique et prolifèrent (**B**). A 72 hpb, la prolifération des fibroblastes est maintenue et le tissu de granulation (gran) est en formation (**C**). A partir de 96 hpb, ce tissu atteint un pic de présence et la prolifération des fibroblastes s'arrête (**D**). Notez à ce stade la formation d'une matrice extracellulaire, encore a-cellulaire, directement (flèche) sous l'assise basale de l'épiderme qui atteint un maximum de chromophilie (**E**). Dès 5 jpb, le tissu de granulation décroît (**F**) et quelques fibroblastes (flèches) envahissent le premier dépôt de matrice extracellulaire, le derme (d) est en cours de formation (**F'**).

**A, E, F, F'** : Coloration Trichrome de Masson; **B, C, D** : Marquage au Brdu, contre coloration hématoxyline de Mayer.

ep : épiderme  
échelle : 50  $\mu$ m



**Figure 34 : La fin du processus cicatriciel abouti à une régénération totale de la peau avec ces écailles**

La reformation des écailles est initiée dans les zones proches du bord de la blessure dès 72 hpb, elle implique la formation d'une condensation dermique (flèche blanche) juste en dessous de l'épiderme hyperplasique (**A**). A 6 jpb, la repousse des écailles est en cours. Notez la superposition des écailles dans le sens antéropostérieure (ec1, ec2) (**B**). Notez la contiguïté des élasmodastes (ela) accolés sous l'écaille en formation qui comprend deux couches, la couche externe (cex) et la couche basale (cbas), composée d'élasmodine (**B'**).

Notez entre l'initiation de la formation des écailles à 72hpb (**A**) et l'écaille en cours de formation à 6 jpb, le retour à la normale de la stratification de l'épiderme.

À 14 jpb, on distingue la zone cicatrisée seulement grâce à la disposition et à la taille anormale des écailles (**C**) en comparaison avec le flanc droit (**D**).

**A, B, B'** : Coloration *Trichrome de Masson*

**C, D** : Coloration au rouge d'alizarine

échelle A, B : 50µm; B' : 20 µm

structure de l'élasmodine évolue progressivement vers une structure plus minéralisée. Après 14 jours, la repousse des écailles est terminée et la zone cicatrisée est difficilement distinguable. La taille des écailles et leur organisation les unes par rapport aux autres sont cependant perturbées (Fig 12, C) par comparaison avec celles recouvrant le flanc témoin gauche (Fig. 12, D).

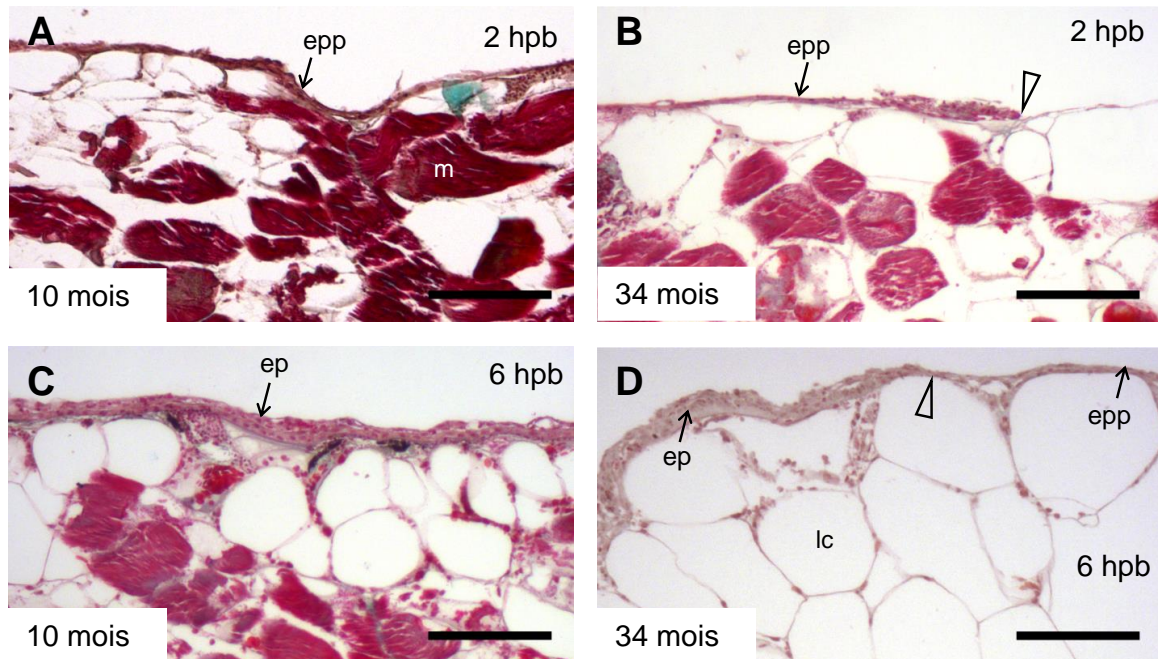
(6) L'impact du vieillissement lors de la cicatrisation de la peau chez le poisson zèbre

Les découpes effectuées chez les poissons âgés de 34 mois n'ont pas présentées la même cinétique de fermeture que chez le jeune adulte de 10 mois. Chez ce dernier, 70% de la surface de la blessure est recouverte (Fig. 30, B) par une monocouche de cellules épidermiques à 2hpb (Fig. 35, A). Chez le poisson âgé de 34 mois, ce recouvrement, bien qu'initié à 2hpb (Fig. 35, B), ne recouvre pas une surface aussi conséquente. C'est seulement 4 heures après la découpe que l'on observe un néo-épiderme primaire sur l'ensemble de la blessure, alors que chez le poisson de 10 mois la stratification est déjà en cours (non montré). De la même façon, à 6hpb, l'épaisseur de l'épiderme est moindre, comptant seulement 1 à 2 couches sur les zones centrales de la blessure chez le poisson de 34 mois (Fig. 35, D) en comparaison des 3 couches cellulaires déjà bien établies sur la totalité de la zone cicatricielle chez l'adulte de 10 mois (Fig. 35, C).

**c) Conclusion**

La cicatrisation de la peau du poisson zèbre adulte comporte une phase d'épithélialisation qui précède, puis devient concomitante à la formation d'un tissu de granulation, suivi de la reconstitution d'un derme et de la reformation des écailles (Fig. 36). La phase d'inflammation est brève et limitée. Mise à part l'absence de formation d'un caillot sanguin, on retrouve donc une succession de phases semblables à ce que l'on connaît chez les mammifères.

La fermeture de la blessure intervient avec un recouvrement complet de la zone lésée par une monocouche épidermique entre 2 et 4 heures post-blessure, couche qui devient stratifiée



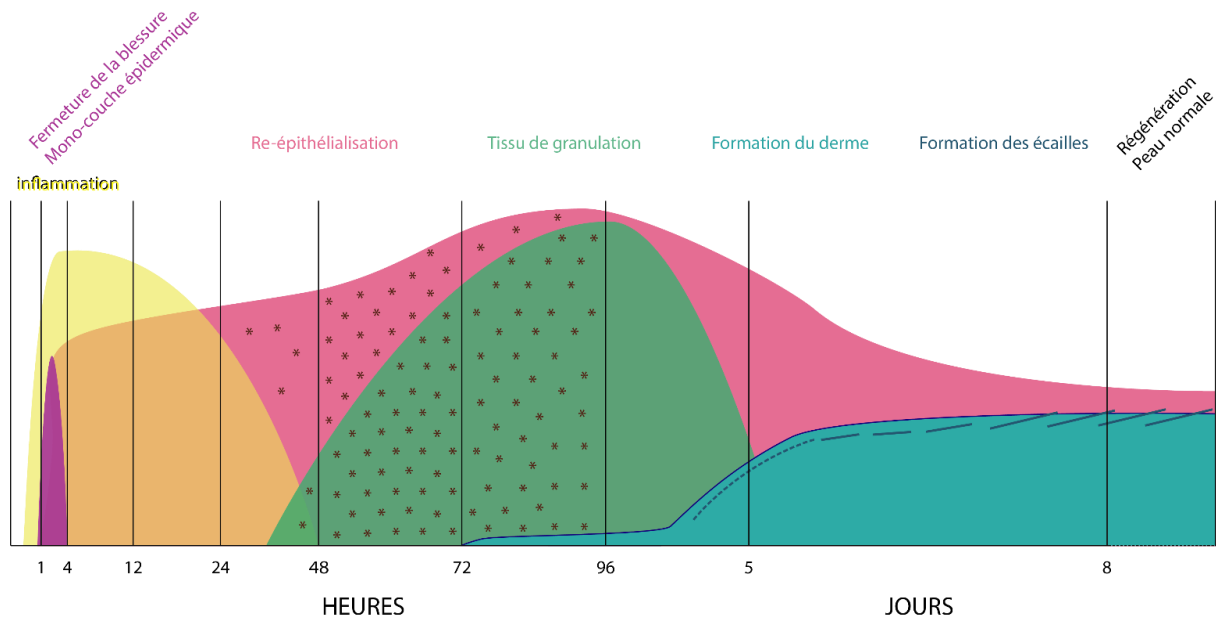
**Figure 35 : La fermeture de la blessure de la peau de poisson zèbre est retardée par le vieillissement**

Chez l'individu de 10 mois, à 2 hpb, le néo-épiderme primaire (epp) recouvre la totalité de la zone lésée (**A**). Par contre à 34 mois le centre de la zone lésée est encore à découvert (tête de flèche) (**B**). De même, alors qu'à 6 hpb, l'épiderme (ep) est stratifié sur toute la surface de la zone cicatricielle (**C**) le centre de la blessure n'est recouvert que par le néo-épiderme primaire (tête de flèche) (**D**).

*Coloration Trichrome de Masson*

*m : fibre musculaire ; lc : lipocyte*

*échelle : 100  $\mu$ m*



**Figure 36 : Schéma des différentes phases du processus cicatriciel conduisant à la formation d'une peau normale chez le poisson zèbre.**

Une blessure entraîne l'activation immédiate d'une réponse inflammatoire , suivie de la fermeture par re-épithélialisation. Cette re-épithélialisation  se fait, dans une première phase, par migration de cellules épidermiques qui ferment en moins de 4 heures la blessure, puis continuent d'affluer jusqu'à l'établissement de la stratification et de l'assise basale à 24 heures. A partir de ce stade, la re-épithélialisation a lieu par prolifération (\*). A partir de 48 hpb, les premiers fibroblastes envahissent l'espace sous-épidermique puis prolifèrent pour former le tissu de granulation . A partir de 72 hpb, les premiers dépôts de collagène, qui est un des constituants principaux de la matrice extracellulaire du derme , apparaissent sous l'assise basale de l'épiderme. L'épiderme est à ce stade hyperplasique, son retour à une épaisseur normale s'effectue progressivement à partir de 96 hpb, conjointement au début de disparition graduelle du tissu de granulation. La re-formation des écailles est initiée dès 5 jpb, et apparait complète à 8 jpb, stade auquel la régénération est complète.

à partir de 6hpb. Cet intervalle de temps étant trop court pour qu'il y ait intervention d'une prolifération cellulaire, ce recouvrement est donc la conséquence d'une migration. La première étude à envisager était d'établir jusqu'à quelle distance du bord de la blessure sont recrutées les cellules migrantes. Afin d'essayer de répondre à cette question, j'ai réalisé des traitements au nocodazole. L'impact de ce traitement est variable selon la concentration utilisée. De faibles concentrations de nocodazole ont tendance à inhiber la mobilité cellulaire, tandis que des fortes concentrations conduisent à une migration aléatoire (Ganguly *et al.*, 2012). Dans les deux cas les cellules sont donc incapables de migrer vers une direction préférentielle. Ces effets sont cependant réversibles une fois la drogue éliminée.

Une application topique de nocodazole sur une large zone du flanc avant découpe empêche la migration des cellules épithéliales, donc la fermeture de la blessure, qui est en fait simplement retardée. Je n'ai cependant pas quantifié le temps nécessaire à la reprise d'une migration des cellules traitées. Un traitement au nocodazole selon un motif de cadre autour de la blessure après la découpe de peau n'empêche pas la formation du néo-épiderme primaire mais semble inhiber ou retarder sa stratification. Les cellules épidermiques les plus proches de la blessure ne sont théoriquement pas impactées par le nocodazole, puisqu'elles sont situées à l'intérieur du cadre. Les cellules responsables de la formation du néo-épiderme, toujours capables de migrer, seraient donc situées sur les bords les plus proches de la blessure, tandis que les cellules assurant la stratification de l'épiderme entre 2 et 6 hpb proviendraient de zones plus périphériques à la blessure, situées dans la zone impactée par le traitement au nocodazole. Cette hypothèse tient néanmoins à être confirmée par de nouvelles expérimentations, puisque je ne suis pas en mesure d'exclure une diffusion du nocodazole sur une zone plus large que celle du cadre imbibé. Afin d'infirmer l'hypothèse de diffusion de la drogue, il faut confirmer la formation d'un néo-épiderme à 2 hpb. Si sa présence est avérée à ce stade, on pourrait conclure que les cellules les plus proches de la zone lésée sont recrutées pour former le néo-épiderme primaire et qu'une deuxième vague de migration, impliquant des cellules plus périphériques serait responsable de la stratification de l'épiderme observée à 6 hpb.

Après 6 hpb, la stratification de l'épiderme continue par migration jusqu'à la mise en place de l'assise basale à 24 hpb. Afin d'établir à partir de quel moment intervenait la prolifération cellulaire, j'ai réalisé une expérimentation d'incorporation du Brdu. La détection des premières cellules proliférantes dans l'épiderme de la zone cicatricielle à 24 hpb coïncide avec l'individualisation de l'assise basale. Chez les mammifères, il est largement admis que la

prolifération dans l'épiderme est restreinte aux cellules de l'assise basale. Dans le cadre de la cicatrisation, il a été démontré chez la souris qu'après une blessure (Repertinger *et al.*, 2004) la prolifération des cellules affecte effectivement l'ensemble de l'assise basale. A contrario, à 48hpb chez le poisson zèbre des cellules proliférantes sont éparées au niveau de l'assise basale de l'épiderme, et abondantes dans la couche intermédiaire. Le mode de prolifération de l'épiderme a été étudié par Quilhac et Sire en 1999 lors de la re-épithélialisation après arrachage des écailles chez *Hemichromis bimacalus*. La fermeture de la blessure s'effectue sans qu'aucune prolifération ne soit détectée. A la suite de cela, des cellules proliférantes sont observées majoritairement dans les couches intermédiaires de l'épiderme. Les auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle les cellules des couches intermédiaires assurent la restructuration du tissu et le renouvellement occasionnel des cellules de la couche basale. J'observe au contraire, dans le cas d'une excision totale de la peau que la couche basale de l'épiderme se différencie avant que toute prolifération n'intervienne. Très récemment, Guzman *et al.* (septembre 2013) ont décrit l'évolution de la prolifération lors du développement de la peau de l'alevin de poisson zèbre. Chez l'alevin de 5,4 à 6 mm de longueur (24 à 28 jpf), le marquage des cellules proliférantes est restreint à des cellules éparées situées dans l'assise basale. Chez l'alevin de 6 mm, lors de la stratification de l'épiderme, les cellules en prolifération sont principalement localisées dans les couches épidermiques suprabasales. J'ai observé des étapes similaires lors de la formation du néo-épiderme de cicatrisation. D'après ces deux observations, les cellules éparées de l'assise basale qui se divisent pourraient être les cellules souches. Elles donneraient une cellule basale de remplacement et une cellule transiente qui migrerait verticalement et qui en se divisant plusieurs fois assurerait la pluri-stratification de l'épiderme. La différence avec l'homéostasie de l'épiderme de mammifère étant que dans cette classe, les cellules transientes proliféreraient au niveau de l'assise basale. Je propose donc cette hypothèse comme une alternative à celle évoquée par Quilhac et Sire pour l'homéostasie de l'épiderme de téléostéen.

Après 72 hpb, une hyperplasie conduit à la formation de 8 couches de cellules. Lors du développement normal, juste avant la formation des écailles se produit également une hyperplasie épidermique (Guzman *et al.*, 2013). Lors de la formation des écailles (Sire *et al.*, 1997) l'épiderme ne comporte plus que 3 à 4 couches. Par contre, pendant la cicatrisation, la reformation du primordium d'écaille, comportant une placode (zone délimitée de l'assise basale) et une condensation dermique, se produit alors que l'épiderme est encore composé de 5 à 6 couches de cellules, le retour à une épaisseur épidermique de 3 à 4 couches ayant lieu lors



de la croissance de l'écaille. Pour déterminer précisément à quel moment la prolifération revient à son niveau basal, lors de la cicatrisation ou du développement normal, ainsi que lors de l'homéostasie de l'épiderme chez l'adulte, il conviendrait d'utiliser un marqueur de la prolifération globale, tel que Ki-67, une protéine présente à tous les stades du cycle cellulaire mais absente chez les cellules quiescentes.

Que se passe-t-il dans l'espace sous-épidermique lors de ces transformations de la structure épidermique au cours de la cicatrisation ? Le dépôt d'une fine couche de matrice acellulaire sous l'assise basale de l'épiderme présent à partir de 72 hpb, est envahi par quelques fibroblastes à 5 jpb. Les fibroblastes continuent d'affluer à 6 jpb, ce qui entraîne la formation d'un derme à 8 jpb. Ce processus de maturation du derme est très similaire à celui observé chez l'alevin (Sire *et al.*, 1997). Le processus de formation de l'écaille s'établit chez l'alevin une fois que le derme atteint une certaine maturité. Par contre, lors du processus cicatriciel chez l'adulte, les premières condensations dermiques et l'initiation des dépôts de couche matricielle des écailles sont observées alors que la formation d'un derme mature n'est pas encore aboutie, autour de 72 à 120 hpb selon la proximité des bords de la blessure.

Lorsque j'ai commencé mon étude sur la cicatrisation de la peau de poisson zèbre, aucun travail n'avait encore été réalisé sur ce sujet. Dans leurs travaux, Richardson et al. (2013) indiquent que la fermeture de la blessure n'a lieu qu'à 7 hpb à 28°C (la même température que celle de mes expérimentations). Cette différence notable dans la cinétique de fermeture peut s'expliquer par le procédé différent d'excision de la peau. Richardson et collaborateurs ont utilisé un laser pour faire une blessure de 2 mm de diamètre. Or, des changements physiologiques surviennent lors de l'utilisation de laser erbium YAG (Pan *et al.*, 2010). Dans les gammes de puissances utilisées par Richardson et al. (autour de 7,5J/cm<sup>2</sup>) l'usage de ce type de laser entraîne, sur la peau de souris nude, une augmentation de la perte d'eau transépidermique, ainsi que des nécroses épidermiques (Pan *et al.*, 2010). On peut supposer que les cellules épidermiques les plus proches de la zone lésée apparente ne seraient donc pas en mesure de migrer pour former le néo-épiderme primaire et des cellules plus périphériques seraient recrutées pour assurer cette tâche, induisant un retard dans la fermeture de la blessure.

D'autres espèces que le poisson zèbre sont également capables d'une régénération totale après une blessure de la peau. L'axolotl, (Seifert *et al.*, 2012b) présente des étapes de cicatrisation comparables, à savoir l'absence de formation de caillot sanguin, une fermeture

rapide de la blessure, la formation du tissu de granulation et la reformation des glandes cutanées. Une des particularités des axolotls (*Ambystoma mexicanum*) est l'existence de deux formes à l'âge adulte. Alors que la migration des cellules épidermiques a lieu immédiatement après la lésion et est complétée en 24 heures chez le pédimorphe aquatique, elle n'est initiée qu'à partir de 18 à 24 hpb et n'est complétée qu'à 72 hpb chez le métamorphe terrestre. Le délai observé dans la mise en place de la migration des cellules épidermiques chez le métamorphe est similaire à celui observé chez les mammifères. Ainsi, la migration immédiate des cellules épidermiques semble être une caractéristique commune entre l'axolotl pédimorphe et le poisson zèbre. On peut donc se demander si ce n'est pas une caractéristique de la cicatrisation en milieu liquide.

Ainsi, chez la souris, la fermeture de blessure par migration des cellules épidermiques demande 6 jours. Par contre, chez le rat, après une lésion de la cornée baignée par le liquide lacrymal, on observe un recouvrement intégral de la zone de blessure en un peu plus de 30 heures (Cao *et al.*, 2011). De même, la migration des cellules épithéliales est complétée en moins de 4 jours au niveau de la langue (Castilho *et al.*, 2010). Outre la composition du milieu liquide dans laquelle baigne la blessure (les larmes, la salive et le mucus sont connus pour leurs propriétés antibactériennes), le milieu liquide semble être un facteur favorisant la cicatrisation. Dans le cadre de la cicatrisation de la peau, il a également été démontré depuis de nombreuses années que le maintien en milieu humide permettait d'accélérer le processus cicatriciel (Winter, 1963). Depuis de nombreux pansements spécifiques sont développés dans ce sens (Yamane *et al.*, 2013).

**En conclusion**, l'occurrence des phases classiques de la cicatrisation, telles que la formation du tissu de granulation et la migration des cellules épidermiques, font du poisson zèbre un excellent modèle. De plus l'étude de la rapidité de ce processus dans cette espèce et la régénération des annexes cutanées, devrait peut-être permettre d'améliorer ce processus dans l'espèce humaine. Rappelons qu'à part le cas d'*Acomys cahirinus*, une souris africaine capable d'autotomie de peau (Seifert *et al.*, 2012a), la régénération totale de la peau et de ses annexes n'est pas reconnue (du moins officiellement) chez différentes espèces de mammifères.

## V. Discussion générale et perspectives

Pendant mon travail de thèse, j'ai étudié les processus régénératif et cicatriciel chez le poisson zèbre. J'ai été amené à étudier la prolifération cellulaire, conduisant à la formation des structures régénérées de la nageoire caudale et de la peau du flanc. Je me suis également appliqué à déterminer un éventuel impact de la sénescence sur ces processus.

### L'impact du vieillissement

Chez les personnes âgées qui développent des escarres, la problématique de la cicatrisation est extrêmement importante, la fermeture de la blessure, et plus largement, la cicatrisation est ralentie.

L'impact du vieillissement sur les capacités de régénération du poisson zèbre n'a jusqu'à présent jamais été étudiée chez des spécimens de plus de 40 mois. Dans mon étude, il semble, même si le nombre de cas observés est beaucoup trop faible pour établir une conclusion de manière formelle, que le vieillissement induit un ralentissement de la régénération et de la cicatrisation. S'il est avéré, à quel mécanisme est-il imputable ? S'agit-il d'un ralentissement global du métabolisme chez le poisson zèbre âgé ? Est-ce lié à une baisse de la capacité de prolifération cellulaire ? Or, il existe des poissons zèbres mutés sur le gène codant pour la transcriptase inverse de la télomèrase (TERT), qui présentent des signes précoces de vieillissement. Ces mutants, induits par un traitement à l'ENU, n'ont été caractérisés qu'en 2013 (Henriques *et al.*, 2013; Wienholds *et al.*, 2003). Ainsi, plutôt que de faire vieillir une population pour étudier l'impact du vieillissement à des stades avancés sur la régénération ou la cicatrisation, l'étude de ces mutants peut s'avérer être une alternative beaucoup plus rapide et efficace.

## **La régénération de la nageoire caudale.**

Le retour à la forme bilobée de la nageoire caudale apparaît comme être la résultante d'un rythme de croissance osseuse saltatoire différent selon la zone latérale ou médiane de la nageoire. Il est cependant nécessaire d'analyser la contribution des cellules provenant du blastème à la croissance osseuse sur une plus longue période pour deux raisons : 1-définir plus précisément le rythme des migrations cellulaires et 2-vérifier un éventuel amortissement du nombre de cellules originaires du blastème à destination des segments osseux en croissance en fin de régénération. Cet amortissement serait en relation avec la diminution de la taille des segments osseux dans la partie proximale de la nageoire.

Rolland-Lagan et collaborateurs ont en 2012 établi un premier modèle mathématique simple de la régénération de la nageoire comportant 3 acteurs arbitraires. Afin d'expliquer un des moyens potentiels de retour à une forme bilobée de la nageoire, ils utilisent un morphogène diffusible, nommé « X » qui serait produit à la base de la nageoire sur l'axe dorso-ventral selon une distribution bimodale. Les acteurs moléculaires restent cependant à caractériser. De plus, le modèle proposé par le laboratoire du Dr. Akimenko ne tient pas compte de la forme évasée de la nageoire caudale. Ce dernier point devrait être pris en compte avant de pouvoir aboutir à une modélisation de la régénération de la nageoire plus proche de la réalité observée.

## **La cicatrisation de la peau**

La compréhension des mécanismes qui régulent la régénération et le processus cicatriciel est fondamentale d'un point de vue médical. La cicatrisation a porté sur de nombreuses études *in vitro* (Coulomb et Dubertret, 2002). Mon étude montre que le poisson zèbre est capable d'une cicatrisation très rapide qui n'aboutit pas à la formation d'une cicatrice mais d'une régénération complète de la peau, ainsi il apparaît comme un modèle d'étude de cicatrisation *in vivo* particulièrement intéressant.

J'ai pu caractériser une vue d'ensemble du processus cicatriciel. Une fois la blessure fermée, la mise en place d'un épiderme mature et la formation du derme apparaît très similaire aux observations faites lors du développement de l'alevin. A l'issue de cette étude, plusieurs questions restent néanmoins en suspens.

Pendant la fermeture de la blessure, les cellules épithéliales migrent très rapidement et sécrètent vraisemblablement leur support de migration. De quelle nature est-il ?

Pendant le développement et lors de la cicatrisation, l'épiderme montre une hyperplasie (6/8 couches cellulaires), puis un retour à un nombre normal de 3 à 4 couches cellulaires (Guzman *et al.*, 2013). Quels sont les mécanismes qui régissent ce phénomène ? On peut notamment s'interroger sur l'implication éventuelle de l'apoptose cellulaire. Dans ce cas, un marquage des cellules apoptotiques par TUNEL permettrait d'en avoir la confirmation. De plus, ce retour à une stratification normale étant concomitant avec l'apparition des écailles, l'éventualité d'une corrélation, ou plus, avec le mécanisme d'initiation de leur formation serait à démontrer.

On peut également s'interroger sur la structure du dépôt de matrice acellulaire présent de 72 à 120 hpb sous l'assise basale de l'épiderme lors de la cicatrisation : est-il de même nature que celui qu'on observe lors du développement (Le Guellec *et al.*, 2004) ?

## **La cicatrisation en milieu liquide**

La composante commune à l'ensemble des cicatrisations qui ont lieu dans des tissus maintenus en milieu liquide, tel que la peau du poisson zèbre, la cornée ou encore la muqueuse buccale (Cao *et al.*, 2011; Castilho *et al.*, 2010), est la migration très rapide des cellules épithéliales. La fermeture de la blessure apparaît beaucoup plus rapide qu'à l'air libre. Cette constatation est renforcée par l'existence et le développement depuis de nombreuses années de pansements humides (Yamane *et al.*, 2013) qui permettent d'accélérer et d'améliorer la cicatrisation, notamment dans le cadre de pathologies d'ulcère du pied diabétique. Une meilleure compréhension de la cicatrisation en milieu liquide pourrait permettre un raffinement de ces traitements ou conduire à de nouvelles méthodes thérapeutiques.

## La problématique d'implication des cellules souches

Que ce soit dans le cadre de la régénération de la nageoire caudale ou de la cicatrisation de la peau, qui conduit également à une régénération, le renouvellement des tissus implique la prolifération de cellules non différenciées. Dans le processus régénératif de la nageoire, le mécanisme de la dédifférenciation est actuellement privilégié, mis en évidence par la formation d'un blastème (Tal *et al.*, 2010). Lors de la cicatrisation, assiste-t-on également à des phénomènes de dédifférenciation ou bien l'ensemble du renouvellement est-il assuré par des niches de cellules souches ? L'existence d'une ou de plusieurs populations de cellules souches impliquées dans la régénération de la peau de poisson zèbre reste donc à étudier. Chez les mammifères, ces niches, parsemées le long de la couche basale de l'épiderme et dans le bulge du follicule pileux, sont présentes et jouent un rôle synergique dans la cicatrisation, les deuxièmes étant mises à contribution en « urgence » lors de blessure de la peau (Cotsarelis, 2006). Leur présence est attribuée au caractère d'auto-renouvellement de l'épiderme et du follicule pileux. Contrairement aux poils, la croissance des écailles est, quant à elle, continue au cours de la vie de l'individu et leur perte n'est pas courante. De la même façon, en milieu liquide, les phénomènes d'abrasion sont moindres qu'en milieu terrestre, impliquant à priori un renouvellement moins fréquent des cellules de l'épiderme. On peut donc s'interroger sur la présence de niches de cellules dormantes chez le poisson zèbre. Sire a pu démontrer qu'une niche particulière de cellules, les cellules de la poche de l'écaille (SPL), sont à l'origine de la repousse des écailles après arrachage de celles-ci (Sire *et al.*, 1990; Sire, 1989). Or, dans le cadre d'une excision totale de la peau (derme et épiderme), ces cellules sont absentes de la surface lésée. Les SPL des écailles intactes à proximité de la lésion interviennent-elles dans le processus de repousse des écailles ? Enfin, comment est reconstituée cette niche lors de la régénération ?

## **Des acteurs moléculaires communs à la régénération et au développement embryonnaire**

Les acteurs gouvernant la régénération font partie des voies de signalisation caractérisées dans le cadre de la morphogénèse de l'embryon. Dans le cadre de la formation du bourgeon de membre on retrouve les mêmes acteurs que dans la régénération de la nageoire caudale. Ainsi les voies Wnt, Bmp, Fgf et Shh sont requises aussi bien pour la formation du membre que pour sa régénération. Dans le cadre de la peau, on retrouve les mêmes acteurs impliqués dans la formation des écailles, les plumes ou les poils. Ces structures requièrent toutes la formation d'un primordium. Lors de l'initiation de la formation de l'écaille chez le poisson zèbre (Harris *et al.*, 2008), à l'instar du poil chez le mammifère ou de la plume d'oiseau (Lin *et al.*, 2006; Pispá et Thesleff, 2003), la zone de la placode exprime EdaR tandis que la zone interplacodale exprime son ligand Eda. La disposition des primordia est également similaire puisqu'elle suit une distribution hexagonale sur l'ensemble de la surface de la peau. Seul le motif délimitant le primordium diffère, il est en forme de croissant dans le cas des écailles de téléostéen, tandis que chez les mammifères et les oiseaux il est arrondi. La croissance de la placode en bourgeon demande l'intervention du gène Shh dans les trois cas (Chiang *et al.*, 1999; McKinnell *et al.*, 2004; Sire et Akimenko, 2004). Il est donc très probable que l'ensemble des acteurs moléculaires impliqués dans la formation du primordium d'écaille soit identique à ceux identifiés dans le cas du primordium de plume et de poil, impliquant notamment les gènes Wnt et BMPs.

Lors de mon travail de thèse, j'ai essayé de caractériser l'implication d'un nouvel acteur potentiel de la régénération, la protéine Yap, principal effecteur de la voie hippo. Cette voie au cœur des mécanismes de régulation de prolifération (Zhao *et al.*, 2011), et à plus large titre, du contrôle de la taille des organes lors du développement apparaissait comme un candidat idéal. L'observation de la translocation nucléaire de Yap n'ayant cependant été établie que dans un cas, il m'est impossible de conclure. Il est néanmoins tout à fait envisageable que cette translocation soit un phénomène activateur très bref et donc difficilement observable. L'utilisation d'un mutant exprimant une forme fonctionnelle de Yap fusionnée à une protéine fluorescente permettrait l'observation *in vivo* de la régulation de l'activité de Yap.

**En conclusion finale**, les similitudes observées dans les processus régénératifs et le développement embryonnaire laissent donc penser que les mêmes acteurs moléculaires sont requis lors la mise en place de ces évènements. Ainsi, même si la caractérisation des acteurs reste toujours intéressante, notamment pour comprendre les interactions croisées entre les différentes voies impliquées, la question fondamentale que soulève le processus régénératif, à savoir comment se reforme une structure à l'âge adulte, demande de mettre en évidence de quelle façon ce processus est initié et quels sont les mécanismes de réactivation du programme ? Des études épigénétiques tendent à donner des premiers éléments de réponse, l'activation de ces gènes étant dépendante de mécanismes de déméthylation (Stewart *et al.*, 2009), mais la question reste à ce jour entière.



## Bibliographie

- Aberle H., Butz S., Stappert J., Weissig H., Kemler R., Hoschuetzky H. (1994), Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*, **107** ( Pt 12), pp. 3655-3663.
- Alarcón C., Zaromytidou A.-I., Xi Q., Gao S., Yu J., Fujisawa S., Barlas A., Miller A. N., Manova-Todorova K., Macias M. J., Sapkota G., Pan D., Massagué J. (2009), Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell*, **139**, 4, pp. 757-769.
- Armanios M., Blackburn E. H. (2012), The telomere syndromes. *Nat Rev Genet*, **13**, 10, pp. 693-704.
- Asai J., Takenaka H., Kusano K. F., Ii M., Luedemann C., Curry C., Eaton E., Iwakura A., Tsutsumi Y., Hamada H., Kishimoto S., Thorne T., Kishore R., Losordo D. W. (2006), Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation*, **113**, 20, pp. 2413-2424.
- Azevedo A. S., Grotek B., Jacinto A., Weidinger G., Saúde L. (2011), The regenerative capacity of the zebrafish caudal fin is not affected by repeated amputations. *PLoS One*, **6**, 7, pp. e22820.
- Banerjee J., Sen C. K. (2013), MicroRNAs in skin and wound healing. *Methods Mol Biol*, **936**, pp. 343-56.
- Bayés M., Hartung A. J., Ezer S., Pispá J., Thesleff I., Srivastava A. K., Kere J. (1998), The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum Mol Genet*, **7**, 11, pp. 1661-1669.
- Bielefeld K. A., Amini-Nik S., Whetstone H., Poon R., Youn A., Wang J., Alman B. A. (2011), Fibronectin and beta-catenin act in a regulatory loop in dermal fibroblasts to modulate cutaneous healing. *J Biol Chem*, **286**, 31, pp. 27687-27697.
- Brockes J. P., Kumar A. (2008), Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **24**, pp. 525-549.
- Cao L., Graue-Hernandez E. O., Tran V., Reid B., Pu J., Mannis M. J., Zhao M. (2011), Downregulation of PTEN at corneal wound sites accelerates wound healing through increased cell migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **52**, 5, pp. 2272-8.
- Carthew R. W. (2006), Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev*, **16**, 2, pp. 203-8.
- Castilho R. M., Squarize C. H., Leelahavanichkul K., Zheng Y., Bugge T., Gutkind J. S. (2010), Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS One*, **5**, 5, pp. e10503.

Chaloin-Dufau C., Pavitt I., Delorme P., Dhouailly D. (1993), Identification of keratins 3 and 12 in corneal epithelium of vertebrates. *Epithelial Cell Biol*, **2**, 3, pp. 120-125.

Chargé S. B. P., Rudnicki M. A. (2004), Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, **84**, 1, pp. 209-238.

Chen L., Qin F., Deng X., Avruch J., Zhou D. (2012), Hippo pathway in intestinal homeostasis and tumorigenesis. *Protein Cell*, **3**, 4, pp. 305-10.

Chen Y., Whetstone H. C., Lin A. C., Nadesan P., Wei Q., Poon R., Alman B. A. (2007), Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med*, **4**, 7, pp. e249.

Cheon S. S., Wei Q., Gurung A., Youn A., Bright T., Poon R., Whetstone H., Guha A., Alman B. A. (2006), Beta-catenin regulates wound size and mediates the effect of TGF-beta in cutaneous healing. *FASEB J*, **20**, 6, pp. 692-701.

Chiang C., Swan R. Z., Grachtchouk M., Bolinger M., Litingtung Y., Robertson E. K., Cooper M. K., Gaffield W., Westphal H., Beachy P. A., Dlugosz A. A. (1999), Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol*, **205**, 1, pp. 1-9.

Clark R. A., Lanigan J. M., DellaPelle P., Manseau E., Dvorak H. F., Colvin R. B. (1982), Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J Invest Dermatol*, **79**, 5, pp. 264-269.

Colwell A. S., Longaker M. T., Lorenz H. P. (2003), Fetal wound healing. *Front Biosci*, **8**, pp. s1240-s1248.

Cotsarelis G. (2006), Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol*, **126**, 7, pp. 1459-1468.

Coulomb B., Dubertret L. (2002), Skin cell culture and wound healing. *Wound Repair Regen*, **10**, 2, pp. 109-12.

Couly G., Le Douarin N. M. (1988), The fate map of the cephalic neural primordium at the presomitic to the 3-somite stage in the avian embryo. *Development*, **103 Suppl**, pp. 101-113.

Del Rio-Tsonis K., Tsonis P. A. (2003), Eye regeneration at the molecular age. *Dev Dyn*, **226**, 2, pp. 211-224.

Demircan T., Berezikov E. (2013), The Hippo pathway regulates stem cells during homeostasis and regeneration of the flatworm *Macrostomum lignano*. *Stem Cells Dev*, **22**, 15, pp. 2174-85.

Demongeot J., Hamie A., Glaria A., Taramasco C. (2013), Dynalets : a new time-frequency representation of periodic biological signals and spectral data. *IEEE AINA' 13 & BLSMC' 1 - IEEE Proceedings*.

Demongeot J., Laksaci A., Madani F., Rachdi M. (2011), Functional data: local linear estimation of the conditional density and its application. *Statistics*, **47**, 1, pp. 26-44.

Dhouailly D. (1977). Dermo-epidermal interactions during morphogenesis of cutaneous appendages in amniotes. *In: Frontier Matrix Biology*. L. Robert, pp.

Eckes B., Nischt R., Krieg T. (2010), Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis Tissue Repair*, **3**, pp. 4.

Eming S. A., Krieg T., Davidson J. M. (2007), Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, **127**, 3, pp. 514-525.

Erspamer G. F., Cei J. M. (1970), Biogenic amines and active polypeptides in the skin of *Leptodactylus vilarsi melin*. *Biochem Pharmacol*, **19**, 2, pp. 321-325.

Fallon J. F., Lopez A., Ros M. A., Savage M. P., Olwin B. B., Simandl B. K. (1994), FGF-2: apical ectodermal ridge growth signal for chick limb development. *Science*, **264**, 5155, pp. 104-7.

Fliniaux I., Viallet J. P., Dhouailly D. (2004), Ventral vs. dorsal chick dermal progenitor specification. *Int J Dev Biol*, **48**, 2-3, pp. 103-106.

Galliot B. (2012), Hydra, a fruitful model system for 270 years. *Int J Dev Biol*, **56**, 6-8, pp. 411-423.

Gamba L., Cubedo N., Lutfalla G., Ghysen A., Dambly-Chaudiere C. (2010), Lef1 controls patterning and proliferation in the posterior lateral line system of zebrafish. *Dev Dyn*, **239**, 12, pp. 3163-3171.

Ganguly A., Yang H., Sharma R., Patel K. D., Cabral F. (2012), The role of microtubules and their dynamics in cell migration. *J Biol Chem*, **287**, 52, pp. 43359-69.

Ghazizadeh S., Taichman L. B. (2005), Organization of stem cells and their progeny in human epidermis. *J Invest Dermatol*, **124**, 2, pp. 367-372.

Gottler L. M., Ramamoorthy A. (2009), Structure, membrane orientation, mechanism, and function of pexiganan--a highly potent antimicrobial peptide designed from magainin. *Biochim Biophys Acta*, **1788**, 8, pp. 1680-1686.

Gurtner G. C., Evans G. R. (2000), Advances in head and neck reconstruction. *Plast Reconstr Surg*, **106**, 3, pp. 672-82; quiz 683.

Guzman A., Ramos-Balderas J. L., Carrillo-Rosas S., Maldonado E. (2013), A stem cell proliferation burst forms new layers of P63 expressing suprabasal cells during zebrafish postembryonic epidermal development. *Biology Open*, pp.

Halder G., Johnson R. L. (2011), Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*, **138**, 1, pp. 9-22.

Hammerschmidt M., Brook A., McMahon A. P. (1997), The world according to hedgehog. *Trends Genet*, **13**, 1, pp. 14-21.

Harland R., Gerhart J. (1997), Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, pp. 611-667.

Harris M. P., Rohner N., Schwarz H., Perathoner S., Konstantinidis P., Nüsslein-Volhard C. (2008), zebrafish *eda* and *edar* mutants reveal conserved and ancestral roles of ectodysplasin signaling in vertebrates. *PLoS Genet*, **4**, 10, pp. e1000206.

Harvey K. F., Zhang X., Thomas D. M. (2013), The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer*, **13**, 4, pp. 246-57.

Hawkes J. W. (1974), The structure of fish skin. I. General organization. *Cell Tissue Res*, **149**, 2, pp. 147-158.

Heallen T., Zhang M., Wang J., Bonilla-Claudio M., Klysiak E., Johnson R. L., Martin J. F. (2011), Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*, **332**, 6028, pp. 458-461.

Hemmati-Brivanlou A., Thomsen G. H. (1995), Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev Genet*, **17**, 1, pp. 78-89.

Henriques C. M., Carneiro M. C., Tenente I. M., Jacinto A., Ferreira M. G. (2013), Telomerase is required for zebrafish lifespan. *PLoS Genet*, **9**, 1, pp. e1003214.

Hinz B. (2007), Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*, **127**, 3, pp. 526-537.

Hogan B. L. (1996), Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 4, pp. 432-438.

- Hu J., Sun S., Jiang Q., Sun S., Wang W., Gui Y., Song H. (2013), Yes-associated protein (yap) is required for early embryonic development in zebrafish (*danio rerio*). *Int J Biol Sci*, **9**, 3, pp. 267-78.
- Huelsken J., Vogel R., Erdmann B., Cotsarelis G., Birchmeier W. (2001), beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, **105**, 4, pp. 533-545.
- Huh S.-H., Närhi K., Lindfors P. H., Häärä O., Yang L., Ornitz D. M., Mikkola M. L. (2013), Fgf20 governs formation of primary and secondary dermal condensations in developing hair follicles. *Genes Dev*, **27**, 4, pp. 450-458.
- Idda M. L., Kage E., Lopez-Olmeda J. F., Mracek P., Foulkes N. S., Vallone D. (2012), Circadian timing of injury-induced cell proliferation in zebrafish. *PLoS One*, **7**, 3, pp. e34203.
- Ito M., Yang Z., Andl T., Cui C., Kim N., Millar S. E., Cotsarelis G. (2007), Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*, **447**, 7142, pp. 316-320.
- Itou J., Kawakami H., Burgoyne T., Kawakami Y. (2012), Life-long preservation of the regenerative capacity in the fin and heart in zebrafish. *Biol Open*, **1**, 8, pp. 739-746.
- Jacinto A., Martinez-Arias A., Martin P. (2001), Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol*, **3**, 5, pp. E117-E123.
- Jain I., Stroka C., Yan J., Huang W. M., Iovine M. K. (2007), Bone growth in zebrafish fins occurs via multiple pulses of cell proliferation. *Dev Dyn*, **236**, 9, pp. 2668-74.
- Jazwinska A., Badakov R., Keating M. T. (2007), Activin-betaA signaling is required for zebrafish fin regeneration. *Curr Biol*, **17**, 16, pp. 1390-1395.
- Jiang Q., Liu D., Gong Y., Wang Y., Sun S., Gui Y., Song H. (2009), yap is required for the development of brain, eyes, and neural crest in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*, **384**, 1, pp. 114-119.
- Jopling C., Sleep E., Raya M., Martí M., Raya A., Izpisua Belmonte J. C. (2010), zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, **464**, 7288, pp. 606-609.
- Kinoshita S., Adachi W., Sotozono C., Nishida K., Yokoi N., Quantock A. J., Okubo K. (2001), Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res*, **20**, 5, pp. 639-673.
- Knapp D., Tanaka E. M. (2012), Regeneration and reprogramming. *Curr Opin Genet Dev*, **22**, 5, pp. 485-493.

Krieg T., Aumailley M. (2011), The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions. *Exp Dermatol*, **20**, 8, pp. 689-695.

Kunz M. (2013), MicroRNAs in melanoma biology. *Adv Exp Med Biol*, **774**, pp. 103-20.

Labus M. B., Stirk C. M., Thompson W. D., Melvin W. T. (1998), Expression of Wnt genes in early wound healing. *Wound Repair Regen*, **6**, 1, pp. 58-64.

Lagna G., Hata A., Hemmati-Brivanlou A., Massagué J. (1996), Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*, **383**, 6603, pp. 832-836.

Lau K., Paus R., Tiede S., Day P., Bayat A. (2009), Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol*, **18**, 11, pp. 921-933.

Lavker R. M., Sun T.-T. (2003), Epithelial stem cells: the eye provides a vision. *Eye (Lond)*, **17**, 8, pp. 937-942.

Le Guellec D., Morvan-Dubois G., Sire J.-Y. (2004), Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Dev Biol*, **48**, 2-3, pp. 217-231.

Lee Y., Grill S., Sanchez A., Murphy-Ryan M., Poss K. D. (2005), Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development*, **132**, 23, pp. 5173-5183.

Lee Y., Hami D., De Val S., Kagermeier-Schenk B., Wills A. A., Black B. L., Weidinger G., Poss K. D. (2009), Maintenance of blastemal proliferation by functionally diverse epidermis in regenerating zebrafish fins. *Dev Biol*, **331**, 2, pp. 270-280.

Lewis J. L., Bonner J., Modrell M., Ragland J. W., Moon R. T., Dorsky R. I., Raible D. W. (2004), Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development*, **131**, 6, pp. 1299-1308.

Lin C. M., Jiang T. X., Widelitz R. B., Chuong C. M. (2006), Molecular signaling in feather morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 6, pp. 730-41.

Lin X., Buff E. M., Perrimon N., Michelson A. M. (1999), Heparan sulfate proteoglycans are essential for FGF receptor signaling during *Drosophila* embryonic development. *Development*, **126**, 17, pp. 3715-3723.

Lopez-Otin C., Blasco M. A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. (2013), The hallmarks of aging. *Cell*, **153**, 6, pp. 1194-217.

Lu L., Li Y., Kim S. M., Bossuyt W., Liu P., Qiu Q., Wang Y., Halder G., Finegold M. J., Lee J.-S., Johnson R. L. (2010), Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 4, pp. 1437-1442.

Majo F., Rochat A., Nicolas M., Jaoude G. A., Barrandon Y. (2008), Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*, **456**, 7219, pp. 250-4.

Margadant C., Sonnenberg A. (2010), Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing. *EMBO Rep*, **11**, 2, pp. 97-105.

Martin P. (1997), Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, **276**, 5309, pp. 75-81.

Mauger A. (1972), [The role of somitic mesoderm in the development of dorsal plumage in chick embryos. I. Origin, regulative capacity and determination of the plumage-forming mesoderm]. *J Embryol Exp Morphol*, **28**, 2, pp. 313-341.

McCrea P. D., Turck C. W., Gumbiner B. (1991), A homolog of the armadillo protein in Drosophila (plakoglobin) associated with E-cadherin. *Science*, **254**, 5036, pp. 1359-1361.

McKinnell I. W., Turmaine M., Patel K. (2004), Sonic Hedgehog functions by localizing the region of proliferation in early developing feather buds. *Dev Biol*, **272**, 1, pp. 76-88.

McNeill H., Woodgett J. R. (2010), When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 6, pp. 404-413.

Michon F., Forest L., Collomb E., Demongeot J., Dhouailly D. (2008), BMP2 and BMP7 play antagonistic roles in feather induction. *Development*, **135**, 16, pp. 2797-2805.

Millar S. E. (2002), Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J Invest Dermatol*, **118**, 2, pp. 216-225.

Miller S. J., Burke E. M., Rader M. D., Coulombe P. A., Lavker R. M. (1998), Re-epithelialization of porcine skin by the sweat apparatus. *J Invest Dermatol*, **110**, 1, pp. 13-19.

Nechiporuk A., Keating M. T. (2002), A proliferation gradient between proximal and msxb-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. *Development*, **129**, 11, pp. 2607-17.

Niswander L., Tickle C., Vogel A., Booth I., Martin G. R. (1993), FGF-4 replaces the apical ectodermal ridge and directs outgrowth and patterning of the limb. *Cell*, **75**, 3, pp. 579-87.

Nohno T., Kawakami Y., Ohuchi H., Fujiwara A., Yoshioka H., Noji S. (1995), Involvement of the Sonic hedgehog gene in chick feather formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **206**, 1, pp. 33-39.

O'Guin W. M., Galvin S., Schermer A., Sun T. T. (1987), Patterns of keratin expression define distinct pathways of epithelial development and differentiation. *Curr Top Dev Biol*, **22**, pp. 97-125.

Okuse T., Chiba T., Katsuomi I., Imai K. (2005), Differential expression and localization of WNTs in an animal model of skin wound healing. *Wound Repair Regen*, **13**, 5, pp. 491-497.

Olivera-Martinez I., Coltey M., Dhouailly D., Pourquié O. (2000), Mediolateral somitic origin of ribs and dermis determined by quail-chick chimeras. *Development*, **127**, 21, pp. 4611-4617.

Olivera-Martinez I., Thélu J., Dhouailly D. (2004), Molecular mechanisms controlling dorsal dermis generation from the somitic dermomyotome. *Int J Dev Biol*, **48**, 2-3, pp. 93-101.

Pan T. L., Wang P. W., Lee W. R., Fang C. L., Chen C. C., Huang C. M., Fang J. Y. (2010), Systematic evaluations of skin damage irradiated by an erbium:YAG laser: histopathologic analysis, proteomic profiles, and cellular response. *J Dermatol Sci*, **58**, 1, pp. 8-18.

Papkoff J. (1997), Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. *J Biol Chem*, **272**, 7, pp. 4536-4543.

Papkoff J., Aikawa M. (1998), WNT-1 and HGF regulate GSK3 beta activity and beta-catenin signaling in mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 3, pp. 851-858.

Pastar I., Khan A. A., Stojadinovic O., Lebrun E. A., Medina M. C., Brem H., Kirsner R. S., Jimenez J. J., Leslie C., Tomic-Canic M. (2012), Induction of specific microRNAs inhibits cutaneous wound healing. *J Biol Chem*, **287**, 35, pp. 29324-35.

Pires-daSilva A., Sommer R. J. (2003), The evolution of signalling pathways in animal development. *Nat Rev Genet*, **4**, 1, pp. 39-49.

Pispa J., Thesleff I. (2003), Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol*, **262**, 2, pp. 195-205.

Poss K. D. (2007), Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol*, **18**, 1, pp. 36-45.

Poss K. D., Shen J., Keating M. T. (2000), Induction of *lef1* during zebrafish fin regeneration. *Dev Dyn*, **219**, 2, pp. 282-286.

Poss K. D., Shen J., Nechiporuk A., McMahon G., Thisse B., Thisse C., Keating M. T. (2000), Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol*, **222**, 2, pp. 347-358.



Poss K. D., Wilson L. G., Keating M. T. (2002), Heart regeneration in zebrafish. *Science*, **298**, 5601, pp. 2188-2190.

Pummila M., Fliniaux I., Jaatinen R., James M. J., Laurikkala J., Schneider P., Thesleff I., Mikkola M. L. (2007), Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development*, **134**, 1, pp. 117-125.

Puolakkainen P. A., Reed M. J., Gombotz W. R., Twardzik D. R., Abrass I. B., Sage H. E. (1995), Acceleration of wound healing in aged rats by topical application of transforming growth factor-beta(1). *Wound Repair Regen*, **3**, 3, pp. 330-339.

Quilhac A., Sire J. Y. (1999), Spreading, proliferation, and differentiation of the epidermis after wounding a cichlid fish, *Hemichromis bimaculatus*. *Anat Rec*, **254**, 3, pp. 435-451.

Quint E., Smith A., Avaron F., Laforest L., Miles J., Gaffield W., Akimenko M.-A. (2002), Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and bmp2b or exposure to cyclopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13, pp. 8713-8718.

Redd M. J., Cooper L., Wood W., Stramer B., Martin P. (2004), Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **359**, 1445, pp. 777-784.

Repertinger S. K., Campagnaro E., Fuhrman J., El-Abaseri T., Yuspa S. H., Hansen L. A. (2004), EGFR enhances early healing after cutaneous incisional wounding. *J Invest Dermatol*, **123**, 5, pp. 982-9.

Richardson R., Slanchev K., Kraus C., Knyphausen P., Eming S., Hammerschmidt M. (2013), Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound-healing research. *J Invest Dermatol*, **133**, 6, pp. 1655-1665.

Rolland-Lagan A.-G., Paquette M., Tweedle V., Akimenko M.-A. (2012), Morphogen-based simulation model of ray growth and joint patterning during fin development and regeneration. *Development*, **139**, 6, pp. 1188-1197.

Sato M. (2006), Upregulation of the Wnt/beta-catenin pathway induced by transforming growth factor-beta in hypertrophic scars and keloids. *Acta Derm Venereol*, **86**, 4, pp. 300-307.

Schultz G. S., Wysocki A. (2009), Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*, **17**, 2, pp. 153-162.

Seifert A. W., Kiama S. G., Seifert M. G., Goheen J. R., Palmer T. M., Maden M. (2012), Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). *Nature*, **489**, 7417, pp. 561-565.

Seifert A. W., Monaghan J. R., Voss S. R., Maden M. (2012), Skin regeneration in adult axolotls: a blueprint for scar-free healing in vertebrates. *PLoS One*, **7**, 4, pp. e32875.

Sengel P., Mauger A. (1976), Peridermal cell patterning in the feather-forming skin of the chick embryo. *Dev Biol*, **51**, 1, pp. 166-171.

Sgonc R., Gruber J. (2013), Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. *Gerontology*, **59**, 2, pp. 159-64.

Sire J.-Y., Akimenko M.-A. (2004), Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Dev Biol*, **48**, 2-3, pp. 233-247.

Sire J.-Y., Boulekbache H., Joly C. (1990), Epidermal-dermal and fibronectin cell-interactions during fish scale regeneration: immunofluorescence and TEM studies. *Biology of the Cell*, **68**, 2, pp. 147-158.

Sire J. Y. (1989), The same cell lineage is involved in scale formation and regeneration in the teleost fish *Hemichromis bimaculatus*. *Tissue Cell*, **21**, 3, pp. 447-462.

Sire J. Y., Allizard F., Babiar O., Bourguignon J., Quilhac A. (1997), Scale development in zebrafish (*Danio rerio*). *J Anat*, **190 ( Pt 4)**, pp. 545-561.

Smith A., Avaron F., Guay D., Padhi B. K., Akimenko M. A. (2006), Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblasts differentiation and function. *Dev Biol*, **299**, 2, pp. 438-454.

Sorg H., Krueger C., Vollmar B. (2007), Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin fold chamber. *J Anat*, **211**, 6, pp. 810-818.

St-Jacques B., Dassule H. R., Karavanova I., Botchkarev V. A., Li J., Danielian P. S., McMahon J. A., Lewis P. M., Paus R., McMahon A. P. (1998), Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol*, **8**, 19, pp. 1058-1068.

Stewart S., Stankunas K. (2012), Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol*, **365**, 2, pp. 339-349.

Stewart S., Tsun Z. Y., Izpisua Belmonte J. C. (2009), A histone demethylase is necessary for regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 47, pp. 19889-94.

Stoick-Cooper C. L., Weidinger G., Riehle K. J., Hubbert C., Major M. B., Fausto N., Moon R. T. (2007), Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development*, **134**, 3, pp. 479-489.

Sun X., Mariani F. V., Martin G. R. (2002), Functions of FGF signalling from the apical ectodermal ridge in limb development. *Nature*, **418**, 6897, pp. 501-8.

Tal T. L., Franzosa J. A., Tanguay R. L. (2010), Molecular signaling networks that choreograph epimorphic fin regeneration in zebrafish - a mini-review. *Gerontology*, **56**, 2, pp. 231-40.

Teele C. (1999). Corneal wound healing: a review, Chris Teele BSc (Hons) , MCOptom , DCLP HEAD OF OPTOMETRY, UNDER LAND EYE INFIRMARY in Optometry Today.

Thatcher E. J., Paydar I., Anderson K. K., Patton J. G. (2008), Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 47, pp. 18384-18389.

Tsonis P. A., Madhavan M., Tancous E. E., Del Rio-Tsonis K. (2004), A newt's eye view of lens regeneration. *Int J Dev Biol*, **48**, 8-9, pp. 975-980.

Tziotzios C., Profyris C., Sterling J. (2012), Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part II. Strategies to reduce scar formation after dermatologic procedures. *J Am Acad Dermatol*, **66**, 1, pp. 13-24; quiz 25-6.

Udan R. S., Kango-Singh M., Nolo R., Tao C., Halder G. (2003), Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol*, **5**, 10, pp. 914-920.

Viallet J. P., Prin F., Olivera-Martinez I., Hirsinger E., Pourquié O., Dhouailly D. (1998), Chick Delta-1 gene expression and the formation of the feather primordia. *Mech Dev*, **72**, 1-2, pp. 159-168.

Wang B., Fallon J. F., Beachy P. A. (2000), Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell*, **100**, 4, pp. 423-434.

Werner S., Grose R. (2003), Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*, **83**, 3, pp. 835-870.

Wienholds E., van Eeden F., Kosters M., Mudde J., Plasterk R. H., Cuppen E. (2003), Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res*, **13**, 12, pp. 2700-7.

Winter G. D. (1963), Effect of Air Exposure and Occlusion on Experimental Human Skin Wounds. *Nature*, **200**, pp. 378-9.

Wrana J. L., Tran H., Attisano L., Arora K., Childs S. R., Massagué J., O'Connor M. B. (1994), Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol*, **14**, 2, pp. 944-950.

Yamane T., Nakagami G., Yoshino S., Muramatsu A., Matsui S., Oishi Y., Kanazawa T., Minematsu T., Sanada H. (2013), Hydrocellular foam dressing promotes wound healing along with increases in hyaluronan synthase 3 and PPARalpha gene expression in epidermis. *PLoS One*, **8**, 8, pp. e73988.

Yin V. P., Thomson J. M., Thummel R., Hyde D. R., Hammond S. M., Poss K. D. (2008), Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. *Genes Dev*, **22**, 6, pp. 728-733.

Zasloff M. (1987), Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 15, pp. 5449-5453.

Zhang J., Jeradi S., Strähle U., Akimenko M.-A. (2012), Laser ablation of the sonic hedgehog-a-expressing cells during fin regeneration affects ray branching morphogenesis. *Dev Biol*, **365**, 2, pp. 424-433.

Zhang Y., Feng X., We R., Derynck R. (1996), Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature*, **383**, 6596, pp. 168-172.

Zhao B., Tumaneng K., Guan K. L. (2011), The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol*, **13**, 8, pp. 877-83.